

# ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Análisis por LC/MS de aminas biogénicas en matrices alimenticias.

Valeria BELLÓN MONSALVE

Trabajo de grado para optar al título de Química

Directora

Elena E. STASHENKO

Química, *PhD*.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL

Bucaramanga

2025

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

### **Agradecimientos**

A mi mamá, Irina, por su apoyo inquebrantable en los momentos difíciles y por su paciencia infinita al escucharme, sin importar cuán repetitivas fueran mis historias. Su amor, consejos y ánimos fueron fundamentales en mi camino.

A mi papá, Arnulfo, por su apoyo constante, su amor incondicional y por confiar en mí en todo momento.

A mis hermanas, Daniela y Gabriela, quienes creyeron en mí en los momentos en que me resultaba difícil hacerlo por mí misma. Me ofrecieron esperanza e hicieron que los agobios de la vida fueran más llevaderos

A mi compañero eterno de laboratorio, Manuel, con quien compartí esta etapa de aprendizaje y quien me enseñó el valor del pensamiento crítico, la historia y me alentó a defender mis ideas con convicción.

A los profesores Elena E. STASHENKO y Jairo R. MARTÍNEZ, cuyo conocimiento, orientación y apoyo hicieron posible este proyecto. Su pasión por la ciencia no solo me guió en este camino, sino que también dejó una huella imborrable en mi formación. Con certeza, atesoraré estos aprendizajes por el resto de mi vida como científica.

A todas las personas que conocí en esta etapa, con quienes aprendí a ver el mundo desde una perspectiva diferente. A quienes me acompañaron entre risas y lágrimas, y juntos logramos que los fracasos, propios del aprendizaje y la ciencia, no pesaran tanto en el alma.

Al Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), el Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), el programa Bio-Reto XXI 15:50 y al programa Ecosistema Científico - Colombia Científica, fondo Francisco José de Caldas contrato RC-FP44842-212-2018, por el financiamiento de este proyecto.

**Tabla de contenido**

	<b>Página</b>
Introducción .....	17
1. Justificación .....	18
2. Hipótesis .....	19
3. Objetivos.....	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos .....	20
4. Marco teórico.....	21
4.1 Aminas biogénicas .....	21
4.1.1 Definición .....	21
4.1.2 Clasificación de aminas biogénicas .....	21
4.1.3 Biosíntesis.....	22
4.2 Algunos aspectos toxicológicos.....	24
4.2.1 Histamina .....	25
4.2.2 Tiramina.....	26
4.2.3 Putrescina y cadaverina.....	26
4.2.3.1 Efecto tóxico potenciador .....	26
4.2.3.2 Formación de nitrosaminas .....	27
4.2.4 Espermidina y espermina.....	28
4.2.5 Otras aminas.....	28
4.2.6 Factores que incrementan la sensibilidad a las aminas biogénicas.....	29
4.3 Aspectos de calidad en alimentos .....	29
4.3.1 Índice de aminas biogénicas .....	30
4.3.2 Índice de calidad .....	30
4.4 Técnicas analíticas .....	31
4.4.1 Cromatografía líquida .....	31
4.4.1.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	31
4.4.1.2 Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia .....	32
4.4.2 Espectrometría de masas.....	33

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

4.4.2.1 Cuadropolo.....	33
4.4.2.2 <i>Orbitrap</i> .....	34
4.4.2.3 <i>Q-Orbitrap</i> .....	35
4.5 Interfaz de ionización.....	36
4.5.1 Interfaz de electronebulización con calentamiento.....	37
4.6 Modos de adquisición de datos .....	40
4.6.1 <i>Full scan</i> .....	41
4.6.2 Fragmentación de todos los iones .....	41
4.6.3 <i>Step-scan</i> .....	41
4.6.4 Monitoreo de reacciones paralelas.....	42
4.6.5 Monitoreo de iones seleccionados .....	42
5. Estado del Arte .....	44
5.1 Extracción .....	45
5.2 Derivatización .....	45
5.3 Separación y análisis.....	46
6. Metodología .....	48
6.1. Ensayos preliminares y determinación de las condiciones en el sistema .....	48
6.1.1 Análisis por inyección en flujo .....	48
6.1.2 Determinación del voltaje del capilar .....	49
6.1.3 Determinación de la energía en la celda de colisiones .....	50
6.1.4 Determinación del gradiente cromatográfico UHPLC .....	51
6.1.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada de espectrometría de masas .....	52
6.2 Determinación del método de extracción .....	53
6.2.1 Dispersión de la matriz en fase solida.....	53
6.2.2 Extracción líquido-sólido.....	54
6.2.2.1 Determinación de aminas biogénicas en atún enlatado .....	54
6.2.2.2 Determinación de la eficiencia de extracción. ....	55
6.3 Preparación de las muestras de mojarra y queso .....	55
6.3.1 Obtención de las muestras .....	55
6.3.2 Extracción de las muestras.....	56

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

6.4	Análisis por UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.....	57
7.	Resultados y discusión.....	59
7.1	Ensayos preliminares .....	59
7.1.1	Análisis por inyección en flujo .....	59
7.1.1.1	Adquisición en modo <i>full scan</i> .....	59
7.1.1.2	Variación de la energía de la HCD en modo de adquisición <i>step-scan</i> .....	66
7.1.2	Determinación del voltaje del capilar .....	69
7.1.3	Determinación de la energía en la celda HCD.....	74
7.1.4	Gradientes de la fase móvil en cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia.....	78
7.1.5	Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	87
7.2	Método de extracción.....	89
7.2.1	Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida.....	89
7.2.2	Extracción líquido-sólido.....	90
7.2.2.1	Determinación de aminas biogénicas en atún enlatado. ....	90
7.2.2.2	Determinación de la eficiencia de extracción. ....	92
7.3	Análisis de matrices alimenticias.....	94
7.3.1	Monitoreo de aminas biogénicas en mojarra .....	95
7.3.2	Análisis de aminas biogénicas en queso .....	101
8.	Conclusiones.....	105
9.	Recomendaciones .....	107
10.	Divulgación de resultados.....	108
	Referencias bibliográficas.....	109
	Apéndices.....	120

## Lista de tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Aminoácidos precursores de algunas BA y las enzimas encargadas de su conversión .	23
<b>Tabla 2.</b> Concentración de aminas biogénicas en muestras de orina de individuos sanos .....	25
<b>Tabla 3.</b> Niveles aceptados de histamina, tiramina, putrescina y cadaverina en alimentos.....	25
<b>Tabla 4.</b> Relación entre el BAI y la calidad de la carne.....	30
<b>Tabla 5.</b> Comparación de algunos parámetros típicos de HPLC y UHPLC .....	33
<b>Tabla 6.</b> Condiciones y parámetros instrumentales empleados en el análisis por inyección en flujo (FIA) de patrones de BA, a 10 mg/L, en un sistema HESI-Q-Orbitrap-HRMS .....	49
<b>Tabla 7.</b> Condiciones y parámetros instrumentales empleados en la determinación del voltaje de extracción del capilar en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.....	50
<b>Tabla 8.</b> Condiciones y parámetros instrumentales empleados en la determinación de la energía de colisión en la HCD en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.....	51
<b>Tabla 9.</b> Gradientes empleados en el sistema cromatográfico UHPLC .....	52
<b>Tabla 10.</b> Condiciones y parámetros instrumentales empleados para el análisis por GC/MS de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina.....	53
<b>Tabla 11.</b> Parámetros y condiciones operacionales empleados en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS para el análisis de BA en muestras reales .....	54
<b>Tabla 12.</b> Iones empleados para la detección y la cuantificación por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en pescado y queso.....	58
<b>Tabla 13.</b> Relaciones isotópicas determinadas para la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> .....	64
<b>Tabla 14.</b> Áreas cromatográficas de las moléculas protonadas $[M + H]^+$ y sus fragmentos $[(M+H) - NH_3]^+$ para cuatro BA, obtenidas por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> , empleando diferentes voltajes de capilar.....	70
<b>Tabla 15.</b> Corrientes iónicas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y fragmentos $[(M+H)-NH_3]^+$ en los espectros de masas de cuatro BA, obtenidas por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición PRM, a diferentes energías de HCD (10, 15, 20 eV) y un voltaje de capilar de 2 kV .....	75

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

<b>Tabla 16.</b> Valores de tiempo de retención ( $t_R$ ), resolución ( $R_s$ ), factor de coeio ( $T_f$ ) y factor de simetría ( $A_s$ ) de la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina empleando tres gradientes diferentes de la fase móvil (G1, G2, G3), en el análisis por UHPLC.....	85
<b>Tabla 17.</b> Información de los picos cromatográficos, obtenidos por GC/MS, basada en la <b>Figura 29</b> .....	88
<b>Tabla 18.</b> Rendimiento de la extracción MSPD de atún enlatado empleando metanol, acetonitrilo y acetato de etilo como solventes de elución .....	90
<b>Tabla 19.</b> Concentraciones de putrescina, cadaverina e histamina en muestras de atún enlatado, analizadas por HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS, usando el método de calibración externa ....	91
<b>Tabla 20.</b> Eficiencia de extracción por LSE de cuatro BA de una matriz blanco de margarina enriquecida con las aminas a concentraciones de 100, 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ .....	94
<b>Tabla 21.</b> Ecuaciones de las rectas de calibración externa utilizadas para la cuantificación de las BA en muestras de pescado y queso .....	95
<b>Tabla 22.</b> Concentración de aminas biogénicas, en función del tiempo de almacenamiento del pescado mojarra, a 1- 4 °C, obtenida por HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS, usando el método de calibración externa .....	96
<b>Tabla 23.</b> Concentración de aminas biogénicas en quesos Chitagá, Reinoso y cuajada, determinada mediante HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS, usando el método de calibración externa.....	102

## Lista de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Clasificación de aminas biogénicas según su estructura química .....	22
<b>Figura 2.</b> Formación de histamina, cadaverina y tiramina a partir de sus aminoácidos precursores .....	24
<b>Figura 3.</b> Formación de nitrosaminas a partir de putrescina y cadaverina .....	27
<b>Figura 4.</b> Componentes básicos de un sistema HPLC .....	32
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de un cuadrupolo .....	34
<b>Figura 6.</b> Vista esquemática del <i>Orbitrap</i> y ejemplo de trayectoria estable de un ion .....	35
<b>Figura 7.</b> Esquema del espectrómetro de masas <i>Q-Orbitrap</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Proceso HESI con la adquisición de datos en modo de iones positivos .....	39
<b>Figura 9.</b> Espectros de masas obtenidos empleando los modos de adquisición AIF y <i>step-scan</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Modos de adquisición de datos en el sistema <i>Q-Orbitrap</i> .....	43
<b>Figura 11.</b> Esquema de la metodología empleada para la extracción y análisis de las BA en pescado y queso .....	57
<b>Figura 12.</b> Espectro de masas de la putrescina obtenido por FIA-HESI- <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> .....	60
<b>Figura 13.</b> Espectro de masas de la cadaverina obtenido por FIA-HESI- <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> .....	61
<b>Figura 14.</b> Espectro de masas de la tiramina obtenido por FIA-HESI- <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> .....	62
<b>Figura 15.</b> Espectro de masas de la histamina obtenido por FIA-HESI- <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> .....	63
<b>Figura 16.</b> Espectros de masas de la putrescina, obtenidos por FIA-HESI- <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> (HCD = 0 eV) y <i>step-scan</i> (HCD = 10, 20, 30 eV) .....	66
<b>Figura 17.</b> Espectros de masas de la cadaverina, obtenidos por FIA-HESI- <i>Q-Orbitrap</i> -HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> (HCD = 0 eV) y <i>step-scan</i> (HCD = 10, 20, 30 eV) .....	67

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

<b>Figura 18.</b> Espectros de masas de la histamina, obtenidos por FIA-HESI-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> (HCD = 0 eV) y <i>step-scan</i> (HCD = 10, 20, 30 eV).....	68
<b>Figura 19.</b> Espectros de masas de la tiramina, obtenidos por FIA-HESI-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas <i>full scan</i> (HCD = 0 eV) y <i>step-scan</i> (HCD = 10, 20, 30 eV).....	69
<b>Figura 20.</b> Intensidad de los iones $[M+H]^+$ y $[(M+H)-NH_3]^+$ en los espectros de masas obtenidos por HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS de las BA bajo estudio, en función del voltaje del capilar .....	71
<b>Figura 21.</b> Relación entre las intensidades de iones de las moléculas protonadas $[M+H]^+$ y sus fragmentos $[(M+H)-NH_3]^+$ , a diferentes voltajes (Véase la <b>Ecuación 3</b> ), en los espectros de masas obtenidos por HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS de las BA estudiadas .....	73
<b>Figura 22.</b> Intensidad de los fragmentos $[(M+H)-NH_3]^+$ en los espectros MS de las BA estudiadas, obtenidos por HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS en modos de adquisición <i>full scan</i> (HCD = 0 eV) y PRM (HCD = 10, 15, 20 eV) (n = 2) .....	76
<b>Figura 23.</b> Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion $[(M+H)-NH_3]^+$ de la putrescina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4 .....	78
<b>Figura 24.</b> Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion $[(M+H)-NH_3]^+$ de la cadaverina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4 .....	79
<b>Figura 25.</b> Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion $[M+H]^+$ de la histamina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4.....	80
<b>Figura 26.</b> Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion $[(M+H)-NH_3]^+$ de la tiramina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4 .....	81
<b>Figura 27.</b> Efecto de diferentes gradientes de UHPLC (G1, G2, G3, G4) sobre la anchura a la mitad de la altura del pico cromatográfico ( $W_{0.5}$ ) de la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina .....	82
<b>Figura 28.</b> Factor de coleo (Tf) y factor de simetría ( $A_s$ ) para los picos cromatográficos de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, empleando tres gradientes diferentes de UHPLC	84
<b>Figura 29.</b> Cromatograma de los patrones de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina (1000 mg/L), obtenidos por GC/MS, en columna apolar DB-5MS (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm).....	87

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

- Figura 30.** Concentración de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, en función del tiempo de almacenamiento del pescado mojarra a 1 - 4 °C (n = 2), determinada mediante HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS utilizando el método de calibración externa ..... 97
- Figura 31.** Concentraciones de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en quesos Chitagá, Reinoso y cuajada, encontrados por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, usando el método de calibración externa ..... 102
- Figura 32.** Reconocimiento al proyecto en modalidad póster en el marco de los Congresos XI COCOCRO, XIX COLACRO, XXVI EXTECH, III SPAE, XVI LASEAC, llevados a cabo en Bucaramanga, Neomundo, del 13 al 15 de noviembre de 2024 ..... 108

### Lista de Apéndices

	<b>Página</b>
<b>Apéndice A.</b> Relaciones entre las intensidades de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y de los fragmentos $[(M+H)-NH_3]^+$ , encontradas para cuatro BA, usando diferentes voltajes de capilar (1, 2, 3, 4, 5 kV), de acuerdo con la <b>Ecuación 3, Sección 7.1.1.2</b> .....	120
<b>Apéndice B.</b> Relaciones entre las intensidades de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y de los fragmentos $[(M+H)-NH_3]^+$ , encontradas para cuatro BA, usando diferentes voltajes de capilar (1, 2, 3, 4, 5 kV), de acuerdo con la <b>Ecuación 4, Sección 7.1.1.2</b> .....	120
<b>Apéndice C.</b> Áreas de picos cromatográficos (corrientes iónicas parciales) del fragmento $[(M+H)-NH_3]^+$ en los espectros de masas de cuatro BA, empleando un voltaje de capilar de 2 kV y modos de adquisición <i>full scan</i> y PRM (HCD: 10, 15, 20 eV).....	121
<b>Apéndice D.</b> Valores de $W_{0.5}$ de los picos cromatográficos de la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, empleando cuatro gradientes diferentes en el sistema UHPLC.....	121
<b>Apéndice E.</b> Factores de dilución empleados en los extractos de pescado y quesos analizados por HESI-UHPLC-Q- <i>Orbitrap</i> -HRMS.....	122
<b>Apéndice F.</b> Cromatograma de la mezcla de BA empleando diferentes gradientes UHPLC ...	123

**Lista de siglas, acrónimos y abreviaturas\***

<b>Siglas, acrónimos y abreviaturas</b>	<b>Descripción</b>
AIF	<i>All Ion Fragmentation</i> (Fragmentación de todos los iones)
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> (Ionización a presión atmosférica)
As	<i>Asymmetry Factor</i> (Factor de asimetría)
$\bar{B}$	<i>Magnetic Field</i> (Campo magnético)
BA	<i>Biogenic amines</i> (Aminas biogénicas)
BAI	<i>Biogenic Amine Index</i> (Índice de aminas biogénicas)
CAD	<i>Cadaverine</i> (Cadaverina)
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> (Electroforesis capilar)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinas Tropicales
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionización química)
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
CQI	<i>Chemical Quality Index</i> (Índice de calidad química)
D.I.	Diámetro interno
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Arreglo de diodos)
DAO	<i>Diamine Oxidase</i> (Diaminooxidasa)
dd- MS <sup>2</sup>	<i>Data-dependent MS<sup>2</sup> Fragmentation</i> (Fragmentación dependiente de los datos)
d <sub>f</sub>	<i>Stationary Phase Thickness</i> (Espesor de fase estacionaria)
$\bar{E}$	<i>Electric Field</i> (Campo eléctrico)
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	<i>Electron Ionization</i> (Ionización con electrones)
EIC	<i>Extracted Ion Current</i> (Corriente iónica extraída)
ENSIN	Encuesta Nacional de Situación Nutricional
ERIA	Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

---

EU	<i>European Union</i> (Unión Europea)
FAA	<i>Free Amino Acids</i> (Aminoácidos libres)
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> (Bombardeo con átomos acelerados)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de alimentos y medicamentos)
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análisis por inyección en flujo)
FTICR	<i>Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance</i> (Resonancia ion-ciclotrónica con transformada de Fourier)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases, cromatógrafo de gases o cromatograma de gases, según el contexto)
HCD	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell</i> (Celda de disociación por colisión de alta energía)
HESI	<i>Heated-Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización con calentamiento)
HIS	<i>Histamine</i> (Histamina)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución)
IC	Intervalo de confianza
IT	<i>Ion Trap</i> (Trampa de iones)
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida, cromatógrafo líquido o cromatograma, según el contexto)
LD <sub>50</sub>	<i>Lethal Dose 50</i> (Dosis letal media)
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de cuantificación)
LSE	<i>Liquid-Solid Extraction</i> (Extracción líquido-sólido)
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-Charge Ratio</i> (Relación masa-carga)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> (Ionización por desorción con láser asistida por matriz)

---

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

---

MAO	<i>Monoamine Oxidase</i> (Monoaminooxidasa)
mDIA	<i>Multiple Data-Independent Acquisition</i> (Adquisición múltiple independiente de los datos)
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i> (Monitoreo de reacción múltiple)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas, espectrómetro de masas, espectro de masas, según el contexto)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas en tándem)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> (Nivel sin efecto adverso observable)
OPA	<i>o-Phthalaldehyde</i> ( <i>o</i> -ftalaldehído)
PAO	<i>Polyamine Oxidase</i> (Poliaminooxidasa)
PRM	<i>Parallel Reaction Monitoring</i> (Monitoreo paralelo de reacciones)
PUT	<i>Putrescine</i> (Putrescina)
Q	<i>Quadrupole</i> (Cuadrupolo)
QqQ	Triple cuadrupolo
Rf	<i>Radiofrequency</i> (Radiofrecuencia)
SD	<i>Spermidine</i> (Espermidina)
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> (Monitoreo de iones seleccionados)
SM	<i>Spermine</i> (Espermina)
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (Ácido tricloroacético)
Tf	<i>Tailing Factor</i> (Factor de coleo)
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (Cromatografía de capa fina)
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TYR	<i>Tyramine</i> (Tiramina)
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia)
UV-VIS	<i>Ultraviolet-Visible Spectroscopy</i> (Espectroscopía ultravioleta visible)
vDIA	<i>Variable Data-Independent Acquisition</i> (Adquisición variable independiente de los datos)

---

\*La mayoría de siglas utilizadas en este documento se emplearon de acuerdo con sus versiones en inglés.

## Resumen

**Título:** Análisis por LC/MS de aminas biogénicas en matrices alimenticias\*

**Autor:** Valeria BELLÓN MONSALVE\*\*

**Palabras clave:** Aminas biogénicas, alimentos, UHPLC-Q-*Orbitrap*, extracción líquido-sólido.

### Descripción:

Las aminas biogénicas (BA) se generan por la descarboxilación de los aminoácidos libres (FAA) presentes en los alimentos, mediada por la acción de bacterias. Los niveles elevados de BA en los alimentos están asociados con efectos adversos para la salud, como migrañas, intoxicaciones e hipertensión. Su reactividad alta con nitritos para formar nitrosaminas, compuestos potencialmente cancerígenos, representa un riesgo para la salud pública. En Colombia, aunque el consumo de pescado y queso es común en la dieta diaria, no existen regulaciones específicas sobre los niveles permitidos de BA en estos productos.

En este estudio se identificaron y cuantificaron cuatro BA (putrescina, cadaverina, histamina y tiramina) en pescado mojarra durante un periodo de almacenamiento de diez días a 1 - 4 °C, y en atún y tres tipos de queso, justo después de su compra. Para ello, se utilizó cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS). La extracción de las BA se llevó a cabo mediante extracción líquido-sólido (LSE), utilizando como solvente de extracción una mezcla de metanol y agua.

La cadaverina fue la BA más abundante en todas las matrices analizadas. En la mojarra, la concentración de todas las BA estudiadas aumentó progresivamente en función del tiempo de almacenamiento, alcanzando sus valores máximos en el décimo día: cadaverina ( $42 \pm 2.6$  mg/kg), putrescina ( $23 \pm 2.0$  mg/kg), histamina ( $21 \pm 1.1$  mg/kg) y tiramina ( $11.1 \pm 0.66$  mg/kg). Este incremento confirma que el tiempo de almacenamiento es un factor clave en la acumulación de las BA. En los quesos, la cadaverina también predominó, el queso maduro tipo Reinoso presentó la concentración más alta de esta BA de todas las matrices analizadas ( $89 \pm 7.4$  mg/kg). Se observó que el proceso de maduración y fermentación influye significativamente en la acumulación de BA, ya que los quesos frescos, como el Chitagá y la cuajada, presentaron concentraciones notablemente menores de putrescina, cadaverina y tiramina, mientras que la histamina no fue detectada en estos quesos.

Estos resultados destacan la importancia de monitorear la cadaverina junto con otras BA en alimentos, especialmente aquellas cuya toxicidad puede verse potenciada por su presencia, como la histamina. Asimismo, evidencian que tanto el tiempo de almacenamiento como el grado de maduración y fermentación son factores determinantes en la formación y acumulación de BA en alimentos. Se recomienda realizar estudios adicionales para definir límites de seguridad y establecer regulaciones específicas que incluyan el análisis de cadaverina en alimentos fermentados y de origen animal. Además, sería fundamental complementar estos estudios con análisis microbiológicos que permitan identificar con certeza el origen de la acumulación de BA.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora Elena. E. STASHENKO, Química, *PhD*.

### Abstract

**Title:** LC/MS analysis of biogenic amines in food matrices\*

**Author:** Valeria BELLÓN MONSALVE\*\*

**Key words:** *Biogenic amines, food, UHPLC-Q-Orbitrap, liquid-solid extraction*

#### Description:

Biogenic amines (BAs) are produced by the decarboxylation of free amino acids (FAAs) in food, driven by bacterial activity. Elevated levels of BAs in food are linked to adverse health effects such as migraines, intoxications, and hypertension. Their high reactivity with nitrites to form nitrosamines, which are potentially carcinogenic, poses a significant public health risk. Despite the widespread consumption of fish and cheese in Colombia, there are no specific regulations on permissible BA levels in these products.

This study identified and quantified four BAs (putrescine, cadaverine, histamine and tyramine) in *mojarra* fish stored for ten days at 1–4 °C, as well as in tuna and three types of cheese immediately after purchase. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS) was used for analysis. The BAs were extracted using liquid-solid extraction (LSE) with a solvent mixture of methanol and water.

Cadaverine was the most abundant BA in all analyzed matrices. In *mojarra* fish, BA concentrations increased progressively over the storage period, reaching their highest levels on the tenth day: cadaverine ( $42 \pm 2.6$  mg/kg), putrescine ( $23 \pm 2.0$  mg/kg), histamine ( $21 \pm 1.1$  mg/kg), and tyramine ( $11.1 \pm 0.66$  mg/kg). This confirms that storage time is a key factor in BA accumulation. In cheeses, cadaverine was also predominant, with the highest concentration observed in the matured *Reinoso* cheese ( $89 \pm 7.4$  mg/kg). The study revealed that the maturation and fermentation processes significantly influence BA accumulation, as fresh cheeses such as *Chitagá* and *cuajada* exhibited considerably lower levels of putrescine, cadaverine, and tyramine, while histamine was not detected.

These findings highlight the need to monitor cadaverine alongside other BAs in food, particularly those that can exacerbate toxicity, such as histamine. Additionally, they emphasize that storage duration, maturation, and fermentation are critical factors in BA formation and accumulation. Further research is recommended to establish safety limits and regulatory guidelines that include cadaverine in fermented and animal-derived foods. Moreover, microbiological analyses should be incorporated to accurately determine the origin of BA accumulation.

---

\* Bachelor thesis

\*\* Science Faculty. School of Chemistry. Director: Elena. E. STASHENKO, Chemist, *PhD*.

## Introducción

Los alimentos están expuestos a contaminación bacteriana durante su transporte, almacenamiento y comercialización. La carga bacteriana no solo indica la calidad del alimento, sino que también desempeña un papel esencial en la síntesis de aminas biogénicas (BA), compuestos tóxicos para el organismo que se generan por la descarboxilación de aminoácidos, catalizada por enzimas descarboxilasas presentes en las bacterias (de la Torre & Conte, 2018; Mohammed *et al.*, 2016; Önal, 2007).

Niveles elevados de BA en los alimentos pueden provocar efectos adversos como envenenamiento, hipertensión, taquicardia y migrañas; algunas BA pueden formar nitrosaminas, compuestos carcinógenos que representan un riesgo para la salud (Al Bulushi *et al.*, 2009; Özogul & Özogul, 2019).

A pesar de estos efectos, la regulación de los niveles de BA en alimentos es aún deficiente en Colombia. Actualmente, solo la histamina es regulada en productos de pesca (Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 122, 2012), mientras que las demás aminas, aunque representan un riesgo potencial para la salud pública, carecen de normativas y regulaciones específicas.

El presente trabajo de grado tiene como objetivo identificar y cuantificar cuatro BA, putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, en pescado y queso, usando la cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución en un sistema UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.

## 1. Justificación

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN), el pescado y el queso son alimentos consumidos muy frecuentemente por los colombianos (Herrán *et al.*, 2020). Sin embargo, la regulación de los niveles de BA permitidos en estos productos es deficiente. Actualmente, solo existen regulaciones para los niveles de histamina permitidos en pescado (Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 122, 2012), mientras que no existen normativas para otras BA. Dado este contexto de regulación insuficiente y el riesgo potencial para la salud pública asociado al consumo de alimentos con niveles altos de BA, el análisis de estos compuestos en las matrices alimenticias adquiere una gran relevancia.

Este estudio proporcionará información sobre la presencia de cuatro aminas biogénicas, *i.e.*, putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, en pescado y queso, así como el perfil de estas BA en función del tiempo de almacenamiento en pescado. Esto permitiría establecer periodos de almacenamiento bajo los cuales el pescado aún puede ser seguro para su consumo, sin posibles riesgos para la salud, asociados con niveles de BA altos.

Los datos sobre la presencia de las BA en pescado y queso podrían brindar información sobre la necesidad de establecer regulaciones en Colombia que contemplen la presencia de otras BA en pescado y cualquier BA en queso. Esto contribuiría a garantizar una protección más efectiva de la salud pública de los colombianos y preservar la calidad de los productos.

## 2. Hipótesis

Se plantea que un aumento en el periodo de almacenamiento del pescado conducirá a un incremento en el contenido total de BA, de forma discernible y cuantificable por UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS. Se espera un incremento mayor en los niveles de histamina en el tiempo con respecto a las demás BA. El aumento de la concentración de putrescina y cadaverina se prevé durante las primeras etapas de descomposición del pescado, no durante los días iniciales de almacenamiento. Aunque los resultados pueden variar de acuerdo con el tipo de matriz y la carga bacteriana inicial en el pescado y queso, se espera que para el día cero (día de compra del producto), los niveles de histamina estén por debajo del límite permitido en Colombia (100 mg/kg), y que las concentraciones del resto de BA cumplan con las normativas o recomendaciones internacionales.

En cuanto a los productos lácteos, se prevé que los niveles de BA sean más elevados en los productos con procesos de fermentación más prolongados, los cuales favorecen la síntesis de estas aminos.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Identificar y cuantificar putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en pescado y queso, empleando UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Comparar métodos de extracción para el aislamiento de aminas biogénicas en muestras de pescado.
- Mejorar la sensibilidad del método analítico ajustando el voltaje del capilar y la energía de la celda de disociación por colisiones activadas (HCD), en el sistema UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS.
- Cuantificar por UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS las BA presentes en las muestras de pescado durante los días 0, 3, 5, 8 y 10 de almacenamiento.
- Cuantificar por UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS las BA presentes en muestras de tres tipos de queso, inmediatamente después de su adquisición.

## 4. Marco teórico

### 4.1 Aminas biogénicas

#### 4.1.1 Definición

Las BA son bases orgánicas de bajo peso molecular. Su presencia en alimentos se origina principalmente a través procesos de descarboxilación de aminoácidos libres (FAA), catalizados por enzimas descarboxilasas provenientes de microorganismos, por ejemplo, bacterias (Bedia, 2013; Montegiove *et al.*, 2023). Comúnmente, las BA se nombran según su aminoácido precursor, así, la histamina es el resultado de la descarboxilación de la histidina, la tiramina proviene de la tirosina, la triptamina, del triptófano, *etc* (de la Torre & Conte, 2018). Sin embargo, aminas como la cadaverina y putrescina, se nombran según los procesos de putrefacción y descomposición durante los cuales se generan (Hui & Sherkat, 2005).

#### 4.1.2 Clasificación de aminas biogénicas

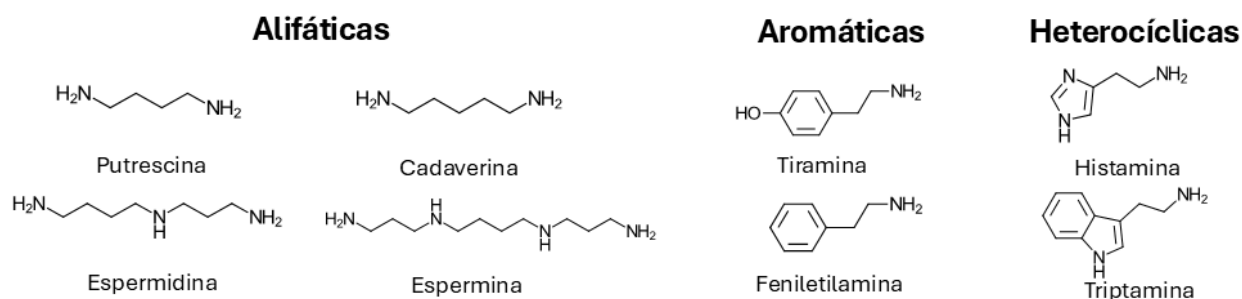
Existen diversos criterios para clasificar aminas; entre ellos, se encuentran su estructura y el número de grupos amino presentes. De acuerdo con su estructura química, estas aminas pueden ser alifáticas, *e.g.*, cadaverina, putrescina, espermina, espermidina; aromáticas, cuando un grupo amino está directamente unido al anillo aromático, *e.g.*, tiramina, feniletilamina; y heterocíclicas, caracterizadas por presentar, al menos, un grupo amino y un anillo compuesto por átomos de carbono y uno o más heteroátomos, frecuentemente, oxígeno, fósforo, oxígeno y azufre, *e.g.*, histamina, triptamina. En la **Figura 1** aparecen aminas biogénicas, clasificadas según su estructura química.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Según el número de grupos amino, se clasifican como monoaminas, *e.g.*, tiramina, feniletilamina; diaminas, *e.g.*, histamina, triptamina, cadaverina, putrescina; y poliaminas, *e.g.*, espermina, espermidina (de la Torre & Conte, 2018; Wójcik *et al.*, 2022).

### Figura 1.

*Clasificación de aminas biogénicas según su estructura química.*



### 4.1.3 Biosíntesis

La formación de aminas biogénicas requiere la disponibilidad de los aminoácidos precursores, la presencia de bacterias que sinteticen enzimas descarboxilasas de aminoácidos y condiciones favorables (temperatura, pH) para el desarrollo de los microorganismos y las reacciones de descarboxilación.

Esencialmente, las BA se producen tras la eliminación del grupo alfa carboxilo de los aminoácidos precursores, con la ayuda de enzimas descarboxilasas específicas de sustrato. En la **Figura 2** se ilustra la formación de algunas BA. La conversión de histidina a histamina ocurre en presencia de la histidina descarboxilasa; la cadaverina resulta de la conversión de lisina catalizada por la lisina descarboxilasa, *etc.* En la **Tabla 1**, se listan los precursores de algunas BA, así como las enzimas responsables de su conversión y los microorganismos que poseen estos biocatalizadores.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Tabla 1**

*Aminoácidos precursores de algunas BA y las enzimas encargadas de su conversión.*

<b>Amina biogénica</b>	<b>Precursor</b>	<b>Catalizador</b>	<b>Bacteria</b>
Histamina	Histidina	Histidina descarboxilasa	<i>Photobacterium phosphoreum</i>  <i>Raoultella planticola</i> (Kanki <i>et al.</i> , 2007)
Cadaverina	Lisina	Lisina descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i> (Ma <i>et al.</i> , 2017) <i>Streptococcus thermophilus</i> (Gezginc <i>et al.</i> , 2013)
Tiramina	Tirosina	Tirosina descarboxilasa	<i>Lactobacillus</i> spp.  <i>Enterococcus</i> spp. (van Kessel <i>et al.</i> , 2019)
Triptamina	Triptófano	Triptófano descarboxilasa	<i>Clostridium</i> spp.  <i>Ruminococcus</i> spp.  <i>Blautia</i> spp.  <i>Lactobacillus</i> spp. (Williams <i>et al.</i> , 2014)
Feniletilamina	Fenilalanina	Fenilalanina descarboxilasa	<i>Ruminococcus gnavus</i> (Sugiyama <i>et al.</i> , 2022)

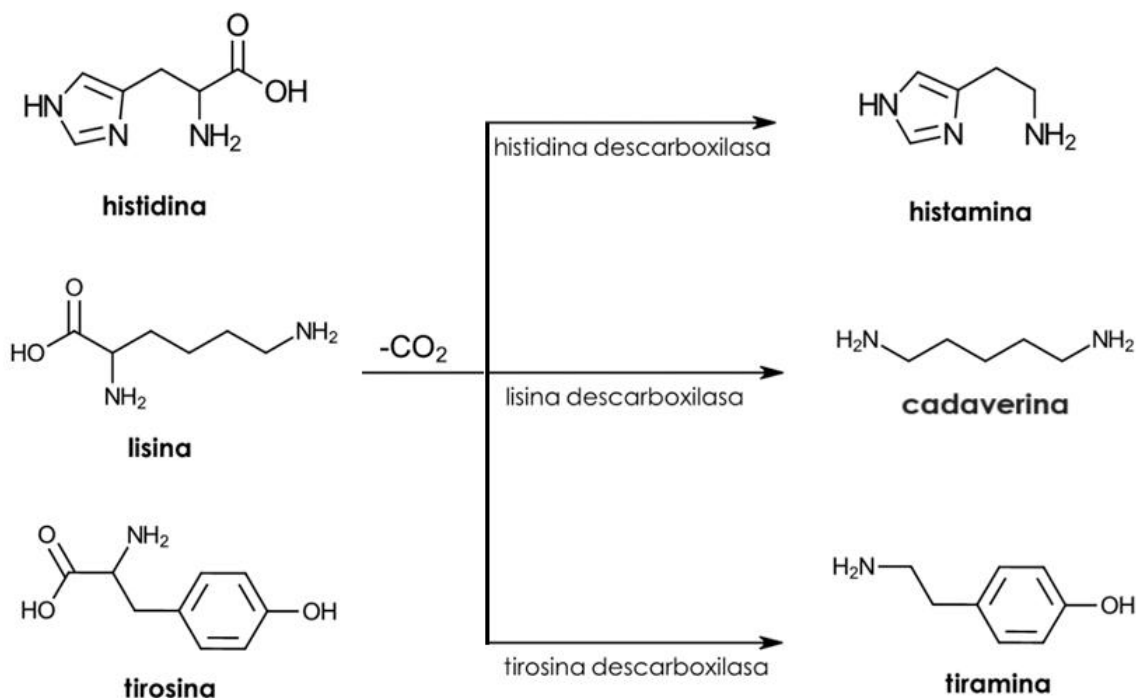
La especificidad de las enzimas descarboxilasas por sustrato no es elevada, por lo que, si el sustrato principal no está presente, estas enzimas pueden emplear aminoácidos estructuralmente similares para dar lugar a varias aminas biogénicas. Por ejemplo, la tirosina descarboxilasa puede

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

catalizar la formación de feniletilamina a partir de la fenilalanina, o la ornitina descarboxilasa puede generar cadaverina a partir de la lisina (EFSA, 2011).

**Figura 2.**

*Formación de histamina, cadaverina y tiramina a partir de sus aminoácidos precursores.*

**4.2 Algunos aspectos toxicológicos**

La histamina, tiramina, cadaverina, putrescina, espermina y espermidina se encuentran en el organismo en concentraciones bajas, cumpliendo funciones en procesos de regulación del crecimiento celular, expresión de genes, rutas de señalización intracelular y reparación de tejidos (Ma *et al.*, 2020). Ibarra *et al.* (2015) reportaron concentraciones de putrescina, cadaverina, espermina y espermidina en orina de individuos sanos, las cuales se presentan en la **Tabla 2**.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Tabla 2.**

*Concentración de aminas biogénicas en muestras de orina de individuos sanos.*

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración promedio, ng/mL <math>\pm</math>s, n= 3</b>	<b>Rango, ng/mL</b>
Putrescina	38 $\pm$ 9.1	27.3 - 50.1
Cadaverina	45 $\pm$ 13	21.5 - 61.9
Espermina	83 $\pm$ 6.3	72.1 - 90.1
Espermidina	19 $\pm$ 6.9	9.1 - 27.2

Sin embargo, concentraciones altas de BA en el organismo, superiores a los niveles aceptados en alimentos (Véase **Tabla 3**), pueden generar afectaciones gastrointestinales, migrañas, hipertensión, intoxicación, respuestas alérgicas, entre otras (Medina *et al.*, 2003). Algunas poliaminas se han vinculado con el crecimiento de tumores (Quemener *et al.*, 1994).

**Tabla 3.**

*Niveles aceptados de histamina, tiramina, putrescina y cadaverina en alimentos.*

<b>Amina biogénica</b>	<b>Niveles aceptados, mg/kg</b>
Histamina	100 (EFSA, 2011)
Tiramina	100-800 (Önal, 2007)
Putrescina	140-510 (Rauscher-Gabernig <i>et al.</i> , 2012)
Cadaverina	430-1540 (Rauscher-Gabernig <i>et al.</i> , 2012)

#### **4.2.1 Histamina**

La ingestión de niveles altos de histamina (>100 mg/kg) puede producir escombroidosis, un tipo de intoxicación frecuentemente vinculada al consumo de pescado de la familia *Scombridae* (atún, caballa), caracterizados por presentar histidina en sus tejidos. Otros alimentos como los quesos (gouda, suizo, cheddar, *etc*), pescados de otras familias (sardina, anchoas), vinos y salchichas también pueden producir esta intoxicación (Danquah *et al.*, 2012). Los principales

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

síntomas de intoxicación son enrojecimiento, taquicardia, hipotensión, palpitaciones, náuseas, vómito y diarrea (Hui & Sherkat, 2005). Los efectos tóxicos de la histamina se ven potenciados por otras BA, como la putrescina y la cadaverina, las cuales limitan la acción de las enzimas responsables de la degradación de la histamina en el intestino (Middlebrooks *et al.*, 2006; Özogul & Özogul, 2019).

La FDA y la Unión Europea (EU) sugieren que los niveles de histamina en pescado no deben exceder los 50 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente (EFSA, 2011; FDA, 2024).

### **4.2.2 Tiramina**

La tiramina se encuentra en diversas bebidas y alimentos, como pescado, carne, bebidas alcohólicas, y, generalmente, es la BA mayoritaria en queso. Niveles de tiramina altos (> 1080 mg/kg) en el organismo pueden generar una crisis hipertensiva conocida como “el efecto queso”, cuyos síntomas incluyen migraña, hipertensión, sudoración excesiva, contracción muscular, alteraciones visuales y disminución del movimiento del tracto gastrointestinal (Hui & Sherkat, 2005; Özogul & Özogul, 2019; Rodriguez *et al.*, 2014).

Nout (1994) indica que el rango permitido de tiramina es de 100-800 mg/kg y, concentraciones mayores de 1080 mg/kg, pueden ser tóxicas.

### **4.2.3 Putrescina y cadaverina**

**4.2.3.1 Efecto tóxico potenciador.** La putrescina y la cadaverina se consideran potenciadores de la toxicidad de la histamina en el organismo, porque compiten por las mismas enzimas catabólicas (diamina oxidasa, DAO), disminuyen la capacidad de degradación de la histamina en el organismo y genera su acumulación en el plasma (Pucciarini *et al.*, 2018).

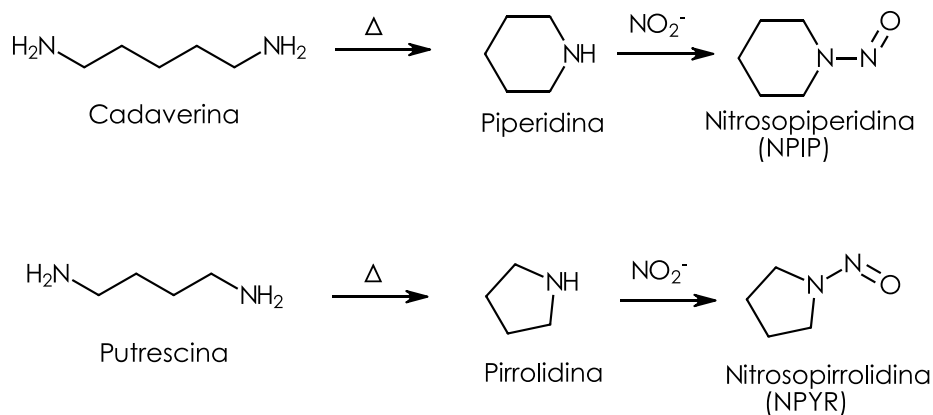
## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Estudios en conejillos de Indias mostraron que, tras la administración a ellos de 150 mg/kg de histamina, no se presentó ninguna mortalidad. Sin embargo, tras la adición de cadaverina (50 mg/kg) a la dosis de histamina, 33 % de los conejillos murieron, y al aumentar la concentración de cadaverina a 75 mg/kg, el 84 % murió (Bjeldanes *et al.*, 1978).

**4.2.3.2 Formación de nitrosaminas.** Bajo procesos de calentamiento, la putrescina y la cadaverina pueden ciclarse, para dar origen a la piperidina y la piperidina, que, al reaccionar con sales de nitrito presentes en pescados comúnmente, pueden formar nitrosaminas (Véase **Figura 3**), compuestos ampliamente conocidos por su actividad cancerígena (Al Bulushi *et al.*, 2009). Actualmente, no existen regulaciones estrictas en cuanto a la dosis máxima de cadaverina y putrescina en alimentos, y sólo se reportan estudios en animales (EFSA, 2011). En un estudio de pruebas toxicológicas agudas, realizadas con ratas, el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) fue de 180 mg//kg para cadaverina y putrescina. Se reportaron niveles de toxicidad oral aguda de 2 g/kg en peso corporal para la putrescina y más de 2 g/kg, para la cadaverina (Til *et al.*, 1997).

**Figura 3.**

*Formación de nitrosaminas a partir de putrescina y cadaverina.*



#### **4.2.4 Espermidina y espermina**

Poliaminas, como la espermidina y la espermina, están presentes de forma natural en animales, plantas y algunas bacterias. Cumplen roles de regulación de la membrana celular, el funcionamiento de ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas, son esenciales en procesos de crecimiento y regeneración celular (EFSA, 2011). Sin embargo, se han encontrado concentraciones altas de estas aminas, en conjunto con la putrescina, en tejidos de crecimiento rápido, por lo que frecuentemente son asociadas con el crecimiento y el desarrollo de tumores. Por esta razón, el control de las enzimas biosintéticas de estas poliaminas ha sido materia de estudio para el desarrollo de drogas antitumorales. Así mismo, alimentos que presenten niveles de estas BA altos son prohibidos para pacientes en tratamientos de cáncer (Cipolla *et al.*, 2007; Quemener *et al.*, 1994).

Niveles altos de espermina han sido asociados con la toxicidad hepática, afectaciones en la coagulación, presión sanguínea, ritmo cardiaco alto y respiración (Hui & Sherkat, 2005). El NOAEL para ratas reportado en la literatura es de 83 mg/kg y 19 mg/kg, en peso corporal, para espermidina y espermina, respectivamente; mientras que la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) para ambas BA fue de 600 mg/kg, en peso corporal (Til *et al.*, 1997).

#### **4.2.5 Otras aminas**

La triptamina y la feniletilamina son aminas vasoconstrictoras de venas y arterias, por lo que su consumo se vincula con un aumento de la presión sanguínea y ritmo cardiaco, así como con dolor de cabeza y migraña (EFSA, 2011).

#### **4.2.6 Factores que incrementan la sensibilidad a las aminas biogénicas**

El organismo presenta enzimas encargadas de la degradación de las BA en el cuerpo. Las más conocidas son las monoaminooxidasas (MAO), diaminooxidasas (DAO) y poliaminooxidasas (PAO) (Medina *et al.*, 2003). Sin embargo, los medicamentos comúnmente empleados para el tratamiento del estrés, depresión, ansiedad, enfermedades de Alzheimer y Parkinson, tuberculosis y malaria, presentan un efecto inhibitorio de las enzimas catabólicas MAO y DAO (Rodríguez *et al.*, 2014). Entre algunos de los inhibidores de MAO se encuentran la isoniacida (antituberculoso), tranilcipromina (antidepresivo), furazolidona (antidiarreico), iproniazida (antidepresivo), isocarboxazida (ansiolítico), entre otros (Hui & Sherkat, 2005). El alcohol, por su parte, inhibe la actividad de la MAO, al tiempo que incrementa la permeabilidad de la pared intestinal; en conjunto con el acetaldehído, promueve e incrementa la toxicidad de las BA (Özogul & Özogul, 2019; Pucciarini *et al.*, 2018).

De esta forma, individuos con alguna de estas condiciones, presentan una mayor vulnerabilidad a los efectos de las BA, pues la actividad de las enzimas encargadas de su degradación está comprometida en la presencia de los inhibidores mencionados anteriormente. Así, si el nivel tóxico de tiramina para un individuo normal es de 100 mg/kg, para aquellas personas con tratamiento con inhibidores de MAO es de 60 mg/kg (Rodríguez *et al.*, 2014).

#### **4.3 Aspectos de calidad en alimentos**

El contenido de las BA se emplea frecuentemente como un marcador de calidad, higiene y procesamiento de los alimentos (Danquah *et al.*, 2012). Los parámetros conocidos como índice de calidad química (CQI) y el índice de aminas biogénicas (BAI) se emplean para relacionar la concentración de las BA en un alimento y el grado de descomposición o su frescura.

### 4.3.1 Índice de aminas biogénicas

El índice de aminas biogénicas (BAI) se emplea para evaluar la frescura de alimentos, particularmente, carne. Este se describe como la sumatoria de la concentración de histamina (HIS), cadaverina (CAD), putrescina (PUT) y tiramina (TYR) (Özogul & Özogul, 2019) (Véase **Ecuación 1**). La **Tabla 4** muestra la relación entre el BAI y la calidad de la carne (Triki *et al.*, 2018).

$$BAI = HIS + CAD + PUT + TYR \quad (1)$$

**Tabla 4.**

*Relación entre el BAI y la calidad de la carne.*

BAI, mg/kg	Calidad de la carne
0	BA involucrada no detectada
< 5	Buena
5-20	Aceptable
20-50	Pobre
> 50	Podrida

### 4.3.2 Índice de calidad

El índice de calidad (CQI) considera la concentración de HIS, PUT, CAD, espermidina (SD) y espermina (SM) (Özogul & Özogul, 2019), según la **Ecuación 2**.

$$CQI = \frac{HIS + PUT + CAD}{1 + SD + SM} \quad (2)$$

#### 4.4 Técnicas analíticas

##### 4.4.1 *Cromatografía líquida*

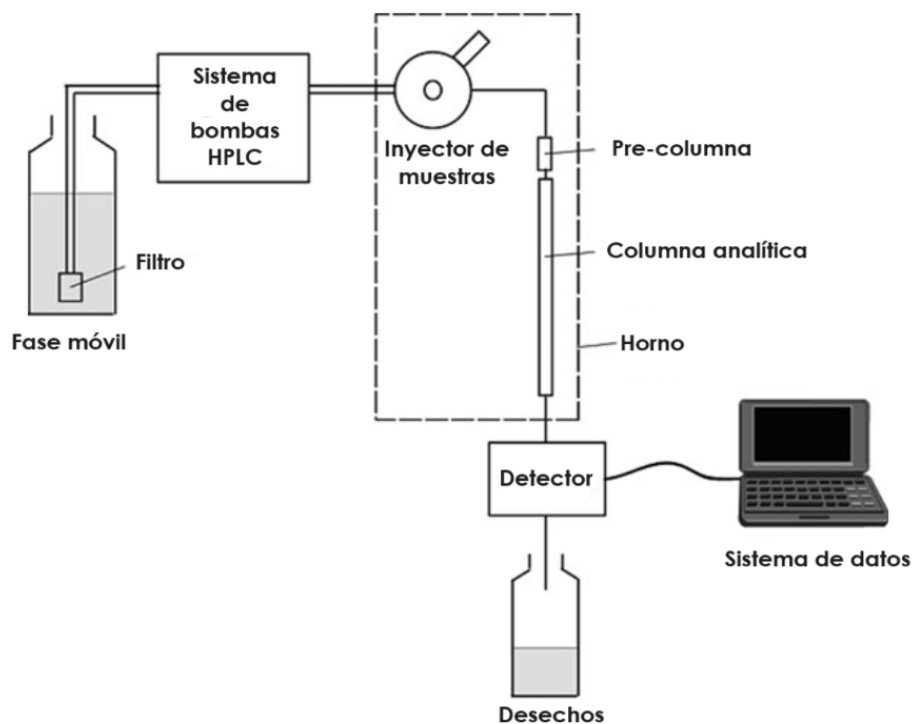
La cromatografía líquida (LC) es una técnica analítica empleada para separar los componentes de una mezcla, que comúnmente contiene sustancias de alto peso molecular, poco volátiles y termoinestables (termolábiles), como proteínas, fármacos, aminoácidos, polisacáridos, metabolitos, entre otros (Snyder & Kirkland, 1979). Esta técnica emplea una fase móvil, que transporta la muestra a través del sistema, y una fase estacionaria, comúnmente un material sólido y poroso en forma de pequeñas partículas o una fina película de líquido que recubre un soporte sólido o la pared de la columna cromatográfica. Los componentes en la mezcla se separan como resultado de las interacciones específicas y su distribución entre las fases estacionaria y móvil (Meyer, 2004).

**4.4.1.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia.** La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se emplea para separar y cuantificar compuestos en una muestra. Esta técnica utiliza una columna a través de la cual se pasa la muestra líquida a alta presión, típicamente hasta 40.000 kPa, presión necesaria para forzar la fase móvil a través de las columnas empaquetadas con partículas más pequeñas. Debido a la presión alta y el tamaño de partícula de empaque menor (3-5  $\mu\text{m}$ ), HPLC tiene la resolución y la eficiencia más altas en comparación con las de LC tradicional.

Como se muestra en la **Figura 4**, un sistema básico de HPLC consta de una bomba de alta presión, un reservorio para la fase móvil, diferentes válvulas, un dispositivo de inyección de muestras, la columna y sistemas de detección y de datos (Pitt, 2009).

**Figura 4.**

*Componentes básicos de un sistema HPLC.*



Nota: Adaptado con modificaciones de *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*, [Esquema explicativo], por Hansen, S.H., 2016, (p. 425).

**4.4.1.2 Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia.** La cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC) es una versión más avanzada y de mayor eficiencia que la HPLC; esta opera a presiones significativamente más altas que la HPLC, de hasta 150.000 kPa. UHPLC emplea columnas de menores longitudes, diámetro y partícula de empaque; diferentes valores que se comparan en la **Tabla 5**. Los parámetros operacionales de UHPLC permiten lograr una mayor eficiencia y resolución en la separación de los componentes de las mezclas, disminuir el tiempo de análisis, usando volúmenes de muestra y solvente más pequeños (Hansen, 2016).

**Tabla 5.**

*Comparación de algunos parámetros típicos de HPLC y UHPLC.*

<b>Parámetro</b>	<b>HPLC</b>	<b>UHPLC</b>
Presión máxima, kPa	40.000	150.000
Tamaño de partícula de empaque, $\mu\text{m}$	3-5	$\leq 2$
Diámetro interno de la columna, mm	4.6	$\leq 2.1$
Longitud de la columna, mm	250	$\leq 100$
Flujo, mL/min	1-2	0.2 - 0.7

#### **4.4.2 Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que permite la identificación de analitos. Las moléculas deben estar previamente ionizadas, para lo cual se emplean técnicas como electronebulización (ESI), ionización con electrones (EI), ionización química (CI), entre otras. Los iones generados durante la ionización se detectan y se separan en un analizador de masas, según su relación masa/carga ( $m/z$ ). Existen diferentes modos de ionización y tipos de analizadores de masas, lo que da lugar a espectrómetros de masas distintos con combinaciones de estos dos procesos diferentes.

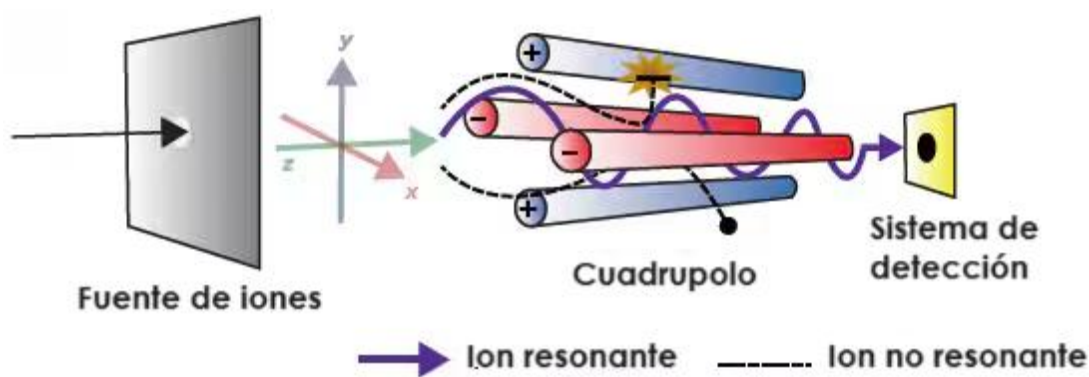
**4.4.2.1 Cuadrupolo.** El cuadrupolo (Q) contiene cuatro varillas metálicas paralelas, sobre las cuales se aplica una combinación de corriente constante y variable (radiofrecuencia). El campo eléctrico ( $\bar{E}$ ) y radiofrecuencia (**Rf**) influyen sobre la trayectoria de los iones que entran al cuadrupolo: solo iones con una determinada relación masa-carga ( $m/z$ ) pasan a través del cuadrupolo, hasta alcanzar el sistema de detección, como se ilustra en la **Figura 5**.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Al variar el  $\bar{E}$  y la  $Rf$  se logra la transmisión de haces de iones ( $m/z$ ) a lo largo del eje de las varillas, dando lugar a la construcción de un espectro de masas con base en la medición de corrientes iónicas parciales y su integración. Comúnmente los cuadrupolos miden las masas que no superan 1000 Da (Shimadzu, s/f).

**Figura 5.**

*Representación esquemática de un cuadrupolo.*



Nota: Adaptado con modificaciones de *Introduction to mass analyzers* [Esquema explicativo], por Shimadzu, ([https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html)).

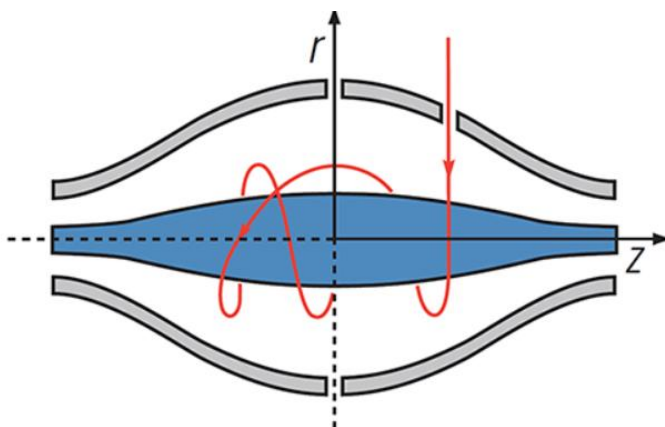
**4.4.2.2 Orbitrap.** El *Orbitrap* es una trampa de iones que tiene un electrodo en forma de huso, un electrodo cilíndrico en el centro de la trampa (electrodo central), que está rodeado por un electrodo hiperboloide (electrodo periférico), como se ilustra en la **Figura 6**. Los iones se inyectan a la región entre los dos electrodos, y se aplica un campo eléctrico ( $\bar{E}$ ), que genera una fuerza para que los iones se muevan en una órbita alrededor del electrodo central. La velocidad angular (eje z) de los iones alrededor del electrodo central (frecuencia de resonancia) está directamente relacionada con su  $m/z$ . Y mientras los iones están en movimiento, generan una señal detectada por el electrodo periférico, electrodo de espejo. Finalmente, las señales eléctricas se digitalizan

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

como la intensidad de la señal en función de la  $m/z$  en el espectro de masas, usando la transformada de Fourier (Creative Proteomics, s/f).

**Figura 6.**

Vista esquemática del Orbitrap y ejemplo de trayectoria estable de un ion.



Nota: Adaptado con modificaciones de *Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer* [Esquema explicativo], por *Creative Proteomics*, (<https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>).

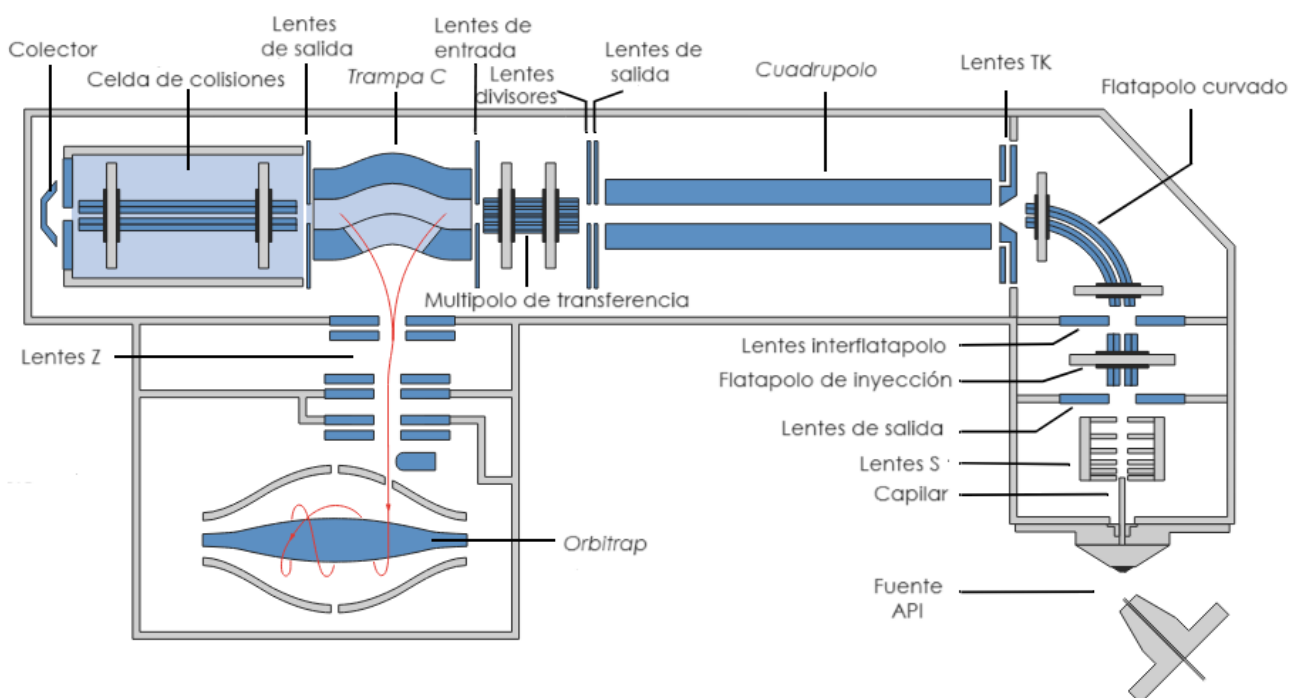
**4.4.2.3 Q-Orbitrap.** El analizador de masas *Q-Orbitrap* combina dos tecnologías avanzadas en espectrometría de masas: un cuadrupolo (Q) y una trampa de iones *Orbitrap*. Esta combinación ofrece una gran versatilidad, confiabilidad y eficiencia en el análisis de muestras complejas. Como se muestra en la **Figura 7**, esta configuración incluye una interfaz de electronebulización, un sistema de lentes, un cuadrupolo, una trampa de iones (*C-Trap*), una celda de disociación por colisión de alta energía (HCD) y un analizador de masas *Orbitrap*. El flatapolo es un arreglo de electrodos que enfoca, acelera, colima y transmite los iones desde la interfaz hasta el cuadrupolo (Q), que, en modo de iones seleccionados (SIM), permite la transmisión y filtración de iones según su  $m/z$ . Los iones ingresan a la *C-Trap*, donde pueden ser directamente enviados al

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

*Orbitrap*, o a la HCD para su fragmentación, y posterior detección en el *Orbitrap* (Thermo Fisher Scientific, 2017).

**Figura 7.**

*Esquema del espectrómetro de masas Q-Orbitrap.*



Nota: Adaptado con modificaciones de *Exactive Series Operating Manual* [Esquema explicativo], por *Thermo Fisher Scientific*, (<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-bre0012255-exactive-series-manbre0012255-en.pdf>, p. 46).

**4.5 Interfaz de ionización**

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite obtener información cualitativa y cuantitativa sobre los analitos presentes en una muestra. Para que estas especies sean detectadas, deben poseer carga, lo que hace esencial la presencia de una fuente de ionización, en donde las moléculas se ionizan, adquiriendo cargas positivas o negativas, y se extraen, según la

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

polaridad de lente extractora. Los iones generados se dirigen al analizador de masas, extraídos y acelerados por el campo, donde se separan y se detectan en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ).

Entre los métodos de ionización se encuentran la ionización con electrones (EI), la ionización con desorción por láser asistida por la matriz (MALDI), el bombardeo con átomos acelerados (FAB) y la ionización química (CI). La técnica que se usó en el presente estudio fue la ionización por electronebulización (ESI).

### ***4.5.1 Interfaz de electronebulización con calentamiento***

La electronebulización ocurrida en la interfaz con calentamiento (HESI) es una técnica empleada para el análisis químico y bioquímico, debido a su capacidad de transferir los iones preformados en solución a la fase gaseosa. Para la electronebulización se usan gases de nebulización y de cortina, lo que mejora significativamente la eficiencia del proceso.

Como interfaz de ionización en espectrometría de masas, HESI supera las limitaciones de otros métodos, como la ionización por electrones (EI), particularmente, en el análisis de compuestos termolábiles, altamente polares, con masa molecular elevada y volatilidad baja. Esta técnica ha ampliado de manera considerable el rango de moléculas que pueden ser ionizadas y analizadas (Wilm, 2011).

En la interfaz HESI, la muestra se disuelve en un eluyente polar y se introduce en el analizador de masas a través de un capilar sometido a un alto voltaje (1-10 kV). Este capilar convierte la solución en una fina niebla de gotas cargadas eléctricamente en su superficie. Un gas auxiliar calentado evapora progresivamente el solvente de las gotas, lo que incrementa la densidad de carga eléctrica en su superficie. A medida que el solvente se evapora, esta densidad de carga

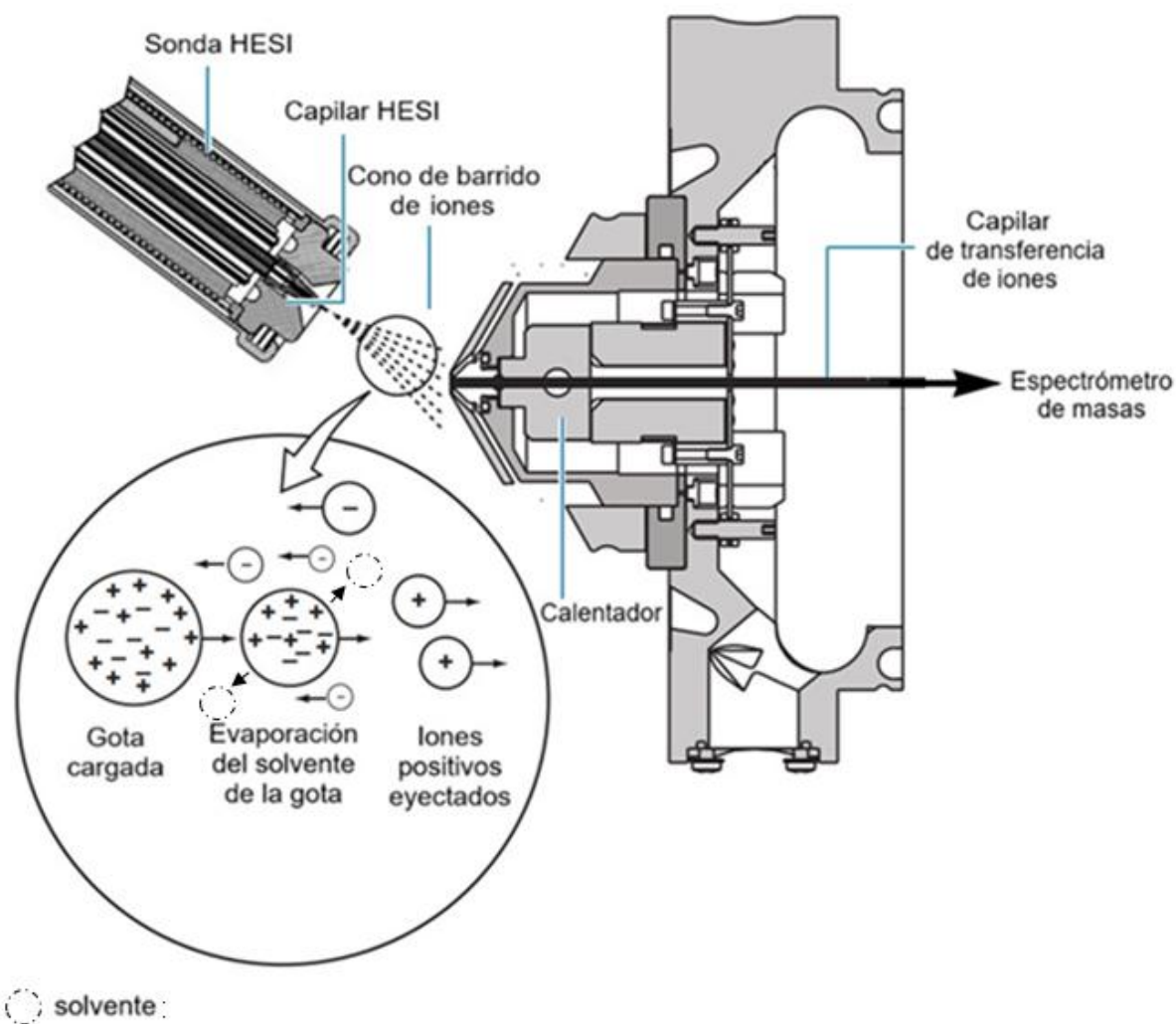
## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

alcanza un punto crítico conocido como el límite de Rayleigh, momento en el que las gotas se fragmentan en otras más pequeñas debido a que la repulsión electrostática supera la tensión superficial. Este proceso se repite varias veces, produciendo gotitas extremadamente pequeñas; la repulsión electrostática alta expulsa los iones de la gota a la fase gaseosa; permitiendo que los iones entren al analizador del espectrómetro de masas (Thermo Fisher Scientific, 2009).

En la **Figura 8**, se ilustra el sistema HESI y el proceso de adquisición de datos en modo de iones positivos.

**Figura 8.**

*Proceso HESI con la adquisición de datos en modo de iones positivos.*



Nota: Adaptado con modificaciones de *HESI Probe User Manual* [Esquema explicativo], por *Thermo Fisher Scientific*, (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/H-ESI-Probe-User.pdf>, p. 2).

#### 4.6 Modos de adquisición de datos

La combinación de los analizadores de masas cuadrupolo (Q) y *Orbitrap*, da lugar a diferentes modos de adquisición de datos (Véase **Figura 10**), los cuales le otorgan al sistema, versatilidad, sensibilidad y diversas aplicaciones analíticas.

Para entender cada modo de adquisición, se deben resaltar algunas características de los analizadores y del sistema completo. El Q tiene la capacidad de transmisión de un rango de masas amplio o estrecho ( $m/z$ ), según la combinación de corriente directa y corriente alterna (**Rf**) empleada, puede dejar pasar un amplio rango de iones (*e.g.*, 60-900 Da), pero también puede funcionar como un filtro de masas que permite filtrar iones con masa nominal preseleccionada.

La *C-Trap*, una trampa de iones captura paquetes de no más de  $10^6$  iones, que puede direccionar a la celda de colisiones HCD, o directamente al analizador *Orbitrap*, donde son detectados. Si los iones ingresan a la HCD, allí se fragmentarán por colisiones con moléculas de nitrógeno, la energía en la celda HCD se puede modificar de 0 a 70 eV, lo que permite aumentar la energía cinética de iones y, por ende, su fragmentación. La energía en la celda HCD se escoge según la estructura de la molécula y su estabilidad. Moléculas con peso molecular alto o moléculas con grado de aromaticidad alto, requieren energías más altas.

El *Orbitrap* funciona como analizador y detector. Los iones oscilan y giran alrededor del electrodo central, la frecuencia de oscilación (eje z) se relaciona con su relación  $m/z$ , que, a través de la transformada de Fourier, se convierte en función del tiempo a un espectro de masas.

#### 4.6.1 *Full scan*

En el modo *full scan* o barrido completo, el Q transmite iones en un rango amplio de  $m/z$ , estos se almacenan en la *C-Trap* hasta acumular un total de un millón de iones, y se dirigen al *Orbitrap*, en donde se detectan y analizan.

#### 4.6.2 *Fragmentación de todos los iones*

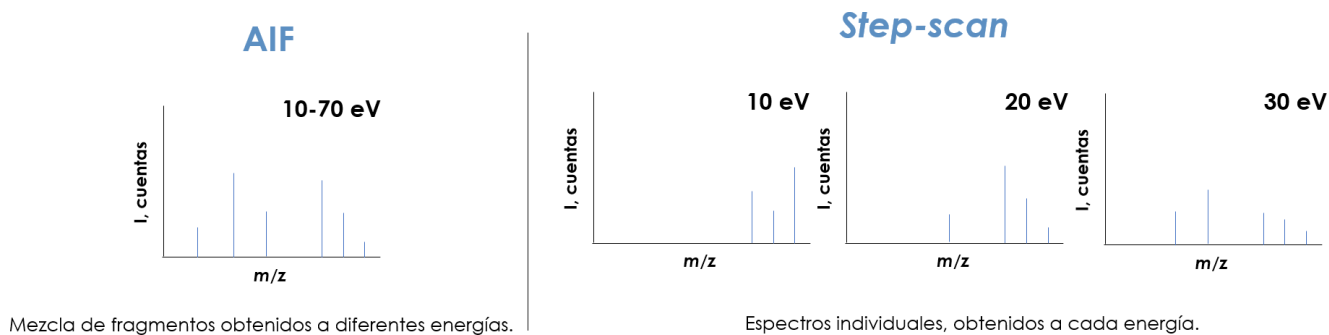
La fragmentación de todos los iones (AIF) es un modo de adquisición de datos que permite obtener mayor información estructural de los analitos. En este modo, el Q permite el paso de iones de rango de  $m/z$  amplio; al pasar por “paquetes” de  $10^6$  iones por la *C-Trap*, estos se dirigen a la celda de colisiones HCD, en donde los iones colisionan con moléculas de nitrógeno, en un campo eléctrico, cuyo potencial varía, promoviendo la fragmentación. Todos los iones, precursores y diversos productos, de la celda HCD se dirigen a la *C-Trap*, de donde se transfieren al *Orbitrap*, para su detección y análisis.

#### 4.6.3 *Step-scan*

El modo de adquisición *step-scan* sigue la misma secuencia que el modo AIF. El cuadrupolo (Q) transmite iones en un rango de  $m/z$  amplio, los cuales llegan en “paquetes” de iones a la *C-Trap*, y luego se dirigen a la celda de colisiones HCD. Sin embargo, a diferencia del modo AIF, en *step-scan* se aplican voltajes específicos de manera escalonada en la celda HCD, permitiendo la adquisición de espectros de masas de forma discreta, individual, para cada energía. De este modo, se obtiene un espectro individual correspondiente a cada energía de celda HCD, en lugar de una mezcla de productos formados a diferentes energías, como ocurre en el modo AIF. La diferencia en los espectros de masas generados por AIF y *step-scan* se ilustra en la **Figura 9**.

**Figura 9.**

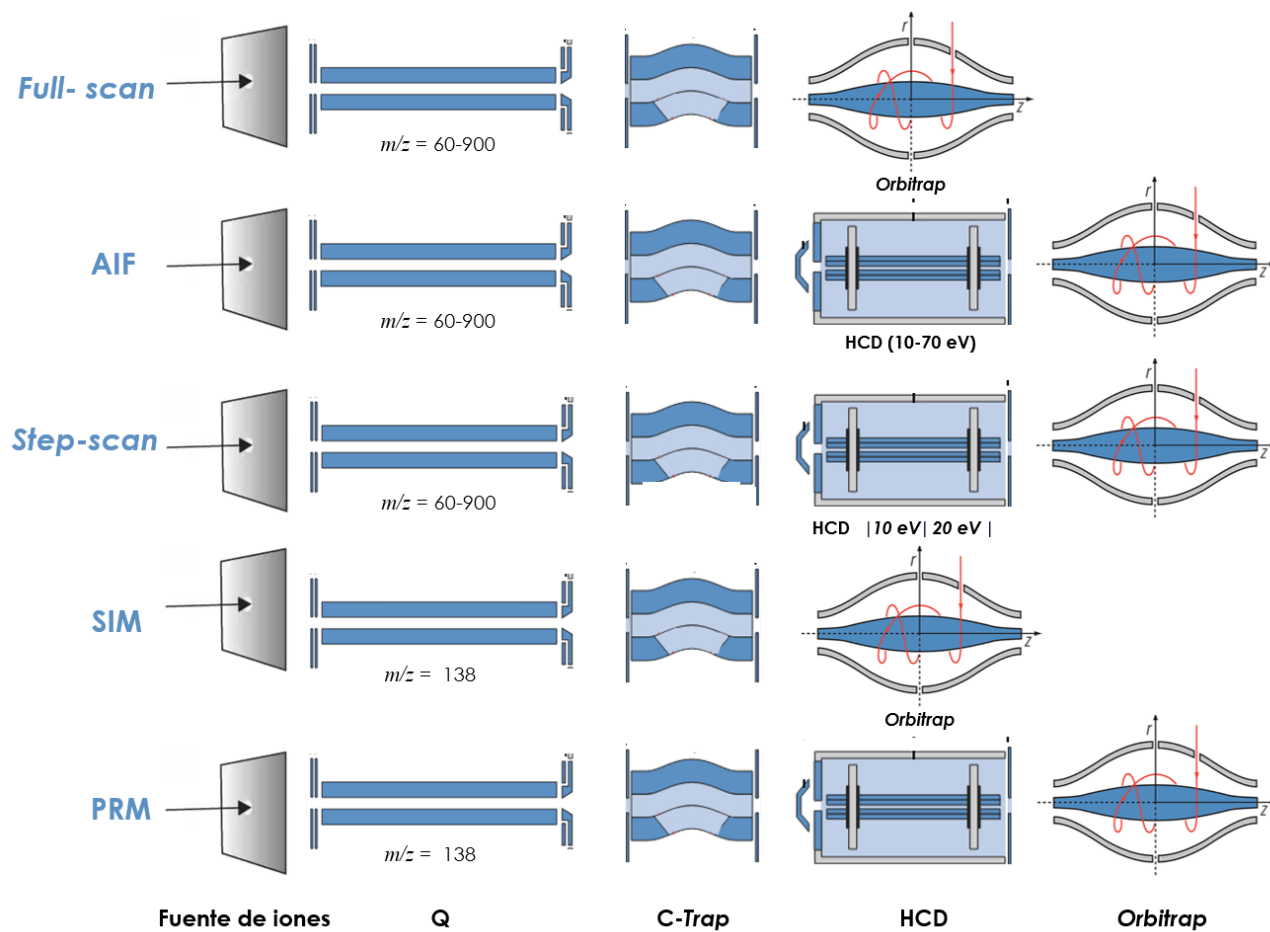
*Espectros de masas obtenidos empleando los modos de adquisición AIF y step-scan.*

**4.6.4 Monitoreo de reacciones paralelas**

El monitoreo de reacciones paralelas (PRM), es un modo de adquisición en donde el Q funciona como un filtro, que permite seleccionar iones con masa nominal determinada, estos iones se acumulan en la *C-Trap*, y se fragmentan en la HCD, retornan a la *C-Trap* y se transfieren al *Orbitrap*, para su detección.

**4.6.5 Monitoreo de iones seleccionados**

El monitoreo de iones seleccionados (SIM) permite filtrar iones con masas particulares, preseleccionadas en el Q. En este modo, se seleccionan independientemente las relaciones  $m/z$  que se desean transmitir, estas se filtran en el Q, se almacenan en la *C-Trap* y, luego, son dirigidas directamente al *Orbitrap*, sin fragmentación en la HCD.

**Figura 10.***Modos de adquisición de datos en el sistema Q-Orbitrap.*

## 5. Estado del Arte

Actualmente, existen diversos métodos de análisis de BA en alimentos, que generalmente, consisten en la extracción de las BA, seguida de su derivatización para mejorar propiedades de analitos como la volatilidad, absorbancia y fluorescencia, según el detector que se va a emplear. La técnica por excelencia para la separación y la detección de aminos es la cromatografía, específicamente, HPLC, técnica que se ha establecido como oficial para el análisis de las BA en diferentes países (*e.g.*, análisis de pescado en Brasil) (Rodríguez *et al.*, 2014). Se emplean, entre otras, las técnicas de separación como la cromatografía de gases (GC), cromatografía de capa fina (TLC), electroforesis capilar (CE), acopladas a detectores como MS, arreglo de diodos (DAD), espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS), espectroscopía de fluorescencia, entre otros (Önal, 2007).

El análisis de las BA en matrices alimenticias, desde el punto de vista analítico, no es sencillo, porque éstas tienen estructuras químicas diferentes (alifáticas, aromáticas, heterocíclicas), y se encuentran en concentraciones bajas. Debido a su polaridad alta, las BA son más afines con el agua que con los solventes orgánicos, empleados generalmente para su extracción; la ausencia o limitación de propiedades fluorescentes o espectroscópicas dificulta también su detección por los métodos de espectrofotometría o de fluorescencia. La complejidad de la matriz alimenticia también representa un reto analítico, debido a las interferencias, por ejemplo, aminoácidos con estructuras similares a los analitos-*target* (Rodríguez *et al.*, 2014).

### 5.1 Extracción

La parte más crítica en el análisis de las BA es la preparación de la muestra. Este proceso busca aislar las BA con una eficiencia alta de extracción de los analitos-*target* de la matriz, libre de interferencias, que no afecten su separación en la columna cromatográfica.

Como método extractivo, frecuentemente se emplea la extracción líquido-líquido (LLE) utilizando un medio ácido, por ejemplo, ácidos clorhídrico (HCl), metanosulfónico (CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H), perclórico (HClO<sub>4</sub>) y tricloroacético (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>).

La eficiencia de extracción de las BA empleando estos ácidos ha sido evaluada. Sin embargo, se presentan diferencias no comparables entre diferentes tipos de matriz, por ejemplo, Ruíz-Capillas *et al.* (2015) reportaron que el ácido tricloroacético (TCA) al 7.5 % fue preferible en la extracción de las BA en pescado; Moret & Conte (1996) indicaron que el ácido clorhídrico al 0.1 M fue una buena opción para el análisis de queso, pero no para pescado o carne, debido a una turbidez generada en la muestra; los autores señalan que el TCA fue preferible para el análisis de pollo, pescado y carne, dada su capacidad de precipitar proteínas. Dadáková *et al.* (2009) señalaron que el ácido perclórico permitió la extracción en una amplia variedad de matrices, pero cuando se trataba de análisis de leche y derivados, con el ácido clorhídrico se lograron mejores resultados.

### 5.2 Derivatización

Las BA son poco volátiles y no tienen de grupos cromóforos; por ende, para emplear detectores espectroscópicos como UV-VIS o de fluorescencia, hay que realizar derivatización, que permita modificar sus propiedades, de tal forma que sean sensiblemente detectables. Algunos

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

agentes derivatizantes empleados son cloruro de benzoilo y cloruro de dansilo, para la detección por UV-VIS, así como el *o*-ftalaldehído (OPA) y éster de N-hidroxisuccinimida para la detección por fluorescencia. Sin embargo, los derivados de OPA son muy inestables y los derivados del cloruro de benzoilo presentan tiempos de elución de columna muy largos en el sistema GC (de la Torre & Conte, 2018).

Para disminuir la polaridad y la reactividad de la BA y aumentar su volatilidad, deseable para el análisis por GC, se llevan a cabo, reacciones de acilación, sililación y la formación de derivados de carbamato (Płotka-Wasyłka *et al.*, 2015).

### 5.3 Separación y análisis

La técnica más empleada en la separación de aminas biogénicas en alimentos es HPLC, y su acople con el sistema de detección de espectrometría de masas presenta muy buenos resultados.

La selectividad alta que provee más de un analizador de MS se emplea en la detección de aminas biogénicas en alimentos. Mazzotti *et al.*(2014) reportaron el uso de triple cuadrupolo (QqQ) como analizador tándem MS/MS, con ionización por electronebulización con calentamiento (HESI), operado en modo positivo, con adquisición de datos, usando monitoreo de reacciones múltiples (MRM) para la detección de las BA en su forma derivatizada.

Zhang *et al.* (2021) establecieron un método para la determinación de seis BA sin derivatización por HPLC-MS/MS, empleando un sistema QqQ en modo MRM, en diferentes muestras alimenticias, entre ellas, carnes fermentadas, vegetales, productos a base de soya, pescado y licor.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Sirocchi *et al.* (2014) usaron HPLC-MS/MS en modo MRM para detectar diez BA sin derivatización. Para cada BA, se empleó la molécula protonada como el ion precursor  $[M+H]^+$ , y la especie generada tras la pérdida de amoniaco  $[(M+H)-NH_3]^+$ , como producto. Se comparó el desempeño del QqQ y de la trampa de iones (IT) en la detección de las aminas; los resultados indicaron que el QqQ fue una mejor opción en términos de sensibilidad y selectividad.

Romero *et al.* (2012) desarrollaron una metodología para la detección de cuatro aminas biogénicas y tres aminas volátiles en anchoas, sin derivatización. Se empleó UHPLC-MS/MS, usando triple cuadrupolo QqQ. Como ion precursor se escogió el ion pico de base, que, para las aminas bajo estudio, correspondía a la molécula protonada  $[M+H]^+$ , y, como ion para cuantificación se usó el ion-producto  $[(M+H)-NH_3]^+$ . Adicionalmente, se analizaron otros iones-producto, con fines confirmatorios.

Jia *et al.* (2020) analizaron los efectos de las especias sobre el contenido de aminas biogénicas en salchichas fermentadas de cordero, empleando HPLC-Q-Orbitrap, usando los modos de adquisición de fragmentación  $MS^2$  dependiente de los datos (dd- $MS^2$ ), adquisición variable independiente de los datos (vDIA) y adquisición múltiple independiente de los datos (mDIA).

Con respecto a los avances en la detección de las BA, la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), se posiciona como una de las herramientas más apropiadas para el análisis de alimentos, porque garantiza la identificación no ambigua y confirmatoria de especies-*target*. Se resaltan la capacidad analítica, la sensibilidad y la selectividad de la espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrónica con transformada de Fourier (FTICR), así como analizadores Orbitrap, los cuales llegan a tener una resolución de hasta 500.000-1.000.000, y una exactitud de medición de masas menor de una  $\Delta$  ppm (Sentellas *et al.*, 2016).

## 6. Metodología

### 6.1. Ensayos preliminares y determinación de las condiciones en el sistema

#### 6.1.1 *Análisis por inyección en flujo*

Los ensayos y análisis por inyección en flujo (FIA) se realizaron, utilizando un sistema Q *Exactive Plus-Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania), equipado con una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II). Como gas secante y gas nebulizador se empleó nitrógeno (pureza > 99 %), generado en un sistema NM32LA (*Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido).

Para el ensayo FIA, se prepararon soluciones estándar de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, a una concentración de 10 mg/L, disueltas en una mezcla (50:50 v/v) de formiato de amonio 5 mM con 0.1 % v/v de ácido fórmico en agua y metanol. Este análisis tuvo como objetivo obtener información preliminar sobre el modo de ionización, los patrones de fragmentación de estas especies y las energías a emplear en la celda HCD (*Higher-Energy Collision Dissociation*) para los ensayos con muestras reales. Las condiciones y parámetros instrumentales empleados se presentan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.**

*Condiciones y parámetros instrumentales empleados en el análisis por inyección en flujo (FIA) de patrones de BA, a 10 mg/L, en un sistema HESI-Q-Orbitrap-HRMS.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Modo de adquisición	<i>Full scan y step-scan</i>
Modo de ionización	Iones positivos y negativos
Voltaje del capilar (ESI)	2.5 kV
Temperatura del capilar	320 °C
Temperatura del gas nebulizador	350 °C
Flujo del gas de secado	40 UA
Flujo del gas auxiliar	10 UA
Energía HCD	10, 20, 30, 40 eV
Rango de $m/z$	60-900 u

### **6.1.2 Determinación del voltaje del capilar**

Se prepararon soluciones estándar de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, a una concentración de 1 mg/L, en una mezcla (50:50 v/v) de formiato de amonio 5 mM con 0.1 % v/v de ácido fórmico en agua y metanol. Estas soluciones se analizaron mediante un sistema UHPLC Vanquish™ (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), que cuenta con una unidad de desgasificación, una bomba binaria de gradiente, un automuestreador (10 °C) y un compartimento de columna termostataado (40 °C). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (*Agilent Technologies* AT, Santa Clara, CA, EE. UU.).

El sistema UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas Q *Exactive Plus-Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania), equipado con una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II). Durante el análisis, se evaluaron diferentes voltajes de extracción del capilar para determinar el valor que proporcionara la intensidad más alta de las BA protonadas y sus productos. Las condiciones y parámetros instrumentales empleados se detallan en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.**

*Condiciones y parámetros instrumentales empleados en la determinación del voltaje de extracción del capilar en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Dimensiones de la columna	50 mm × 2.1 mm I.D. × 1.8 μm tamaño de partícula
Temperatura de la columna	40 °C
Fase móvil A	H <sub>2</sub> O (0.1 % HCOOH + 5 mM HCOONH <sub>4</sub> )
Fase móvil B	MeOH (0.1% HCOOH + 5mM HCOONH <sub>4</sub> )
Caudal de fase móvil	300 μL/min
Modo de ionización	Iones positivos
Modo de adquisición	<i>Full scan</i>
Voltaje del capilar (ESI)	1, 2, 3, 4, 5 kV
Temperatura del capilar	320 °C
Gas secante y nebulizador	Nitrógeno
Temperatura del gas nebulizador	350 °C
Volumen de inyección	2 μL
Rango de <i>m/z</i>	60-900 u

### **6.1.3 Determinación de la energía en la celda de colisiones**

Se preparó una mezcla de estándares de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, a una concentración de 1 mg/L, en una mezcla (50:50 v/v) de formiato de amonio 5 mM con 0.1 % v/v de ácido fórmico en agua y metanol. Esta mezcla se analizó por un sistema UHPLC Vanquish™ (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas *Q Exactive Plus-Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania), cuyas especificaciones fueron descritas en la **Sección 6.1.1**. Se evaluaron distintas energías en la celda HCD para determinar las condiciones que ofrecieran la intensidad más alta (corriente iónica) de las BA protonadas y sus productos. Las condiciones y parámetros empleados se resumen en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.**

*Condiciones y parámetros instrumentales empleados en la determinación de la energía de colisión en la HCD en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Columna	Zorbax Eclipse XDB C <sub>18</sub> (AT, CA, Santa Clara, EE. UU.)
Dimensiones de la columna	50 mm × 2.1 mm I.D. × 1.8 μm tamaño de partícula
Temperatura de la columna	40 °C
Fase móvil A	H <sub>2</sub> O (0.1 % HCOOH + 5 mM HCOONH <sub>4</sub> )
Fase móvil B	MeOH (0.1% HCOOH + 5mM HCOONH <sub>4</sub> )
Caudal de la fase móvil	300 μL/min
Modo de ionización	Iones positivos
Modo de adquisición	Monitoreo de reacciones paralelas (PRM)
Voltaje del capilar (ESI)	2 kV
Temperatura del capilar	320 °C
Gas nebulizador y secante	Nitrógeno
Temperatura del gas nebulizador	350 °C
Energía HCD	10, 15, 20 eV
Volumen de inyección	2 μL

#### **6.1.4 Determinación del gradiente cromatográfico UHPLC**

Se evaluaron cuatro gradientes cromatográficos en el sistema UHPLC Vanquish™ (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), acoplado a un espectrómetro de masas Q *Exactive Plus-Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania), cuyas especificaciones se describieron previamente en la **Sección 6.1.1**. El análisis de la mezcla de BA (1 mg/L) se llevó a cabo en modo de adquisición de corrientes iónicas *full scan* (HCD = 0 eV), manteniéndose las demás condiciones instrumentales presentadas en la **Tabla 8**. La fase móvil A fue 5 mM de HCOONH<sub>4</sub> con 0.1% v/v de HCOOH en agua, y la fase móvil B, la misma composición en metanol. Los gradientes cromatográficos, detallados en la **Tabla 9**, se evaluaron para determinar su influencia sobre el

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

tiempo de retención ( $t_R$ ), la forma y la simetría de los picos cromatográficos de cada BA.

**Tabla 9.**

*Gradientes empleados en el sistema cromatográfico UHPLC.*

Tiempo, min	Fase B (5 mM HCOONH <sub>4</sub> + 0.1% v/v HCOOH en MeOH), % Gradiente*			
	1	2	3	4
0	0.0	50	75	100
8	100	10	10	10
12	100	10	10	10
13	0.0	50	75	100
20	0.0	50	75	100

\*Fase A (5 mM HCOONH<sub>4</sub> + 0.1% v/v HCOOH en H<sub>2</sub>O) = 100 - % Fase B

### 6.1.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada de espectrometría de masas

Soluciones estándar de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina se prepararon a una concentración de 1000 mg/L, en metanol. Estas soluciones se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) en un sistema GC 6890 con detector selectivo de masas Q (MSD 5973, AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), con ionización electrónica (EI), a 70 eV. Para la separación cromatográfica se empleó una columna apolar DB-5MS (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.) con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La programación de temperatura del horno inició en 50 °C (5 min) hasta 150 °C (7 min), a 4 °C/min; luego, hasta 230 °C (por 40 min), a 4 °C/min. Los demás parámetros del sistema GC/MS se detallan en la

**Tabla 10.**

**Tabla 10.**

*Condiciones y parámetros instrumentales empleados para el análisis por GC/MS de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina.*

<b>Parámetros</b>	<b>Especificaciones</b>
Dimensiones de la columna	60 m × 0.25 mm, D.I. × 0.25 μm, d <sub>f</sub>
Gas de arrastre	Helio
Flujo (constante)	1.0 mL/min
Volumen de inyección	2 μL
Modo de inyección	<i>Split</i> (5:1)
Temperatura del inyector	250 °C
Temperatura de la cámara de ionización	230 °C
Temperatura del cuadrupolo	150 °C
Rango de <i>m/z</i>	45-450 u
Velocidad de adquisición	3.58 scans/s

## 6.2 Determinación del método de extracción

### 6.2.1 *Dispersión de la matriz en fase sólida*

La extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) se realizó, usando gel de sílice C<sub>18</sub> en una relación 4:1 con respecto al material estudiado (*e.g.*, atún enlatado). Se pesaron 2 g de C<sub>18</sub> y 0.5 g de atún, los cuales se maceraron durante cinco minutos antes de ser transferidos a un cartucho. Posteriormente, la mezcla se compactó y se eluyó con 5 mL de solvente. Se emplearon tres solventes diferentes: metanol, acetonitrilo y acetato de etilo. Los extractos se concentraron mediante una corriente de nitrógeno. Estos se pesaron y reconstituyeron en 2 mL de una mezcla (50:50 v/v) de formiato de amonio 5 mM con 0.1 % v/v de ácido fórmico en agua y metanol. La solución se centrifugó a 6000 rpm durante diez minutos, se filtró y se transfirió a un frasco de análisis para su inyección al sistema UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, operado según las condiciones descritas en la **Tabla 11**.

### 6.2.2 Extracción líquido-sólido

**6.2.2.1 Determinación de aminas biogénicas en atún enlatado.** Se pesaron 5 g de atún enlatado, comprado en un supermercado local, en un tubo Falcon de 50 mL, se añadieron 12 mL de la mezcla (50:50 v/v) de formiato de amonio 5 mM con 0.1 % v/v de ácido fórmico en agua y metanol; la mezcla se agitó durante cinco minutos y se centrifugó a 6000 rpm durante diez minutos; luego, el sobrenadante se recolectó y se filtró, y se transfirió a un balón de 25 mL y se aforó con la mezcla de agua y metanol descrita previamente.

La solución (5 mL) se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante diez minutos, y se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante. Esta alícuota se filtró y se trasladó a un frasco de análisis para su inyección al sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, cuyas condiciones se especifican en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.**

*Parámetros y condiciones operacionales empleados en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS para el análisis de BA en muestras reales.*

Parámetros	Especificaciones
Columna	Zorbax Eclipse XDB C <sub>18</sub> (AT, Santa Clara, CA, EE. UU.)
Dimensiones de la columna	50 mm, 2.1 mm I.D., 1.8 μm tamaño de partícula
Temperatura de la columna	40 °C
Fase móvil A	H <sub>2</sub> O (0.1 % HCOOH + 5 mM HCOONH <sub>4</sub> )
Fase móvil B	MeOH (0.1% HCOOH + 5mM HCOONH <sub>4</sub> )
Modo de ionización	Iones positivos
Modo de adquisición	Monitoreo de iones seleccionados (SIM)
Voltaje del capilar (ESI)	2 kV
Temperatura del capilar	320 °C
Gas nebulizador y secante	Nitrógeno
Temperatura del gas nebulizador	350 °C
Volumen de inyección	2 μL

**6.2.2.2 Determinación de la eficiencia de extracción.** Se determinó la eficiencia de la extracción líquido-sólido (LSE) utilizando margarina como matriz de blanco. Esta elección se realizó porque no se encontró una matriz de pescado o queso libre de trazas de las cuatro BA de interés (blanco).

Para el procedimiento, se empleó margarina comercial, adquirida en un supermercado local. Se pesaron 5 g a temperatura ambiente en un tubo Falcon de 50 mL. Luego, la muestra se llevó a un baño de agua caliente hasta su completa fundición. Una vez en estado líquido, se enriqueció con las cuatro BA en concentraciones de 100 µg/kg, 200 µg/kg y 500 µg/kg. Posteriormente, la mezcla se agitó en un vórtex durante 5 min y se dejó solidificar, primero, a temperatura ambiente, y luego en refrigeración a -18 °C durante 12 h.

Transcurrido este tiempo, las muestras se retiraron de la nevera, y una vez alcanzaron la temperatura ambiente, se les realizó la extracción LSE ilustrada en la **Figura 11**. Luego, se analizaron en el sistema HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, según las condiciones presentadas en la **Tabla 11**.

## **6.3 Preparación de las muestras de mojarra y queso**

### **6.3.1 Obtención de las muestras**

Los productos de mojarra y queso se adquirieron en la plaza de mercado de Bucaramanga, donde se encontraban comercializados de manera artesanal sin etiquetado que indique marca, fecha de fabricación o número de lote. Esta condición es común en la venta de productos pesqueros y lácteos en mercados locales. Las muestras de mojarra se adquirieron en la plaza de mercado de Bucaramanga, Santander, y se transportaron inmediatamente al laboratorio, donde se procesaron y homogeneizaron. Se tomaron cinco gramos de cada muestra, que se depositaron en tubos Falcon

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

de 50 mL, identificados según los días de almacenamiento planificados (0, 3, 5, 8 y 10 días). Posteriormente, las muestras se almacenaron en una nevera marca Indufrial a una temperatura de 1- 4 °C. Las muestras de queso también se adquirieron en la plaza de mercado de Bucaramanga, Santander, y se transportaron de inmediato al laboratorio, donde fueron procesadas y homogeneizadas. Se tomaron cinco gramos de cada tipo de queso, que se depositaron en tubos Falcon de 50 mL para proceder con su extracción.

### **6.3.2 Extracción de las muestras**

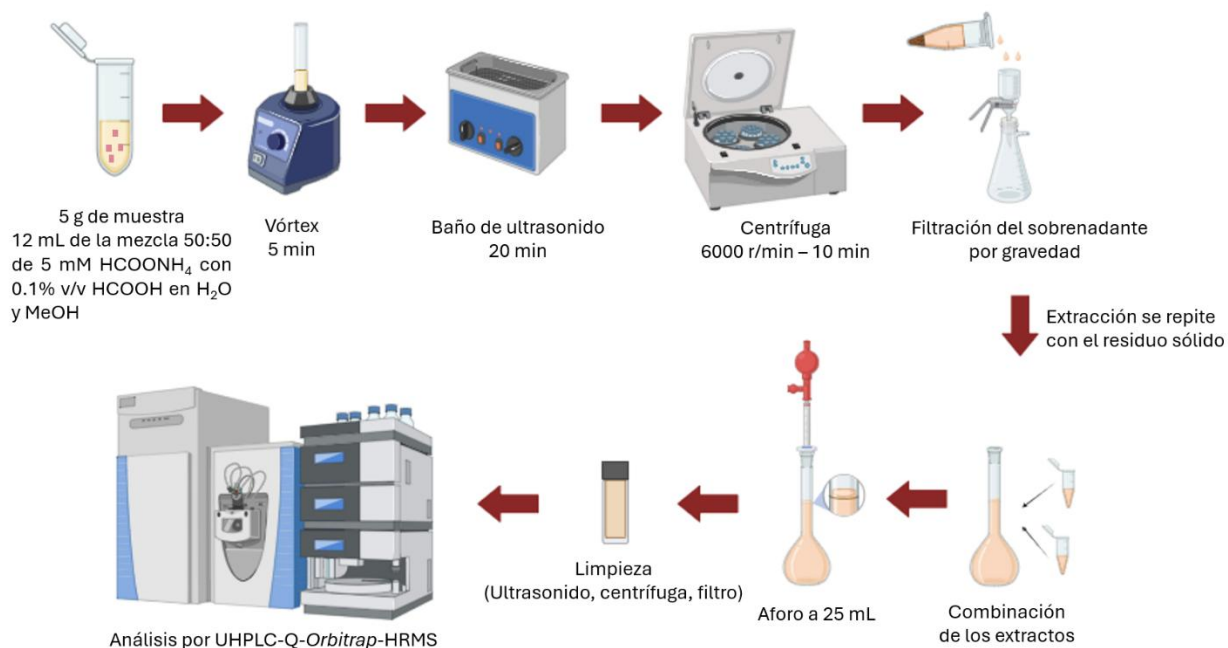
A los 5 g de muestra en el tubo Falcon se le añadieron 12 mL de una mezcla en proporción 50:50 de la fase móvil A (5 mM de formiato de amonio con 0.1% de ácido fórmico en agua) y la fase móvil B (5 mM de formiato de amonio con 0.1% de ácido fórmico en metanol). La mezcla se agitó durante cinco minutos en un agitador de vórtice MX-S (*DLAB Scientific*, Riverside, CA, EE. UU.), luego, se llevó a un baño de ultrasonido *Elmasonic S15H* (Singen, Alemania) durante 20 min y se centrifugó a 6000 rpm durante diez minutos. Posteriormente, el sobrenadante se filtró por gravedad y se repitió el proceso de extracción con el residuo sólido restante. Los extractos obtenidos se combinaron en un balón aforado de 25 mL, completando el volumen con la mezcla de extracción.

Finalmente, se tomó una alícuota de la solución en un tubo cónico de 2 mL, se sonicó durante cinco minutos, se centrifugó a 6000 rpm durante diez minutos y se filtró en un vial para su análisis por UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS, esta solución fue diluida en factores de dilución (FD) entre uno y nueve (Véanse **Apéndices, Tabla A 5**). La metodología de la extracción se ilustra en la **Figura 11**.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 11 .**

*Esquema de la metodología empleada para la extracción y análisis de las BA en pescado y queso.*

**6.4 Análisis por UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS**

El sistema UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS (*Thermo Scientific, Vanquish, Germering, Alemania*) se empleó para el análisis, usando la columna Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (AT, Santa Clara, CA, EE.UU) para la separación cromatográfica de los analitos.

La ionización de los analitos se realizó en la interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), usando modo de iones positivos. El monitoreo selectivo de iones (SIM) permitió la identificación y la cuantificación de las BA; los iones empleados para cada BA se reportan en la **Tabla 12**; los parámetros operacionales del sistema se especificaron en la **Tabla 11**, en la **Sección 6.2.2**.

**Tabla 12.**

*Iones empleados para la detección y la cuantificación por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en pescado y queso.*

<b>Compuesto</b>	<b>Ion precursor [M+H]<sup>+</sup>, m/z</b>	<b>Fragmento [(M+H)-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, m/z</b>
Cadaverina	103.12297	86.09642
Putrescina	89.10732	72.08077
Histamina	112.08692	95.06037
Tiramina	138.09134	121.06479

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Ensayos preliminares

#### 7.1.1 *Análisis por inyección en flujo*

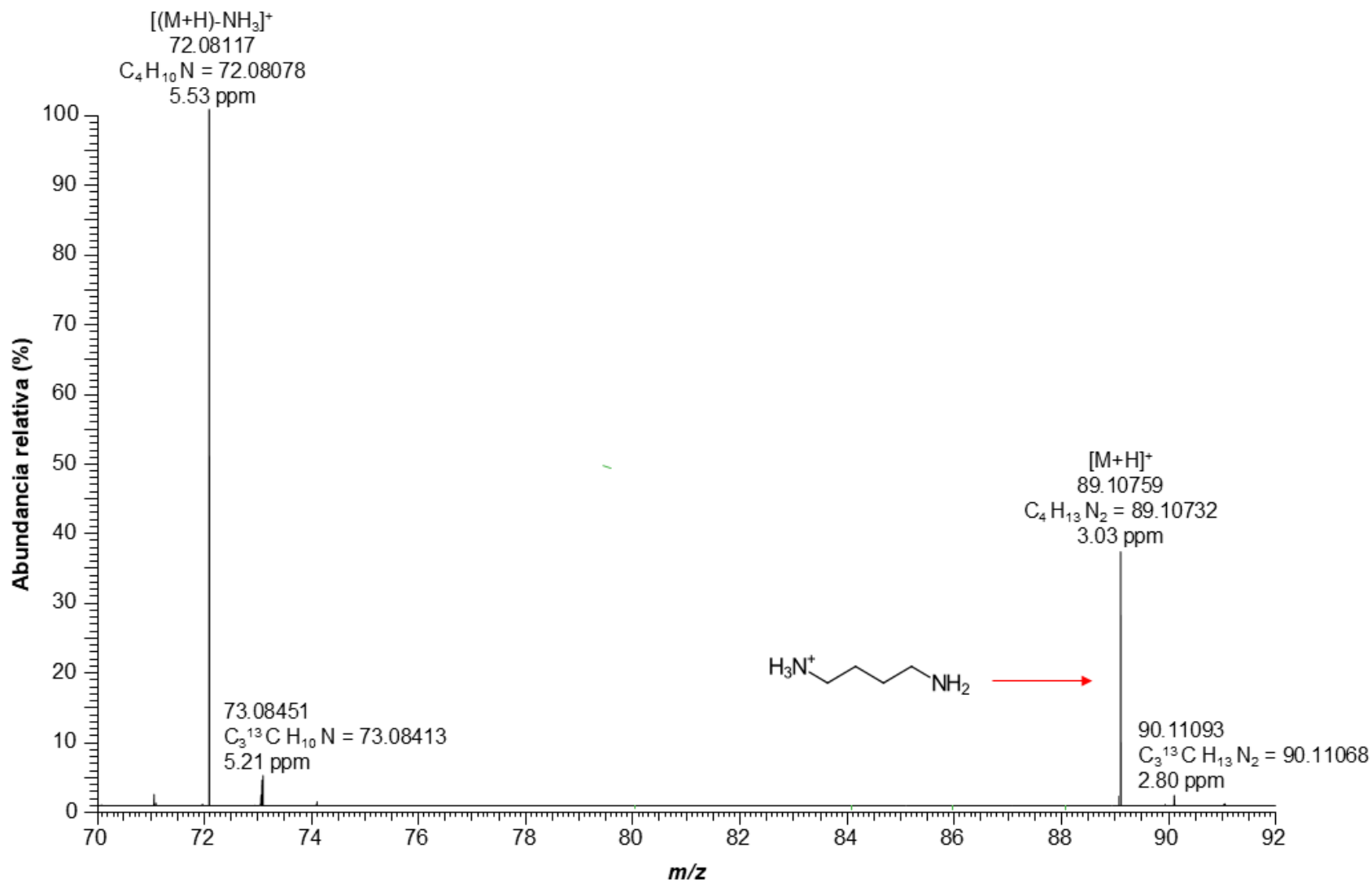
**7.1.1.1 Adquisición en modo *full scan*.** Este ensayo permitió escoger el modo de ionización de las BA, confirmando que estas sustancias se detectan exclusivamente en modo de ionización de iones positivos. Adicionalmente, se obtuvo información detallada sobre sus espectros de masas. Al utilizar una interfaz de electronebulización con calentamiento (HESI-II), que es un método de ionización suave, y operar en modo de adquisición *full scan*, se esperaba detectar principalmente moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y aductos, sin una fragmentación significativa. Sin embargo, en los espectros de masas de las BA bajo estudio se observó la predominancia de un fragmento característico atribuido a la pérdida de una molécula de amoníaco ( $-NH_3$ ). En particular, en los espectros de masas de la putrescina, cadaverina y tiramina (**Figuras 12-14**), predominaron estos fragmentos  $[(M+H)-NH_3]^+$  sobre las moléculas protonadas  $[M+H]^+$ . Este comportamiento se debe al peso molecular bajo y estructura de estas especies, que, a las temperaturas operativas altas del sistema, presentan procesos de desaminación.

En este estudio, los criterios de identificación incluyeron la masa exacta de las sustancias, con un valor de  $\Delta$ ppm aceptable, junto con su composición elemental, la relación isotópica y el patrón de fragmentación, el cual debía concordar con la estructura y la fórmula elemental. Los espectros de masas obtenidos en modo *full scan* para cada una de las aminas biogénicas se presentan en las **Figuras 12-15**, mientras que la información correspondiente a su patrón isotópico se detalla en la **Tabla 13**.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 12.**

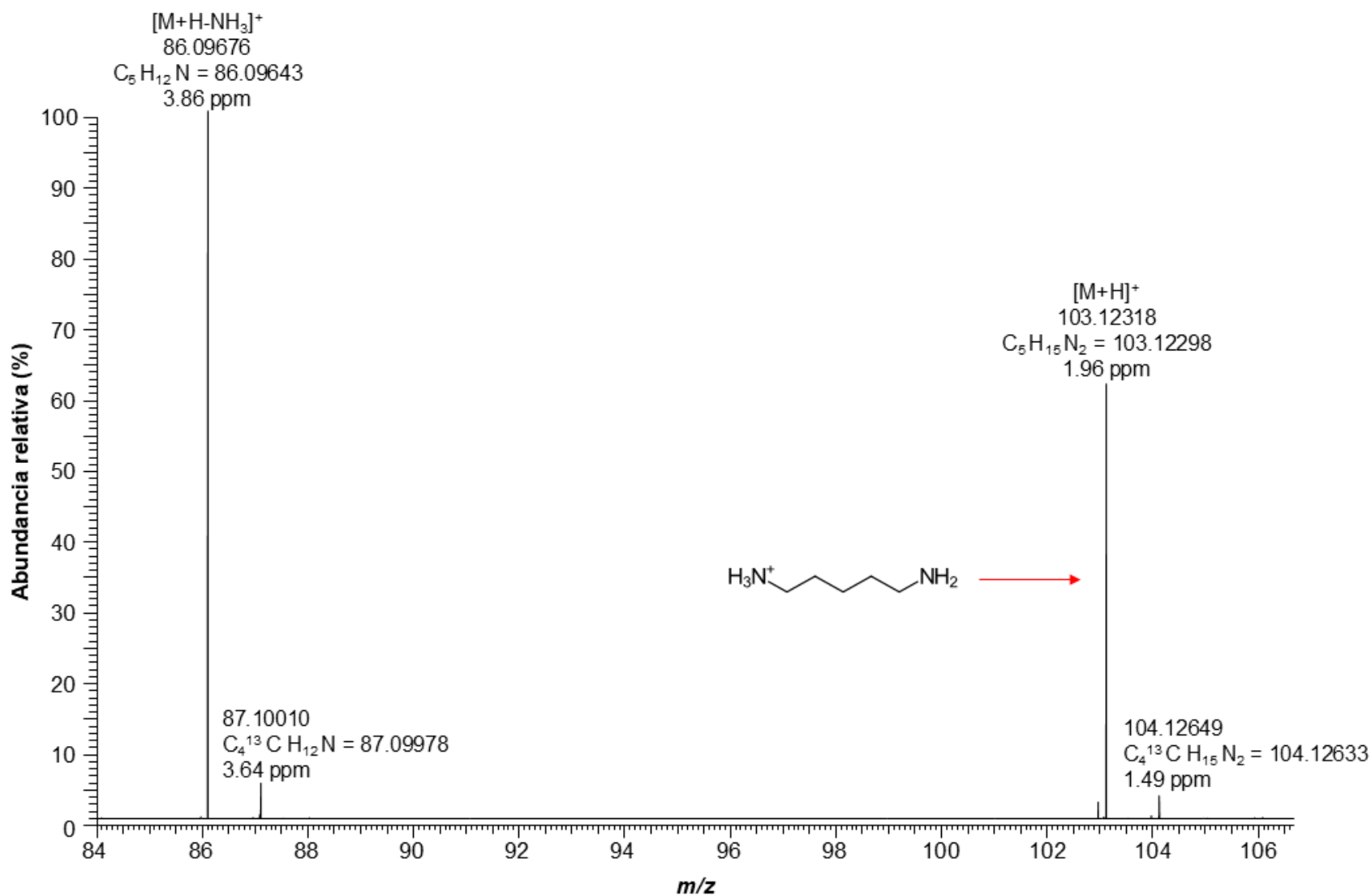
*Espectro de masas de la putrescina obtenido por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas full scan.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 13.**

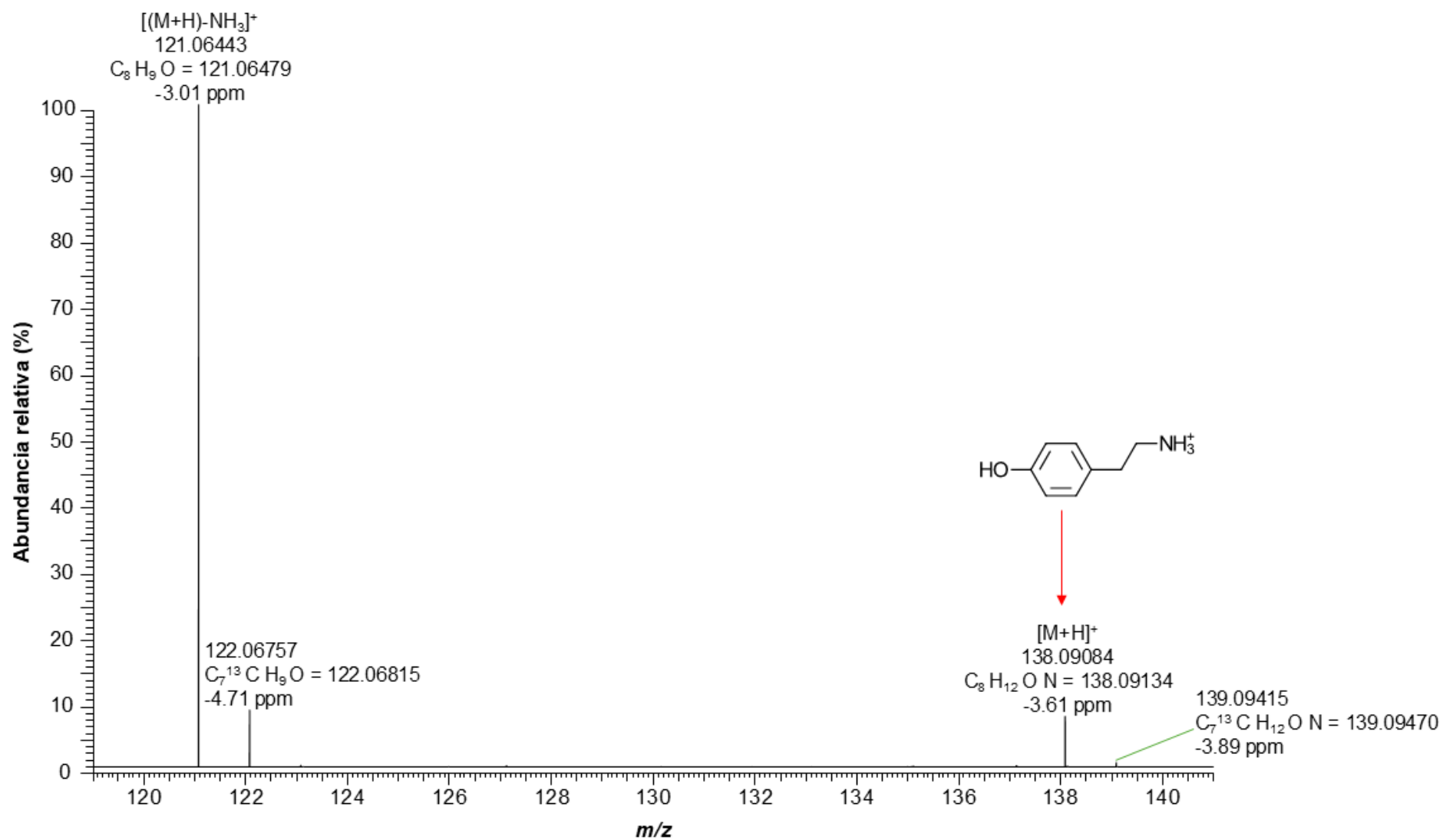
*Espectro de masas de la cadaverina obtenido por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas full scan.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 14.**

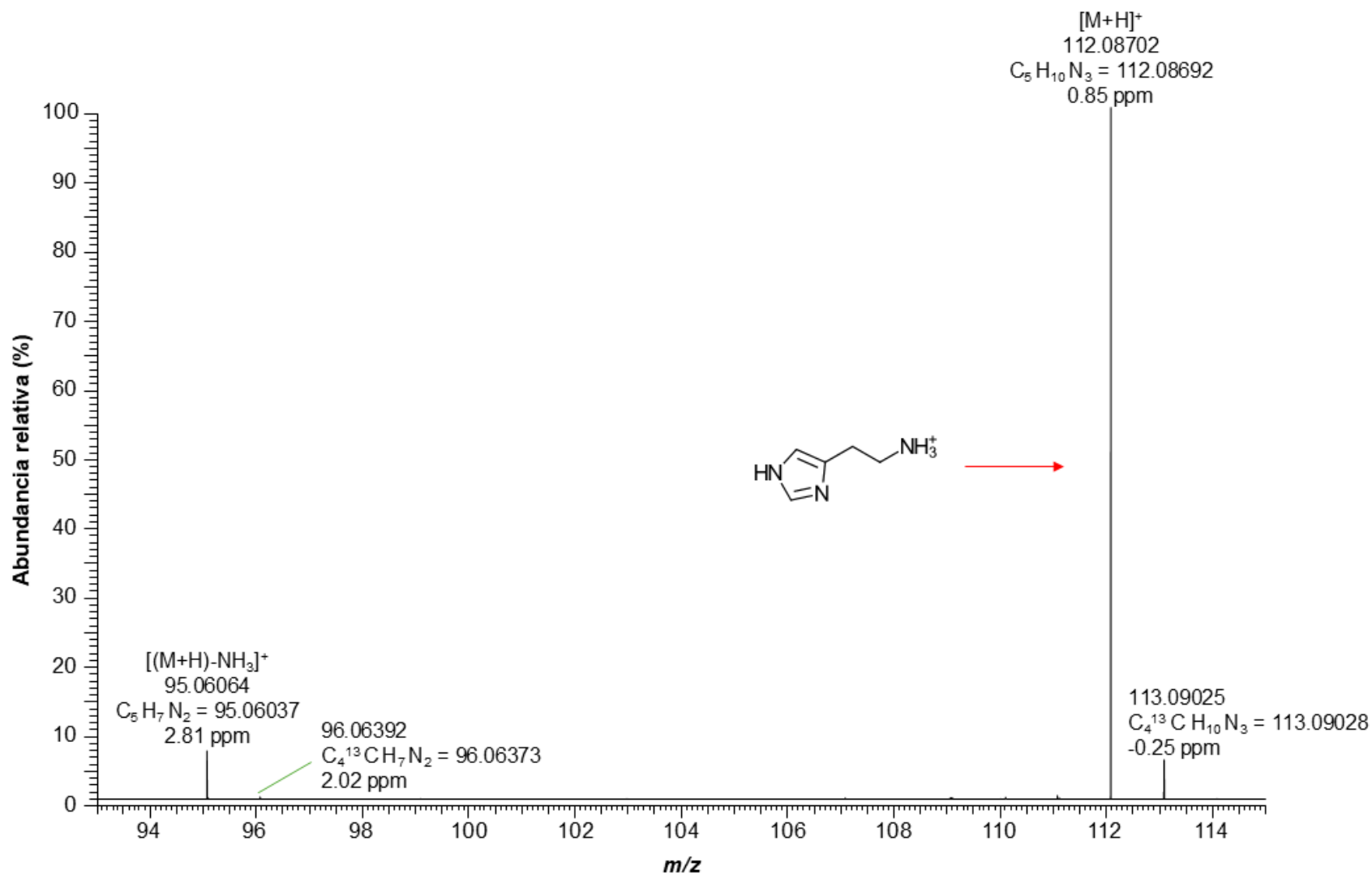
*Espectro de masas de la tiramina obtenido por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas full scan.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 15.**

Espectro de masas de la histamina obtenido por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas full scan.



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Tabla 13.**

*Relaciones isotópicas determinadas para la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas full scan.*

Compuesto	Ion	Fórmula	Intensidad, cuentas	m/z		Relación isotópica, %		Exactitud, Δppm
				Experimental	Teórica	Experimental	Teórica	
Putrescina	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub>	7011135.5	89.10759	89.10732	100	100	3.03
		C <sub>3</sub> <sup>13</sup> C H <sub>13</sub> N <sub>2</sub>	295139.1	90.11093	90.11068	4.21	4.33	2.80
	[(M+H)-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N	19207314	72.08117	72.08078	100	100	5.53
		C <sub>3</sub> <sup>13</sup> C H <sub>10</sub> N	831174.4	73.08451	73.08413	4.33	4.33	5.21
Cadaverina	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub>	7281005	103.12318	103.12297	100	100	1.96
		C <sub>4</sub> <sup>13</sup> C H <sub>15</sub> N <sub>2</sub>	383596	104.12648	104.12633	5.27	5.40	1.49
	[(M+H)-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N	12762317	86.09675	86.09642	100	100	3.86
		C <sub>4</sub> <sup>13</sup> C H <sub>12</sub> N	657847.9	87.10009	87.09978	5.15	5.40	3.64
Histamina	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	157104944	112.08702	112.08692	100	100	0.85
		C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> <sup>15</sup> N	1724746.3	113.08402	113.08396	1.10	1.09	0.54
		C <sub>4</sub> <sup>13</sup> C H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	8941142	113.09025	113.09028	5.69	5.40	-0.25
		C <sub>3</sub> <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	186366.9	114.09352	114.09363	0.12	0.12	-1.02
	[(M+H)-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>	10436228	95.06064	95.06037	100	100	2.81
		C <sub>4</sub> <sup>13</sup> C H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>	523237.8	96.06392	96.06372	5.01	5.40	2.02
Tiramina	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O N	2325729.8	138.09083	138.09134	100	100	-3.61
		C <sub>7</sub> <sup>13</sup> C H <sub>12</sub> O N	208516.9	139.09415	139.09469	8.96	8.65	-3.89
	[(M+H)-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O	29422696	121.06442	121.06479	100	100	-3.10
		C <sub>7</sub> <sup>13</sup> C H <sub>9</sub> O	2539969	122.06756	122.06815	8.63	8.65	-4.71
		C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> <sup>18</sup> O	53485.8	123.06854	123.06903	0.18	0.2	-4.07
		C <sub>6</sub> <sup>13</sup> C <sub>2</sub> H <sub>9</sub> O	87939.1	123.07093	123.0715	0.30	0.33	-4.67

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

En modo de adquisición de corrientes iónicas *full scan*, se observó que el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  fue pico de base en el espectro de masas de la putrescina, la cadaverina y la tiramina. Este comportamiento se atribuyó a la temperatura alta en la interfaz HESI, suficiente para inducir la desaminación de estas especies. Por el contrario, en el espectro de masas de la histamina se detectó un perfil de fragmentación distinto, y el pico de base correspondió a la molécula protonada  $[M+H]^+$ .

Esta diferencia puede explicarse desde una perspectiva estructural, debido a la presencia del anillo imidazol en la histamina. Este anillo se estabiliza mediante resonancia, a través de la deslocalización de la carga positiva en los átomos de nitrógeno, lo que confiere una mayor estabilidad del ion  $[M+H]^+$  y su resistencia a la fragmentación; las demás moléculas, como la putrescina y la cadaverina, son diaminas alifáticas que carecen de esta posibilidad de estabilización, ya que no presentan estructuras aromáticas ni heterocíclicas. Algunos autores sugieren que, tras la pérdida de amoníaco (favorecida por las temperaturas altas en el sistema), la putrescina y la cadaverina pueden ciclarse para formar pirrolidina y piperidina protonadas, respectivamente (Al Bulushi *et al.*, 2009; Poupin *et al.*, 1999), estructuras cíclicas más estables en comparación con el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  en su forma lineal.

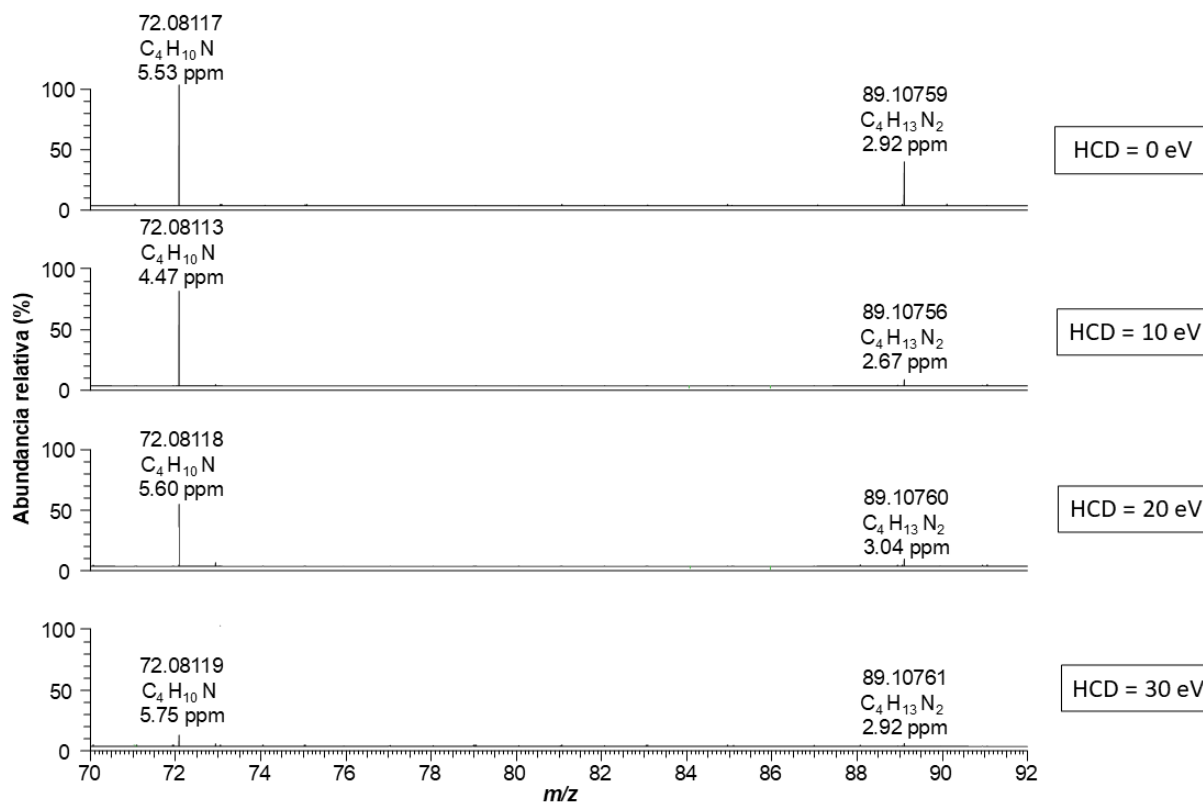
En el caso de la tiramina, al igual que en los espectros de masas de la putrescina y la cadaverina, se observa una predominancia del fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  sobre el ion  $[M+H]^+$ . Sin embargo, no se encontraron estudios que describan los posibles reordenamientos estructurales de esta molécula tras la pérdida de amoníaco. Se sugiere que la estructura aromática de la tiramina, junto con la presencia del grupo hidroxilo en el anillo, podría favorecer a una redistribución electrónica, estabilizando el ion resultante y aumentando su abundancia en el espectro de masas.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**7.1.1.2 Variación de la energía de la HCD en modo de adquisición *step-scan*.** Al variar la energía en la celda de colisiones activadas (10, 20, 30, 40 eV) y usando el modo de adquisición de corrientes iónicas *step-scan*, se observó que energías mayores de 20 eV son demasiado altas para la fragmentación de estas moléculas de bajo peso molecular. Al emplear valores superiores a 20 eV en la HCD, se extingue la señal de la molécula protonada  $[M+H]^+$  y solo se observa el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  (**Figuras 16-19**). Con base en estos resultados, se escogieron los valores de 0, 10, 15, 20 eV para evaluar en etapas posteriores.

**Figura 16.**

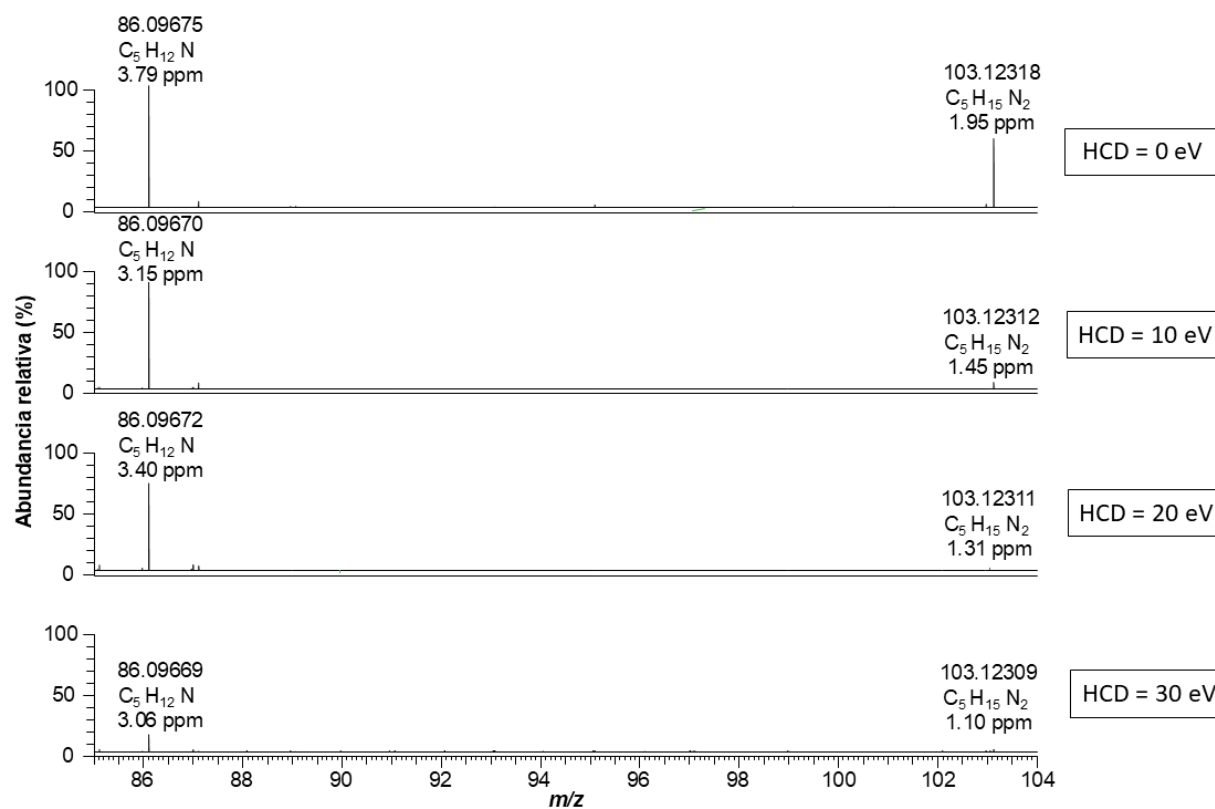
*Espectros de masas de la putrescina, obtenidos por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas full scan (HCD = 0 eV) y step-scan (HCD = 10, 20, 30 eV).*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

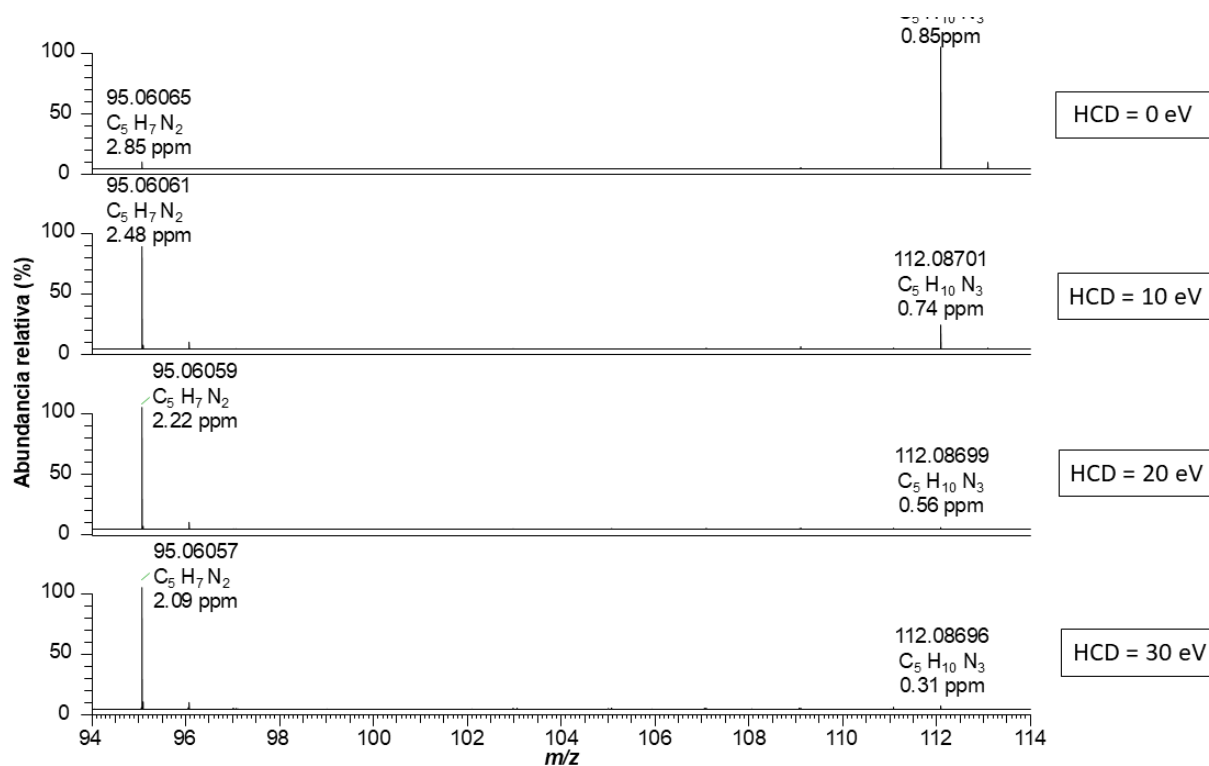
**Figura 17.**

*Espectros de masas de la cadaverina, obtenidos por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas full scan (HCD = 0 eV) y step-scan (HCD = 10, 20, 30 eV).*



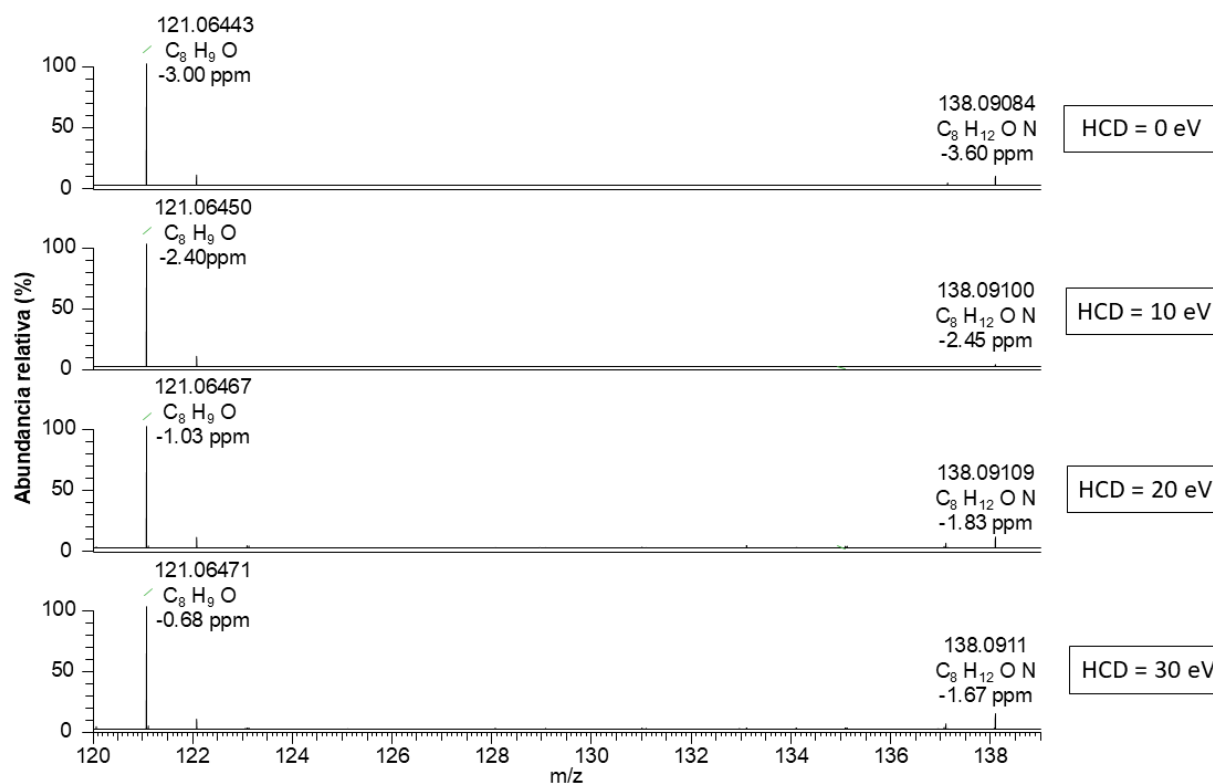
**Figura 18.**

Espetros de masas de la histamina, obtenidos por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas full scan (HCD = 0 eV) y step-scan (HCD = 10, 20, 30 eV).



**Figura 19.**

*Espectros de masas de la tiramina, obtenidos por FIA-HESI-Q-Orbitrap-HRMS en modos de adquisición de corrientes iónicas full scan (HCD = 0 eV) y step-scan (HCD = 10, 20, 30 eV).*



### 7.1.2 Determinación del voltaje del capilar

Se evaluó el efecto del voltaje del capilar (1, 2, 3, 4 y 5 kV) sobre la relación de intensidades entre la molécula protonada  $[M+H]^+$  y el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$ . Se determinó el voltaje que maximiza dicha relación. Las intensidades correspondientes de cada ion en función del voltaje del capilar se presentan en la **Tabla 14** y se ilustran en la **Figura 20**.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Tabla 14.**

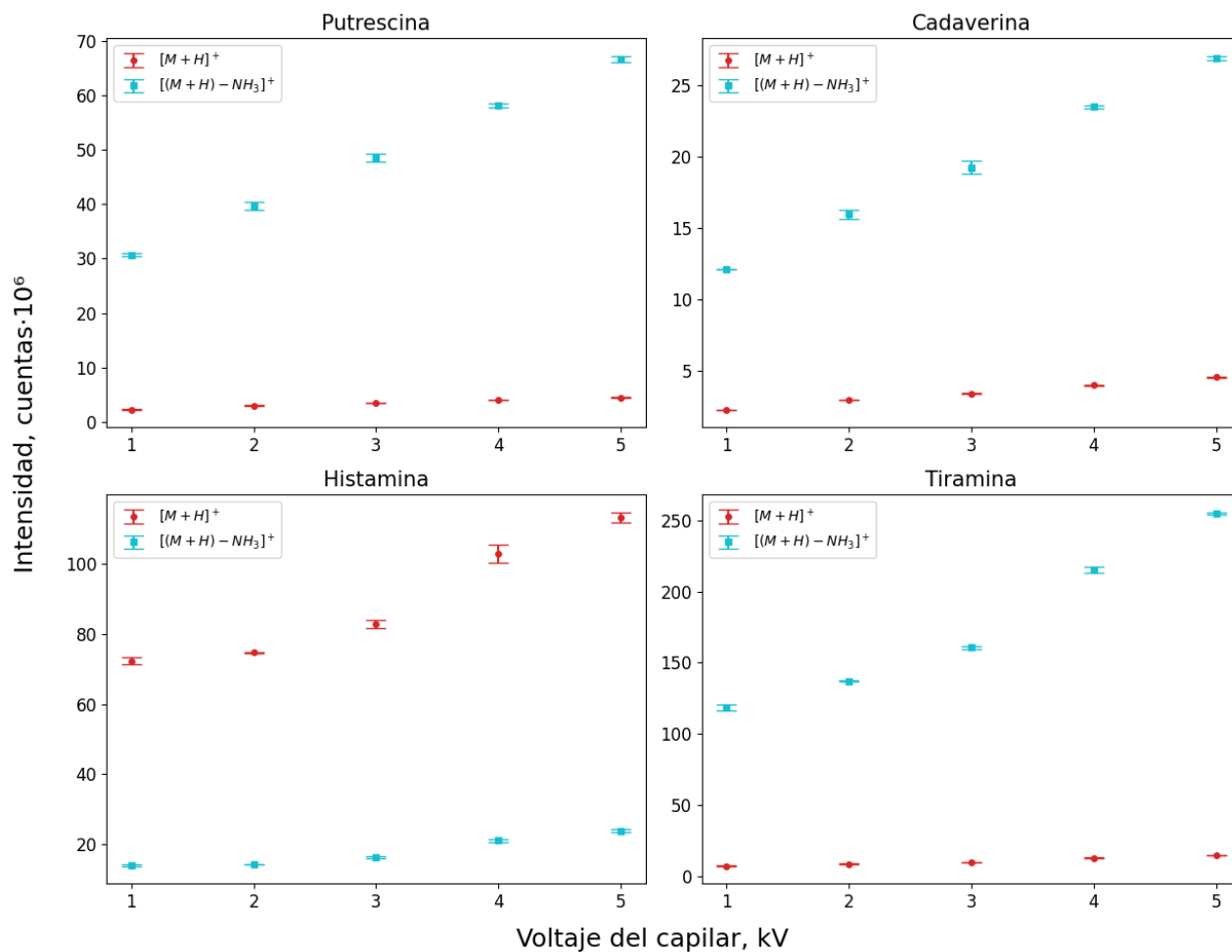
Áreas cromatográficas de las moléculas protonadas  $[M + H]^+$  y sus fragmentos  $[(M+H) - NH_3]^+$  para cuatro BA, obtenidas por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición de corrientes iónicas full scan, empleando diferentes voltajes de capilar.

Compuesto	Ion	Intensidad, cuentas·10 <sup>6</sup> ± s, n = 2				
		Voltaje del capilar, kV				
		1	2	3	4	5
Putrescina	$[M + H]^+$	2.30 ± 0.04	3.02 ± 0.08	3.49 ± 0.06	4.06 ± 0.08	4.48 ± 0.08
	$[(M+H) - NH_3]^+$	30.6 ± 0.29	40.3 ± 0.43	49.5 ± 0.58	58.6 ± 0.55	66.6 ± 0.48
Cadaverina	$[M + H]^+$	2.25 ± 0.01	2.92 ± 0.05	3.38 ± 0.05	4.02 ± 0.04	4.53 ± 0.07
	$[(M+H) - NH_3]^+$	12.07 ± 0.01	16.2 ± 0.63	19.7 ± 0.63	23.4 ± 0.23	26.7 ± 0.29
Histamina	$[M + H]^+$	72 ± 1.1	74.7 ± 0.12	83 ± 1.1	102 ± 1.0	113 ± 1.2
	$[(M+H) - NH_3]^+$	13.9 ± 0.2	14.45 ± 0.09	16.8 ± 0.21	21.5 ± 0.26	23.5 ± 0.27
Tiramina	$[M + H]^+$	7.3 ± 0.17	8.7 ± 0.13	9.9 ± 0.13	12.8 ± 0.14	14.9 ± 0.15
	$[(M+H) - NH_3]^+$	117 ± 1.8	137.3 ± 0.91	160 ± 1.2	217 ± 2.0	255.6 ± 0.83

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 20.**

Intensidad de los iones  $[M+H]^+$  y  $[(M+H)-NH_3]^+$  en los espectros de masas obtenidos por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS de las BA bajo estudio, en función del voltaje del capilar.



En la **Figura 20** se observa que la intensidad de los iones aumentó con el incremento del voltaje del capilar, más pronunciadamente para la molécula protonada  $[M+H]^+$  que para el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$ .

En el modo de adquisición *full scan*, sin disociación activada en la HCD, se evidenció que el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  de putrescina, cadaverina y tiramina fue más abundante que su

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

respectiva molécula protonada  $[M+H]^+$ . En el caso de la histamina, se observó la tendencia inversa, cuando predominó la molécula protonada  $[M+H]^+$  sobre su fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$ .

Las BA estudiadas son moléculas pequeñas, con masas moleculares inferiores a 140 Da, y las temperaturas altas del capilar y del gas auxiliar (320 °C y 350 °C, respectivamente) favorecen su descomposición y ruptura de enlaces, lo que explica la predominancia del fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  en tres de las cuatro BA analizadas.

Debido a su predominancia, el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  se utilizó como ion para cuantificar putrescina, cadaverina y tiramina, mientras que la molécula protonada  $[M + H]^+$  se seleccionó como ion cualitativo. En el caso de la histamina, se empleó la molécula protonada como ion para cuantificar y el fragmento, como ion cualitativo.

Por lo tanto, fue importante seleccionar el voltaje del capilar que permitiera obtener la mejor relación de intensidades entre la molécula protonada ( $I_{[M+H]}$ ) y el fragmento ( $I_{[M+H-NH_3]}$ ), usando la **Ecuación 3**. Los resultados numéricos se presentan en la **Tabla A 1** (Véanse **Apéndices**) y se ilustran gráficamente en la **Figura 21**. La relación de las intensidades obtenida, usando la **Ecuación 4** aparece en la **Tabla A 2** (Véanse **Apéndices**).

$$\frac{I_{[M+H-NH_3]^+}}{I_{[M+H-NH_3]^+} + I_{[M+H]^+}} \quad (3)$$

$$\frac{I_{[M+H]^+}}{I_{[M+H-NH_3]^+} + I_{[M+H]^+}} \quad (4)$$

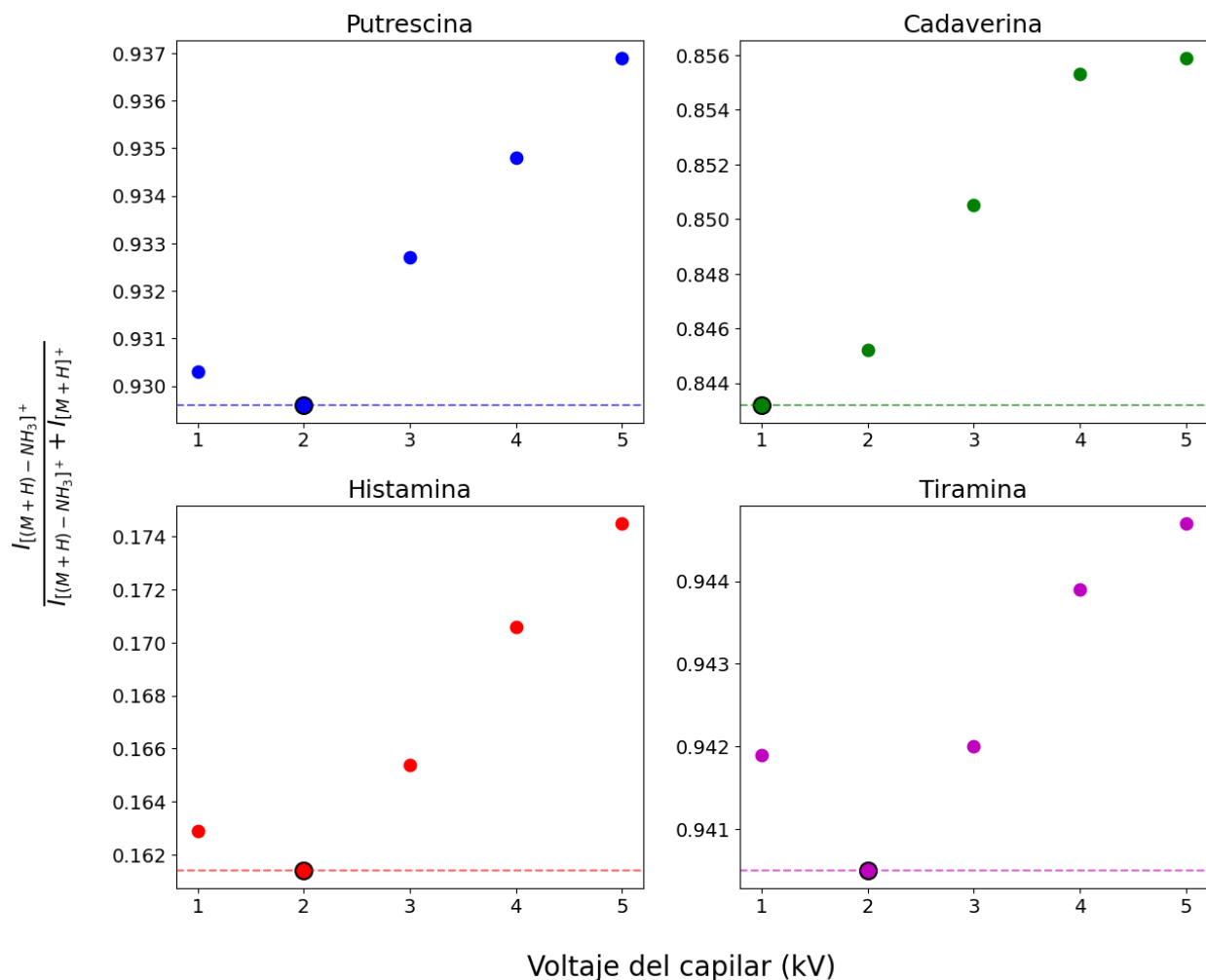
**Donde:**

$I_{[M+H-NH_3]^+}$  = intensidad del fragmento, cuentas

$I_{[M+H]^+}$  = intensidad de la molécula protonada (precursor), cuentas

**Figura 21.**

Relación entre las intensidades de iones de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y sus fragmentos  $[(M+H)-NH_3]^+$ , a diferentes voltajes (Véase la **Ecuación 3**), en los espectros de masas obtenidos por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS de las BA estudiadas.



La mejor relación, según la **Ecuación 3**, entre la molécula protonada  $[M+H]^+$  y el fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  se asocia con valores más bajos, ya que el valor más bajo indica que la intensidad de la especie protonada  $I_{[M+H]^+}$  fue mayor en comparación con los valores obtenidos a otros voltajes, dado que esta especie protonada está en el numerador del cociente de la relación.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Y, fue especialmente relevante aumentar la intensidad de la especie protonada  $[M+H]^+$ , ya que, para tres de las cuatro aminas (putrescina, cadaverina y tiramina), la intensidad de este ion fue relativamente baja con respecto a su fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$ . Como se observa en la **Figura 21**, la mejor relación para putrescina, histamina y tiramina se obtuvo con un voltaje del capilar de 2 kV. En el caso de la cadaverina, aunque la relación mejoró ligeramente a 1 kV, la diferencia con los resultados a 2 kV no fue significativa (0.002 UA), por lo tanto, se escogió el 2 kV como voltaje de extracción para los siguientes ensayos.

### 7.1.3 *Determinación de la energía en la celda HCD*

Para evaluar las abundancias y relaciones de iones en los espectros de masas en función de la energía de la celda de colisiones activadas (HCD), se realizó un análisis de espectros adquiridos en modo PRM. Se filtró en el cuadrupolo la masa  $m/z$  correspondiente a la BA protonada, usando el voltaje de capilar previamente determinado, *i.e.*, 2 kV. El análisis inició con el valor mínimo permitido por el sistema (10 eV), y tomando en cuenta los resultados del análisis por inyección en flujo (FIA), donde se observó que energías superiores a 20 eV extinguen la señal de la molécula protonada, se seleccionaron tres energías de colisión para la HCD: 10, 15 y 20 eV. En la **Tabla 15** se muestran las intensidades iónicas de las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y sus productos  $[(M+H)-NH_3]^+$  de las BA, para cada energía de HCD evaluado.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Tabla 15.**

Corrientes iónicas de moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y fragmentos  $[(M+H)-NH_3]^+$  en los espectros de masas de cuatro BA, obtenidas por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS en modo de adquisición PRM, a diferentes energías de HCD (10, 15, 20 eV) y un voltaje de capilar de 2 kV.

Compuesto	Ion	Área del pico cromatográfico, cuentas $\cdot 10^6 \pm s$ , n = 2		
		Energía de HCD, eV		
		10	15	20
Putrescina	$[M + H]^+$	N. D.	N. D.	N. D.
	$[(M+H) - NH_3]^+$	$0.32 \pm 0.02$	$0.29 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.03$
Cadaverina	$[M + H]^+$	N. D.	N. D.	N. D.
	$[(M+H) - NH_3]^+$	$0.50 \pm 0.02$	$0.46 \pm 0.04$	$0.51 \pm 0.01$
Histamina	$[M + H]^+$	$10.5 \pm 0.79$	$10.98 \pm 0.01$	$10.93 \pm 0.01$
	$[(M+H) - NH_3]^+$	$37 \pm 4.30$	$38 \pm 3.91$	$38 \pm 5.44$
Tiramina	$[M + H]^+$	N. D.	N. D.	N. D.
	$[(M+H) - NH_3]^+$	$1.65 \pm 0.01$	$1.69 \pm 0.04$	$1.77 \pm 0.01$

Para putrescina, cadaverina y tiramina, se observó que, incluso la energía mínima en la HCD (10 eV), fue demasiado alta y provocó que todas las moléculas protonadas  $[M+H]^+$  que ingresaron a la celda se fragmentaran, lo que impidió el registro de la señal de molécula protonada, con excepción a la histamina, en cuyo espectro de masas sí se conservó la señal correspondiente a su molécula protonada  $[M+H]^+$ .

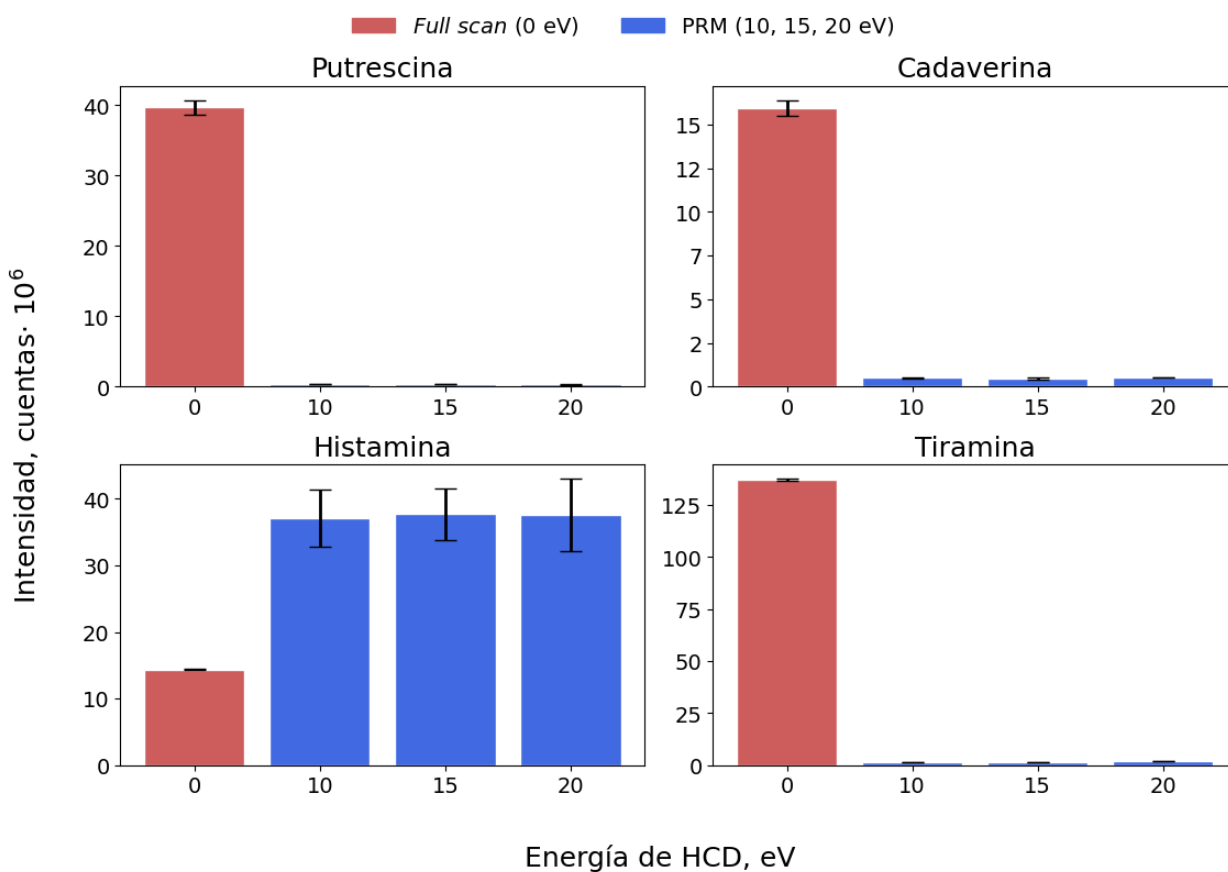
La ionización por electronebulización es una ionización suave, los espectros de masas obtenidos generalmente proporcionan poca información estructural sobre los analitos. Por esta razón, se utilizan modos de activación de iones que inducen fragmentación de las moléculas protonadas o deprotonadas, usando la HCD, en diferentes modos de adquisición de corrientes iónicas, como AIF, *step-scan*, PRM, que permiten obtener los fragmentos y, en consecuencia, la información adicional sobre las estructuras de los analitos.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

El objetivo inicial de estos ensayos consistió en ampliar la información estructural mediante la generación y detección de fragmentos. La fragmentación inducida por HCD, en teoría, debería aumentar la intensidad de los fragmentos respecto a la observada en el modo *full scan* sin activación de iones  $[M+H]^+$ . Sin embargo, este comportamiento no se observó para este grupo de moléculas. En la **Tabla A 3** (Véanse **Apéndices**) se presenta la comparación entre la intensidad del fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$ , medido usando el modo *full scan*, y su intensidad al inducir fragmentación mediante HCD a 10, 15 y 20 eV, utilizando el modo de adquisición PRM. En la **Figura 22** esta comparación se aprecia gráficamente.

**Figura 22.**

*Intensidad de los fragmentos  $[(M+H)-NH_3]^+$  en los espectros MS de las BA estudiadas, obtenidos por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS en modos de adquisición *full scan* (HCD = 0 eV) y PRM (HCD = 10, 15, 20 eV) (n = 2).*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Se observa que, para putrescina, cadaverina y tiramina, la intensidad del fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  fue más alta para el modo de adquisición *full scan* (HCD = 0 eV) en comparación con el de PRM (HCD = 10, 15, 20 eV). Este resultado fue coherente con los espectros de masas de estas BA. En PRM, el cuadrupolo filtra inicialmente la masa nominal correspondiente a la molécula protonada  $[M+H]^+$ , sin embargo, para estas aminas, este ion no es abundante, lo que limita desde el inicio la cantidad de fragmentos que se obtendrán. Además, de los iones seleccionados, no sólo se generan los fragmentos de interés, como  $[(M+H)-NH_3]^+$ , sino también otros fragmentos, que, en el caso de moléculas como la putrescina o cadaverina, tienen masas menores que las del rango de masas evaluado (60-900  $m/z$ ).

A medida que se incrementa el voltaje en la cámara HCD, aumenta la probabilidad de obtener otros fragmentos, lo que reduce la intensidad del ion deseado  $[(M+H)-NH_3]^+$ . Por esta razón, el modo PRM no aporta muchas ventajas para la detección y cuantificación de estas tres aminas biogénicas (BA), como se puede apreciar en la **Figura 22**.

La histamina exhibe un comportamiento diferente: la intensidad del fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  aumenta en el espectro MS adquirido en el modo PRM, alcanzando el mayor valor con una energía de HCD de 15 eV. A diferencia de las otras BA, la histamina presenta el ion  $[M+H]^+$  abundante, su fragmentación inducida en HCD, también produce fragmentos abundantes y, por consiguiente, aumenta el área cromatográfica, lo cual mejora su detección y cuantificación.

Dado que la fragmentación en la celda HCD, usando el modo de adquisición PRM solo beneficia la detección de la histamina, pero afecta negativamente la detección de la putrescina, cadaverina y tiramina, se optó por no inducir la fragmentación en la HCD, y en su lugar, emplear el modo de adquisición SIM, el cual permite filtrar la  $m/z$  correspondiente a cada amina protonada

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

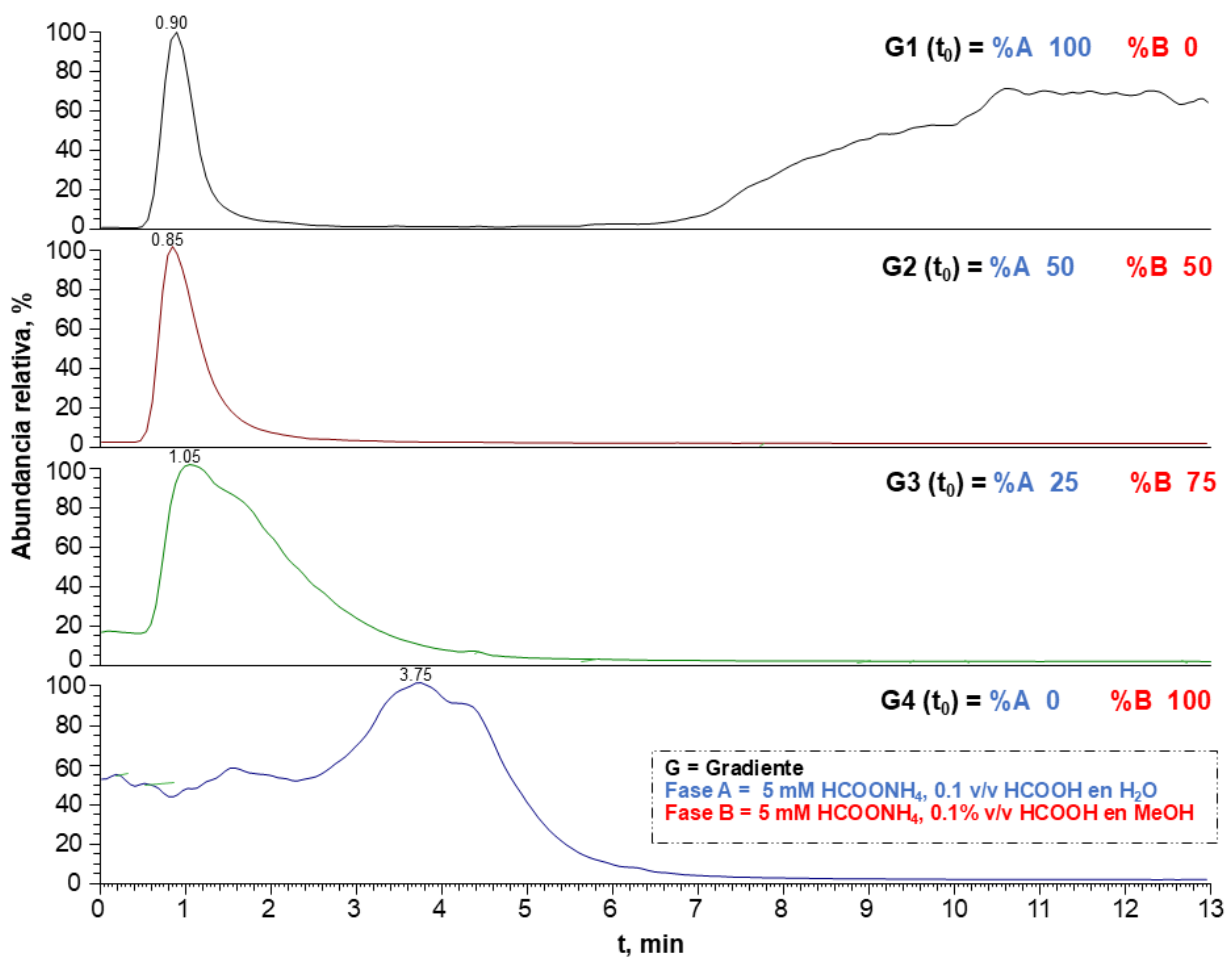
[M+H] y a sus fragmentos [(M+H)-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, los cuales también se generan en la interfaz HESI, sin necesidad de inducir la fragmentación en la celda HCD.

### 7.1.4 Gradientes de la fase móvil en cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia

Se ensayaron cuatro gradientes de la fase móvil de UHPLC, descritos en la **Tabla 9** de la **Sección 6.1.1** de la Metodología, y se evaluaron sus efectos sobre el tiempo de retención ( $t_R$ ), la resolución ( $R_s$ ), la forma y la simetría de los picos cromatográficos. La corriente iónica extraída para cada BA utilizando los gradientes 1, 2, 3 y 4 se presentan en las **Figuras 23-26**.

#### Figura 23.

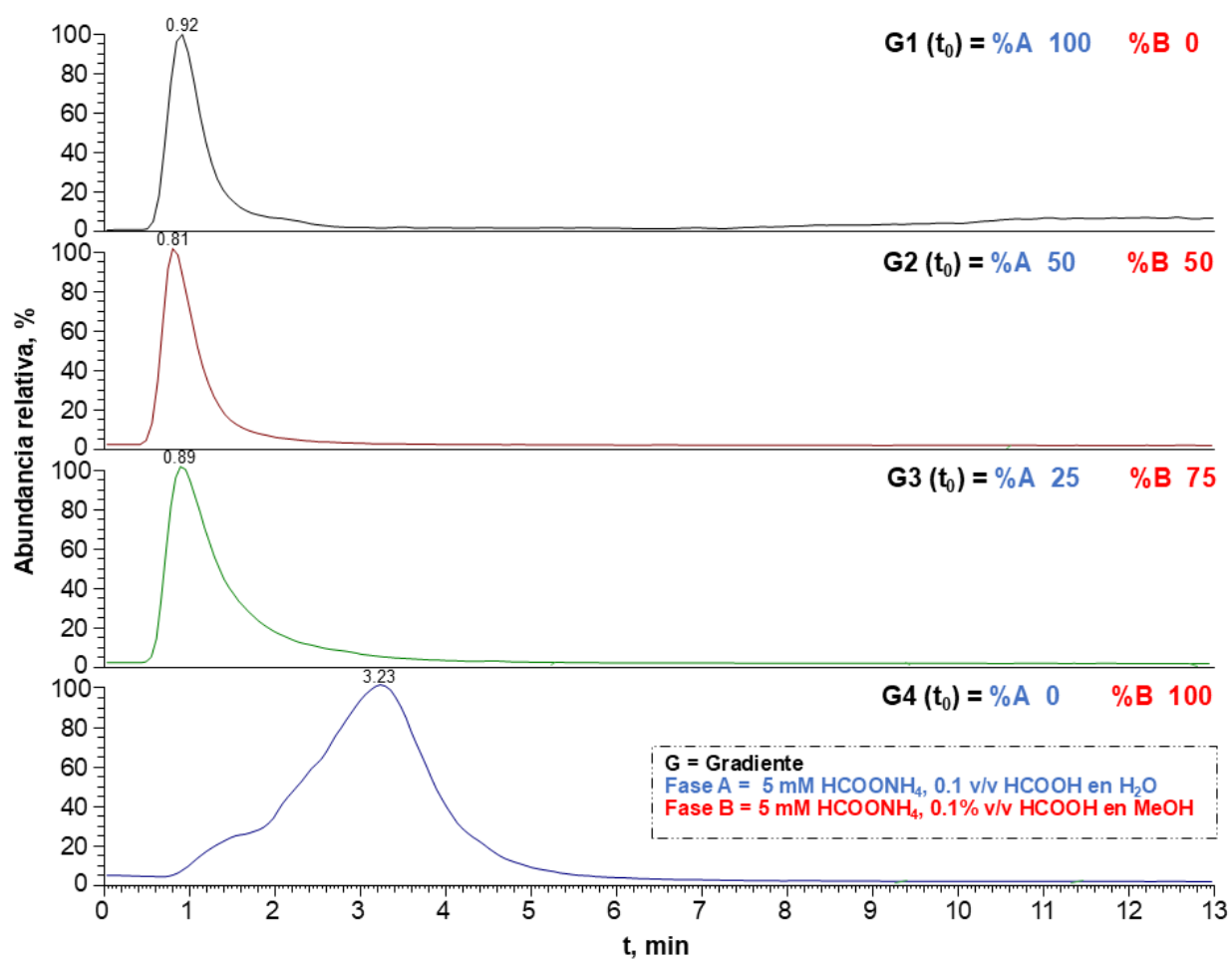
Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion [(M+H)-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> de la putrescina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4.



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Figura 24.**

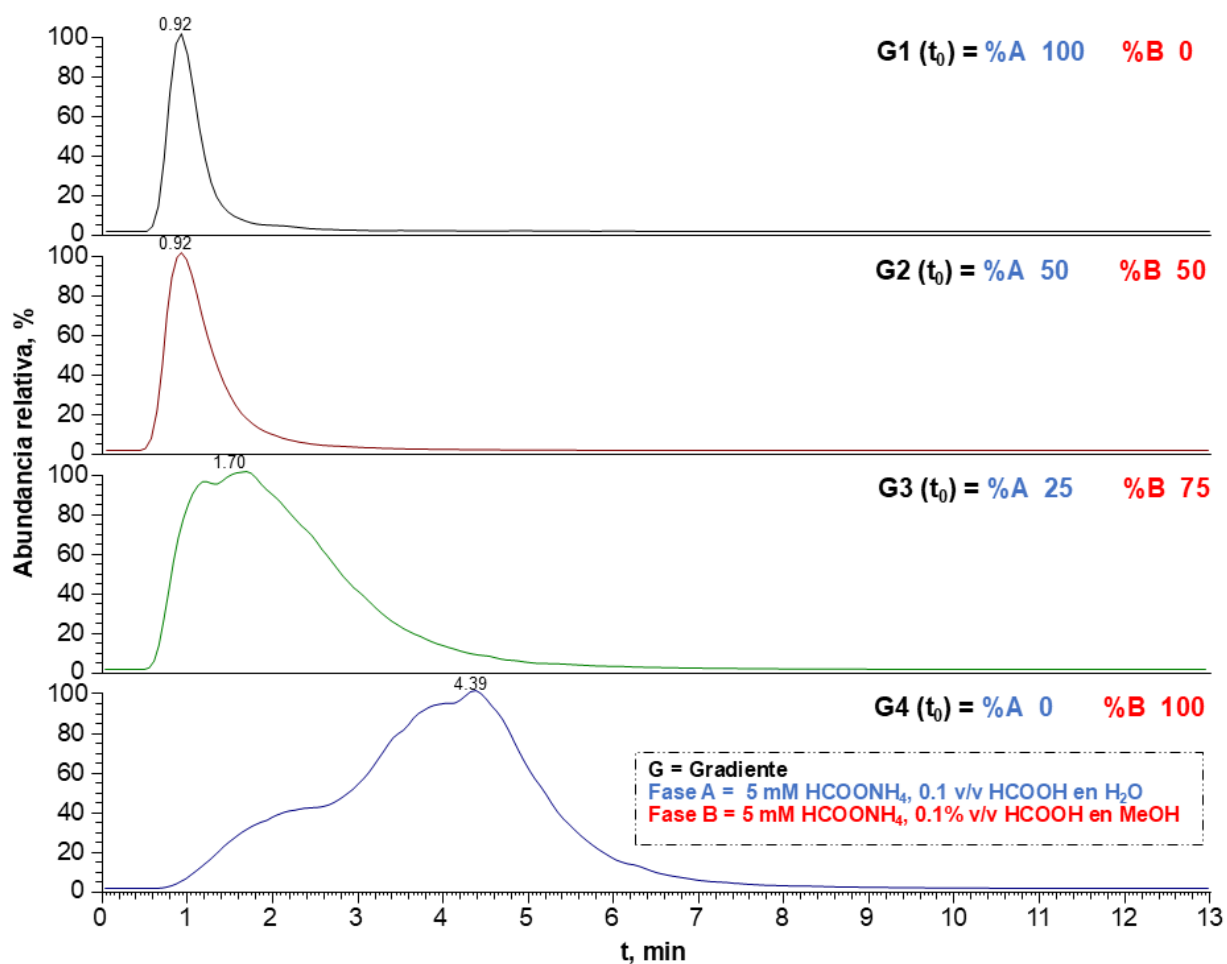
Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion  $[(M+H)-NH_3]^+$  de la cadaverina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4.



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

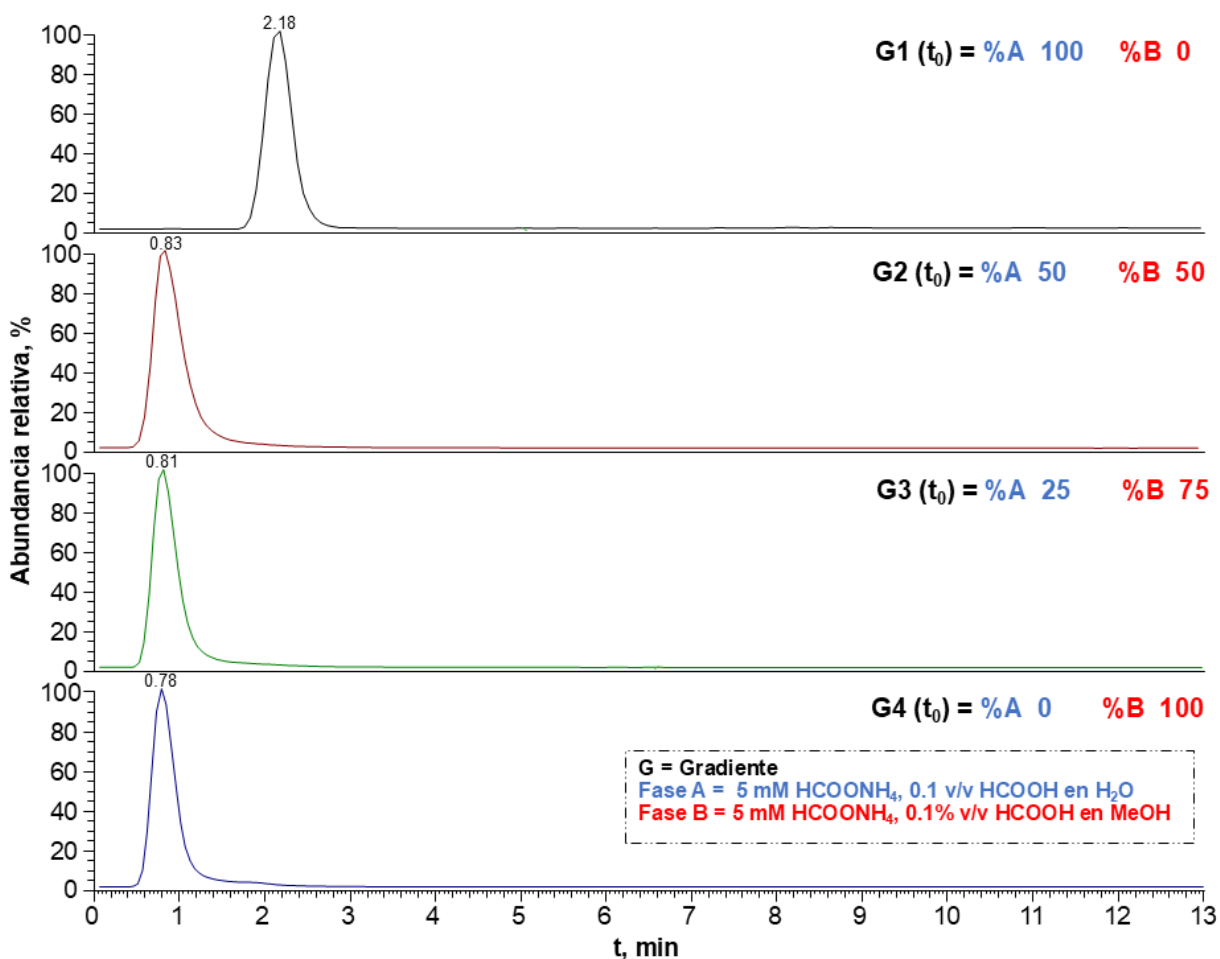
**Figura 25.**

Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion  $[M+H]^+$  de la histamina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4.



**Figura 26.**

Corrientes iónicas extraídas (EIC) del ion  $[(M+H)-NH_3]^+$  de la tiramina empleando los diferentes gradientes de UHPLC G1, G2, G3 y G4.



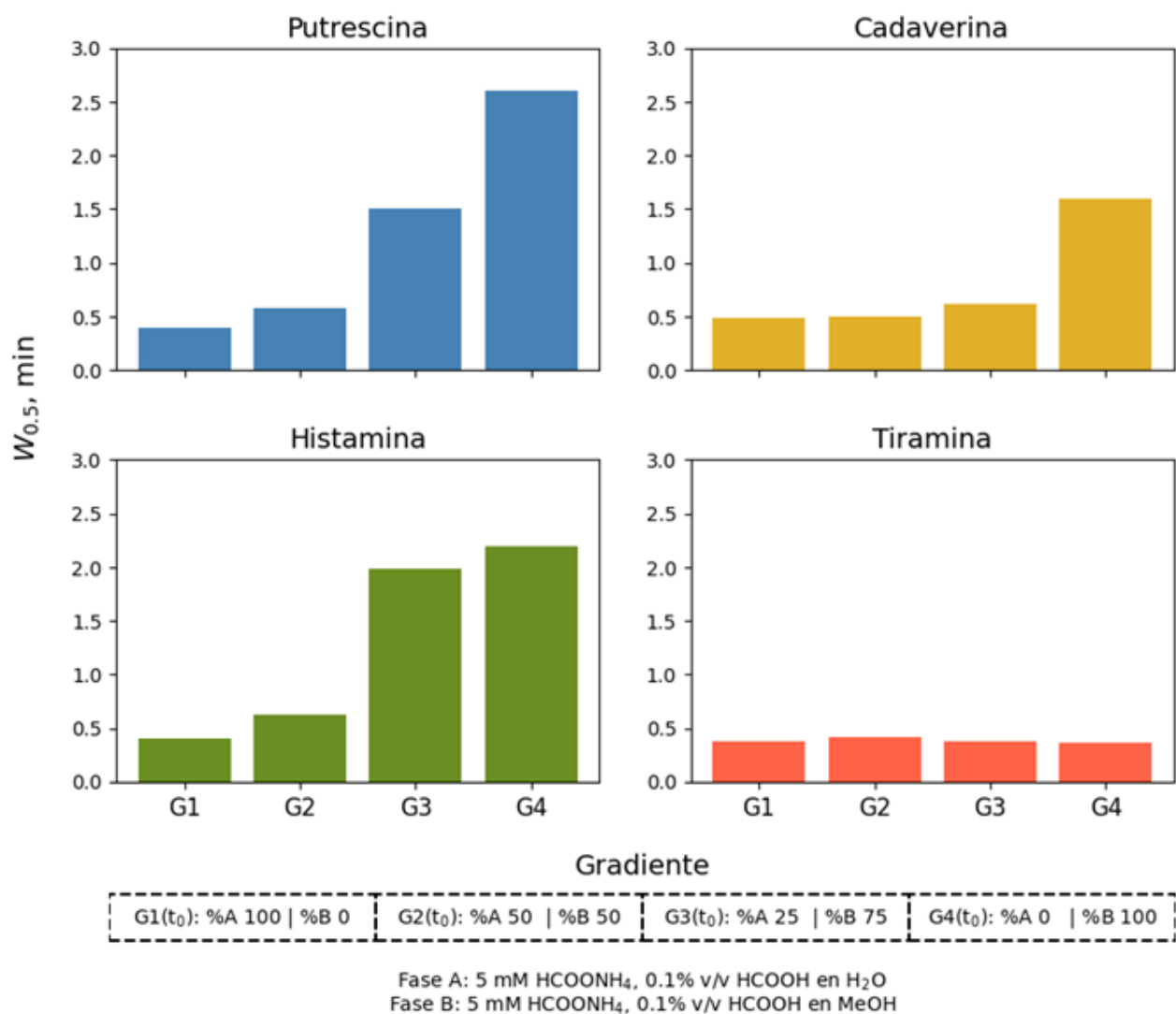
Se evaluó el efecto del gradiente sobre la forma y la simetría del pico cromatográfico. Los resultados mostraron que un aumento en la cantidad inicial de fase orgánica en el gradiente genera el ensanchamiento de los picos cromatográficos. En la **Tabla A 4** (Véanse **Apéndices**) se presentan los valores de  $W_{0.5}$  para los picos cromatográficos de cada BA utilizando los cuatro gradientes. La **Figura 27** ilustra gráficamente este efecto, donde se observa que el gradiente 4 (G4), el cual inició con un 100 % de fase orgánica, incrementó de manera pronunciada la anchura de los picos

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

cromatográficos de putrescina, cadaverina e histamina, por lo que, el gradiente 4 se descartó por completo.

**Figura 27.**

*Efecto de diferentes gradientes de UHPLC (G1, G2, G3, G4) sobre la anchura a la mitad de la altura del pico cromatográfico ( $W_{0.5}$ ) de la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

En contraste, el gradiente 1 (G1), que inició con 0% de la fase orgánica B y 100% de la fase acuosa A, generó los picos con el menor valor de  $W_{0.5}$  para todas las BA. Esto indica que las BA bajo estudio presentan mayor afinidad por la fase acuosa que por la fase orgánica, lo que favorece su elución de la columna y reduce la dispersión de los picos cromatográficos. Valores más bajos de  $W_{0.5}$  están asociados con una eficiencia de separación mayor.

Otros parámetros como la resolución ( $R_s$ ) y los factores de coleo (Tf) y de simetría ( $A_s$ ), se calcularon para los picos cromatográficos de las BA bajo estudio según las **Ecuaciones 5-7**.

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{b1} + W_{b2})} \quad (5)$$

Donde:

$t_{R1}$  y  $t_{R2}$  = Tiempos de retención de los dos compuestos (con  $t_{R2} > t_{R1}$ )

$W_{b1}$  y  $W_{b2}$  = Anchos de los picos sobre la línea base

$$Tf = \frac{W_{0.05}}{2f} \quad (6)$$

Donde:

$W_{0.05}$  = ancho del pico al 5% de la altura

f = distancia desde el máximo del pico hasta el borde inicial del pico

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (7)$$

Donde:

A = distancia desde el máximo del pico hasta el inicio del pico (al 10% de la altura del pico).

B = distancia desde el máximo del pico hasta el final del pico (al 10% de la altura del pico)

(Azim *et al.*, 2015).

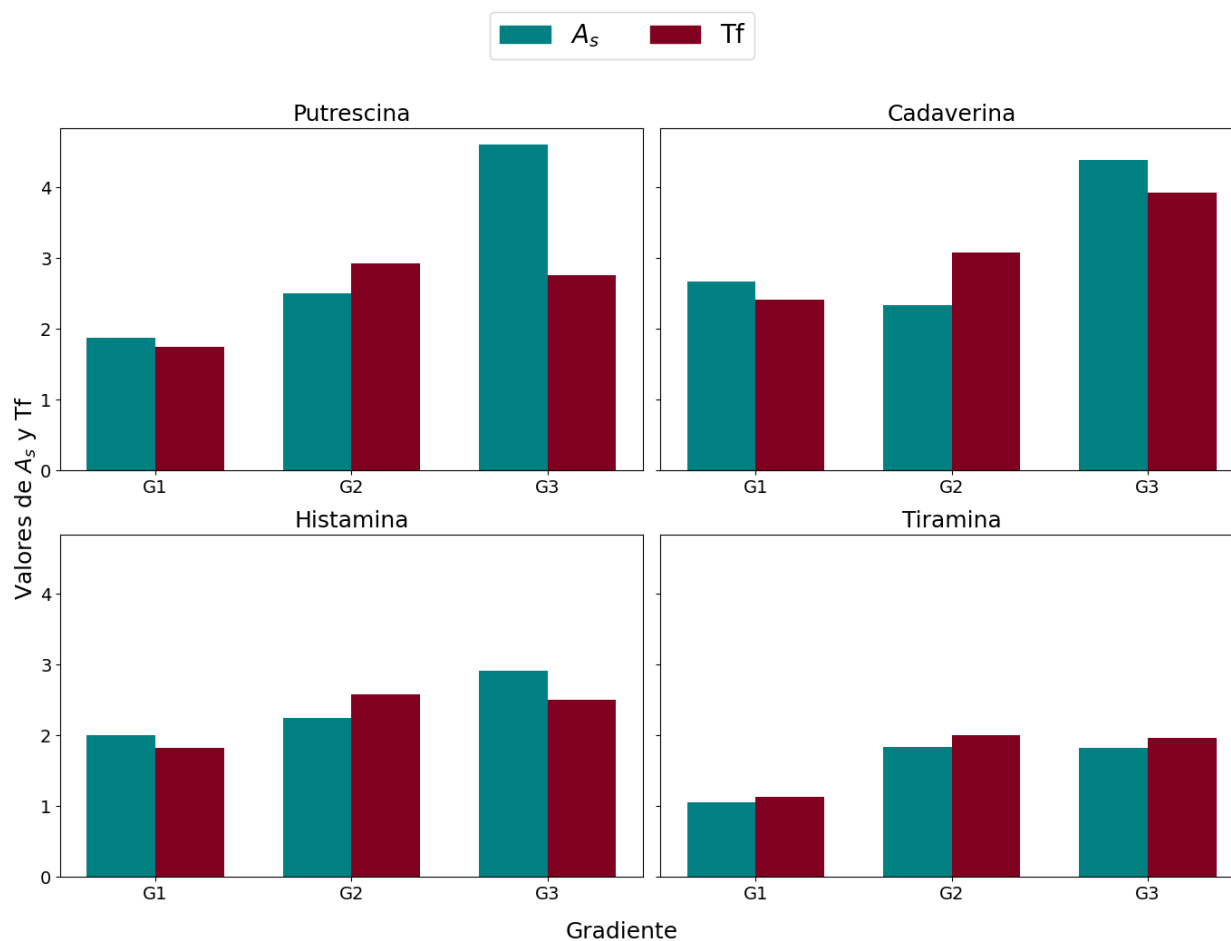
## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

En la **Tabla 16** se muestran estos parámetros para los picos cromatográficos de cuatro BA, empleando tres gradientes diferentes. El cromatograma de la mezcla de las BA cuando se emplearon diferentes gradientes se presenta en la **Figura A 1** (Véanse **Apéndices**).

En la **Figura 28** se comparan los factores de coleo (Tf) y de simetría ( $A_s$ ) de los picos cromatográficos para cada BA, cuando se emplearon los gradientes G1, G2 y G3.

**Figura 28.**

*Factor de coleo (Tf) y factor de simetría ( $A_s$ ) para los picos cromatográficos de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, empleando tres gradientes diferentes de UHPLC.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Tabla 16.**

*Valores de tiempo de retención ( $t_R$ ), resolución ( $R_s$ ), factor de coeio ( $T_f$ ) y factor de simetría ( $A_s$ ) de la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina empleando tres gradientes diferentes de la fase móvil ( $G1$ ,  $G2$ ,  $G3$ ), en el análisis por UHPLC.*

Compuesto	Gradiente 1				Gradiente 2				Gradiente 3			
	$t_R$ , min	$R_s$	$T_f$	$A_s$	$t_R$ , min	$R_s$	$T_f$	$A_s$	$t_R$ , min	$R_s$	$T_f$	$A_s$
Putrescina	0.90	0.01	1.75	1.88	0.85	0.01	2.93	2.50	1.05	0.04	2.76	4.60
Cadaverina	0.92	0.01	2.41	2.67	0.81	0.01	3.08	2.33	0.89	0.04	3.92	4.38
Histamina	0.94	0.01	1.82	2.00	0.93	0.03	2.58	2.25	1.70	0.14	2.50	2.91
Cadaverina	2.18	0.73	1.13	1.05	0.83	0.01	2.00	1.83	0.81	0.03	1.96	1.82

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

El gradiente 1 permitió obtener los valores de  $A_s$  más cercanos a 1 y presentó los valores más bajos de  $T_f$  en comparación con los obtenidos para los demás gradientes. Los picos obtenidos con el gradiente 1 presentaron, de manera general, los valores de  $W_{0.5}$ ,  $A_s$  y  $T_f$  más bajos (Véanse **Tabla 16** y **Figura 28**). Esto favorece el uso del gradiente 1 para los análisis posteriores.

En contraste, el gradiente 2 afecta negativamente la separación de los compuestos, ya que las cuatro aminas eluyeron prácticamente al mismo tiempo. Sin embargo, no se observó un ensanchamiento excesivo de los picos en comparación con lo observado para los gradientes 3 y 4, y presentó, para la mayoría de las aminas, los segundos mejores valores de  $A_s$  y  $T_f$ . Con el gradiente 3 se observó un ensanchamiento notable de los picos, especialmente, de la putrescina y la histamina, los valores de  $T_f$  fueron altos y los factores de asimetría ( $A_s$ ) considerablemente alejados de uno.

En conclusión, usando el gradiente 1 se lograron los mejores valores de  $T_f$ ,  $A_s$  y  $W_{0.5}$  para los picos cromatográficos de las BA estudiadas en comparación con los demás gradientes, por lo que éste se seleccionó para los ensayos posteriores. Aunque no se logró la resolución muy alta y la separación sobre la línea base de los compuestos, el sistema UHPLC-Q-*Orbitrap* permitió superar esta limitación. Dado que cada ion  $[M+H]^+$  y  $[(M+H)-NH_3]^+$  de las BA tiene una masa única, se extrajo la corriente iónica específica asociada a cada  $m/z$ . Esto permitió obtener un pico cromatográfico individual para cada BA; este procedimiento representó una ventaja analítica clave, y permitió la identificación y la cuantificación de los compuestos incluso en condiciones de resolución cromatográfica baja.

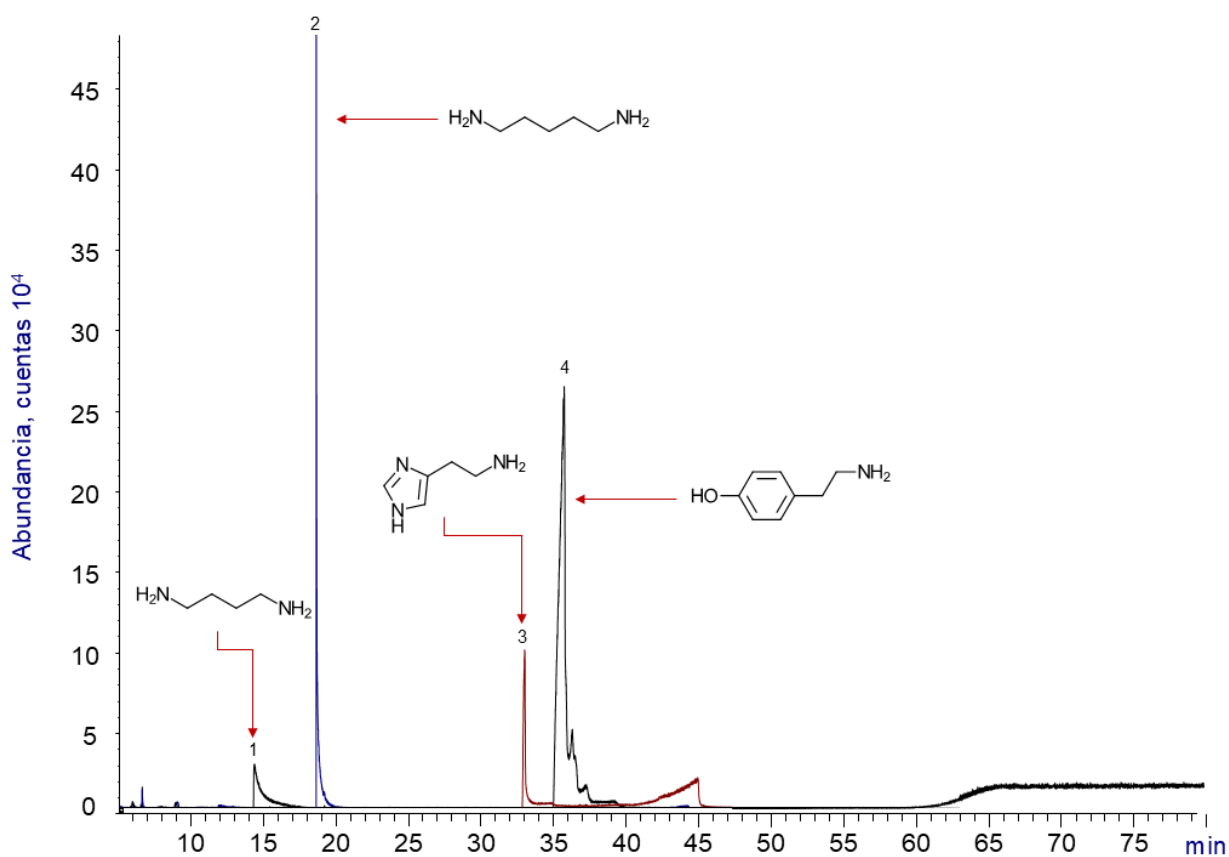
## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**7.1.5 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Fue interesante comparar el análisis de las BA, utilizando dos técnicas cromatográficas, por lo que se usó también la técnica GC/MS. La **Figura 29** muestra el cromatograma de los estándares de BA, a una concentración de 1000 mg/L, obtenido en una columna apolar DB-5MS (60 m × 0.25 mm D.I × 0.25 μm d<sub>f</sub>).

**Figura 29.**

*Cromatograma de los patrones de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina (1000 mg/L), obtenidos por GC/MS, en columna apolar DB-5MS (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm).*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Se calculó el factor de respuesta ( $R_f$ ) para cada BA, de acuerdo con la **Ecuación 8**.

$$R_f = \frac{A_x}{C_x} \quad (8)$$

Donde:

$A_x$  = Área del pico cromatográfico del analito

$C_x$  = Concentración del analito

Se calculó un  $R_f$  con respecto al  $R_f$  de la tiramina, que tenía la respuesta más alta de las BA bajo estudio, para representar de forma más clara la diferencia entre estos valores. La **Tabla 17** presenta estos datos, así como la información correspondiente a cada pico cromatográfico registrado por GC/MS.

**Tabla 17.**

*Información de los picos cromatográficos, obtenidos por GC/MS, basada en la **Figura 29**.*

Pico N° Fig. 29	Compuesto	Fórmula	$t_R$ , min	Área GC, cuentas $\cdot 10^6$	$R_f \cdot 10^3$	$R_f$ relativo*
1	Putrescina	$C_4H_{12}N_2$	14.38	7.43	7.43	0.10
2	Cadaverina	$C_5H_{14}N_2$	18.65	15.4	15.4	0.20
3	Histamina	$C_5H_9N_3$	32.98	8.90	8.90	0.12
4	Tiramina	$C_8H_{11}NO$	35.72	75.9	75.9	1.00

\*  $R_f$  relativo al  $R_f$  de la tiramina, que presentó la respuesta más alta de las BA estudiadas.

Aunque las cuatro BA se encontraban a la misma concentración, 1000 mg/L, se observaron diferencias en la intensidad de los picos cromatográficos. La putrescina presentó la intensidad más baja, mientras que la tiramina mostró la más alta (Véase **Tabla 17**). Esta diferencia podría deberse a procesos de descomposición térmica en el puerto de inyección, a 250 °C, ya que estas moléculas pequeñas y de bajo peso molecular pueden desaminarse a temperaturas altas. Sin embargo, no se dispone de datos específicos en la literatura sobre las temperaturas de descomposición de las BA estudiadas.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Las diferencias en la intensidad de los picos también pueden estar relacionadas con la eficiencia de ionización, distinta para cada BA, lo que genera factores de respuesta diferentes para cada analito. En particular, la putrescina y la histamina presentan los factores de respuesta más bajos, lo que limita su detección y cuantificación por GC/MS. Esta limitación es aún más crítica en muestras reales, donde las concentraciones esperadas de BA son considerablemente menores que las evaluadas en este ensayo preliminar, y es probable que solo se detecten en trazas durante los primeros días de almacenamiento.

Para mejorar la sensibilidad en GC/MS, sería necesario adicionar un paso de derivatización en la preparación de la muestra para aumentar la estabilidad y la volatilidad de estas moléculas. No obstante, con base en estos resultados, se concluyó que el análisis de BA se debía realizar únicamente mediante cromatografía líquida y no cromatografía de gases.

### **7.2 Método de extracción**

#### ***7.2.1 Extracción por dispersión de la matriz en fase sólida***

En la **Tabla 18** se muestran los rendimientos obtenidos con cada uno de los solventes de elución evaluados, calculados según la relación de las masas del extracto seco y la muestra inicial. Aunque estos valores fueron similares entre sí, con el metanol se logró obtener el rendimiento un poco más alto. Este comportamiento puede estar asociado a la polaridad alta y la viscosidad más baja del solvente, que facilita la solubilización de compuestos polares como las BA. Además, su capacidad para formar puentes de hidrógeno con las aminas aumenta la eficiencia de la extracción.

**Tabla 18.**

*Rendimiento de la extracción MSPD de atún enlatado empleando metanol, acetonitrilo y acetato de etilo como solventes de elución.*

<b>Solvente</b>	<b>Rendimiento, % <math>\pm</math> s, n = 2</b>
Metanol	3.0 $\pm$ 0.81
Acetonitrilo	2.8 $\pm$ 0.42
Acetato de etilo	2.3 $\pm$ 0.70

Tras el secado con una corriente de nitrógeno de los extractos de atún obtenidos mediante MSPD, se observaron sólidos de consistencia viscosa, lo cual se atribuyó al contenido alto de grasas en la muestra, cuya presencia dificulta la cuantificación de las BA, e implica implementar metodologías adicionales de limpieza y desengrasado del extracto para obtener un sólido completamente seco y evitar interferencias que puedan comprometer la precisión y la exactitud de los resultados. Por esta razón, se descartó el uso de MSPD como técnica de extracción para esta matriz.

### **7.2.2 Extracción líquido-sólido**

**7.2.2.1 Determinación de aminas biogénicas en atún enlatado.** En el atún, de manera confirmatoria, se detectaron y cuantificaron putrescina, cadaverina e histamina por un método cromatográfico de calibración externa; sin embargo, no se detectó la tiramina. Esto podría deberse a una limitación en el método de extracción utilizado o a que su concentración estaba por debajo del límite de detección (LOD), de 2.94  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Véase **Tabla 21**).

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Teniendo en cuenta esta observación, se realizó una segunda extracción de la matriz sólida remanente tras la remoción del sobrenadante, para mejorar la eficiencia de extracción de las BA. Esta modificación se implementó en etapas posteriores para el monitoreo de las BA en mojarra y queso, y se llevaron a cabo dos extracciones consecutivas, en lugar de una sola, como se aplicó inicialmente en la extracción de las BA en el atún. En la **Tabla 19** se presentan las cantidades de BA aisladas del atún enlatado (en agua).

**Tabla 19.**

*Concentraciones de putrescina, cadaverina e histamina en muestras de atún enlatado, determinadas por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, usando el método de calibración externa.*

Compuesto	Fórmula	Ion cuantificador	<i>m/z</i>	Exactitud, $\Delta$ ppm	Concentración, mg/kg $\pm$ s, n = 2
Putrescina	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N	[(M+H) -NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	72.08106	7.79	2.4 $\pm$ 0.31
Cadaverina	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N	[(M+H) -NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	86.09669	5.90	28 $\pm$ 5.9
Histamina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	112.09225	2.88	13.0 $\pm$ 0.55
Tiramina	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O	[(M+H) -NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	N. D.	N. D.	N. D.

Todos los niveles de las BA analizadas en el atún enlatado se encuentran dentro de los límites considerados seguros, según lo indicado en la **Tabla 3, Sección 4.2**. La BA más abundante fue la cadaverina, con un valor de 28  $\pm$  5.9 mg/kg. Este resultado podría estar asociado con la predominancia de lisina en el atún, aminoácido precursor directo de la cadaverina, o con la actividad de bacterias productoras de lisina descarboxilasa, como ciertas cepas de *Escherichia coli* (W. Ma *et al.*, 2017) o *Streptococcus thermophilus* (Gezginc *et al.*, 2013).

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Los niveles de BA encontrados en este estudio muestran variaciones significativas en comparación con los datos reportados en la literatura. En este trabajo, las concentraciones de putrescina, cadaverina e histamina en atún enlatado fueron de  $2.4 \pm 0.31$  mg/kg,  $28 \pm 5.9$  mg/kg y  $13.0 \pm 0.55$  mg/kg, respectivamente, mientras que la tiramina no fue detectada. En contraste, Bilgin *et al.* (2015) reportaron concentraciones promedio más elevadas de putrescina ( $12.6 \pm 0.20$  mg/kg) y cadaverina ( $79 \pm 33$  mg/kg), aunque la histamina presentó un valor inferior ( $4 \pm 1.6$  mg/kg), y la tiramina tampoco fue detectada. Veciana *et al.* (1997) documentaron rangos de concentración más amplios, con valores máximos de 2.20 mg/kg para putrescina, 12.05 mg/kg para cadaverina, 40.5 mg/kg para histamina y 3.00 mg/kg para tiramina. Finalmente, Guo *et al.* (2022) reportaron concentraciones aún mayores, con máximos para la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, de 142.63 mg/kg, 118.36 mg/kg, 167.02 mg/kg y 75.97 mg/kg, respectivamente.

Estos resultados evidencian una alta variabilidad en la concentración de BA en atún enlatado, posiblemente, influenciada por factores como la especie de atún (*e.g.*, *Thunnus atlanticus*, *T. thynnus*, *T. alalunga*), las condiciones de procesamiento y almacenamiento, así como la metodología analítica utilizada en cada estudio.

**7.2.2.2 Determinación de la eficiencia de extracción.** Para determinar la eficiencia de la extracción y debido a la ausencia de una matriz libre de las cuatro BA bajo estudio (blanco), tanto en pescado como en queso, se empleó margarina como matriz alternativa. Para ello, la muestra de margarina se enriqueció con las BA en concentraciones de 100 µg/kg, 250 µg/kg y 500 µg/kg, cada una. La margarina se fundió antes de añadir las BA, se agitó y, posteriormente, se dejó

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

solidificar, con el fin de lograr una distribución homogénea de las aminos en la muestra, evitando que quedaran únicamente en la superficie.

Para determinar la eficiencia de la extracción y debido a la ausencia de una matriz libre de las cuatro BA bajo estudio (blanco), tanto en pescado como en queso, se empleó margarina como matriz alternativa. Para ello, la muestra de margarina se enriqueció con las BA en concentraciones de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , cada una. La margarina se fundió antes de añadir las BA, se agitó y, posteriormente, se dejó solidificar, con el fin de lograr una distribución homogénea de las aminos en la muestra, evitando que quedaran únicamente en la superficie.

Sin embargo, durante el ensayo se identificaron problemas con esta matriz. Aunque el pescado es rico en ácidos grasos y Omega 3, y el queso contiene triglicéridos y grasas lácteas, no todo su contenido es de naturaleza apolar. En contraste, la margarina empleada tenía un 70% de grasas (saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas), lo que generó dificultades durante la extracción con la mezcla de agua y metanol acidificado. Se observó que el solvente interactuó principalmente con los compuestos en la superficie de la margarina, sin lograr permear en su interior debido a la naturaleza polar del solvente de extracción y al predominio de componentes apolares en la margarina.

Este efecto no se evidenció en las muestras reales, en las cuales se observó que el solvente sí logró permear al interior de las matrices. La limitada permeabilidad del solvente en la margarina podría explicar el porcentaje de recuperación bajo de los analitos de esta matriz, el cual se presenta en la **Tabla 20**. No obstante, con base en estas observaciones, se presume que la eficiencia de extracción en las muestras reales podría ser mayor que la de margarina.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

A pesar de estas limitaciones, se logró calcular el porcentaje de recuperación en la matriz de margarina, lo que permitió estimar la eficiencia de extracción bajo las condiciones utilizadas. Sin embargo, esta matriz no resultó ser la más adecuada para simular el comportamiento de las muestras reales debido a diferencias en su composición y en la interacción con el solvente. En el futuro se llevarán a cabo ensayos con otras matrices para obtener una determinación más exacta de la eficiencia de extracción.

**Tabla 20.**

*Eficiencia de extracción por LSE de cuatro BA de una matriz blanco de margarina enriquecida con las aminos a concentraciones de 100, 250 y 500 µg/kg.*

Compuesto	Eficiencia de extracción, % ± s, n = 2		
	100 µg/kg	250 µg/kg	500 µg/kg
Putrescina	11.5 ± 0.11	11 ± 1.5	9.2 ± 0.16
Cadaverina	17.4 ± 0.31	12 ± 1.1	9.4 ± 0.74
Histamina	13.7 ± 0.61	12 ± 1.1	11.2 ± 0.39
Tiramina	15.2 ± 0.72	13 ± 1.6	11.5 ± 0.19

**7.3 Análisis de matrices alimenticias**

La cuantificación de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en las muestras de pescado y queso se realizó mediante un método cromatográfico de calibración externa. Las ecuaciones de las rectas utilizadas se encuentran en la **Tabla 21**.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Los valores de LOD y LOQ se calcularon según las **Ecuaciones 9 y 10**:

$$LOD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{S} \quad (9)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \quad (10)$$

Donde

$\sigma$  = Desviación estándar de la respuesta

S = Pendiente de la curva de calibración

**Tabla 21.**

*Ecuaciones de las rectas de calibración externa utilizadas para la cuantificación de las BA en muestras de pescado y queso.*

Compuesto	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>	LOD, µg/kg	LOQ, µg/kg
Putrescina	$y = 51836.0 \cdot x$	0.987	3.29	9.96
Cadaverina	$y = 33467.0 \cdot x$	0.980	1.53	4.65
Histamina	$y = 51786.5 \cdot x$	0.994	1.54	4.66
Tiramina	$y = 34557.3 \cdot x$	0.996	2.94	8.91

### 7.3.1 Monitoreo de aminas biogénicas en mojarra

En la **Tabla 22** se presentan los resultados del monitoreo de las cuatro BA en mojarra, en función del tiempo de su almacenamiento. Como se describió en la **Sección 6.3.2** de la Metodología, el extracto LSE se aforó a un volumen de 25 mL y, posteriormente, se sometió a una segunda dilución, con factores de dilución (FD) específicos para cada muestra que variaron entre uno y nueve, según se detalla en la **Tabla A 5** (Véanse **Apéndices**). Esta dilución adicional garantizó que los valores obtenidos se mantuvieran dentro del rango lineal de la curva de calibración.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

A partir de la curva de calibración, se calculó la concentración de la muestra diluida que fue inyectada al sistema UHPLC-Q-Orbitrap. Finalmente, se aplicó la **Ecuación 11**, la cual consideró el volumen inicial al que se aforó el extracto (0.025 L), la masa de la muestra (0.005 kg) y el factor de dilución FD empleado en la segunda etapa (Véanse **Apéndices, Tabla A 5** para cada muestra), permitiendo así obtener las concentraciones finales de las BA en las muestras de mojarra, expresadas en mg/kg y reportadas en la **Tabla 22**.

$$C_{\frac{mg}{kg}} = C_{\frac{\mu g}{L}} \cdot FD \cdot \frac{0.025 L}{0.005 kg} \cdot \frac{1 mg}{1000 \mu g} \quad (11)$$

**Donde:**

$C_{\frac{mg}{kg}}$  = Concentración en mg/kg de BA en la muestra original.

$C_{\frac{\mu g}{L}}$  = Concentración en  $\mu\text{g/L}$  de BA en la muestra diluida inyectada en el sistema UHPLC-Q-Orbitrap, y calculada a través de la curva de calibración.

FD = Factor de dilución aplicado para cada muestra (Véanse **Apéndices, Tabla A5**)

**Tabla 22.**

*Concentración de aminas biogénicas, en función del tiempo de almacenamiento del pescado mojarra, a 1- 4 °C, obtenida por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, usando el método de calibración externa.*

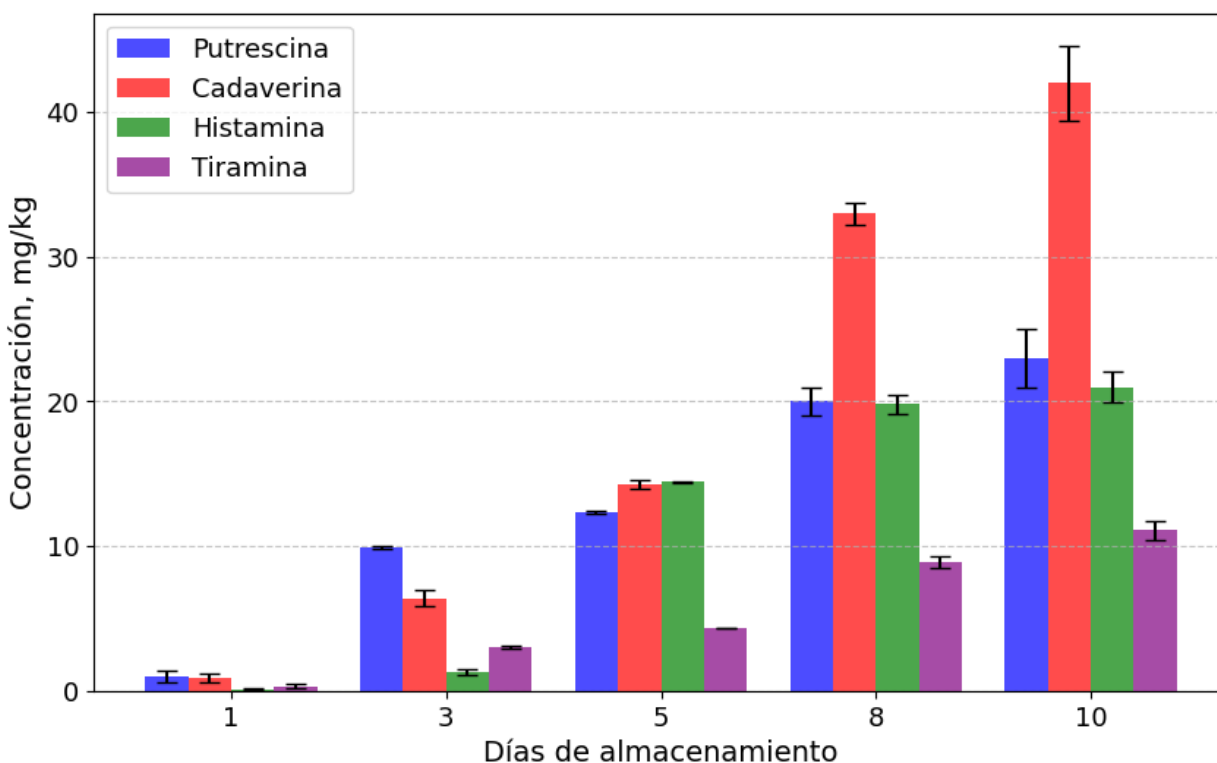
Compuesto	Concentración, mg/kg $\pm$ s, n = 2				
	Día 1	Día 3	Día 5	Día 8	Día 10
Putrescina	1.0 $\pm$ 0.43	9.91 $\pm$ 0.08	12.3 $\pm$ 0.1	20.0 $\pm$ 0.96	23 $\pm$ 2.0
Cadaverina	0.9 $\pm$ 0.27	6.4 $\pm$ 0.53	14.3 $\pm$ 0.31	33.0 $\pm$ 0.75	42 $\pm$ 2.6
Histamina	0.11 $\pm$ 0.03	1.3 $\pm$ 0.20	14.42 $\pm$ 0.07	19.8 $\pm$ 0.67	21 $\pm$ 1.1
Tiramina	0.3 $\pm$ 0.15	3.0 $\pm$ 0.1	4.33 $\pm$ 0.01	8.9 $\pm$ 0.44	11.1 $\pm$ 0.66

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Se evidenció un aumento progresivo de la concentración de BA con el tiempo de almacenamiento, lo cual podría indicar la presencia de bacterias en las muestras y, a su vez, la ocurrencia de algunos procesos enzimáticos, *e.g.*, reacciones de descarboxilación catalizadas por enzimas presentes en bacterias, que dan origen a las BA de interés. En la **Figura 30**, se visualizan gráficamente los resultados.

**Figura 30.**

*Concentración de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, en función del tiempo de almacenamiento del pescado mojarra a 1 - 4 °C (n = 2), determinada mediante HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS utilizando el método de calibración externa.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

En la **Figura 30** se observa que la cantidad de la cadaverina incrementó mucho más, que otras BA, durante los días de almacenamiento, mientras que la cantidad de la tiramina no aumentó tan rápido. Este comportamiento podría estar relacionado con la cantidad de aminoácidos libres (FAA) presentes en la matriz alimenticia. Es posible que la lisina, precursor directo de la cadaverina, se encuentre en mayor concentración en los tejidos del pescado en comparación con la tirosina, precursor de la tiramina.

Sin embargo, la formación de las BA no depende únicamente de los niveles de aminoácidos precursores, sino también de la actividad enzimática de las bacterias presentes, específicamente, de enzimas descarboxilasas. Se ha reportado que *Escherichia coli* (W. Ma *et al.*, 2017) y *Streptococcus thermophilus* (Gezginc *et al.*, 2013) poseen lisina descarboxilasa, enzima encargada de la conversión de la lisina en cadaverina. Sin embargo, en este caso, no se realizaron estudios de carga bacteriana, por lo que no fue posible confirmar y explicar con certeza el origen de las diferencias observadas.

Durante los diez días de monitoreo, la concentración de las BA estudiadas se mantuvieron por debajo de los límites permitidos o sugeridos (Véase **Tabla 3, Sección 4.2**). En el primer y tercer día de almacenamiento, la putrescina fue la BA más abundante, seguida de la cadaverina. Sin embargo, a partir del quinto día de almacenamiento hasta el décimo, la cadaverina se detectó en la concentración más alta de todas las BA estudiadas. La predominancia de la cadaverina también se observó en los estudios con atún, este hallazgo es relevante para el análisis de seguridad alimentaria, ya que los niveles considerados seguros para la cadaverina no están claramente

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

establecidos y no contemplan factores de riesgo adicionales, como su capacidad de formar nitrosopiperidina (NPIP), potencialmente carcinogénica (Al Bulushi *et al.*, 2009).

La interacción entre la cadaverina y la histamina merece especial atención debido a su efecto potenciador en la toxicidad. Según estudios realizados en conejillos de Indias (Bjeldanes *et al.*, 1978), la combinación de cadaverina (50 mg/kg) con histamina (150 mg/kg) resultó en la mortalidad del 33 % de los individuos. Mongar (1957) reportó que la cadaverina no solo potencia las contracciones inducidas por la histamina en el intestino de conejillos de Indias, sino que también inhibe su degradación enzimática. Sánchez *et al.* (2022) realizaron ensayos enzimáticos *in vitro* utilizando histamina como sustrato de reacción en combinación con distintas proporciones de cadaverina. Los resultados mostraron que la cadaverina retrasó significativamente la degradación de la histamina en todas las concentraciones evaluadas. Estos hallazgos son especialmente relevantes en el contexto del presente estudio, donde en el décimo día de almacenamiento se detectaron niveles de cadaverina de  $42 \pm 2.6$  mg/kg y de histamina de  $21 \pm 1.1$  mg/kg. Aunque la concentración de histamina fue relativamente baja, en matrices alimenticias con niveles más elevados de esta amina, la presencia simultánea de cadaverina en las concentraciones detectadas podría incrementar el riesgo toxicológico.

Estos resultados sugieren la necesidad de incluir a la cadaverina como un analito *target* en estudios de seguridad alimentaria, evaluándola de manera conjunta con la histamina. La predominancia de cadaverina tanto en atún como en mojarra refuerza su relevancia, ya que su capacidad de potenciar los efectos adversos de la histamina podría representar un riesgo significativo para la salud de los consumidores.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

No se encontraron reportes en la literatura sobre el monitoreo de aminas biogénicas en mojarra. Sin embargo, Ben-Gigirey *et al.* (1998) reportaron el contenido de BA en músculo de atún blanco (*Thunnus alalunga*) tras uno, tres, seis y nueve meses de almacenamiento a -18 °C y -25 °C. La putrescina aumentó su concentración más rápidamente que las demás BA estudiadas, alcanzando niveles de 59.04 mg/kg y 68.26 mg/kg tras nueve meses de almacenamiento a -18 °C y -25 °C, respectivamente. Las concentraciones de cadaverina e histamina se mantuvieron por debajo de 3 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Además, el estudio microbiológico confirmó la ausencia de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, e.g., *Raoultella planticola* y *E. coli*, microorganismos asociados a la formación de histamina (Kanki *et al.*, 2007) y cadaverina (Ma *et al.*, 2017). Esto podría explicar el aumento limitado de la concentración de estas BA en el tiempo.

En el presente estudio, la cadaverina fue la BA que presentó el mayor incremento en concentración, seguida por la putrescina, alcanzando valores de  $43 \pm 2.1$  mg/kg y  $23 \pm 2.0$  mg/kg, respectivamente, tras diez días de almacenamiento a 1-4 °C. Aunque el tiempo de almacenamiento fue significativamente menor en comparación con el del estudio de Ben-Gigirey *et al.* (1998), la temperatura más alta utilizada en la presente investigación podría explicar la acumulación más rápida de las BA, ya que las temperaturas más altas favorecen el crecimiento de microorganismos y, por ende, la actividad enzimática descarboxilasa responsable de la síntesis de estas aminas. Estos hallazgos coinciden con los reportados por Lozada *et al.* (2020), quienes evaluaron la formación de histamina, putrescina y tiramina en trucha arcoíris, cachama y tilapia provenientes de mercados en Nariño, Colombia, bajo diferentes condiciones, y concluyeron que la temperatura de almacenamiento fue uno de los factores que más influyó en la acumulación de las BA.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

La concentración baja de cadaverina, encontrada en el estudio de Ben-Gigirey *et al.* (1998) podría estar relacionada con la ausencia de bacterias capaces de convertir la lisina en esta amina *e.g.*, *E.coli*. En cambio, en la mojarra, la concentración de cadaverina elevada sugiere la posible presencia de *E. coli* u otros microorganismos involucrados en su síntesis, una hipótesis que concuerda con los resultados del análisis de bases de datos microbiológicos en alimentos en Colombia, realizado por el Instituto Nacional de Salud y el grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos (2021) entre 2016 y 2020; en el cual se evidenció una prevalencia alta de *E. coli* (60.9 %) en diversos alimentos provenientes de supermercados y plazas de mercado en distintos departamentos del país (IC95: 37.9% - 84%).

Estos resultados resaltan la importancia del análisis microbiológico para comprender la relación entre los microorganismos presentes y la producción de BA, lo que resulta crucial para garantizar la inocuidad de los alimentos y minimizar los riesgos de su consumo para la salud pública.

### **7.3.2 Análisis de aminas biogénicas en queso**

En la **Tabla 23** se presentan las concentraciones de BA cuantificadas, por un método cromatográfico de calibración externa (Véase **Tabla 21**) en los siguientes tres tipos de queso: Chitagá, Reinoso y cuajada.

En la **Figura 31** se presenta la concentración de las BA estudiadas en cada tipo de queso.

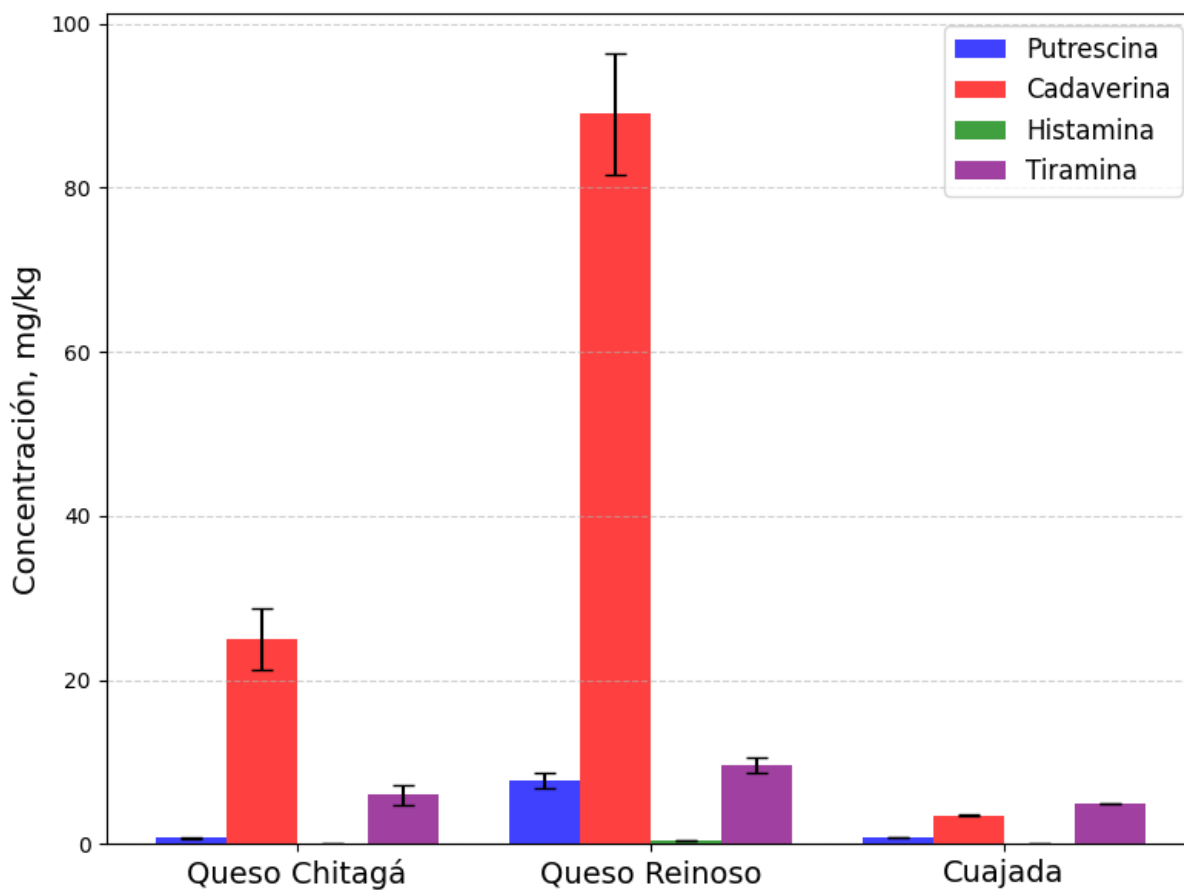
**Tabla 23.**

*Concentración de aminas biogénicas en quesos Chitagá, Reinoso y cuajada, determinada mediante HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, usando el método de calibración externa.*

Compuesto	Concentración, mg/kg $\pm$ s, n = 2		
	Queso Chitagá	Queso Reinoso	Cuajada
Putrescina	0.76 $\pm$ 0.09	7.8 $\pm$ 0.96	0.79 $\pm$ 0.04
Cadaverina	25 $\pm$ 3.7	89 $\pm$ 7.4	3.5 $\pm$ 0.11
Histamina	N. D.	0.40 $\pm$ 0.01	N. D.
Tiramina	6 $\pm$ 1.2	9.6 $\pm$ 0.93	4.93 $\pm$ 0.08

**Figura 31.**

*Concentraciones de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en quesos Chitagá, Reinoso y cuajada, encontrados por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS, usando el método de calibración externa.*



## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Las concentraciones de las BA en los quesos Chitagá, Reinoso y en cuajada difirieron entre sí, sin embargo, en todas las muestras, la cadaverina fue la BA más abundante. La concentración de la cadaverina fue más alta en el queso Reinoso ( $89 \pm 7.4$  mg/kg), su cantidad fue aproximadamente el doble de la cadaverina en mojarra, después de diez días de almacenamiento ( $42 \pm 2.6$  mg/kg). El contenido alto de cadaverina en el queso Reinoso podría estar relacionado con su proceso de maduración. Este queso es un producto tradicional, originario de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, y es el único queso madurado tradicional de Colombia.

Su proceso de maduración, que requiere al menos 30 días e involucra cultivos de bacterias y levaduras de géneros como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp., *Cladosporium* spp., *Botrytis* spp., *Geotrichum* spp., además de levaduras como *Trichosporum beigelii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida guilliermondii* y *Cryptococcus uniguttulatus* (López, 2011). Estos microorganismos podrían estar involucrados en la conversión de la lisina a la cadaverina, aunque no se encontraron reportes específicos sobre la presencia de enzimas lisina descarboxilasa en estos organismos.

A diferencia del queso Reinoso, el queso Chitagá y la cuajada no pasan por este tipo de procesos de curación y maduración, lo que se refleja en concentraciones menores de las BA. Esto concuerda con los hallazgos de Kandasamy *et al.* (2021), quienes determinaron el contenido de las BA en queso fresco y queso maduro, y observaron que los quesos maduros acumularon concentraciones de BA más altas en comparación con los quesos frescos. Un grado de maduración mayor podría favorecer el crecimiento y la actividad de los microorganismos con enzimas descarboxilasas implicados en la síntesis de las BA.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

La putrescina y la cadaverina se encontraron en el 63 % de los quesos maduros, con concentraciones que variaron entre 6.92 - 211.89 mg/kg y 4.13 - 127.83 mg/kg, respectivamente; mientras que BA en estas concentraciones no fueron detectadas para la mayoría de los quesos frescos estudiados.

La histamina no se detectó en el queso Chitagá ni en la cuajada, y solo se encontró en concentraciones bajas en el queso Reinoso. De manera similar, Kandasamy *et al.* (2021) no detectaron histamina en quesos frescos, *e.g.*, Burrata, Mascarpone y Ricotta. Mayer & Fiechter (2018) estudiaron el contenido de BA en siete tipos de queso, seis de los cuales eran maduros, y detectaron la histamina en el 79 % en todas las muestras, sin embargo, solo el 5 % de los quesos superó los 170 mg/kg.

La tiramina fue la segunda BA más abundante en los quesos Reinoso, Chitagá y cuajada, se encontró en la concentración más alta en el queso Reinoso ( $9.6 \pm 0.93$  mg/kg). Todas las muestras presentaron concentraciones de tiramina por debajo del límite sugerido (Önal, 2007) (100 - 800 mg/kg). Kandasamy *et al.* (2021) detectaron la tiramina en el 88 % de los quesos analizados, con concentraciones entre 11.08 y 310.11 mg/kg, quesos maduros, como Cheddar y Edam presentaron concentraciones más altas de tiramina.

En general, los resultados obtenidos en este estudio confirman que la maduración y la fermentación de los quesos influyen significativamente en la acumulación de BA, especialmente, en el caso de la cadaverina y la tiramina. Esto ha sido consistente con estudios previos que han reportado concentraciones mayores de BA en quesos maduros en comparación con los frescos, resaltando la importancia de los procesos microbiológicos involucrados en la formación de estas aminas.

## 8. Conclusiones

Los resultados evidenciaron un aumento progresivo, en función del tiempo de almacenamiento, de la concentración de aminas biogénicas en la mojarra almacenada a 1 - 4 °C, lo que sugiere la presencia de microorganismos con actividad enzimática de descarboxilación de aminoácidos. Tras diez días de almacenamiento, la cadaverina fue la amina más abundante ( $42 \pm 2.6$  mg/kg), seguida por la putrescina ( $23 \pm 2.0$  mg/kg), la histamina ( $21 \pm 1.1$  mg/kg) y la tiramina ( $11.1 \pm 0.66$  mg/kg). Estos hallazgos resaltan la importancia del tiempo y las condiciones de almacenamiento como un factor crítico en la formación de aminas biogénicas en pescado.

La cadaverina fue la amina biogénica mayoritaria en los quesos analizados, alcanzando su concentración más alta en el queso maduro tipo Reinoso ( $89 \pm 7.4$  mg/kg). Se observó que el proceso de maduración y fermentación fue un factor determinante en la acumulación de aminas biogénicas, ya que, en quesos frescos, de Chitagá y la cuajada, las concentraciones de aminas biogénicas fueron considerablemente menores.

La predominancia de la cadaverina en todas las matrices analizadas es preocupante debido a su capacidad para formar nitrosaminas y potenciar la toxicidad de la histamina, sumado esto a la ausencia de regulaciones y niveles de seguridad definidos en Colombia. Esto resalta la necesidad de incluir la cadaverina en estudios de seguridad alimentaria. La posible presencia de bacterias con enzimas lisina descarboxilasa, como *E. coli*, podría explicar la elevada producción de esta amina, aunque se requiere el análisis microbiológico para confirmarlo.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

Desde el punto de vista del análisis instrumental, se observó que el uso de gradientes UHPLC con una mayor proporción de fase orgánica genera distorsión en los picos cromatográficos y reduce la eficiencia de separación. Asimismo, valores más bajos de voltaje de capilar favorecieron la detección de moléculas pequeñas como las aminas biogénicas estudiadas.

La prevalencia del fragmento  $[(M + H) - NH_3]^+$  en los espectros de masas obtenidos por HESI-UHPLC-Q-*Orbitrap*-HRMS de la putrescina, la cadaverina y la tiramina podría estar relacionada con las temperaturas elevadas en el sistema, que promueven la desaminación. Por otro lado, la técnica MSPD no resultó adecuada para matrices con alto contenido de grasas sin la incorporación de pasos adicionales de limpieza; con la técnica de extracción LSE se lograron más altas eficiencias y reproducibilidades.

### 9. Recomendaciones

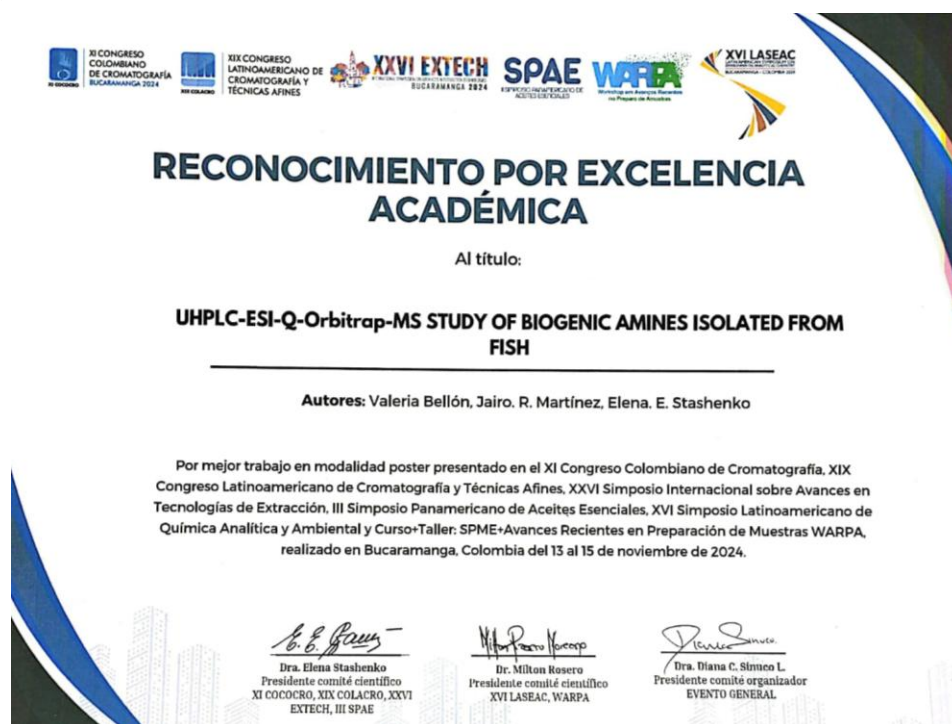
1. Se sugiere incluir el análisis de la cadaverina en estudios de seguridad alimentaria, en conjunto con otras aminas biogénicas, en especial aquellas cuya toxicidad aumenta en su presencia, como la histamina. Será fundamental promover estudios adicionales que permitan definir límites de seguridad y establecer regulaciones específicas para las aminas biogénicas en alimentos fermentados y de origen animal, como medidas esenciales para proteger la salud pública.
2. Se recomienda realizar análisis microbiológicos de las muestras, con el fin de confirmar y comprender con certeza el origen de las aminas biogénicas. La producción de estas aminas no depende exclusivamente de la presencia de aminoácidos precursores, sino también de la actividad bacteriana, en particular de aquellas bacterias que poseen enzimas descarboxilasas.
3. El análisis de quesos frescos (Chitagá y cuajada) y maduros (Reinoso) permitió evidenciar diferencias en el contenido de aminas biogénicas, según el tipo de tratamiento del queso. Se sugiere comparar productos con distintos grados de maduración, para evaluar como el tiempo de maduración o de fermentación influye sobre los niveles de las aminas biogénicas.
4. Para garantizar una estimación más exacta del porcentaje de recuperación de aminas en este estudio, se recomienda emplear una matriz de características más similares a las del pescado o el queso. Dado que la composición de la matriz (contenido de agua, grasa, proteínas y otros componentes) influye en la recuperación de las aminas biogénicas, una matriz más representativa permitirá obtener valores de recuperación más exactos.

## 10. Divulgación de resultados

Los resultados de este proyecto se presentaron en modalidad de póster bajo el título “UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS study of biogenic amines isolated from fish” en el marco del XI Congreso Colombiano de Cromatografía (XI COCOCRO), XIX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines (XIX COLACRO), XXVI Simposio Internacional sobre Avances en Tecnologías de Extracción (XXVI EXTECH), III Simposio Panamericano de Aceites esenciales (III SPAE), XVI Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental (XVI LASEAC), realizados en Bucaramanga, Colombia, del 13 al 15 de noviembre de 2024. Se obtuvo un reconocimiento en modalidad de póster, el cual se adjunta en la **Figura 32**.

### Figura 32.

*Reconocimiento al proyecto en modalidad póster en el marco de los Congresos XI COCOCRO, XIX COLACRO, XXVI EXTECH, III SPAE, XVI LASEAC, llevados a cabo en Bucaramanga, Neomundo, del 13 al 15 de noviembre de 2024.*



**Referencias bibliográficas**

- Al Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H. C. & Dykes, G. A. (2009). Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49 (4), 369–377. <https://doi.org/10.1080/10408390802067514>.
- Azim, M. A., Moloy, M. & Bhasin, P. S. (2015). HPLC method development and validation: A review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4 (4), 39-46. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407>.
- Ben-Gigirey, B., Vieites Baptista De Sousa, J. M., Villa, T. G.; Barros-Velazquez, J. (1998). Changes in biogenic amines and microbiological analysis in albacore (*Thunnus alalunga*) muscle during frozen storage. *Journal of Food Protection*, 61 (5), 608–615. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.5.608>.
- Bilgin, B. & Gençcelep, H. (2015). Determination of biogenic amines in fish products. *Food Science and Biotechnology*, 24 (5), 1907–1913. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0251-4>.
- Bjeldanes, L. F., Schutz, D. E. & Morris, M. M. (1978). On the aetiology of scombroid poisoning: Cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16 (2), 157–159. [https://doi.org/10.1016/S0015-6264\(78\)80196-5](https://doi.org/10.1016/S0015-6264(78)80196-5).
- Cipolla, B. G., Havouis, R. & Moulinoux, J. P. (2007). Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long-term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*, 33 (2), 203–212. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0524-1>.

Creative Proteomics (s.f). *Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer*.

<https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>. Fecha de consulta: 3 de abril de 2024.

Dadáková, E., Křížek, M. & Pelikánová, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 116 (1), 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.018>.

Danquah, A. O., Benjakul, S. & Simpson, B. K. (2012). Biogenic Amines in Foods. En: Simpson, B. K., Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Benjakul, S., Paliyath, G. & Hui, Y. H. (Eds.), *Food Biochemistry and Food Processing*. Wiley. Hoboken, Estados Unidos, 820-832. <https://doi.org/10.1002/9781118308035.ch43>.

EFSA. (2011). Scientific opinion on risk-based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9, 93-110. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>.

Erim, F. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 52, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.018>.

FDA. (2022). *Fish and fishery products hazards and controls*. Center for Food Safety and Applied Nutrition. <https://www.fda.gov/food/seafood-guidance-documents-regulatory-information/fish-and-fishery-products-hazards-and-controls>. Fecha de consulta: 1 de abril de 2024.

Gezginc, Y., Akyol, I., Kuley, E. & Özogul, F. (2013). Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. *Food Chemistry*, 138(1), 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.138>.

- Guo, X., Dai, Z. & Zhang, W. (2022). Pollution, exposure and risk of biogenic amines in canned sea fish: classification of analytical methods based on carbon spheres QuEChERS extraction combined with HPLC. *Molecules*, 27 (19), 6243. <https://doi.org/10.3390/molecules27196243>.
- Hansen, S. H. (2016). HPLC/UHPLC. En: Müllertz, A., Perrie Y. & Rades T. (Eds.), *Analytical techniques in the pharmaceutical sciences*. Springer. Berlín, Alemania, 413-437. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-4029-5_13).
- Herrán, O. F., Bermúdez, J. N. & Zea, M. (2020). Cambios alimentarios en Colombia; resultados de dos encuestas nacionales de nutrición, 2010-2015. *Salud UIS*, 52 (1), 21–31. <https://doi.org/10.18273/revsal.v52n1-2020004>.
- Hui, Y. H. & Sherkat, F. (2005). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. CRC Press. Boca Ratón, Estados Unidos, 13.1-13.31.
- Ibarra, A., Wrobel, K., Corrales Escobosa, A., Torres, J., Sevilla, M. A. & Wrobel, K. (2015). Determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in different chemical matrices by high performance liquid chromatography - electrospray ionization - ion trap tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS/MS). *Journal of Chromatography B*, 1002, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.08.036>.
- Instituto Nacional de Salud & Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos y Plaguicidas. (2021). Reporte técnico: análisis de bases de datos microbiológicos de 2016 a 2020 en alimentos para establecer mapas de priorización de riesgo. <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/reportes-tecnicos/analisis-de-bases-microbiologicas-2016-20.pdf>. Fecha de consulta: 26 de febrero de 2025.

- Jia, W., Zhang, R., Shi, L., Zhang, F., Chang, J. & Chu, X. (2020). Effects of spices on the formation of biogenic amines during the fermentation of dry fermented mutton sausage. *Food Chemistry*, 321, 126723. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126723>.
- Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H. B., Seol, K.-H. & Ham, J. S. (2021). Quantitative analysis of biogenic amines in different cheese varieties obtained from the Korean domestic and retail markets. *Metabolites*, 11 (1), 31. <https://doi.org/10.3390/metabo11010031>.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. & Baba, E. (2017). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Applied Environmental Microbiology* 73 (5), 1467–1473. <https://doi.org/10.1128/AEM.01907-06>.
- Lázaro de la Torre, C. A. & Conte, C. A. (2018). Detection of biogenic amines: Quality and toxicity indicators in food of animal origin. En: Holban A. M. & Grumezescu, A. M. (Eds.), *Handbook of Food Bioengineering: Food Control and Biosecurity*. Academic Press. Amsterdam, Países Bajos, 225-257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811445-2.00006-4>.
- López M. A. (2011). Diversidad de la microbiota fúngica del queso Paipa fabricado en Pacho, Cundinamarca. *Revista ION*, 24 (1), 77–84.
- Lozada-Castro, J. J., Arturo-Perdomo, D. & Pardo-Rueda, A. (2020). Biogenic amines in rainbow trout, tilapia, and cachama fish, available for consumption in Nariño, southern Colombia. *Universitas Scientiarum*, 25 (2), 321–340. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC25-2.bair>.

- Ma, J.-K., Raslan, A. A., Elbadry, S., El-Ghareeb, W. R., Mulla, Z. S., Bin-Jumah, M., Abdel-Daim, M. M. & Darwish, W. S. (2020). Levels of biogenic amines in cheese: correlation to microbial status, dietary intakes, and their health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 27 (35), 44452–44459. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10401-2>.
- Ma, W., Chen, K., Li, Y., Hao, N., Wang, X. & Ouyang, P. (2017). Advances in cadaverine bacterial production and its applications. *Engineering*, 3 (3), 308–317. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.012>.
- Mayer, H. K. & Fiechter, G. (2018). UHPLC Analysis of biogenic amines in different cheese varieties. *Food Control*, 93, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.040>.
- Mazzotti, F., Di Donna, L., Napoli, A., Aiello, D., Siciliano, C., Athanassopoulos, C. M. & Sindona, G. (2014). N-hydroxysuccinimidyl *p*-methoxybenzoate as suitable derivative reagent for isotopic dilution assay of biogenic amines in food. *Journal of Mass Spectrometry*, 49 (9), 802–810. <https://doi.org/10.1002/jms.3417>.
- Medina, M. A., Urdiales, J. L., Rodríguez-Caso, C., Ramírez, F. J. & Sánchez-Jiménez, F. (2003). Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (1), 23–59. <https://doi.org/10.1080/713609209>.
- Meyer, V. R. (2004). *Practical high-performance liquid chromatography*. John Wiley & Sons. Hoboken, Estados Unidos, 17-57. <https://doi.org/10.1002/0470032677>.

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

- Middlebrooks, B. L., Toom, P., Douglas, W., Harrison, R. & McDowell, S. (2006). Effects of storage time and temperature on the microflora and amine-development in spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *Journal of Food Science*, 53, 1024–1029. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13522.x>.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2012). Resolución 122 de 2012. Sistema único de información normativa. <https://www.suinjuriscol.gov.co/viewDocument.asp?ruta=Resolucion/30033961>. Fecha de consulta: 25 de marzo de 2024.
- Mohammed, G. I., Bashammakh, A. S., Alsibaai, A. A., Alwael, H. & El-Shahawi, M. S. (2016). A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs. *Trends in Analytical Chemistry*, 78, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.007>.
- Mongar, J.L. (1957). Effect of chain length of aliphatic amines on histamine potentiation and release. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 12, 140–148. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1957.tb00112.x>.
- Montegiove, N., Leonardi, L., Cesaretti, A., Pellegrino, R. M., Pellegrino, A., Emiliani, C. & Calzoni, E. (2023). Biogenic amine content analysis of three chicken-based dry pet food formulations. *Animals* 13 (12), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ani13121945>.
- Moret, S. & Conte, L. S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, 729 (1), 363–369. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00961-2](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00961-2).

- Nout, M. J. R. (1994). Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 27 (3), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90097-3).
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103 (4), 1475–1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>.
- Özogul, Y. & Özogul, F. (2019). Biogenic amines: Formation, toxicity, regulations in food. En: Doe, A. & Green, B. (Eds.), *Food Chemistry, Function and Analysis* (pp. 1-17). Ed. Royal Society of Chemistry. Londres, Reino Unido, 1-17. <https://doi.org/10.1039/9781839162265-00123>.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clinical Biochemist Reviews*, 30 (1), 19–34.
- Płotka-Wasyłka, J. M., Morrison, C., Biziuk, M. & Namieśnik, J. (2015). Chemical derivatization processes applied to amine determination in samples of different matrix composition. *Chemical Reviews*, 115 (11), 4693–4718. <https://doi.org/10.1021/cr4006999>.
- Poupin, P., Godon, J. J., Zumstein, E. & Truffaut, N. (1999). Degradation of morpholine, piperidine, and pyrrolidine by mycobacteria: evidences for the involvement of a cytochrome P450. *Canadian Journal of Microbiology*, 45 (3), 209–216. <https://doi.org/10.1139/w99-002>.
- Pucciarini, L., Ianni, F., Galarini, R., Sardella, R. & Natalini, B. (2018). Importance of quantitative analysis of toxic biogenic amines in food matrices. *International Journal of Clinical Research & Trial*, 3(1), 123. <https://doi.org/10.15344/2456-8007/2018/123>.

- Quemener, V., Blanchard, Y., Chamaillard L., Havouis, R., Cipolla, B. & Moulinoux J. P. (1994). Polyamine deprivation: a new tool in cancer treatment. *Anticancer Research*, 14 (2A), 443–448.
- Rauscher-Gabernig, E., Gabernig, R., Brueller, W., Grossgut, R., Bauer, F. & Paulsen, P. (2012). Dietary exposure assessment of putrescine and cadaverine and derivation of tolerable levels in selected foods consumed in Austria. *European Food Research Technology*, 235 (3), 209–220. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1748-1>.
- Rodríguez, M. B. R., Carneiro, C. da S., Feijó, M. B. da S., Júnior, C. A. C. & Mano, S. B. (2014). Bioactive amines: aspects of quality and safety in food. *Food and Nutrition Sciences*, 5 (2), 138–146. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.52018>.
- Romero-González, R., Alarcón-Flores, M. I., Vidal, J. L. M. & Frenich, A. G. (2012). Simultaneous determination of four biogenic and three volatile amines in anchovy by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (21), 5324–5329. <https://doi.org/10.1021/jf300853p>.
- Ruiz-Capillas, C., Triki, M., Heras, C., Tejada-Yábar, M., Pálmadóttir, H., Porvaldsdóttir, R., Jiménez Colmenero, F. & Herrero, A. M. (2015). Essay of different extraction procedures in capelin fish meal for biogenic amine determination by HPLC. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24, 443–453. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.787482>.

- Sánchez-Pérez, S., Comas-Basté, O., Costa-Catala, J., Iduriaga-Platero, I., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou, M. C. & Latorre-Moratalla, M. L. (2022). The rate of histamine degradation by diamine oxidase is compromised by other biogenic amines. *Frontiers in Nutrition*, 9, 897028. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.897028>.
- Sentellas, S., Núñez, Ó. & Saurina, J. (2016). Recent advances in the determination of biogenic amines in food samples by (U)HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7667–7678. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02789>.
- Shimadzu. (s.f). *Introduction to mass analyzers*. [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass\\_analyzers.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html). Fecha de consulta: 25 de marzo de 2024.
- Sirocchi, V., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Vittori, S. & Sagratini, G. (2014). Simultaneous determination of ten underivatized biogenic amines in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 49 (9), 819–825. <https://doi.org/10.1002/jms.3418>.
- Snyder, L. R. & Kirkland, J. J. (2009). *Introduction to modern liquid chromatography* (2<sup>nd</sup> Ed). John Wiley & Sons. Hoboken, Estados Unidos, 1-17. <https://doi.org/10.1002/9780470508183.ch1>.
- Sugiyama, Y., Mori, Y., Nara, M., Kotani, Y., Nagai, E., Kawada, H., Kitamura, M., Hirano, R., Shimokawa, H., Nakagawa, A., Minami, H., Gotoh, A., Sakanaka, M., Iida, N., Koyanagi, T., Katayama, T., Okamoto, S. & Kurihara, S. (2022). Gut bacterial aromatic amine production: aromatic amino acid decarboxylase and its effects on peripheral serotonin production. *Gut Microbes*, 14 (1), 2128605. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2128605>.

- Thermo Fisher Scientific. (2009). *H-ESI probe user guide*. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/H-ESI-Probe-User.pdf>. Fecha de consulta: 1 de diciembre de 2024.
- Thermo Fisher Scientific. (2017). *Exactive series operating manual*. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/man-bre0012255-exactive-series-manbre0012255-en.pdf>. Fecha de consulta: 22 de mayo de 2024.
- Til, H. P., Falke, H. E., Prinsen, M. K. & Willems, M. I. (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35 (3), 337–348. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00121-X).
- Triki, M.; Herrero, A.; Jiménez-Colmenero, F.; Ruíz-Capillas, C. (2018). Quality assessment of fresh meat from several species based on free amino acid and biogenic amine contents during chilled storage. *Foods*, 7 (9), 132. <https://doi.org/10.3390/foods7090132>.
- van Kessel, S. P., Frye, A. K., El-Gendy, A. O., Castejon, M., Keshavarzian, A., van Dijk, G. & El Aidy, S. (2019). Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Nature Communications*, 10, 310. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08294-y>.
- Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A. & Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (11), 4324–4328. <https://doi.org/10.1021/jf970092k>.

- Williams, B. B., Van Benschoten, A. H., Cimermancic, P., Donia, M. S., Zimmermann, M., Taketani, M., Ishihara, A., Kashyap, P. C., Fraser, J. S. & Fischbach, M. A. (2014). Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine. *Cell Host & Microbe*, 16 (4), 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.00>.
- Wilm, M. (2011). Principles of electrospray ionization. *Molecular & Cellular Proteomics* 10 (7). M111.009407. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009407>.
- Wójcik, W., Łukasiewicz-Mierzejewska, M., Damaziak, K. & Bień, D. (2022). Biogenic amines in poultry meat and poultry products: formation, appearance, and methods of reduction. *Animals*, 12 (12), 1-14. <https://doi.org/10.3390/ani12121577>.
- Zhang, X., Hui, Y., Jiang, M., Cai, Y., Huang, D., Yang, G. & Kong, C. (2021). Determination of 6 biogenic amines in food using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1653, 462415. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462415>.

## Apéndices

**Apéndice A.**

Relaciones entre las intensidades de moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y de los fragmentos  $[(M+H)-NH_3]^+$ , encontradas para cuatro BA, usando diferentes voltajes de capilar (1, 2, 3, 4, 5 kV), de acuerdo con la **Ecuación 3, Sección 7.1.1.2.**

Compuesto	$\frac{I_{[M+H-NH_3]^+}}{I_{[M+H-NH_3]^+} + I_{[M+H]^+}}$				
	Voltaje del capilar, kV				
	1	2	3	4	5
Putrescina	0.9303	0.9296	0.9327	0.9348	0.9369
Cadaverina	0.8432	0.8452	0.8505	0.8553	0.8559
Histamina	0.1629	0.1614	0.1654	0.1706	0.1745
Tiramina	0.9419	0.9405	0.9420	0.9439	0.9447

**Apéndice B.**

Relaciones entre las intensidades de moléculas protonadas  $[M+H]^+$  y de los fragmentos  $[(M+H)-NH_3]^+$ , encontradas para cuatro BA, usando diferentes voltajes de capilar (1, 2, 3, 4, 5 kV), de acuerdo con la **Ecuación 4, Sección 7.1.1.2.**

Compuesto	$\frac{I_{[M+H]^+}}{I_{[M+H-NH_3]^+} + I_{[M+H]^+}}$				
	Voltaje del capilar, kV				
	1	2	3	4	5
Putrescina	0.0699	0.0697	0.0659	0.0648	0.0630
Cadaverina	0.1571	0.1527	0.1464	0.1466	0.1451
Histamina	0.8382	0.8379	0.8317	0.8259	0.8278
Tiramina	0.0587	0.0596	0.0583	0.0557	0.0551

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

**Apéndice C.**

Áreas de picos cromatográficos (corrientes iónicas parciales) del fragmento  $[(M+H)-NH_3]^+$  en los espectros de masas de cuatro BA, empleando un voltaje de capilar de 2 kV y modos de adquisición full scan y PRM (HCD: 10, 15, 20 eV).

Compuesto	Área del pico cromatográfico, cuentas · 10 <sup>6</sup> ± s, n = 2			
	Full scan	Modo de adquisición PRM		
		Energía de HCD, eV		
		10	15	20
Putrescina	40 ± 1.03	0.31 ± 0.02	0.290 ± 0.003	0.30 ± 0.03
Cadaverina	15.9 ± 0.44	0.50 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.51 ± 0.01
Histamina	14.4 ± 0.11	37 ± 4.30	38 ± 3.91	38 ± 5.44
Tiramina	136.9 ± 0.51	1.65 ± 0.02	1.68 ± 0.03	1.77 ± 0.02

**Apéndice D.**

Valores de  $W_{0.5}$  de los picos cromatográficos de la putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, empleando cuatro gradientes diferentes en el sistema UHPLC.

Compuesto	$W_{0.5}$ , min			
	Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Gradiente 4
Putrescina	0.40	0.58	1.50	2.60
Cadaverina	0.48	0.50	0.62	1.60
Histamina	0.40	0.62	1.98	2.20
Tiramina	0.38	0.42	0.38	0.36

**Apéndice E.**

*Factores de dilución empleados en los extractos de pescado y quesos analizados por HESI-UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS.*

<b>Muestra</b>	<b>Factor de dilución</b>
Extracto de mojarra - Día 1	1
Extracto de mojarra - Día 3	2
Extracto de mojarra - Día 5	3
Extracto de mojarra - Día 8	6
Extracto de mojarra - Día 10	8
Extracto de queso Chitagá	5
Extracto de queso Reinoso	9
Extracto de cuajada	2

## ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS EN ALIMENTOS

## Apéndice F.

Cromatograma de la mezcla de BA empleando diferentes gradientes UHPLC.

