

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE AMINAS BIOGENICAS POR MEDIO DE
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION EN PRODUCTOS CARNICOS
PROCESADOS, EXPENDIDOS EN LA CIUDAD CAPITAL**

Informe de Tesis

Presentado por:

INGRID LORENA BENITEZ PACHECO

para optar el Título de

QUIMICO

Guatemala, marzo de 1,999

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

DEDICATORIA

A DIOS

A quien debo todo lo que tengo, todo lo que soy y todo lo que algún día pueda llegar a ser.

A MIS PADRES

Aura Pacheco de Benítez (QEPD)
Con mucho amor, aún vives en mi corazón y pensamientos.

Gregorio Benítez Girón
Por su amor, esfuerzo y sacrificio en hacer de ésta meta una realidad.

A MI HERMANA

Claudia Jeaneth
Por su apoyo y aliento en todo momento

Con Especial Cariño a:

Maria Fernanda, Karla, Liliana, Gabriela y Lillian Lisseth

A MIS PRIMOS Y AHIJADOS

Que la meta que hoy alcanzo sea solo una de las tantas que ellos pueden alcanzar.

A MI NOVIO

Hugo
Por abrigarme con su valor, positivismo e inteligencia. Cielol Te amo.

A MIS TIOS

Ima, Herlindo, Helio, Elsa, Berta, Tullo, Enrique, Jaime y Yolanda
Por su apoyo y cariño

A MIS AMIGOS

Claudia H. Carmen Alicia, Adamina, Lorena, Claudia, Velveth, Maco, Benjamín, Saul, Carmina, Byron, Manuel, Alvaro, Leonardo, Juan Antonio, James y Victor.
Con gran estima

La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
La Universidad de San Carlos de Guatemala.

Confía plenamente en el Señor, y en todo lo que hagas, pon a Dios en primer lugar,
El te guiará y coronará de éxito tus esfuerzos.

del Libro de Proverbios

AGRADECIMIENTOS

- Mi mayor agradecimiento al **Dr. Rubén D. Velásquez M.** por la asesoría brindada a mi trabajo de tesis, entregándose a la misma con alto grado de profesionalismo y dedicación, además por la confianza depositada en mí.
- Al Laboratorio del Departamento de Bioquímica Escuela de Química Biológica y el Laboratorio de Alimentos de la Escuela de Nutrición, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- A la Licenciada Diana Pinagel.
- A los Licenciados Carlos Klee y Silvia Coto de Orozco, por brindarme su tiempo y conocimientos en la revisión del presente estudio.
- Al Centro de Investigaciones de Ingeniería
Especialmente al Ing. César A. García e Inga. Telma M. Cano.
- Al Centro de Información a la Construcción
Especialmente a la Licda. Carmen Alicia de Padilla, por su amistad y compañerismo.
- A la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Especialmente a Yoly de Ovalle
- Al Ing Marino Barrientos por su ayuda y consejos.

INDICE

	PAGINA
I. RESUMEN	I
I. INTRODUCCION	01
III. ANTECEDENTES	
3.1 Aminas Biogénicas	03
3.2 Ocurrencia de las Aminas Biogénicas	05
3.3 Formación de las Aminas Biogénicas	05
3.4 Factores que influyen en la formación de las Aminas Biogénicas	07
3.5 Metabolismo de las Aminas Biogénicas exógenas	07
3.6 Actividad Biológica de las Aminas Biogénicas	09
3.7 Efectos fisiológicos adversos de Aminas Biogénicas	
a. Efectos vasoactivos	10
b. Efectos psicoactivos	11
c. Formación de nitrosaminas	11
3.8 Estudios de Aminas Biogénicas en alimentos	12
3.9 Análisis de las Aminas Biogénicas	13
IV. JUSTIFICACION	16
V. OBJETIVOS	
5.1 General	17
5.2 Específicos	17
VI. HIPOTESIS	18
VII. MATERIALES Y METODOS	
7.1 Universo de Trabajo	19
7.2 Medios	
7.2.1 Recursos Humanos	19
7.2.2 Recursos Institucionales	19

7.2.2.1 Instrumentación	20
7.2.2.2 Materiales y Equipo	20
7.2.2.3 Reactivos	21
7.3 Procedimiento	21
7.3.1 Diseño del Estudio	21
7.3.2 Procedimiento de Muestreo	22
7.3.3 Preparación de la Muestra	23
7.3.4 Preparación de los derivados	23
7.3.5 Análisis por HPLC	24
7.3.6 Análisis de los Datos	24
VIII. RESULTADOS	26
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	30
X. CONCLUSIONES	34
XI. RECOMENDACIONES	36
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
XIII ANEXOS	
Anexo 1 Toxicidad de las Aminas Biogénicas	41
Anexo 2 Niveles de Toxicidad en aminas Biogénicas	42
Anexo 3 Listado de carnicerías que fueron muestreadas	43
Anexo 4 Método de Extracción y Derivatiza- ción utilizado)	45
Anexo 5 Indices toxicológicos	46
Anexo 6 Gráficas de las condiciones del Expendio	47
Anexo 7 Tabla de Correlaciones multiples	50
Anexo 8 Cromatogramas de las muestras	51

I. RESUMEN

Reciben el nombre de aminas biogénicas (AB) aquellas que forman parte del contenido normal de muchos alimentos, encontrándose presentes en bajas concentraciones. Sin embargo, en alimentos expuestos a actividad bacteriana pueden alcanzar altas concentraciones como producto del metabolismo y/o actividad de microorganismos.

En el presente trabajo de investigación se realizó la identificación y cuantificación analítica de las aminas biogénicas en productos cárnicos procesados (cecina, ahumado, adobado de res y adobado de marrano), expendidos en mercado y supermercados de la ciudad capital, a través de un método de cromatografía líquida de alta resolución.

Para dicho estudio se estandarizó un método de HPLC con el cual se logró la separación e identificación simultánea de 10 derivados fluorescentes de aminas biogénicas por medio de un método de derivatización pre-columna, utilizando el reactivo OPA (oftodialdehído).

El grupo muestral estuvo constituido de 58 muestras de carne procesada: 15 cecina de res, 13 ahumado de res, 25 de adobado de res y 6 de adobado de

marrano.

Posteriormente se determinaron las concentraciones en mg/100g de carne fresca para cada amina biogénica presente en base al tipo de carne procesada, calculándose el valor promedio, la desviación y el error estándar.

En base a los resultados obtenidos se concluyó que la carne cecina de res muestra los niveles más altos de aminas biogénicas en comparación al de los otros tipos de carnes procesadas.

El presente trabajo confirma que en Guatemala no existe un verdadero control de Sanidad a las empresas encargadas del expendio de alimentos, en este caso carnicerías, marranerías de mercados y supermercados. Además se puede observar que algunas de ellas, no cumplen con condiciones higiénicas elementales para la venta y despacho de productos alimenticios.

"Un informe es como un témpano de hielo en el océano, nuestra un octavo del esfuerzo y el material que se utilizó para la presentación del documento final. Sin embargo, son los siete octavos restantes los que proporcionan solidez, autoridad y convencimiento."

F. Dickson

II. INTRODUCCION

Las aminas biogénicas son compuestos que forman parte del contenido normal de muchos alimentos, en los que se encuentran presentes en bajas concentraciones. Sin embargo, en alimentos expuestos a actividad bacteriana pueden alcanzar altas concentraciones. Esta actividad puede producirse durante su almacenamiento y/o descomposición así como durante procesos biotecnológicos de preparación de alimentos. Aminas biogénicas en altas concentraciones, pueden ser perjudiciales para la salud.^[1] (Ver anexo 2).

Entre las aminas biogénicas presentes en los alimentos se incluyen compuestos potencialmente peligrosos, como aminas vasoactivas y psicoactivas que producen intoxicación cuando son ingeridas en cantidades moderadas en el caso de la histamina 10.4-16.9 mg/100 gramos; altas como la cadaverina con un límite superior de 78.7 mg/100 gramos para embutidos crudos ^{1*}; y aminas que por calentamiento reaccionan con nitritos para formar n-nitrosaminas, compuestos altamente cancerígenos.^[1] El contenido de aminas biogénicas es claramente influenciado por el procesamiento y almacenamiento de los productos cárnicos, por lo

^{1*} Ref. Z.ges Hyg. 30 (1984) Heft 2.66

que el contenido de aminas biogénicas puede servir como índice de la calidad de la carne.^[1] Aunque no existen normas nacionales sobre los contenidos máximos permitidos de aminas biogénicas en los alimentos, en otros países se ha dado mucha importancia a los estudios sobre este tipo de compuestos. Esto ha permitido recomendar niveles de riesgo y peligro, como los establecidos para la histamina por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA) ^[2]. En la presente investigación se determinó, por medio de un método de cromatografía líquida de alta resolución, los contenidos de aminas biogénicas en carne procesada que se expende en el área metropolitana de la Ciudad de Guatemala, y se estableció una tabla con las cantidades detectadas en las diferentes carnes procesadas.

II. ANTECEDENTES

3.1 AMINAS BIOGENICAS

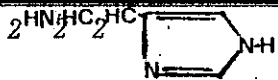
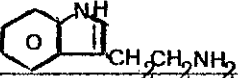


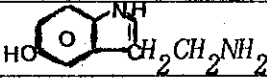
Las aminas son compuestos orgánicos que contienen el grupo amino ($-NH_2$). Se pueden clasificar como primarias, secundarias y terciarias, según el número de sustituyentes (diferentes al hidrógeno) sobre el átomo de nitrógeno.

También pueden clasificarse como aminas aromáticas y aminas alifáticas dependiendo de si los sustituyentes son grupos de la familia del benceno o grupos con carbono sp^3 únicamente. Dentro de las aminas alifáticas se pueden distinguir las aminas acíclicas (de cadena abierta) y las aminas cíclicas (sustituyentes cíclicos no aromáticos).

Reciben el nombre de aminas biogénicas (AB) aquellas formadas como productos del metabolismo y/o actividad de organismos vivos. Es muy común encontrar aminas biogénicas alifáticas acíclicas, como la putrescina; amina alifática alicíclicas como la tiramina; heterocíclicas con el grupo amino hexocíclico, como la histamina^[3]. En el siguiente cuadro se muestra la clasificación de algunas de las aminas biogénicas.

CUADRO No. 1

CLASIFICACION DE LAS AB COMUNMENTE ENCONTRADAS EN ALIMENTOS

AMINA	TIPO	ESTRUCTURA
Histamina	Heterocíclica aromática	
Cadaverina	Alifática acíclica	$NH_2(CH_2)_5NH_2$
Putrescina	Alifática acíclica	$NH_2(CH_2)_4NH_2$
Triptamina	Heterocíclica aromática	
2-feniletilamina	Aromática	
Espermina	Alifática acíclica	$H_2N(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2(CH_2)_3$
Espermidina	Alifática acíclica	$NH_2(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$
Tiramina	Aromática	
Agmatina	Alifática acíclica	$H_2N-CNH(CH_2)_4NH$
Serotonina	Heterocíclica aromática	
Etanolamina	Alifática acíclica	$HOCH_2CH_2NH_2$
Dimetilamina	Alifática acíclica	$(CH_3)_2NH$
Trimetilamina	Alifática acíclica	$(CH_3)_3N$

3.2 OCURRENCIA DE LAS AMINAS BIOGENICAS

La presencia de las AB ha sido detectada en muchos materiales biológicos y en varios tipos de alimentos: productos del mar ^[4,5] como pescado ^[6] y sus productos; productos cárnicos procesados fermentados, ^[7] como salchichas y otros embutidos; carne fresca de res empacada al vacío y carne cruda de res; bebidas alcohólicas como vinos y cerveza; frutas y vegetales, como uvas frescas y repollo; productos derivados de la leche, como quesos y otros alimentos que contienen caseína; levadura y pastas de tomate; en platos típicos de la comida china, etc. ^[8].

3.3 FORMACION DE LA AMINAS BIOGENICAS

La síntesis de las AB ocurre exclusivamente por medio de: 1) descarboxilación de aminoácidos por la acción de descarboxilasas específicas, y 2) por aminación de aldehídos y cetonas, ya sea mediante aminación reductiva (lo que prácticamente no ocurre) o por transaminación catalizada por transaminasas. Las aminas primarias se forman, principalmente, mediante la descarboxilación de aminoácidos. Las descarboxilasas actúan con alta especificidad sobre un aminoácido determinado, y casi siempre sobre su forma -L-, configuración que se mantiene en el producto. Las secundarias y terciarias aparecen como resultado de sustitución alquílica. ^[9].

Las AB son productos de la actividad enzimática bacteriana relacionada con los procesos de fermentación, ya sean deseables, como en la fabricación de algunos productos alimenticios o deseables, como resultado de la descomposición de los alimentos. En la descomposición de los alimentos las AB son formadas por la flora bacteriana contaminante normal de estos, y su formación es dependiente de las condiciones de almacenamiento.^[10] Las AB se forman por reacciones de descarboxilación enzimática de sus aminoácidos precursores por ejemplo: de la histidina se forman la histamina, de la tirosina la tiramina; de la fenilalanina la feniletilamina, etc.).^[11] Estas reacciones de descarboxilación son catalizadas por enzimas provenientes del metabolismo natural de algunos microorganismos contaminantes. Las condiciones necesarias para la formación de una AB específica son: a) suficiente concentración del aminoácido apropiado en su forma libre, y b) la presencia de organismos suficientemente activos que produzcan la descarboxilasa necesaria, como ejemplo, las especies *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae* han mostrado que producen cantidades significativas de putrescina y cadaverina en marrano y carne de res almacenada en refrigeración. *Lactobacillus divergens* y *Lactobacillus carnis* son dos cepas importantes en la producción de tiramina. *Proteus morgani*, *Lactobacillus buchneri* y *Klebsiella pneumoniae*^[12] son formadores típicos de histamina; además existen otras especies bacterianas que también la forman^[13].

Lactobacillus buchneri fue la responsable de un brote de envenamiento por histamina en el queso suizo.^[14] *Klebsiella pneumoniae* produce considerables cantidades de histamina en el atún. *Proteus morganii* es capaz de producir niveles de histamina capaces de provocar envenamiento por alimentos, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Vibrio alginolyticus*, bacterias aisladas de atún descompuesto, produjeron histamina en medios de cultivo con histidina a 38°C temperatura óptima para la formación de histamina.^[13] El pescado *escombroide* (especies de la familia *Scombridae*)², contiene cantidades sustanciales de histidina libre que pueden ser descaboxilada para formar histamina por medio de bacterias entéricas presentes en el pescado descompuesto.^[15]

3.4 METABOLISMO DE LAS AMINAS BIOGENICAS EXOGENAS

En la mucosa del intestino están presentes las enzimas histidina descarboxilasa, histamina-N-metiltransferasa y diamina oxidasa (DAO); esta última es preeminente en el catabolismo de la histamina, y en la regulación del contenido de la

² Es un pez marino, de cuerpo alargado y fusiforme moderadamente comprimido en algunos géneros, las especies más comunes son los atunes, bacaretas, bonitos, caballos, estorninos, melva, son muy apreciados por su excelente calidad de carne y se comercializan en fresco, ahumado y enlatado. ^[15] En Guatemala se encuentra únicamente en el Pacífico, y es conocido como pez Sierra. ^[16]

histamina en la mucosa del colon. La actividad de histidina descarboxilasa es importante para controlar la cantidad de histamina presente en la mucosa gástrica.^[6,19] La DAO presenta actividad también con otras aminas, especialmente putrescina (diaminobutano) y cadaverina (diaminopentano) sin embargo la afinidad de la enzima intestinal por la histamina es más alta que para la putrescina.^[19]

En el hombre, la DAO se encuentra presente en muchos tejidos, pero su actividad predomina en el riñón y el intestino. La distribución típica de la enzima a lo largo del tracto gastrointestinal muestra una mínima actividad en el estómago, mayor en el duodeno y yeyuno, la más alta actividad en el íleo y una actividad disminuida en el intestino grueso. El origen de la DAO liberada en el plasma en humanos no está clara.^[7]

Los principales sustratos de la DAO intestinal: putrescina, metilhistamina y especialmente histamina, inhiben la enzima cuando están presentes en exceso (concentraciones supraóptima). Las monoaminas serotonina, benzilamina y tiramina, y las poliaminas espermidina y espermina no son afectadas por la DAO intestinal. La DAO es sensible a los reactivos del grupo carbónico como los derivados de hidroxilamina, hidrazina y guanidina. La aminoguanidina ha sido considerada como

el inhibidor más potente y selectivo. También es sensible a algunos análogos de la histamina como el imidazol y sus derivados^[20].

Una de las aminas que más ha sido estudiada es la histamina, por lo que se conoce mucho acerca de su metabolismo en el organismo. La histamina está presente en grandes cantidades a lo largo del tracto intestinal de los mamíferos, es de primera importancia en muchas reacciones patológicas en el intestino y podría estar involucrada en procesos reguladores fisiológicos aunque no hay prueba de esto.

3.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS

Las AB producen efectos fisiológicos y patológicos complejos en el cuerpo humano. En relación al tipo de acción producida, se distingue entre aminas vasoactivas y psicoactivas. Las primeras actúan en forma directa o indirecta sobre el sistema vascular, elevando (tiramina, fenilamina, isoamilamina) o disminuyendo (histamina, serotonina) la presión sanguínea. Las psicoactivas (dopamina, serotonina) actúan como sustancias mensajeras en el Sistema Nervioso Central.^[21]

3.6 EFECTOS FISIOLÓGICOS ADVERSOS DE LAS AMINAS BIOGÉNICAS

Estos compuestos orgánicos de bajo peso molecular, no representan ningún riesgo a las personas, a menos que se ingieran grandes cantidades o que el mecanismo natural de su degradación este inhibido. Las AB en los alimentos tienen implicaciones toxicológicas, que pueden ser:

a. **Efectos vasoactivos:** Efectos sobre el sistema vascular, por ejemplo la tiramina y la histamina exhiben propiedades vasoactivas (elevando y disminuyendo la presión sanguínea, respectivamente) el consumo de alimentos que contiene altas concentraciones de tiramina ha sido asociado con ataques de migraña, crisis hipertensivas, etc., en pacientes que son tratados con inhibidores de la monoamina oxidasa como antidepresores. En general las manifestaciones clínicas que se presentan por el envenenamiento por AB son: alteraciones del gusto, ansiedad, hipertermia de la cara y el cuello, prurito, ataques de migraña, crisis hipertensivas, náuseas, mareos, palpitaciones, en casos severos hemorragia intracerebral y muerte.^[22]

Se ha creído que la histamina en alimentos no es peligrosa, ya que se metaboliza rápidamente en el tracto gastrointestinal por la DAO y no es absorbida

dentro de la circulación. Animales de laboratorio a los que se le administró bloqueadores de la DAO mostraron hipotensión, vómitos y una elevación concomitante de los niveles plasmáticos de histamina (hasta 160 ng/ml) como respuesta a la administración oral de histamina (60mg). En humanos se puede observar distintas reacciones hacia la ingesta de histamina, por lo que los factores de riesgo individuales que llevan hacia un bloqueo en la DAO pueden ser peligrosos en combinación con una ingesta aún moderada de histamina en el alimento. La importancia del estudio de la histamina en los alimentos se hace evidente en el nivel de peligro de envenamiento ($\geq 450\mu\text{mol}/100\text{g}$) establecido por la FDA para alimentos que contienen histamina. La histamina (en una concentración de 8mg/100 g) es pobremente absorbida oralmente, pero por vía intravenosa puede provocar respuestas fisiológicas indeseables en humanos^[23]. Muchos otros estudios se han realizado en bebidas y comidas preparadas. La DAO puede ser inhibida por ingesta de drogas, alcohol, etc.^[22]

b. Efectos psicoactivos: las aminas psicoactivas actúan sobre los transmisores neuronales, su ingestión en grandes cantidades puede provocar crisis hipertensivas en pacientes bajo tratamientos con drogas que inhiben la enzima monoamina-oxidasa.^[22]

c. Formación de nitrosaminas

Las AB en presencia de nitritos pueden producir compuestos que pueden ser precursores endógenos de N-nitrosaminas, las cuales son compuestos potentemente carcinogénicos. Por ejemplo la espermidina y la espermina, que son aminas secundarias, o la putrescina o cadaverina que con el calentamiento pueden ser convertidas en aminas secundarias (pirrolidina y piperidina), pueden formar N-nitrosaminas por reacción con nitritos. Los nitratos y nitritos son aditivos que se le agregan a la carne principalmente por su efecto antimicrobial y porque mantienen su coloración, sin embargo existen riesgos de importancia en la utilización de estas sales, puesto que los nitratos y nitritos pueden participar en la formación de nitrosamidas y nitrosaminas al reaccionar con las aminas biogénicas.^[24]

3.7 ESTUDIOS DE AMINAS BIOGENICAS EN ALIMENTOS

La mayoría de los estudios realizan una comparación de los niveles de AB que pueden producirse durante el almacenamiento de alimentos y el efecto de la temperatura de almacenamiento; en una menor cantidad de estudios se ha hecho el análisis de las AB, es decir probar varios tipos de metodología, de extracción, preparación y análisis de las muestras. Otros experimentos han tratado de encontrar cuáles son las principales especies de microorganismos que se encuentran

involucrados en la formación enzimática de AB; son comunes los estudios de este tipo sobre histamina. De las publicaciones consultadas solamente algunas de ellas, (9 de ellas aparecidas entre 1978 -1991) se refieren a análisis realizados en carne fresca o cocida, pero ninguna a carnes procesadas. En Guatemala no se conocen hasta la fecha estudios sobre los contenidos de AB en los alimentos. Sin embargo, existe actualmente el Proyecto de Investigación "Determinación de los contenidos de aminas biogénicas en productos cárnicos de consumo popular en Guatemala" que está siendo apoyado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB- y cuenta con la ayuda de la Sociedad Alemana de Cooperación Técnica -GTZ-, y del Servicio Alemán de Intercambio Académico -DAAD-. Este trabajo se está realizando dentro del marco de dicho Proyecto.

3.8 Análisis de las Aminas Biogénicas

En la preparación de las muestras para el análisis de alimentos por cromatografía, están involucrados tres pasos imprescindibles: 1) muestreo, 2) homogenización y 3) preparación. Estos pueden ocurrir ocasionalmente en forma reversa o combinados. Aunque cada uno de estos pasos tiene el propósito de incrementar la exactitud y precisión del análisis, cada paso introduce errores inherentes.^[26] En la preparación de la muestra el paso crítico es la extracción de las

AB de la matriz pues muchas veces se recuperan cantidades analíticas muy bajas.

Con respecto a la metodología utilizada para el análisis de la AB, la mayoría hace uso de los métodos cromatográficos; se ha utilizado métodos espectrofluorométricos, métodos colorimétricos, cromatografía de gases, cromatografía de capa fina, así como cromatografía líquida de alta resolución -HPLC. En general, las aminas biogénicas son compuestos que contienen grupos cromóforos con un poder de absorción en el Ultravioleta relativamente bajo. Así pues, sólo es posible su detección con un nivel de sensibilidad suficiente, si se recurre a técnicas que incrementan la misma mediante la formación de derivados como productos de reacción entre la amina y un reactivo externo.^[26]

Estos procedimientos son conocidos como derivatizaciones y se pueden realizar antes de la separación cromatográfica (pre-columna), o bien después de la misma (post-columna).^[26]

Para efecto del análisis en particular, de las AB, se utilizará la derivatización pre-columna; existen tres posibilidades de preparación de derivados fluorescentes, éstos son: reacción con cloruro de dansilo (DSCI), reacción con 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC) y reacción con o-ftaldialdehído (OPA). El DSCI es un reactivo

que ofrece la ventaja de reaccionar con aminas primarias y secundarias fácilmente y el derivado que forma es muy estable; sin embargo su precio es muy alto, además a menudo causa problemas en la detección ya que el ácido dansilsulfónico es fluorescente.^[27]

El FMOC reacciona bien con las aminas primarias y secundarias, las separaciones que se presentan son adecuadas, pero el exceso de reactivo debe ser eliminado con un paso adicional posterior a la derivatización; por lo tanto, la reproducibilidad no es tan buena, y la presencia de un pico de reactivo es inevitable en el rango cromatográfico útil.^[27]

El reactivo OPA puede reaccionar fácilmente con aminas primarias pero no así con las aminas secundarias, sin embargo, se han realizado trabajos en los cuales se ha detectado la presencia de aminas secundarias, tales como la espermina y la espermidina. El derivado formado es muy inestable y puede descomponerse con la luz; sin embargo, se consigue una separación adecuada y la sensibilidad es buena.^[27]

IV. JUSTIFICACION

Las aminas biogénicas AB son compuestos que están presentes normalmente en alimentos, entre los que se encuentran los productos cárnicos procesados. Las AB se producen en los alimentos como consecuencia de la actividad enzimática de la flora microbiana normal de los alimentos. Las AB permanecen estables aún en altas temperaturas, lo que hace difícil su eliminación una vez producidas. Por esto los contenidos de AB pueden ofrecer información más útil que el análisis microbiológico, ya que los microorganismos resultan comunmente eliminados por el procesamiento de los alimentos (cocción, asado, etc). Los niveles de AB en productos cárnicos han sido propuestos como índices de la calidad/aceptabilidad de la carne.

Por lo anteriormente descrito, el estudio de las AB ha cobrado gran importancia en los últimos años, especialmente su cuantificación, para llegar a determinar si las AB podría llegar a constituirse en un problema de salud pública. El estudio de las AB data desde los años '70 cuando se descubrió que la ingestión de alimentos que contenía histamina, producía serios daños fisiológicos.^[21] En Guatemala no se conocen estudios sobre AB en alimentos, por lo que es importante iniciar investigaciones para este tipo de compuestos y establecer metodologías de análisis, de manera que la cuantificación de AB pueda llegar a ser un índice de la calidad de los alimentos.

V. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

- 5.1.1 Determinar los niveles de aminas biogénicas, en muestras de carne procesada, expandidas en carnicerías de los mercados y supermercados del área metropolitana de la Ciudad de Guatemala.

5.2 ESPECIFICOS

- 5.2.1 Estandarizar un método de Cromatografía Líquida de Alta resolución (HPLC) para el análisis cuantitativo de Aminas Biogénicas en muestras de carne procesada.
- 5.2.2 Obtener muestras representativas de la carne procesada que se vende en los mercados y supermercados del área metropolitana de la Ciudad de Guatemala.
- 5.2.3 Determinar los contenidos de Aminas Biogénicas en carne adobada, cecina y ahumada de res.

VI. HIPOTESIS

El presente es un estudio observacional en el que se determinará el Contenido de Aminas Biogénicas en Carne Procesada.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Carne procesada, expendida en los diferentes carnicerías de los mercados y supermercados del área metropolitana de la Ciudad de Guatemala.

7.2 MEDIOS

7.2.1 RECURSOS HUMANOS

7.2.1.1 Autor del trabajo:

Br. Ingrid Lorena Benítez P.

7.2.1.2 Asesor:

Dr. Rubén D. Velásquez M.

7.2.2. RECURSOS INSTITUCIONALES

7.2.2.1 Instalaciones

Para la realización de este trabajo se utilizó el laboratorio del Departamento de Bioquímica, Escuela Química Biológica y el Laboratorio de Alimentos de la Escuela de Nutrición, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

7.2.2.2 Materiales y equipo

a.) Equipo de Laboratorio

El sistema de HPLC está constituido por:

- Bomba de Inyección HPLC para gradientes Merck-Hitachi, modelo L-6200.
- Detector de fluorescencia con lámpara de Xenon 150w Merck-Hitachi, modelo F-1050
- Integrador cromatográfico Merck-Hitachi, modelo D-2500
- Columnas cromatográficas de acero inoxidable Lichrospher 100RP-18
- Inyector manual Mod. LC-Organizer 9125 Merck-Hitachi

b.) Material para el Análisis por HPLC

- Potenciómetro marca CORNING Mod. Senior
- Agitador Vortex marca MISTRAL Lab Line Mod 1190
- Equipo de Filtración de Solventes
- Equipo de Filtración de muestras
- Jeringa de inyección HAMILTON de 100 μ l
- Jeringa de inyección HAMILTON de 250 μ l
- Filtros Whatman de 0.20 μ m, 13mm D.

- Filtros Whatman de 0.45 μm , 47 mm D.
- c.) Cristaleria
- Matraces aforados de 50 ml.
- Vasos de precipitados de 250, 100 y 50 ml
- Kitasato de 1000 ml
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 ml
- Pipetas automáticas
- Viales de eppendorff
- Gradilla para eppendorff

7.2.2.3 Reactivos

- Acido Clorhídrico, Merck (p.a)
- Borato de sodio, Merck (p.a)
- Agua, EM Science (para HPLC)
- Metanol, EM Science (para HPLC)
- Hidróxido de sodio, Merck (p.a)
- Acetato de sodio, Merck (p.a)
- OPA (Oftadáldehído) Merck (p.a)
- Estándares de las aminas a utilizar

- Triptamina Merck
- Putrescina Merck
- Tiramina Fluka Biochemika
- Espermina Merck
- Isoamilamina Merck
- Espermidina Merck
- 1,2-Diaminopropano Merck
- 2-Feniletilamina Aldrich
- Cadaverina Merck
- Histamina Aldrich

7.3 PROCEDIMIENTO

7.3.1 Diseño del Estudio

Por sus características, el presente es un estudio observacional prospectivo (en cada tipo de carne procesada se obtuvo los valores de cada una de las AB analizadas), por medio de un muestreo simple aleatorio (selección de los lugares de muestreo).

Población: Carne procesada, expendida en las carnicerías de mercados y supermercados de área metropolitana de la Ciudad de Guatemala.

Muestra: El grupo muestral está constituido por un total de 58 muestras de carne procesada cada una de 0.5 lbs. Estas, corresponden a tres tipos de carne: Cecina (15 muestras), Ahumada (13 muestras), Adobada (30 muestras).

7.3.2 Procedimiento de Muestreo:

Para el estudio en mención se eligió al azar 30 lugares de muestreo (Carnicerías) de la siguiente forma: Se numeró cada una de las carnicerías del directorio de PROMECA^[28]. Luego se hizo un sorteo al azar por semana que indicaban las 2 carnicerías a muestrear; y así hasta completar el total de 30 expendios a visitar. Los días martes y jueves de cada semana se procedió a visitar las carnicerías correspondiente, entre 8:30 y 11:00 horas, en donde se adquirió media libra del tipo de producto cárnico correspondiente. Las muestras se almacenaron en congelamiento (-20°C) en el laboratorio de Alimentos de la Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. El estudio se llevó a cabo en los meses de Septiembre a Noviembre (época lluviosa del año).

7.3.3 Preparación de la muestra

Se utilizó el procedimiento de extracción y preparación previo a realizar el análisis por medio de HPLC, este se describe a continuación:

20 gramos de muestra se homogeniza con 50 ml de HCl 0.1M. (5 minutos) La mezcla se centrifuga (15 minutos) y la fase acuosa se separa, el residuo es re-extraído con el mismo procedimiento (2 veces). Los extractos se combinan y se filtran y se guardan en un erlenmeyer de 125 ml, hasta el aforo. La muestra se dividen en alícuotas de 1.5 ml. y se guardan en refrigeración hasta su análisis por HPLC.

7.3.4 Preparación de los derivados

La preparación de los derivados fluorescentes y las condiciones cromatográficas que se describen a continuación^[29].

A 200 μ l del extracto de AB en HCl 0.1N, se le agrega 200 μ l de la solución de buffer de borato 0.2 M pH 8.5 y se agita durante 10 segundos, se añade 100 μ l de OPA, se agita durante 10 segundos más y se deja reposar 220 segundos, se agregan 100 μ l de HCl 0.75N y se agita 10 segundos más. Se toma una alícuota de 50 μ l y se diluye con 500 μ l del eluyente de la columna (metanol:agua:NaOAc pH 7 60:20:20), se filtra la mezcla en membranas de

nylon de 0.2 μm y se inyectan 20 μl en el Cromatógrafo.

7.3.5 Análisis por HPLC

Para el Análisis cromatográfico se utilizarón las siguientes condiciones:

Columna: MERCK Lichrocart 100 R-18, 5 μm , ID 250*4 mm.				
Detección: EX 330/EM 450				
Elución: Gradiente "1" para mezcla de aminas biogénicas				
T (min)	% A	% B	%C	Flujo (ml/min)
0	60	20	20	1.0
10	60	20	20	1.0
20	80	10	10	1.0
28	80	10	10	1.0
29	60	20	20	1.0
35	60	20	20	1.0

Donde: A: Metanol HPLC; B: H₂O HPLC; C: NaAc 50 mM pH 7

7.3.6 ANALISIS DE DATOS

Los valores obtenidos de concentraciones de aminas biogénicas en las carnes procesadas fueron evaluados mediante un análisis del valor promedio (\bar{x}) la desviación estandar (σ) y el límite de confianza ($\bar{x} \pm Z \sigma/\sqrt{n}$) con un $\alpha = 0.05$ para cada una de las aminas biogénicas presentes.

VIII. RESULTADOS

METODO ANALITICO:

Para la determinación y cuantificación de los niveles de aminas biogénicas en carnes procesadas, se calibró un método de cromatografía líquida de alta resolución, con el cual se logró la separación e identificación simultánea, de 10 derivados fluorescentes de aminas biogénicas las cuales son: 1,2 diaminopropano, triptamina, 2-feniletilamina, cadaverina, histamina, putrescina, isoamilamina, tiramina, espermina y espermidina.

Posterior a la separación e identificación de las aminas biogénicas, se midieron los parámetros de reproducibilidad, linealidad, exactitud y precisión del método utilizado. (Cuadro No.1).

CUADRO No. 1
PARAMETROS DE VALIDACION DEL METODO

PARAMETROS AMINAS	TIEMPO RETENCION (min)	K' (*1)	REPRODUCIBILIDAD ERROR ESTANDAR (area) % (*2)	LINEALIDAD r ²
HISTAMINA	9.51 ± 0.37	8.51	9.01	0.9636
TIRAMINA	19.22 ± 0.25	14.26	9.36	0.8242
ESPERMINA	22.35 ± 0.30	21.35	22.51	0.8144
1,2 DIAMINOPROPANO	22.55 ± 0.25	21.55	13.54	0.9904
TRIPTAMINA	24.44 ± 0.24	23.44	15.11	0.9954
2-FENILETILAMINA	25.32 ± 0.58	24.32	17.64	0.9834
ESPERMIDINA	25.71 ± 0.22	24.71	29.35	0.7838
PUTRESCINA	26.28 ± 0.18	25.28	8.41	0.9734
ISOAMILAMINA	26.88 ± 0.21	25.77	11.54	0.9512
CADAVERINA	28.88 ± 0.19	27.88	9.68	0.9848

*1: $K' = \frac{TR_m - TR_{fso}}{TR_{fso}}$, $TR_{fso} = 2.38 \pm 0.02$ (n=3)

*2: $ES = (\sigma/x) * 100$ (n=10)

En lo que respecta a los límites de detección se encontró que la máxima concentración detectada corresponde a 0.5 mg/ml y la mínima de $6.17 \cdot 10^{-8}$ mg/ml (ó $6.17 \cdot 10^{-5}$ μ g/ml) para la mayoría de las aminas biogénicas, exceptuando la espermina, espermidina y 1,2 diaminopropano en donde la máxima concentración es 1 mg/ml y la mínima 0.025 mg/ml.

El grupo muestral estuvo constituido por 58 muestras de carne procesada: 15 de cecina de res, 13 de ahumado de res, 25 de adobado de res, y 6 de adobado de marrano. Se seleccionó 2 mercados semanales, las cuales fueron visitados los días martes y jueves, respectivamente. Después de una inspección visual, se procedió a comprar media libra de cada carne procesada disponible para la venta. Se visitaron (anexo 3) un total de 23 mercados durante un lapso de 10 semanas. Las muestras se almacenaron en congelamiento (-20oC) en el laboratorio de Alimentos de la Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. La colecta se realizó de Septiembre a Noviembre (época lluviosa del año).

PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS:

Las aminas biogénicas, se extrajeron mediante HCl 0.1 N; con el procedimiento descrito (anexo 4) y se guardó en congelación (-5°C) hasta su análisis cromatográfico.

En el cuadro No. 2 se presentan los resultados de concentraciones de aminas biogénicas, los datos se encuentran tabulados en base al tipo de carne procesada y la concentración de amina biogénica en mg/100 gramos de carne fresca.

CUADRO No. 2
CONTENIDO DE AMINAS BIOGENICAS (mg/100g)
EN CARNE PROCESADA FRESCA

AMINA BIOGENICA	CARNE DE RES			CARNE DE MARRANO ADOBADO X ± ee
	ADOBADO X ± ee	AHUMADO X ± ee	CECINA X ± ee	
HISTAMINA	7.78 ± 1.43	12.1 ± 2.70	13.8 ± 4.73	11.3 ± 4.90
TIRAMINA	1.05 ± 0.23	0.88 ± 0.29	2.1 ± 0.60	0.7 ± 0.21
ESPERMINA	0.35 ± 0.30	ND	ND	ND
1,2-DIAMINOPROPANO	0.02 ± 0.01	ND	ND	ND
TRIPTAMINA	0.29 ± 0.20	ND	0.50 ± 0.34	ND
2-FENILETILAMINA	ND	ND	0.15 ± 0.09	ND
ESPERMIDINA	ND	ND	ND	ND
PUTRESCINA	1.67 ± 0.59	0.08 ± 0.03	2.5 ± 1.30	1.4 ± 0.60
ISOAMILAMINA	1.14 ± 0.65	0.31 ± 0.22	0.48 ± 0.29	ND
CADAVERINA	0.39 ± 0.13	0.10 ± 0.04	1.02 ± 0.59	0.28 ± 0.20

ee = error estandar ($x \pm Z \sigma/\sqrt{n}$) con un $\alpha = 0.05$.

N.D. = No detectado

El contenido de cada amina se comparó con el respectivo límite de toxicidad reportado para carne no procesada³ En el cuadro No.3 se muestran la media y la desviación estandar de la relación (contenido de amina/límite de toxicidad) en los distintos tipos de carne estudiada.

CUADRO No. 3
RELACION CONTENIDO DE AMINA BIOGENICA/LIMITE DE TOXICIDAD
PARA CARNE PROCESADA (mg/100g)

AMINA BIOGENICA	CARNE DE RES			CARNE DE MARRANO ADOBADO X ± ee
	ADOBADO X ± ee	AHUMADO X ± ee	CECINA X ± ee	
HISTAMINA	33.80 ± 6.20	32.6 ± 2.70	70.8 ± 25.3	49.1 ± 5.30
TIRAMINA	0.44 ± 0.09	0.37 ± 0.29	1.02 ± 0.33	0.3 ± 0.10
ESPERMINA	0.13 ± 0.11	NE	NE	NE
PUTRESCINA	7.26 ± 02.56	0.39 ± 0.14	12.7 ± 7.20	5.8 ± 2.80
CADAVERINA	1.15 ± 0.39	0.13 ± 0.05	1.61 ± 0.93	0.36 ± 0.20

ee = error estandar ($x \pm Z_{\alpha/2} \sigma/\sqrt{n}$) con un $\alpha = 0.05$.

NE= No establecido

³ Ref. Z.ges Hyg 30 (1984) Heft 2.66. (Anexo 2)

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

En lo referente al método utilizado se hicieron varias pruebas para encontrar las condiciones que brindarán resultados precisos y reproducibles. En lo que respecta a los parámetros de confiabilidad y reproducibilidad la espermidina y la espermina presentan altos porcentajes de error estandar (29 y 22 por ciento respectivamente).

En cuanto a la linealidad del método, la espermina, espermidina y tiramina, presentaron la menor linealidad. Los rangos de detección para la mayoría de las aminas biogénicas fueron de $6.17 \cdot 10^{-8}$ mg/ml a 0.5 mg/ml, con excepción de espermina, espermidina y 1,2 diaminopropano que presentaron rangos de 0.025 a 1 mg/ml.

Los contenidos cualitativos de aminas biogénicas son distintos para cada tipo de carne procesada; la carne adobado de res presentó el mayor número de AB, en las cuales únicamente espermidina y la 2-feniletilamina no fueron detectadas. La cecina de res, presenta siete de las diez aminas biogénicas estudiadas, (histamina, tiramina, triptamina, 2-feniletilamina, putrescina, isoamilamina y cadaverina); en la

carne ahumada de res unicamente presenta cinco (histamina, tiramina, putrescina, isoamilamina y cadaverina) y la carne adobado de marrano solamente cuatro (histamina, tiramina, putrescina y cadaverina). En lo que respecta a los contenidos cuantitativos, es la carne cecina de res la que presenta los mayores niveles de concentración; siendo los contenidos de cadaverina, putrescina, tiramina e histamina considerablemente mayores en comparación con los otros tipos de carne procesada.

En general, en los 4 tipos de carnes se encontraron niveles elevados de histamina. En la carne cecina de res, la cadaverina y la putrescina, estan presentes en altas concentraciones, lo que indica que ya se encontraban en proceso de descomposición microbiana.

No se conocen datos de aminas biogénicas en carnes procesadas del país. Tampoco la FDA ha establecido valores de toxicidad en tipos de carnes similares a las estudiadas. Sin embargo, para tener una idea de la toxicidad de los niveles de aminas biogénicas encontradas, se compararon estos con los límites de toxicidad para la carne no procesada fresca (anexo 5). Relaciones contenido observado/límite de toxicidad mayores a 1, indican que estos límites son sobrepasados. La media de estas relaciones para un tipo de carne indicaría si en

general, la carne sobrepasó este límite. Con esto se pudo observar perfectamente que la carne cecina de res presenta en promedio valores 70 veces mayores que el límite de toxicidad para la histamina y aproximadamente 13 veces para los límites de putrescina. En general en los 4 tipos de carne, la histamina está en niveles de 33-71 veces mayores que los límites de toxicidad para la carne fresca, así mismo, la putrescina esta en niveles de 6 a 13 veces mayor que en 3 de estas carnes (adobado de marrano y res y cecina de res). La carne ahumada de res presenta niveles de aminas biogénicas menores que los límites de toxicidad de carne fresca, con excepción de la histamina. El ahumado parece ser el mejor método de preservación de la carne.

Se precisó por medio de encuestas realizadas al momento de comprar la carne, (anexo 6) que el 14 por ciento de las carnicerías visitadas no poseen equipo de refrigeración. Que el 15 por ciento de las carnicerías visitadas no poseían un mostrador con material lavable, para la atención del público. Además, un 25 por ciento de los establecimientos, no poseen mostradores limpios; se observó también que un 5 por ciento de las personas que atienden las carnicerías no utilizan gabachas u otro tipo de ropa apropiada para la manipulación de la carne; además, un 5 por ciento de las carnicerías tienen piso de tierra. Los datos obtenidos a través de

las encuestas fueron analizados por medio de chi-cuadrada, llegandose a determinar que estos parámetros no correlacionan estadísticamente con el contenido de aminas biogénicas en la carne expandida.

Un análisis de correlaciones múltiple (anexo 7) entre los niveles de las distintas aminas biogénicas para un tipo de carne indican que en la carne adobada los contenidos de putrescina, cadaverina, espermina, 2-feniletilamina y triptamina están correlacionadas positivamente. En la carne cecina de res existe una correlación entre las concentraciones de cadaverina, putrescina, histamina, tiramina y 2-feniletilamina.

En la carne ahumada, que posee las concentraciones más bajas de aminas biogénicas, los contenidos de triptamina, tiramina, putrescina y cadaverina están menos correlacionadas que en los otros dos tipos de carne procesada.

El presente trabajo confirma además, que en Guatemala no existe un verdadero control de Sanidad a las empresas encargadas del expendio de alimentos en este caso carnicerías, marranerías de mercados y supermercados, se puede observar que algunas de ellas, no cumplen con condiciones higiénicas elementales para la venta y despacho de productos alimenticios.

XI. CONCLUSIONES

1. Se logró establecer un método satisfactorio de Cromatografía líquida de alta resolución para la separación, identificación y cuantificación simultánea de 10 tipos de aminas biogénicas.
2. A través del método cromatográfico utilizado se determinó que los rangos de detección para la mayoría de las aminas biogénicas fueron de $6.17 \cdot 10^{-8}$ a 0.5 mg/ml.
3. La espermina, espermidina y 1,2 diaminopropano presentaron rangos de detección que oscilan entre 0.025 a 1 mg/ml.
4. La cecina de res, muestra los niveles más altos de concentración de aminas biogénicas en comparación con el adobado de res, marrano y ahumado.
5. En los cuatro tipos de carnes procesadas, los contenidos de Histamina sobrepasa los límites permisibles de toxicidad reportados para la carne de res fresca.

6. Que las concentraciones de putrescina y cadaverina son mayores en la carne cecina de res en comparación con los otros tipos de carnes procesadas estudiadas.

7. La ubicación de los establecimientos y las condiciones generales del expendio no influyen estadísticamente en el contenido de aminas biogénicas de la carne que expenden.

XII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con investigaciones con otros diferentes tipos de carnes.
2. Se debe realizar un muestreo más grande, para que sea representativo con respecto al número de carnicerías y marranerías en la ciudad capital.
3. Establecer tablas con contenidos máximos y mínimos de toxicidad para aminas biogénicas en carnes procesadas expandidas en la ciudad capital.
4. Realizar un estudio para determinar el porqué del incremento de Histamina en la carne.
5. Realizar estudios para investigar la posible relación entre carga microbiana y el contenido de aminas biogénicas, especialmente putrescina y cadaverina.
6. Realizar un estudio similar con los principales rastros y mataderos que expenden en la ciudad capital.

7. Divulgar los resultados para contribuir al establecimiento de programas de control que eviten el expendio de carnes procesadas con incremento de aminos biogénicas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Schmitt RE, Haas J., Amado R. **Determinación of biogenic Amines by RP-HPLC for monitoring microbial spoilage of poltry.** Z. Lebensm Unters. Forch. 1988; 187-121-124.
2. Morrow JM, et al. **Evidence that histamine is the causative Toxin of scombroide-fish poisoning.** N Engl. J. Med., 1991; 324:716-720
3. Knize-MG, Felton JS. **Chromatographic methods for the analysis of the heterocyclic amine food mutagens/carcinogens.** J. Chromatgr., 1992; 624:253-265.
4. Suzuki S. et al. **Simultaneous determination of biogenic amines by reserved phase high-performance liquid chromatography.** J. Chromatgr., 1990; 508:225-228
5. Gajewka R. Lipka E. Ganowiak Z. **Histamine and tyramine levels in selected food products.** Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 1991; 42(1):1-7.
6. Velásquez R. Tsikas D. Brunner G. **Determination of histamine in food by combined ion-pair extraction and reversed-phase HPLC with fluorescence detection.** Fresenius J. Anal. Che., 1992; 343:78-79
7. Shalaby AR. **Separation, Identification and Estimation of Biogenic Amines in Foods by Thin-Layer Chromatography.** Food Chem., Analytical Methodos Section 1994; 49:305-310
8. Chin KW. Garriga MM. Metcalfe DD. **The Histamine content of oriental foods.** Food Chem. Toxicol., 1989; 27(5):238-287.
9. Yamani MI. Dickertmann. D. Untermann F. **Histamine formation by Preteus species in tunafish.** Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hyg. B., 1981; 173(6):478-87
10. Sayem El Daher N. et al. **Determination of mono-, di- and polyamines in foods using a single column amino acid autoanalyzer.** J. Chromatogr., 1983; 256(2): 313-321.

11. Barath A. Halasz A. Holzapfel W. **Biogenic amine concentration in some food items.** *Elelmezasi ipar*, 1991; 45(8):286-291.
12. Taylor SL. et al. **Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning.** *Applied Environmental Microbiology*, 1979 Feb; 37(2):274-8.
13. Russell FE, Maretic Z. **Scombroid poisoning: mini-review with case histories.** *Toxicon*. 1986; 24(10):967-973.
14. Summer SS. et al. **Isolation of histamine-producing *Lactobacillus buchneri* from Swiss Cheese implicated in a food poisoning outbreak.** *Applied Environmental Microbiology*, 1985; 50(4):1094-1096
15. ———. **Pacifico Central-Oriental. Guía FAO para la identificación de especies para fines de la Pesca. FAO-CE--FIS-NORAD. Vol.3. Vertebrados Parte II.** Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación. Roma 1995; 235-236.
16. Rosales Fernando. **Listado de Especies Identificados de la colección efectuada en el BI, "fengur" en la Costa del Pacifico de Guatemala.** CEMA 1993; 7.
17. Vidal Carou MC. et al. **Histamina y Tiramina en derivados carnicos.** *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 1990; 50:102-108.
18. Slem J. Beyermann K. **Concentration Profiles of Diamines in Fresh and Aerobically Stored Pork and Beef.** *J. Agric. Food Chem.*, 1985; 33:336-339.
19. Huneau JF, Tome D. Wall JM. **Histamine content, diamine oxydase and histadine decarboxylase activities along the intestinal tract of the rat.** *Agents and Actions*, 1989; 28:3-4.
20. Burkhalter A, Frick OL. **Histamina, serotonina y alcaloides del cornezuelo del centeno.** pp 203-221. En: Katzung BG, *Farmacología Básica y Clínica*. 4a edición Carsoio M del R. García. trads. México: El Manual Moderno, 1991. 922pp.
21. Bieganski T. **Biochemical, physiological and pathophysiological aspects of intestinal diamine oxidase.** *Acta physiol. Pol.*, 1983; 34(1):139-154.

22. Moret S, Bortolomeazzi R. **Improvement of extraction procedure for biogenic amines in foods and their high-performance liquid chromatography determination.** J. Chromatogr., 1992; 591:175-180.
23. Subden RE, Brown RG, Noble AC. **Determination of histamines in wines and musts by reversed-phase high-performance liquid chromatographic.** J. Chromatogr., 1987; 166(1):310-312
24. Lardas K. Sampatakou O. **Nitrosamines in meat products.** Deltio Ellinikis Ktianiatrikis Etaireias, 1986; 37(4):292-300.
25. Liehon MJ. **Sample preparation for chromatographic analysis of Food.** J. Chromatogr., 1992; 624:3-4.
26. Benítez P. Ingrid L. **Estandarización de un método por Cromatografía de Alta Resolución para el Análisis, Identificación y Cuantificación de Aminoácidos Proteicos.** Informe Final de Exámen de Integración. Fac. CC.QQ. y Farmacia. Julio, 1995; pp.12-13.
27. Garcia del Pozo, Edgar A. **Estandarización de método para el Análisis, Identificación y Cuantificación de Aminas Biogénicas, por medio de Cromatografía Líquida de Alta Presión.** Informe Final de Exámen de Integración. Fac. CC.QQ. y Farmacia, Julio, 1995; pp. 8-11.
28. Proyecto para el Mejoramiento de la carne -PROMECA-. **Listado de expendios de productos cárnicos de la Ciudad Capital y lugares aledaños.** Guatemala: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 1994. 360p. Documento Interno.
29. Chromatography Merck. **HPLC Analysis of AminoAcids by Automatic precolumn Derivation with OPA/mercaptoethanol.** Merck 1994.

ANEXOS
**“Las estadísticas, las citas y las anécdotas;
apoyan, fundamentan y resaltan el problema
de una investigación”.**
C. Schemelkes

ANEXO 1
TOXICIDAD DE LAS AMINAS BIOGENICAS
COMUNMENTE ENCONTRADAS EN ALIMENTOS

Nombre de la Amina	p. Fus. (°C)	p. Eb. (°C)	Toxicidad	Solubilidad	Densidad	Nº	Otro
Histamina	83-84	209 (18 mm)	DL ₅₀ (i.p.m) 2020 mg/kg	Sol: Agua, alcohol y cloroformo caliente. Poco Sol. Eter	NR	NR	Compuesto delicuescente
			DL ₅₀ (iv.rb) 100 mg/kg				
			DLLO (iv.rb) 100 mg/kg				
Cadaverina	9	178-180	DLLO (o.m.) 1600 mg/kg	Sol: agua, alcohol Poco Sol. Eter	0.873 (25 °C)	1.463	Líquido incoloro Dulce, volátil Reacciona CO ₂
			DLLO (iv.rb) 100 mg/kg				
Putrescina	23-24	158-160	DLLO (o.m) 1600 mg/kg	Sol.: agua			Aceite incoloro fuerte olor a piperidina.
			DLLO (o.rb) 1600 mg/kg				
			DLL (sc.m) 200 mg/kg				
Triptamina	118		D ₅₀ (sc.m) 500 mg/kg	Sol. Etanol, Acetona Ins. Agua, benceno			Uvmax (EtOH) 222, 282, 290
Feniletilamina	NR	80-81 (18 mm)	DL ₅₀ (o.r) 0.94 g/kg	Sol. Agua, 4.2% Alcohol, éter.	0.9395 (15°C)		Forma dl, liq. Olor aromático. Abs. CO ₂ aire
			DLLO (o.r) 800 mg/kg				
			DL ₅₀ (iv.m) 100 mg/kg				
Espermina	55-60	142 0.5 mm	DL ₅₀ (iv.r) 65 mg/kg	Sol. Agua Poc. Sol. Alcohol Ins. Éter, benceno	NR	NR	Base fuerte Absorbe CO ₂ del aire
			DL ₅₀ (iv.m) 56 mg/kg				
Espermidina	23	128-130 (14 mm)	DL ₅₀ (iv.m) 78 mg/kg	Sol: Agua, etanol y éter	NR	NR	NR
Tiramina	164-165	205-207 (25 mm)	DL ₅₀ (iv.m) 229 mg/kg	Sol: lg/96 ml agua a 15 °C Poco Sol. Benc.	NR	NR	NR
Etanolamina	10.3	170.8	DL ₅₀ (iv.m) 10.20 g/kg	Sol.: agua, Metanol, Acetona, benceno 1.4%	0.680 (0°C)	NR	Gas olor carac. Agua forma sol. Fuertem. Alcali
			DL ₅₀ (o.m) 700 mg/kg				
			DL ₅₀ (o.or) 1000 mg/kg				

REF. Index Merck 11 th Edition

rb: conejo

m: ratón

ip: intraperitoneal

O: oral

r: rata

iv: intravenoso

sb: subcutáneo

ANEXO 2 NIVELES DE TOXICIDAD DE LAS AB

EN CARNE NO PROCESADA (BOVINA)

AMINA BIOGENINA	VALORES DE TOXICIDAD (mg/100 g)
Cadaverina	0.80
Espermina	2.58
Histamina	0.23
Putrescina	0.23
Tiramina	2.35

Ref. Z.ges Hyg. 30 (1984) Heft 2.66

EN EMBUTIDOS CRUDOS

AMINA BIOGENICA	VALORES DE TOXICIDAD (mg/100 g)	
	Mas frecuente	Lim. Superior
Cadaverina	2.4 - 17.1	78.7
Espermina	3.6 - 5.4	18.1
Histamina	10.4 - 16.9	44.2
Putrescina	9.3 - 27.6	59.8
Tiramina	10.7 - 21.8	68.5

Ref. Z.ges Hyg. 30 (1984) Heft 2.66

TOXICIDAD DE LA TIRAMINA

Extractos de carne de res	95-305µg/g Muestra
Higado de Vaca	274 µg/gramos de Muestra

Committee on food Protec. Washington DC 1973

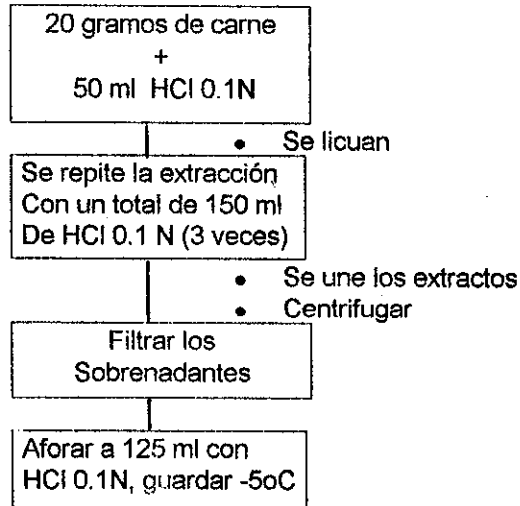
ANEXO 3
LISTADO DE CARNICERIAS MUESTREADAS

ZONA 1	
Costa Sur	Mercado Cervantes
Supercañneria imperio	Mercado Central
Carniceria California	Mercado Central
Marranería Monzón	Mercado Central
Marranería la Central	Mercado Cervantes
Carnicería los Toritos	Mercado Cervantes
ZONA 3	
Carnicería la Tolteca	Mercado el Gallito
ZONA 4	
Navidad	TERMINAL
Marranería Aristocrata	TERMINAL
Carnicería Wendy	TERMINAL
Carnicería la Antigueña	TERMINAL
La Chinita	TEPMINAL
Mi Sandrita	TERMINAL
Jerusalem	Mercado el Granero
ZONA 5	
Los Patojos	Mercado la Palmita
Pollería Wendy	Mercado la Palmita
Carnicería America	Mercado la Palmita
La Favorita	Mercado la Palmita
SIN NOMBRE	Mercado la Palmita
Zona 6	
El divino Maestro	Mercado Candelaria
Minicarnicería	Mercado Candelaria
Paiz Mega seis	Supermercado
ZONA 7	
Carnicería Felix Gonzalez	Mercado San Jose
Carnicería San Judas	Mercado San Jose
Carnicería la Antigueña	Mercado San Jose
Paiz Megacentro	Supermercado z.7

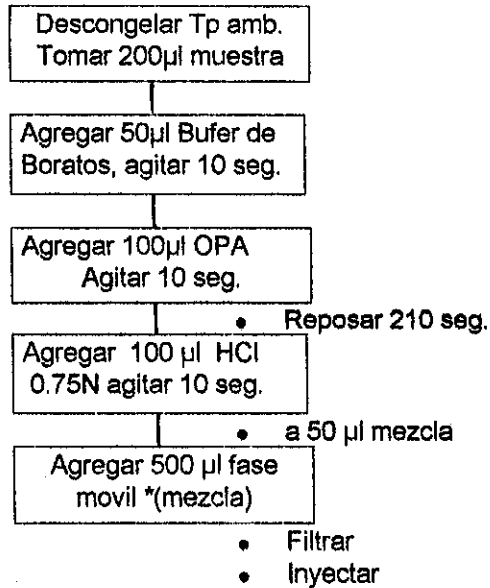
ZONA 10	
Carnicería la Unica	Mercado la Villa
El Refugio	Mercado la Villa
Samaritana Reforma	SUPERMERCADO
ZONA 11	
Marranería Santa Marta	Mercado el Guarda
Pollería Ruby	Mercado el Guarda
Mi dulce Señor	Zona 11
Paiz Utatlan	SUPERMERCADO
Paiz Novicentro	SUPERMERCADO
ZONA 12	
SIN NOMBRE	Mercado Villalobos
La Torre Aguilar Batres	SUPERMERCADO
Santa Catarina	Mercado Ciudad Real
ZONA 13	
Carnicería Cesar	Mercado Santa Fé
Monte Limar	
ZONA 18	
El corazón de Jesus	Mercado Alameda
SIN NOMBRE	Mercado Alameda
ZONA 19	
Mercado San Vicente	San Francisco I
MIXCO	
Santo Domingo No. 3	Mercado Mixco
Marranería San Francisco	Mercado Mixco
Carnicería la Milagrosa	Mercado Mixco
Marranería la Mixqueñita	Mercado Mixco
Los Tres Reyes	Mercado Mixco

ANEXO 4 METODO DE EXTRACCION Y DERIVATIZACION

METODO DE EXTRACCION



METODO DE DERIVATIZACION



* Fase Movil: (AcNa:MeOH:H₂O) (20:60:20)

ANEXO 5 RELACION CONTENIDO AMINAS BIOGENICAS/LIMITE DE TOXICIDAD

Para determinar la relación AB/LT, se realizaron los siguientes pasos:

1. A los datos originales (mg/100 gramos) de las distintas carnes, se dividió el contenido de amina biogénicas entre el valor de toxicidad reportado para las carnes no procesadas.
2. Se determinó el valor promedio, desviación y error estandar de dichas relaciones.

Ejemplo: **Carne Adobado-marrano**

Datos originales

MSTA	HYS	TYR	ESP	PUTR	CADV
01	22.5	0.3	ND	5.1	0.25
02	23.5	0.5	ND	4.8	0.31
03	21.1	0.4	ND	5.2	0.27
04	22.4	0.5	ND	5.0	0.26
05	23.8	0.6	ND	4.6	0.30

VALORES DE TOXICIDAD

MSTA	Mg/100 g
HYS	0.23
TYR	2.355
ESP	2.58
PUT	0.23
CADV.	0.80

Se procede a dividir los datos originales entre los valores de toxicidad, construyendose la sig. tabla.

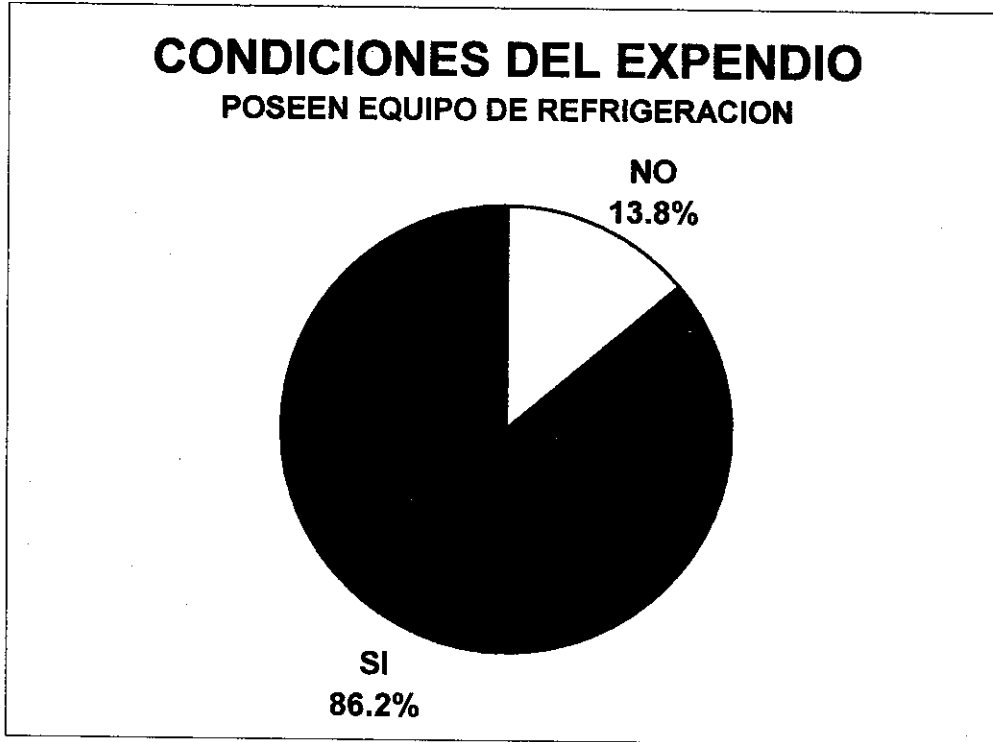
MSTA	HYS	TYR	ESP	PUTR	CADV
01	97.8	0.12	ND	22.1	0.31
02	102.1	0.21	ND	20.9	0.39
03	91.7	0.17	ND	22.6	0.34
04	97.4	0.21	ND	21.7	0.33
05	103.4	0.26	ND	20.0	0.38
Media	98.4	0.19	---	21.3	0.35
Desvst	4.6	0.05	---	1.0	0.03
e.e	4.02	0.04	---	0.1	0.03

Ejemplo: $22.5 / 0.23 = 97.8$

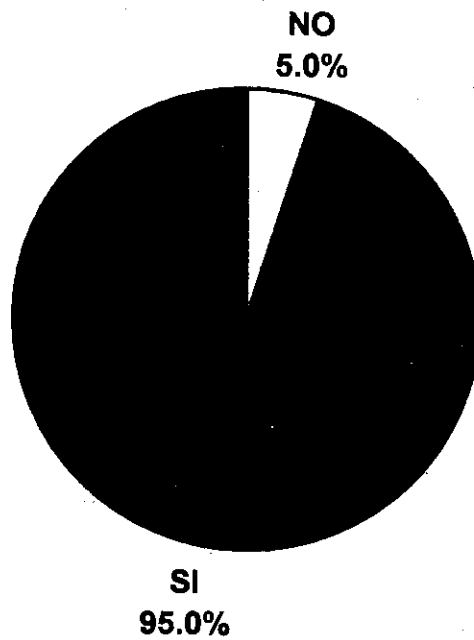
Por lo tanto las relaciones medias para carne 1 son:

Hys 98.4 ± 4.02
 Tyr 0.19 ± 0.04
 Esp no determinada
 Putr. 21.3 ± 0.1
 Cadv. 0.35 ± 0.03

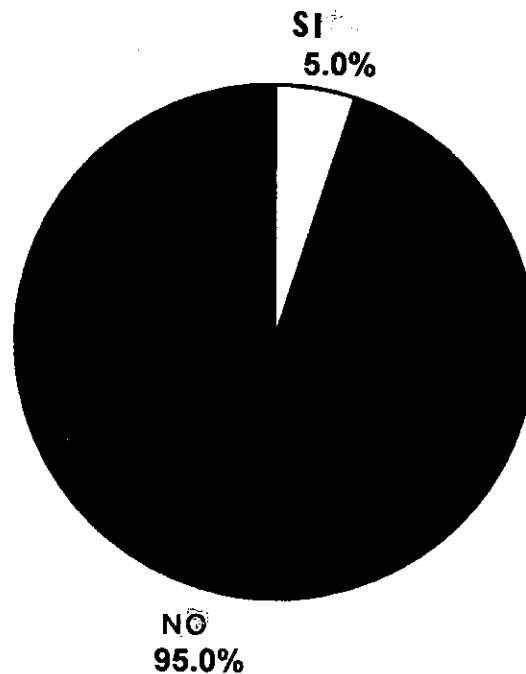
ANEXO 6



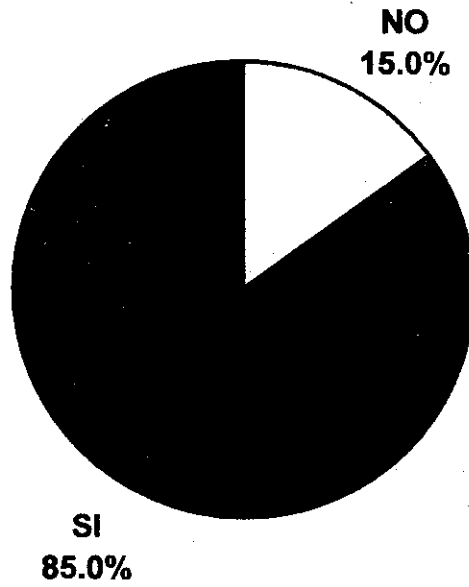
CONDICIONES DEL EXPENDIO POSEEN ROPA ADECUADA



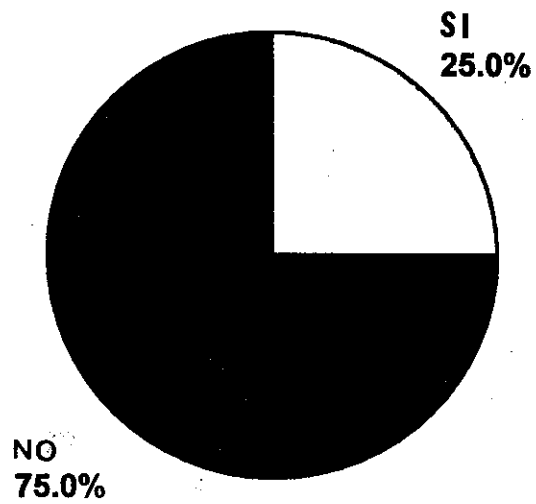
CONDICIONES DEL EXPENDIO ESTABLEC. CON PISO DE TIERRA



CONDICIONES DEL EXPENDIO
MOSTRADOR LAVABLE



CONDICIONES DEL EXPENDIO
MOSTRADOR SUCIO



ANEXO 7
TABLA DE CORRELACIONES MULTIPLES

CARNE ADOBADO

AMINA	HYS	TYR	ESP	DIAMIN	TRIPT	FENILE	ESPM	PUTS	ISOAM	CADV
HYS	1.00									
TYR	0.25	1.00								
ESP	0.06	-0.14	1.00							
DIAMI	0.16	-0.18	0.12	1.00						
TRIP	0.38	0.34	-0.11	-0.08	1.00					
FENIL	-0.03	0.02	0.73	-0.04	0.25	1.00				
ESPM										
PUTS	0.65	0.38	0.20	0.02	0.63	0.11	0.00	1.00		
ISOAM	0.43	0.08	0.49	0.18	0.16	0.02	0.00	0.68	1.00	
CADV	0.66	0.26	-0.11	0.08	0.74	0.15	0.00	0.57	0.21	1.00

CARNE AHUMADO

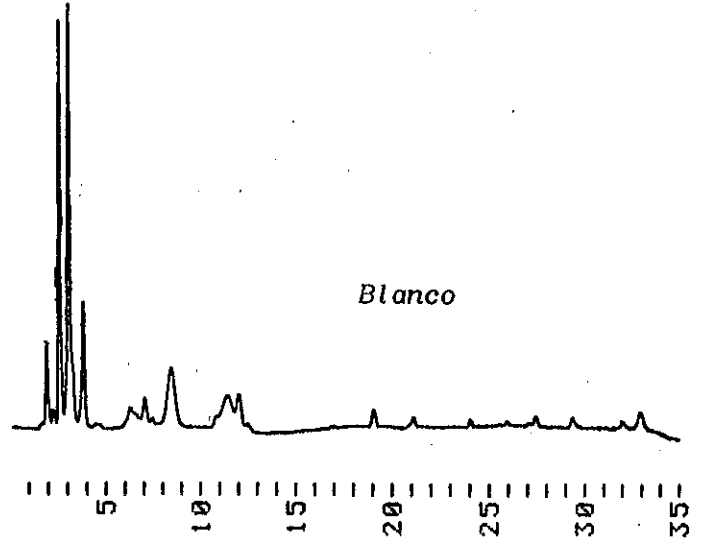
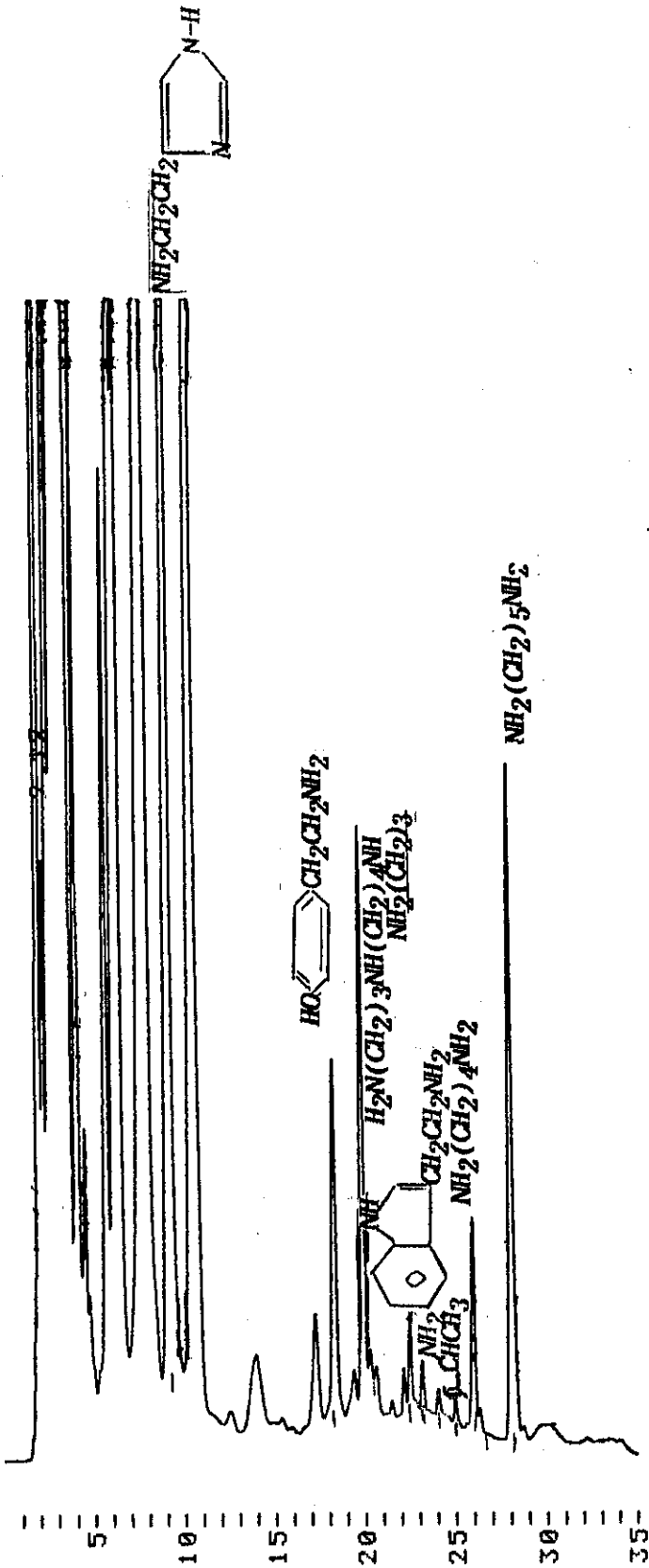
AMINA	HYS	TYR	ESP	DIAMIN	TRIPT	FENILE	ESPM	PUTS	ISOAM	CADV
HYS	1.00									
TYR	0.06	1.00								
ESP	-0.11	0.18	1.00							
DIAMI	0.48	0.01	-0.07	1.00						
TRIP	-0.17	0.55	-0.09	-0.07	1.00					
FENIL										
ESPM										
PUTS	0.12	-0.24	0.08	-0.05	-0.27	0.00	0.00	1.00		
ISOAM	0.26	-0.33	-0.16	0.42	-0.15	0.00	0.00	0.41	1.00	
CADV	0.40	-0.27	-0.21	-0.21	-0.25	0.00	0.00	0.64	0.01	1.00

CARNE CECINA

AMINA	HYS	TYR	ESP	DIAMIN	TRIPT	FENILE	ESPM	PUTS	ISOAM	CADV
HYS	1.00									
TYR	0.76	1.00								
ESP	-0.13	-0.20	1.00							
DIAMI	-0.03	0.22	-0.01	1.00						
TRIP	0.83	0.67	-0.13	0.35	1.00					
FENIL	0.70	0.85	-0.13	0.51	0.74	1.00				
ESPM	0.30	0.31	0.58	-0.08	0.17	0.36	1.00			
PUTS	0.91	0.68	-0.10	-0.04	0.87	0.60	0.21	1.00		
ISOAM	0.38	0.30	-0.14	-0.10	0.35	0.29	-0.05	0.45	1.00	
CADV	0.93	0.74	-0.13	0.21	0.97	0.76	0.22	0.94	0.40	1.00

ANEXO 8
CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS

M. I C. S 2.50 ATT 6 OFFS W 01/14/98 17-00



Separación Simultánea de 10 derivados fluorescentes de Aminas Biogénicas

-Columna Lichrocart 100 R-18
Gradiente 1
Detección EX 330 | EM 450

CROMATOGRAMAS DE LAS CARNES

CH. 1 C.S 2.50 ATT 6 OFFS 0 01/22/98 16:35

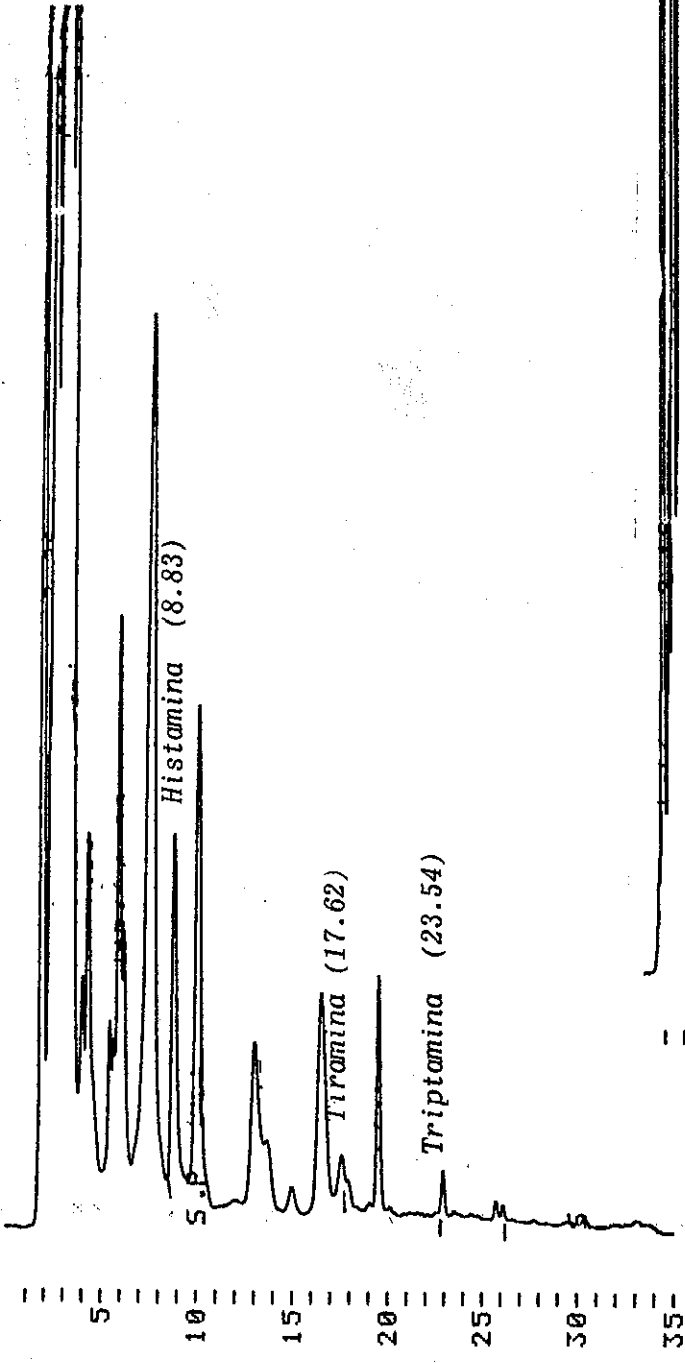


Fig. M-29 (CECINA)

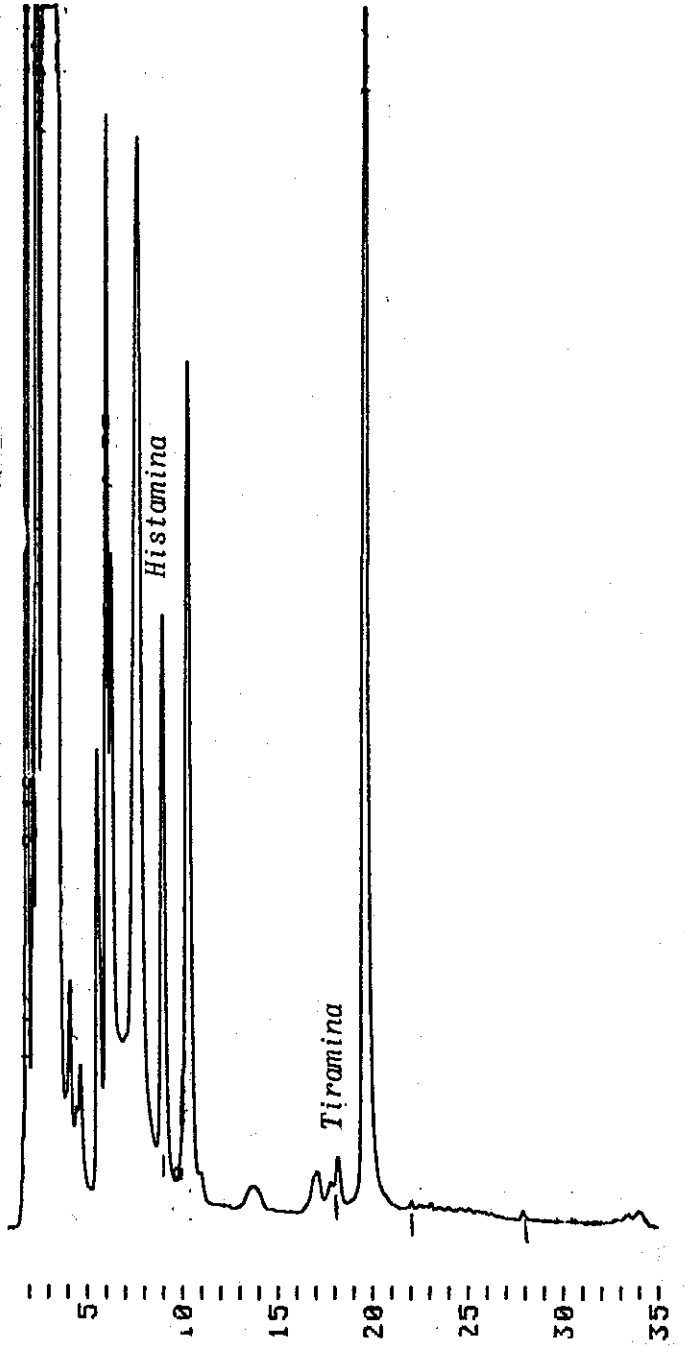


Fig. M-38 (AHUMADO)

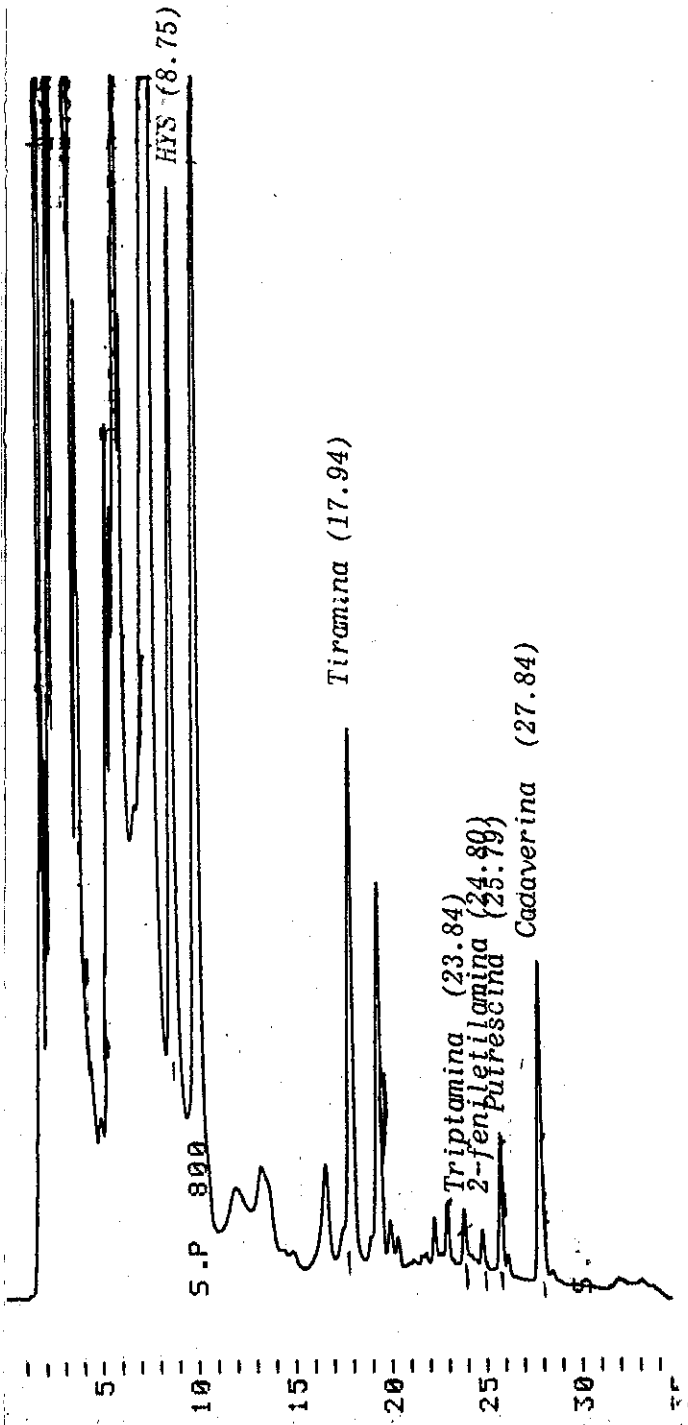


Fig. M-67 (ADOBADO MARRANO)

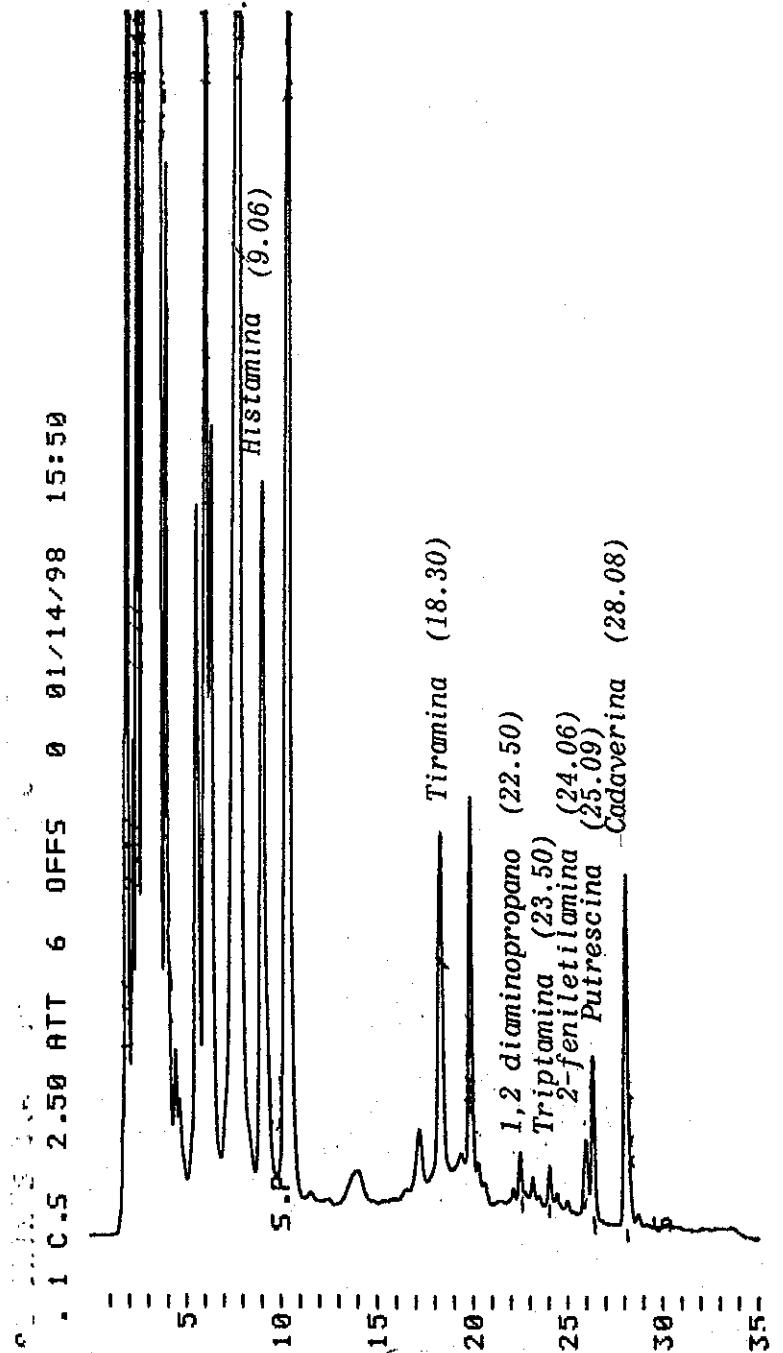
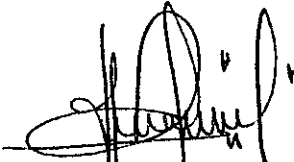


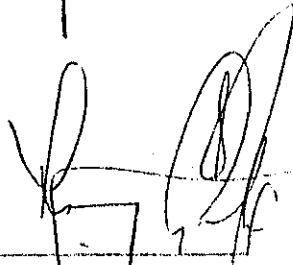
Fig. M-89 (ADOBADO RES)



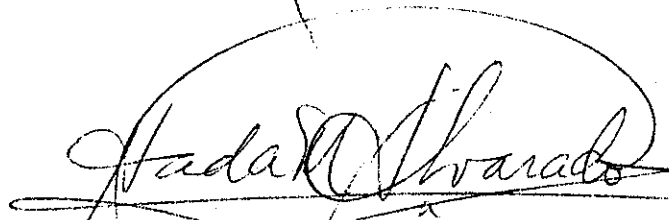
**INGRID LORENA BENITEZ PACHECO
AUTORA**



**DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
ASESOR**



**LIC. RONY ESTUARDO AYALA JIMENEZ
DIRECTOR**



**LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
DECANA**