

# NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS PESQUEROS

TESIS DOCTORAL - 2016

**Presentada por:**  
Lander Baliño Zuazo

**Dirigida por:**  
Dr. Alejandro Barranco Ibarbia

# NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS PESQUEROS

TESIS DOCTORAL - 2016

**Presentada por:**

Lander Baliño Zuazo

**Dirigida por:**

Dr. Alejandro Barranco Ibarbia

**Diseño de portada y maquetación:** Marta Jaunarena | Maquetatutesis - maquetatutesis@gmail.com

**Ilustración portada:** © Lukasvonbenes | Dreamstime.com



Nuevas metodologías para la evaluación de la calidad de productos pesqueros por Lander Baliño Zuazo se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Alejandro Barranco toda su ayuda, desde el momento del comienzo de la tesis con sus ánimos y confiando en mí, hasta el momento final de las correcciones y la defensa. Has sido un gran apoyo Alex! Muchas gracias!

También quiero agradecer a AZTI-Tecnalia la oportunidad de llevar a cabo esta tesis y al Gobierno Vasco por la beca que pude disfrutar durante ese periodo. Durante esos seis años largos que he estado en AZTI-Tecnalia he conocido a muuuucha gente, y algunas personas os habéis convertido en grandes amigas. También guardo muy buenos recuerdos de nuestros comienzos juntos y la pandi que creamos (Saio, Lanu, Esti, Sani, Mai, Mari, Aitziber, Usua, Yoli, Boni, Deivis, Maikol...)

Igualmente a todos mis amig@s, con los que he pasado muy buenos momentos que me han ayudado a relajarme y desconectar en los momentos más “críticos”, y muy en especial a mi amiga Marti, por el gran trabajo que ha hecho con el diseño y maquetación de todo este documento. Eskerrik asko por tu tiempo y tu amistad!

Por último quiero dar las gracias a mis padres, porque sin su apoyo y cariño no estaría aquí ahora. Y como no, a mi hermano Mikel por estar siempre ahí. Los tres me habéis sufrido durante mis malos humores y nervios jajajja. Os quiero mucho!

Y por supuesto a Iban, por estar siempre ahí, deseando ayudarme y apoyándome desde el principio hasta el final con todo lo que hago. Maite zaitut!



<b>ADP:</b> Difosfato de adenosina	<b>MeCN:</b> Acetonitrilo
<b>AIBN:</b> Azoisobutironitrilo	<b>NAD:</b> Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>AMP:</b> Monofosfato de adenosina	<b>NIR:</b> Infrarrojo cercano
<b>AO:</b> Naranja de acridina	<b>NVC:</b> N-vinil carbazol
<b>AOAC:</b> Asociación oficial de químicos analíticos	<b>PA:</b> Poliamida
<b>ATP:</b> Trifosfato de adenosina	<b>PE:</b> Polietileno
<b>BAE:</b> Bromoacetato de etilo	<b>PET:</b> Polietilen tereftalato
<b>BATB:</b> Bromoacetato de tertbutilo	<b>PUT:</b> Putrescina
<b>Car:</b> <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	<b>SD:</b> Desviación estándar
<b>CD:</b> Congelado - Descongelado	<b>Serr:</b> <i>Serratia proteamaculans</i>
<b>DER:</b> Desviación estándar relativa	<b>She:</b> <i>Shewanella baltica</i>
<b>DMA:</b> Dimetilamina	<b>SSO:</b> Microorganismos de deterioro específico
<b>DNPH:</b> Dinitrofenilhidrazina	<b>TEAC:</b> Cloruro de tetraetilamonio
<b>DPS:</b> Sulfato de dipropilo	<b>TH:</b> Tionina
<b>EGDMA:</b> Etilenglicol dimetacrilato	<b>THF:</b> Tetrahidrofurano
<b>EVOH:</b> Etilenvinil alcohol	<b>TMA:</b> Trimetilamina
<b>FIA:</b> Análisis por inyección en flujo	<b>TMAO:</b> Óxido de trimetilamina
<b>FMOC:</b> Cloroformiato de fluorenilmetilo	<b>TVBN:</b> Bases volátiles totales de nitrógeno
<b>HILIC:</b> Cromatografía líquida de interacción hidrofílica	<b>VAR:</b> Varianza
<b>HIS:</b> Histamina	<b>Xa:</b> Xantina
<b>Hx:</b> Hipoxantina	<b>Yer:</b> <i>Yersinia intermedia</i>
<b>IMP:</b> Inositol monofosfato	<b><math>\alpha</math>CD:</b> $\alpha$ -Ciclodextrina
<b>Ino:</b> Inositol	<b><math>\beta</math>CD:</b> $\beta$ -Ciclodextrina
<b>IPA:</b> Isopropanol	<b>2VN:</b> 2 Vinil naftaleno
<b>LOD:</b> Límite de detección+	
<b>LOQ:</b> Límite de cuantificación	
<b>MA:</b> Metilamina	
<b>MB:</b> Azul de metileno	



La producción y consumo mundial del pescado ha aumentado a gran velocidad en las últimas décadas debido al aumento de la población y la mejora en los canales de distribución de los alimentos. Se trata de un alimento rico en proteínas y minerales y algunas especies presentan ácidos grasos muy interesantes como el ácido docosahexaenóico o el ácido eicosapentaenóico.

Pero el pescado es un producto altamente perecedero y tras su captura comienza rápidamente su deterioro principalmente mediante dos grandes mecanismos, la autólisis, responsable de la degradación de proteínas, grasas y compuestos nitrogenados entre otros y la vía de deterioro microbiológico, generadora de una gran variedad de compuestos químicos, entre los que destacamos las aminas biógenas, aminas volátiles y aldehídos/cetonas, estos dos últimos principales objetivos de la presente tesis. Estos compuestos son responsables de la pérdida de calidad del pescado y el crecimiento experimentado en el consumo ha traído consigo una mayor preocupación por parte de los consumidores en cuanto a la calidad del producto.

Por todo esto existen numerosas metodologías, y continuamente surgen nuevas, para cuantificar el estado de calidad de los productos pesqueros. Los distintos métodos abarcan desde el análisis sensorial, considerado el más apropiado para determinar la frescura del pescado, hasta metodologías químicas o análisis microbiológicos, que se encargan de determinar cuáles son los microorganismos de deterioro específico (responsables microbianos del deterioro del pescado).

De entre los métodos químicos, cabe destacar el gran avance en los últimos tiempos de los sensores. Anticuerpos y enzimas resultan de gran interés en este campo por su alta especificidad y sensibilidad pero poco a poco también se han ido introduciendo nuevos elementos de reconocimiento como son los polímeros de impresión molecular. Estos compuestos son entramados poliméricos con propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia compuestos para los que han sido sintetizado y son utilizados para determinar una gran variedad de compuestos en multitud de matrices alimentarias.

Los principales objetivos de la tesis han sido: *i*) desarrollar una metodología de análisis multianálisis de gran sensibilidad para poder caracterizar el contenido en aminas volátiles en el músculo y la atmósfera de distintas muestras de pescado (merluza, chicharro y trucha) y determinar así cual utilizar como biomarcador en cada caso; *ii*) determinar la presencia de otras sustancias (p.ej. aldehídos y cetonas) en distintas especies de interés y en distintas condiciones; *iii*) diseñar y sintetizar distintos materiales poliméricos que podrían ser utilizados como elementos de reconocimiento, en sensores, de los marcadores de interés e incluso utilizarlos en posibles envases.

Para alcanzar estos objetivos, primeramente se seleccionaron distintas metodologías que a priori resultasen interesantes por sus características y la que resultó más prometedora fue optimizada y validada. Se trató de una metodología HPLC-MS en la que se utilizó un agente derivatizante (bromoacetato de tert-butilo) para aminas primarias, secundarias y terciarias. Esta metodología fue validada y con ella se alcanzaron límites de cuantificación para la metilamina, dimetilamina y trimetilamina de 0,37, 0,28 y 0,08 mg N/kg pescado respectivamente.

Posteriormente esta metodología se utilizó para caracterizar el contenido en metilamina, dimetilamina y trimetilamina en pescado almacenado en distintas condiciones de temperatura. Se caracterizaron cambios debidos a temperaturas de refrigeración y congelación en el músculo así como cambios a consecuencia de la utilización de atmósferas modificadas.

Esta metodología también fue adaptada para poder cuantificar muestras gaseosas siendo validada y alcanzando porcentajes de recuperación de 48%, 61% y 77% para la metilamina, dimetilamina y trimetilamina respectivamente. Con esta adaptación se caracterizaron los cambios ocurridos en la atmósfera que rodea el pescado debidos a las distintas condiciones de almacenamiento, tanto en refrigeración como en congelación.

Así mismo, se determinaron otros marcadores químicos como aldehídos/cetonas en distintas muestras de pescado y sus atmósferas, así como en un sistema modelo creado a partir de caldos de chicharro y utilizando microorganismos de deterioro específicos para inocularlos.

Por último, se estudió el efecto de las aminas volátiles en la señal de fluorescencia de distintas moléculas de interés con la finalidad de utilizar dichas moléculas para crear polímeros de impresión molecular que experimentasen cambios detectables colorimétricamente al quedar retenida la trimetilamina en ellos. Como moléculas de interés por los cambios observados se seleccionaron el naftaleno y el naranja de acridina. Se utilizaron moléculas estructuralmente similares para llevar a cabo el proceso de síntesis del polímero y posteriormente se trituró, tamizó y lavó, para llevar a cabo los estudios de afinidad.

De todos los resultados obtenidos en esta tesis cabe destacar la metodología desarrollada para el análisis de aminas volátiles tanto en músculo de pescado como en aire y en distintos medios orgánicos. Gracias a esta metodología y sus bajos límites de detección, se ha podido utilizar la TMA como marcador de calidad en pescado de agua dulce. Asimismo, se ha desarrollado un protocolo de análisis para determinar la concentración de metilamina, dimetilamina y trimetilamina en el músculo de pescado mediante la extracción del aire de las barquetas del pescado a analizar, de esta forma se consigue una metodología no destructiva con el consiguiente beneficio que eso supone. Además, utilizando la medida indirecta de la atmósfera de las barquetas se ha logrado discriminar entre pescado fresco y pescado congelado-descongelado.

In recent decades world fish production and consumption has rapidly increased due to population growth and the improvement of food distribution channels. Fish is a food with a high content of proteins and minerals. Some species contain very interesting fatty acids such as docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid.

But fish is also a highly perishable product and after its catch the deterioration begins rapidly via two main mechanisms: the autolysis, responsible for the protein, fat and nitrogen compounds deterioration among others; and the microbiological deterioration route, generating a wide variety of chemical compounds among which biogenic amines, volatile amines and aldehydes/ketones can be highlighted, being the latter two the main target analytes of the present thesis. These compounds cause the loss of fish quality and the experimented growth in the fish intake has led to a greater consumers' concern about the product quality. For all these reasons, there are numerous methodologies and new ones are emerging constantly for the quantification of the fish products quality state. The methodologies range from sensory methods, considered the most appropriate for the determination of the fish freshness, to chemical or microbiological methodologies which help to identify the specific spoilage microorganisms responsible for the fish deterioration.

Among the chemical methods it is important to mention the great breakthrough of sensors in recent years. Antibodies and enzymes are of great interest in this field for its high specificity and sensibility but gradually new recognition elements have been introduced such as molecularly imprinted polymers. These compounds are polymeric networks with selective molecular recognition properties towards the compounds for which they have been synthesized and used to determine a wide variety of compounds in different food matrices.

The main objectives of this thesis have been: i) to develop a multianalyte methodology of analysis with great sensitivity to characterize the volatile amine content in the muscle and gas phase of different fish species (hake, atlantic horse mackerel and trout) and to determine the best biomarker at each condition; ii) to detect the presence of other substances (e.g. aldehydes and ketones) in different species of commercial interest and at different conditions; iii) to design and synthesize different polymeric materials that could be used as recognition elements of selected biomarkers or even integrated in different food packaging.

To reach these objectives, firstly, different interesting methodologies were selected and the more promising was optimized and validated. It was an HPLC-MS methodology in which a derivatizing agent (tert-butyl bromoacetate) was used for primary, secondary and tertiary amines.

The methodology was validated and limits of quantification of 0,37, 0,28 and 0,08 mg N/kg of fish were reached for methylamine, dimethylamine and trimethylamine respectively.

After that, this methodology was used to characterize the content of methylamine, dimethylamine and trimethylamine in fish stored at different temperature conditions. Changes due to chilling and freezing temperatures were characterized as well as those changes under modified atmospheres.

This method was adapted and validated for the quantification of gaseous samples, reaching recovery values of 48, 61 and 77% for methylamine, dimethylamine and trimethylamine respectively. Thanks to this adaptation, changes taken place in the gas phase of fish stored at different conditions such as chilling or freezing could be measured.

Other biomarkers such as aldehydes/ketones in different fish samples and gas phases were also determined. A model system was created with atlantic horse mackerel extracts and different specific spoilage microorganisms were inoculated to determine the generated biomarkers.

Finally, the effect of the volatile amines in the fluorescence signal of different molecules of interest was studied with the aim of using those molecules in the synthesis of molecularly imprinted polymers that could suffer colorimetric changes when trimethylamine is retained within the polymer. Taking into consideration the observed changes, naphthalene and acridine orange were selected, and structurally similar molecules were used in the synthesis process. Afterwards the polymer was ground, sieved and cleaned before conducting the binding tests.

From all the results of this thesis it has to be emphasized the development of the methodology for the quantification of volatile amines in fish muscle, atmospheres and different organic media. Thanks to this methodology and its low limits of detection, TMA has been proved to be a good quality marker even in freshwater fish. Furthermore, a protocol for the determination of methylamine, dimethylamine and trimethylamine in fish muscle by means of the extraction of the air of the fish trays was developed, a non destructive methodology with the subsequent benefit. Moreover with the indirect measure of the atmosphere of the fish trays, discrimination between fresh and frozen – thawed fish has been achieved.

Azken hamarkadetan, populazioaren handitzeari eta banaketa kanalen hobekuntzari esker, munduko arrain ekoizpena eta kontsumoa abiadura handian handitu dira. Arraina proteina eta mineraletan elikagai aberatsa da eta espezie batzuek oso interesgarriak diren azido koipetsuak azaltzen dituzte, hala nola, docosahexaenoico azidoa edota eicosapentaenoico azidoa.

Baina arraina produktu oso galkorra da eta harrapatu ostean bere hondatzea azkar hasten da. Bi mekanismok hartzen dute parte prozesu honetan, alde batetik autolisia, proteina, koipe, eta konposatu nitrogenatuen hondatzearen arduraduna, eta bestaldekik bakteriaren bidezko degradazioa, non konposatu kimiko anitzak sortzen diren. Prozesu honetan azpimarratzekoak dira amina biogenak, amina lurrunkorrek eta aldehidoak/ cetonak. Azken bi hauek aurkeztutako tesiaren helburu nagusiak dira. Konposatu guzti hauek arrainaren kalitatearen galeraren arduradunak dira, eta kontsumitzaileen aldetik kalitateari buruzko urduritasun handiago ekarri du.

Hau guztiarengatik, arrantzu-produktuen kalitatea kuantifikatzeko metodologia berriak etengabe sortzen ari dira. Metodologia hauek zentzumen-analisiak izan daitezke, arrainaren freskotasuna neurritzeko egokienak izan ohi direnak baina metodologia kimikoak edota analisi mikrobiologikoak ere izan daitezke. Azken hauek arrainaren hondatzearen arduradun mikrobiologikoak identifikatzen dituzte.

Metodo kimiko guztien artean, azken garai honetan sentsoreetan izandako aurrerapauso handia nabarmentzekoa da. Arlo honetan antigorputzak eta entzimak bere espezifikotasun eta sentikortasun altuarengatik interes handikoak dira, baina pixkanaka-pixkanaka ikuskapenaren hastapen batzuk sartu dira, hala nola aztarna molekularren polimeroak. Konposatu hauek molekula espezifikoak ezagutzeko propietatea duten egitura polimerikoak dira. Oro har, elikagai matrize ugarran konposatu ezberdinak zehazteko erabili ohi dira.

Tesiaren helburu nagusiak izan dira: *i*) arrain lagin batzuetako (legatza, txitxarro eta amurrua) giharrean eta atmosferan amina lurrunkorrek neurtzeko sentikortasun handiko multianalito analisisiaz metodologia bat garatzea, eta horrela kasu bakoitzean biomarkatzaile moduan zein erabili erabakitzea; *ii*) intereseko espezie ezberdinetan eta egoera ezberdinetan beste substantzien presentzia neurtzea (adibidez aldehidoak eta cetonak); *iii*) intereseko markatzaileen sentsoreetan ikuskapenerako hastapen polimeroen material ezberdinak diseinatzea eta sintetizatzea, eta gainera haiek erabiltzea alegiazko ontzietan.

Helburu hauek lortzeko, hasiera batean beren ezaugarriengatik interesgarriak ziren metodologia ezberdin batzuk aukeratu ziren eta interesgarriena zena optimizatu eta balioztatua izan zen.

Amina primario, sekundario eta tertziarioentzako eragile deribatzaile bat (bromoacetato de tert-butilo) erabili zen metodologian. HPLC-MS metodologia bat izan zen. Metodologia hau balioztatua izan zen eta harekin metilamina, dimetilamina eta trimetilaminarentzako 0,37, 0,28 eta 0,08° mg° N/kg arrain hurrenez hurren kuantifikazio-limiteak lortu ziren.

Ondoren, metodologia honen bitartez tenperatura ezberdinetan biltegitratutako arrainaren metilamina, dimetilamina eta trimetilamina edukia neurtu zen. Arrain giharrean hozte eta izozte tenperaturek eragindako aldaketak neurtu ziren baita atmosfera aldatuak erabiltzeak eragindako aldaketak ere.

Metodologia hau ere lagin gaseosoak neurritzeko moldatua izan zen eta metilamina, dimetilamina eta trimetilaminarentzako % 48. % 61 eta % 77 suspertze portzentajeak lortuz hurrenez hurren. Hozte nahiz izozte biltegitratzetan arrainaren inguruko atmosferan eragindako aldaketak moldaera honekin neurtu ziren.

Era berean, arrain lagin ezberdinetan eta beren atmosferetan beste markatzaile kimiko batzuk, hala nola aldehidoak/cetonak, neurtu ziren, baita txitxarro saldez sortutako sistema eredu batean ere hondatze mikroorganismo espezifikokoak inokulatuz.

Azkenik, amina lurrunkorren intereseko molekula ezberdinetan fluoreszentsia-seinalean efektua ikasi zen eta naftaleno eta akridinazko laranja aukeratu ziren. Polimeroaren sintesi prozesua egiteko egituraz antzekoak diren molekulak erabili ziren eta trimetilamina egitura horien artean harrapaturik geratzean, kolorimetrikoki detektagarriak diren aztarna molekularreko polimeroak sortu ziren. Geroago bahetu eta garbitu ziren afinitate probak egiteko.

Tesi honetan lortutako emaitza guztienetik, bai arrainaren giharrean bai airean eta ingurune organiko ezberdinetan, amina lurrunkorrek garatzeko azpimarretzekoa da. Metodologia honen detekzio limite baxuei esker, TMA molekula ur gezatako arrainen kalitate markatzaile bezala erabili ahal izan da. Halaber, arrainen ontzien airearen azterketaren bidez, giharrean metilamina, dimetilamina eta trimetilamina kontzentrazioa ezagutzeko protokolo ez-suntsitzaile berri bat etekina ekarriz garatu da. Gainera, arrain ontzien atmosfera zehar-neurketa erabiliz arrain freskoaren eta arrain izoztuta-desizostutaren artean ezberdintzea lortu da.

La production et la consommation mondiale de poisson a augmenté rapidement au cours des dernières décennies en raison de la croissance de la population et l'amélioration des canaux de distribution des aliments. C'est un aliment riche en protéines et en minéraux et certaines espèces ont des acides gras très intéressants tels que l'acide docosahexaénoïque ou l'acide eicosapentaénoïque.

Cependant, le poisson est un produit hautement périssable et après sa capture il commence rapidement à se détériorer principalement par le biais de deux mécanismes : d'une part, l'autolyse, responsable de la dégradation des protéines, des graisses et des composés azotés entre autres , d'autre part, la voie de détérioration microbiologique, qui forme une grande variété de composés chimiques, parmi lesquels on trouve des amines biogènes, des amines volatiles et des aldéhydes/cétones. Ces deux derniers sont les objectifs principaux de cette thèse. Ces composés sont responsables de la perte de qualité du poisson. De plus, la croissance de la consommation a entraîné une forte préoccupation chez les consommateurs à propos de la qualité des produits.

Pour tout cela, il y a plusieurs méthodes, et continuellement ils apparaissent des nouvelles méthodes afin de quantifier l'état de qualité des produits de la pêche. Les différentes méthodes vont de l'analyse sensorielle, considérée comme la méthode la plus appropriée pour la détermination de la fraîcheur du poisson, à des méthodes d'analyse chimique ou microbiologique, responsables de déterminer qui sont les micro-organismes d'altération spécifiques (des micro-organismes responsables de la détérioration des poissons).

Parmi les méthodes chimiques, les capteurs se sont mis à la tête de la course. Les anticorps et les enzymes sont d'un grand intérêt dans ce domaine du à leur haute spécificité et sensibilité, mais, petit à petit, de nouveaux éléments de reconnaissance ont été progressivement introduits, par exemple des polymères d'empreinte moléculaire. Ces composés sont des réseaux polymériques avec des propriétés de reconnaissance moléculaire sélective vers des certaines composés contre lesquels ils ont été synthétisés, et ils sont employés pour déterminer une grande variété de composés dans de nombreuses matrices alimentaires.

Les principaux objectifs de la thèse sont: i) mettre au point une méthodologie d'analyse multi-analyte avec une sensibilité élevée pour caractériser la teneur en amines volatiles dans le muscle et dans l'atmosphère autour de différents échantillons de poisson (le merlu, le maquereau et la truite) et déterminer ainsi lesquels utiliser comme biomarqueur dans chaque cas; ii) déterminer la présence d'autres substances (par exemple des aldéhydes et des cétones) chez différentes espèces d'intérêt et dans des conditions différentes; iii) designer et synthétiser différents

matériaux polymères qui pourraient être utilisés comme des éléments de reconnaissance des marqueurs d'intérêt, chez des capteurs. On pourrait même les utiliser potentiellement dans des possibles emballages.

Pour atteindre ces objectifs, on a d'abord sélectionné des différentes méthodologies qui semblaient intéressantes pour leurs caractéristiques et celle qui s'est révélée comme la plus prometteuse parmi eux a été optimisée et validée. Il s'agit d'une méthode HPLC-MS qui employé un agent de dérivation (bromoacétate de tert-butyle) pour les amines primaires, secondaires et tertiaires. Cette méthodologie a été validée en trouvant des limites de quantification pour méthylamine, diméthylamine et triméthylamine de 0,37, 0,28 et 0,08 mg N / kg de poisson respectivement.

Plus tard, cette méthode a été utilisée pour caractériser la teneur en méthylamine, diméthylamine et triméthylamine chez le poisson stocké dans différentes conditions de température. On a caractérisé des changements dus à la température de réfrigération et de congélation dans le muscle ainsi que des changements résultant de l'utilisation des atmosphères modifiées.

Cette méthode a également été adaptée pour quantifier des échantillons gazeux étant validée et atteignant des pourcentages de récupération de 48%, 61% et 77% pour la méthylamine, la diméthylamine et la triméthylamine, respectivement. Grâce à cette adaptation il a été possible de mettre en évidence des changements dans l'atmosphère au tour du poisson en raison des différentes conditions de stockage, aussi bien dans la réfrigération que dans la congélation.

Par ailleurs, des autres marqueurs chimiques, tels que des aldéhydes/cétones, ont été déterminés chez des différents échantillons de poisson, ainsi que leur contribution à la modification de la teneur gazeuse autour d'eux. Un système modèle a été conçu, issu des bouillons du maquereau inoculés avec des microorganismes connus comme les causants spécifiques de la détérioration.

Enfin, l'effet des amines volatiles a été étudié dans le signal de fluorescence de certaines molécules d'intérêt dans le but d'utiliser ces molécules pour dessiner des polymères d'empreinte moléculaire qui puissent reconnaître la triméthylamine et produire des changements mesurables dans la lumière émise. Naphthalène et orange d'acridine ont été les molécules qu'ont montré les propriétés les plus intéressantes. D'un point de vue structural, au but de synthétiser le polymère, les molécules employées ont été très semblables. Après, le polymère a été trituré, tamisé et lavé, pour mettre au point les études d'affinité.

De tous les résultats obtenus dans cette thèse il faut faire mention de la méthode développée pour l'analyse des amines volatiles dans les muscles des poissons et dans l'air ainsi que dans des divers moyennes organiques. Grâce à cette méthode et à ses limites de détection, la triméthylamine

a pu être employée comme marqueur de qualité chez le poisson d'eau douce. On a également développé un protocole de analyse pour déterminer la concentration de méthylamine, diméthylamine et triméthylamine dans le muscle de poisson par l'extraction de l'air de leurs barquettes. La méthode développée se montre comme une méthode pas destructive, avec les bénéfices qu'il emporte. En plus, avec la mesure indirecte de l'atmosphère issu des barquettes il a été possible de différentier parmi du poisson frais et du poisson surgelé-décongelé.



AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
LABURPENA	XI
RÉSUMÉ	XIII
ÍNDICE	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XXV
ÍNDICE DE TABLAS	XXXIII

---

**CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN** **3**

**BLOQUE 1: EL PESCADO: IMPORTANCIA NUTRICIONAL Y SOCIOECONÓMICA. DETERIORO Y METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS**

1.1 -El pescado en la alimentación.....	3
1.1.1 -Consumo de pescado y acuicultura.....	3
1.1.2 -Importancia socioeconómica del pescado.....	5
1.1.3 -Composición nutricional del pescado.....	7
1.2 -Deterioro del pescado y marcadores químicos de calidad.....	9
1.2.1 -Autólisis.....	10
1.2.1.1 -Carbohidratos.....	10
1.2.1.2 -Nucleótidos.....	11
1.2.1.3 -Proteólisis y compuestos nitrogenados no protéicos.....	11
1.2.1.4 -Lipólisis.....	13
1.2.2 -Deterioro microbiológico.....	13
1.2.2.1 -Aminas biógenas y volátiles.....	13
1.2.2.2 -Aldehídos y cetonas.....	15
1.2.2.3 -Compuestos azufrados.....	15
1.2.3 -Legislación.....	16
1.3 -Métodos de conservación.....	17

<b>1.4 -Metodologías de análisis</b> .....	18
1.4.1 -Métodos microbiológicos.....	18
1.4.2 -Métodos sensoriales.....	19
1.4.3 -Colorimetría.....	20
1.4.4 -Cromatografía.....	21
1.4.5 -Sensores y otras metodologías.....	23
<b>BLOQUE 2: POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES</b>	
<b>1.5 -Los sensores y su importancia</b> .....	23
<b>1.6 -Polímeros de impresión molecular (MIPs)</b> .....	25
1.6.1 -Ventajas y desventajas de los MIPs.....	26
<b>1.7 -Síntesis</b> .....	26
1.7.1 -Tipos de polímeros en función de la unión molécula molde-monomero.....	27
1.7.2 -Componentes de los polímeros de impresión molecular.....	28
1.7.3 -Tipos de polimerización.....	30
<b>1.8 -Caracterización de los polímeros de impresión molecular</b> .....	32
1.8.1 -Morfológica.....	32
1.8.2 -Química.....	32
1.8.3 -Caracterización de la unión analito - MIP.....	32
<b>1.9 -Aplicaciones</b> .....	34
1.9.1 -SPE.....	34
1.9.2 -Fase estacionaria en técnicas de separación.....	35
1.9.2.1 -HPLC.....	35
1.9.2.2 -Electrocromatografía capilar.....	35
1.9.3 -Sensores.....	36
<b>1.10 -Bibliografía</b> .....	37

---

**CAPÍTULO 2: OBJETIVOS** **53**

---

**CAPÍTULO 3: SELECCIÓN Y DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS PARA AMINAS PRIMARIAS, SECUNDARIAS Y TERCIARIAS** **57**

<b>3.1 -Materiales, equipos y software</b> .....	57
3.1.1 -Reactivos y disolventes:.....	57

3.1.2 -Equipos:	58
3.1.3 -Software	58
<b>3.2 -Utilización de par iónico</b>	<b>58</b>
3.2.1 -Introducción	58
3.2.2 -Materiales y métodos	59
3.2.3 -Resultados	60
<b>3.3 -Adaptación del método del ácido pícrico de Dyer</b>	<b>62</b>
3.3.1 -Introducción	62
3.3.2 -Materiales y métodos	64
3.3.3 -Resultados	64
<b>3.4 -Cloruro de benzoílo</b>	<b>65</b>
3.4.1 -Introducción	65
3.4.2 -Materiales y métodos	66
3.4.3 -Resultados	68
<b>3.5 -Cromóforos y ciclodextrinas</b>	<b>71</b>
3.5.1 -Introducción	71
3.5.2 -Materiales y métodos	74
3.5.3 -Resultados	74
<b>3.6 -Sulfato de dipropilo</b>	<b>78</b>
3.6.1 -Introducción	78
3.6.2 -Materiales y métodos	78
3.6.3 -Resultados	80
<b>3.7 -Bromoacetato de etilo y de tert-butilo</b>	<b>83</b>
3.7.1 -Introducción	83
3.7.2 -Materiales y métodos	84
3.7.2.1 -Bromoacetato de etilo	84
3.7.2.2 -Bromoacetato de tert-butilo	84
3.7.2.2.1 -Optimización de la derivatización	85
3.7.2.2.2 -Separación cromatográfica y espectrometría de masas	86
3.7.2.2.3 -Análisis de muestras reales	87
3.7.2.2.4 -Validación	88
3.7.2.2.5 -Estabilidad de los extractos y de los productos de reacción	88
3.7.3 -Resultados	89
3.7.3.1 -Bromoacetato de etilo	89

3.7.3.2 -Bromoacetato de tert-butilo.....	90
3.7.3.2.1 -Optimización de la reacción.....	94
3.7.3.2.2 -Optimización de la separación y análisis mediante HPLC-MS.....	96
3.7.3.2.3 -Validación.....	109
3.7.3.2.3.1 -Intervalo lineal.....	109
3.7.3.2.3.2 -Precisión y exactitud.....	113
3.7.3.2.3.3 -Robustez.....	115
3.7.3.2.3.4 -Estabilidad de los extractos y los productos de reacción.....	115
3.8 -Conclusiones.....	117
3.9 -Bibliografía.....	119
Publicación 1: A novel liquid chromatography-mass spectrometric method for the simultaneous determination of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in fishery products.....	122

**CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINAS VOLÁTILES DEL MÚSCULO DE PESCADO** **133**

---

4.1 -Introducción.....	134
4.2 -Material y métodos.....	135
4.2.1 -Separación cromatográfica y espectrometría de masas para la determinación de aminas volátiles.....	135
4.2.2 -Análisis de las muestras de pescado (experimento 1 y 3).....	136
4.2.3 -Espacio en cabeza estático y condiciones de cromatografía gaseosa (Experimento 4).....	137
4.2.4 -Envasado de pescado (Experimento 3 y 5).....	137
4.2.5 -Caldos de pescado (Experimento 6).....	138
4.2.5.1 -Preparación e inoculación de los caldos.....	138
4.2.5.2 -Determinación de biomarcadores.....	138
4.2.5.3 -Análisis de componentes principales.....	139
4.3 -Resultados y discusión.....	140
4.3.1 -Experimento 1: Determinación del contenido en aminas volátiles en músculo de trucha, merluza y chicharro en refrigeración (4°C).....	140
4.3.2 -Experimento 2: Determinación del contenido de aminas volátiles en merluza y chicharro durante distintos tiempos de congelación (-20°C).....	144
4.3.3 -Experimento 3: Determinación del contenido en TMA en músculo de dorada y chicharro envasados en MAP a distintas temperaturas.....	146

4.3.4 -Experimento 4: Determinación del contenido de compuestos volátiles en músculo de merluza y chicharro congelados-descongelados .....	148
4.3.4.1 -Contenido en aminas volátiles (HPLC-MS).....	148
4.3.4.2 -Contenido en aminas volátiles y otros compuestos volátiles .....	154
4.3.5 -Experimento 5: Determinación del contenido de aminas volátiles en músculo de merluza y chicharro envasados en barquetas para su correlación con el contenido en atmósfera .....	156
4.3.6 -Experimento 6: Determinación de TMA y aldehídos/cetonas en caldos de chicharro inoculados con distintas cepas bacterianas .....	158
4.3.6.1 -TMA .....	158
4.3.6.1.1 -Conversión térmica .....	158
4.3.6.1.2 -Evolución de la TMA en los caldos .....	160
4.3.6.2 -Evolución de los aldehídos en los caldos .....	161
4.3.6.3 -Análisis de componentes principales .....	164
4.3.7 -Experimento 7: Determinación de aminas volátiles en carne de pollo vacuno y cerdo .....	167
4.4 -Conclusiones .....	169
4.5 -Bibliografía .....	170
Publicación 2: Quality changes of Atlantic horse mackerel fillets ( <i>Trachurus trachurus</i> ) packed in a modified atmosphere at different storage temperatures .....	174

## **CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINAS VOLÁTILES Y ALDEHÍDOS DE LA ATMÓSFERA DE PESCADO ENVASADO**

185

5.1 -Introducción .....	186
5.2 -Material y métodos .....	187
5.2.1 -Cartuchos de extracción en fase sólida .....	187
5.2.1.1 -Aminas .....	187
5.2.1.2 -Aldehídos .....	189
5.2.1.3 -Envasado del pescado .....	190
5.2.2 -Bomba de muestreo personal .....	190
5.2.2.1 -Equipo y condiciones cromatográficas para la medida de las aminas volátiles .....	190
5.2.2.2 -Extracción de volátiles con soluciones patrón .....	191
5.2.2.3 -Extracción de volátiles en muestras reales .....	192
5.2.2.4 -Validación .....	193
5.2.2.5 -Envasado de pescado y análisis de vida útil .....	193
5.2.2.6 -Experimento de pescado congelado-descongelado (Experimento 3) .....	193

5.2.2.7 - <i>Reacción de derivatización</i> .....	194
<b>5.3 -Resultados</b> .....	194
5.3.1 -Experimento 1: Estudio del contenido en TMA y aldehídos/cetonas en dorada entera, dorada fileteada y chicharro envasado en MAP .....	194
5.3.1.1 - <i>Contenido en TMA</i> .....	194
5.3.1.2 - <i>Contenido en Aldehídos/Cetonas</i> .....	195
5.3.2 -Experimento 2: Estudio del contenido en TMA y DMA y su correlación con la concentración en el músculo en merluza y chicharro envasados en atmósfera no modificada .....	198
5.3.2.1 - <i>Optimización de la metodología</i> .....	198
5.3.2.2 - <i>Validación</i> .....	202
5.3.2.2.1 - <i>Linealidad y límites de detección</i> .....	202
5.3.2.2.2 - <i>Recuperación y repetibilidad</i> .....	204
5.3.2.2.3 - <i>Correlación entre músculo y atmósfera</i> .....	206
5.3.2.3 - <i>Vida útil</i> .....	208
5.3.3 -Experimento 3: Estudio de la evolución de TMA en chicharro envasado para discriminar entre pescado fresco y congelado-descongelado .....	211
5.3.3.1 - <i>Pescado congelado-descongelado</i> .....	211
5.3.4 -Experimento 4: Determinación de TMA y análisis de aldehídos/cetonas en las atmósferas de caldos de chicharro inoculados con distintas cepas bacterianas .....	213
5.3.4.1 - <i>TMA</i> .....	213
5.3.4.2 - <i>Aldehídos/cetonas</i> .....	213
<b>5.4 -Conclusiones</b> .....	214
<b>5.5 -Bibliografía</b> .....	216
Comunicación Oral 1: A novel non-destructive method for a determination of volatile amines from packaged fish .....	218

**CAPÍTULO 6: DESARROLLO DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIPS) PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS VOLÁTILES** **229**

---

<b>6.1 -Introducción</b> .....	229
<b>6.2 -Materiales y métodos</b> .....	230
6.2.1 -Ensayos de alteración de la señal de fluorescencia de distintos fluoróforos (Experimento 1) .....	230
6.2.2 - <i>Síntesis de los materiales poliméricos (Experimento 2)</i> .....	230
6.2.3 - <i>Tamizado y limpieza materiales (experimento 2)</i> .....	231

6.2.4 -Reacción de derivatización de los extractos y separación cromatográfica (Experimento 2).....	231
6.2.5 -Ensayo de afinidad (Experimento 3).....	232
<b>6.3 -Resultados</b> .....	232
6.3.1 -Experimento 1: Influencia de las aminas en la señal de fluorescencia .....	232
6.3.1.1 -Diclorofluoresceína .....	232
6.3.1.2 -Naftaleno.....	234
6.3.1.3 -Azul de metileno.....	235
6.3.1.4 -Tionina.....	236
6.3.1.5 -Proflavina.....	236
6.3.1.6 -Naranja de acridina .....	237
6.3.2 -Experimento 2: Síntesis, tamizado y lavado de los materiales poliméricos con los monómeros seleccionados, así como testado del metanol como medio de reacción para el método BATB.....	238
6.3.2.1 -Limpieza de los materiales sintetizados.....	241
6.3.2.2 -Reacción de derivatización en metanol y metanol: H <sub>2</sub> O.....	243
6.3.3 -Experimento 3: Estudio de la afinidad de los materiales sintetizados frente a la TMA.....	243
<b>6.4 -Conclusiones</b> .....	249
<b>6.5 -Bibliografía</b> .....	251

---

**CONCLUSIONES**
**255**



Figura 1: Evolución de la pesca extractiva y la acuicultura en el periodo 1950 -2012 (FAO, 2014).....	3
Figura 2: Foto de <i>Merluccius merluccius</i> . Autor: ICTIOTERM. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía ( <a href="http://www.ictioterm.es/">http://www.ictioterm.es/</a> ). (Accedido 12/2015).....	4
Figura 3: Foto de <i>Trachurus trachurus</i> . Autor: ICTIOTERM. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía ( <a href="http://www.ictioterm.es/">http://www.ictioterm.es/</a> ). (Accedido 12/2015).....	5
Figura 4: Foto de <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Autor: Lander Baliño.....	5
Figura 5: Formación de las aminas biógenas a partir de aminoácidos.....	14
Figura 6: Evolución de las publicaciones sobre MIPs desde 1980-2015. Tomado de <a href="http://mipdatabase.com/all_items.php">http://mipdatabase.com/all_items.php</a> (Accedido 04/2016).....	25
Figura 7: Estructura química del ácido octanosulfónico (a) y el ácido butanoico (b).....	59
Figura 8: Diferencias entre el octanosulfonato y el ácido butanoico utilizados para crear un par iónico. Los cromatogramas se corresponden a la extracción del m/z : 60, correspondiente a la TMA.....	61
Figura 9: Calibrado de 1 a 100 ppm de TMA Fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua con ácido butanoico 5 mM.....	61
Figura 10: Espectro de masas del pico correspondiente a la TMA. Fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua con ácido butanoico 5 mM.....	62
Figura 11: Estructura química del ácido pícrico.....	63
Figura 12: Esquema de reacción entre formaldehído y aminas primarias y secundarias.....	63
Figura 13: Esquema de la reacción entre al ácido pícrico y la trimetilamina.....	63
Figura 14: Calibrados de TMA-ácido pícrico en distintos disolventes.....	65
Figura 15: Estructura química del cloruro de benzoilo.....	66
Figura 16: Esquema de reacción entre cloruro de benzoilo y metanol.....	68
Figura 17: a) Señal UV a 254 nm superpuesta sobre el m/z: 137 extraído. b) Espectro de masas del pico cromatográfico. c) Espectro UV del pico cromatográfico.....	68
Figura 18: Esquema de la reacción entre el cloruro de benzoilo y la trimetilamina.....	69
Figura 19: Esquema de reacción entre el cloruro de benzoilo y la dimetilamina.....	70
Figura 20: Recta de calibrado de DMA con cloruro de benzoilo (0,5-10 ppm).....	70
Figura 21: Estructura química y tamaño de los distintos tipos de ciclodextrinas ( <a href="http://unam.bilkent.edu.tr/~uyar/Research.html">http://unam.bilkent.edu.tr/~uyar/Research.html</a> ) (Accedido 06/2015).....	72
Figura 22: Máximos de absorbancia de los distintos cromóforos utilizados en las condiciones del experimento.....	75
Figura 23: Azul de metileno (MB) 20µM con distintas concentraciones de TMA a temperatura ambiente.....	75
Figura 24: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia del azul de metileno a 620nm.....	76
Figura 25: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia de la tionina a 620nm.....	76
Figura 26: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia de la pironina a 550nm.....	77
Figura 27: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia de la proflavina a 550nm.....	77

Figura 28: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia del naranja de acridina a 492nm.....77

Figura 29: Estructura química del sulfato de dipipilo.....78

Figura 30: Estructura química del producto de reacción generado entre TMA y DPS (m/z: 102). .....80

Figura 31: Cromatograma correspondiente la extracción del m/z: 102 a los productos de reacción del DPS con la trimetilamina en isocrático. Rojo: muestra blanco; verde:1ppm; azul:10ppm y lila:50ppm.....80

Figura 32: Cromatograma correspondiente la extracción del m/z: 102 a los productos de reacción del DPS con la trimetilamina en gradiente. Rojo: muestra blanco; verde: 1ppm; azul: 10ppm y lila: 50ppm.....81

Figura 33: cromatogramas de inyección en FIA de los productos de reacción entre el sulfato de dipipilo y la trimetilamina. A: espectro MS1; B: m/z: 102 aislado; C: m/z: 102 fragmentado.....82

Figura 34: Estructura química del bromoacetato de etilo (a) y el bromoacetato de tert-butilo (b).....83

Figura 35: Esquema de reacción entre la trimetilamina y el BATB.....83

Figura 36: Calibrados utilizando bromoacetato de etilo como agente derivatizante y distintos modificadores de pH a temperatura ambiente. Para la cuantificación se monitorizó el m/z: 146. ....89

Figura 38: Área cromatográfica obtenida para la TMA (m/z: 174) a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (A) y área cromatográfica obtenida para la TMA en mezcla a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (B).....93

Figura 39: Área cromatográfica obtenida para la DMA (m/z: 274) en mezcla a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (A) y área cromatográfica obtenida para la PUT (m/z: 567) en mezcla a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (B). ....93

Figura 40: Superficies de respuesta de los productos de reacción de MA, DMA y TMA con bromoacetato de tert-butilo. El factor tiempo está representado en su valor óptimo (I) que corresponde a 60 minutos. ....94

Figura 41: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la metilamina y el bromoacetato de etilo.....98

Figura 42: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la etilamina y el bromoacetato de etilo.....99

Figura 43: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la butilamina y el bromoacetato de etilo.....99

Figura 44: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la trietilamina y el bromoacetato de etilo.....100

Figura 45: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la putrescina y el bromoacetato de etilo.....100

Figura 46: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la cadaverina y el bromoacetato de etilo.....101

Figura 47: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermina y el bromoacetato de etilo.....101

Figura 48: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermidina y el bromoacetato de etilo.....102

Figura 49: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la tiramina y el bromoacetato de etilo.....102

Figura 50: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la histamina y el bromoacetato de etilo.....103

Figura 51: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la etilamina y el bromoacetato de tert-butilo. ....103

Figura 52: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la butilamina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 104

Figura 53: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la trietilamina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 104

Figura 54: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la putrescina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 105

Figura 55: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la cadaverina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 105

Figura 56: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 106

Figura 57: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermidina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 106

Figura 58: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la tiramina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 107

Figura 59: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la histamina y el bromoacetato de tert-butilo. .... 107

Figura 60: Cromatogramas superpuestos de DMA y TMA en función de los distintos volúmenes de inyección testados. .... 108

Figura 61: Cromatograma que muestra los distintos compuestos a distintas concentraciones de dopaje. .... 109

Figura 62: Dopajes a distintas concentraciones y posteriores diluciones para demostrar el efecto matriz en los pescados de agua salada. Pescado utilizado: Merluza. A: DMA y B: TMA. .... 110

Figura 63: Linealidad en las tres especies de estudio, trucha (A), merluza y chicharro (B). .... 111

Figura 64: Correlación del método BATB y el método ácido picrico. .... 114

Figura 65: Evolución de los productos de reacción de la DMA parando la reacción y sin pararla. .... 116

Figura 66: Relación de experimentos con músculo de pescado en el capítulo 4. Las distintas coloraciones de los recuadros son para resaltar la correspondencia de los experimentos del presente capítulo con los del capítulo 5. La ausencia de color en el recuadro indica que el experimento no tiene correspondencia con el siguiente capítulo. .... 125

Figura 67: Evolución de la metilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C). .... 132

Figura 68: Evolución de la dimetilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C). .... 132

Figura 69: Evolución de la trimetilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C). .... 133

Figura 70: Evolución del óxido de trimetilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C). .... 134

Figura 71: Contenido en TMA en merluza M1 y M2 y chicharro C1. .... 136

Figura 72: Contenido en DMA en merluza M1 y M2 y chicharro C1. .... 136

Figura 73: Evolución de la TMA a lo largo de los 11 días de experimento a 2°C, 4°C, 6°C y 10°C en la dorada entera. .... 138

Figura 74: Evolución de la TMA a lo largo de los 11 días de experimento a 2°C, 4°C, 6°C y 10°C en la dorada fileteada. .... 139

Figura 75: Evolución de la TMA a lo largo de los 11 días de experimento a 2°C, 4°C, 6°C y 10°C en el chicharro. .... 139

Figura 76: Evolución de la trimetilamina en músculo de merluza a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 141

Figura 77: Evolución de la trimetilamina en músculo de chicharro a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 141

Figura 78: Evolución de la dimetilamina en músculo de merluza a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 143

Figura 79: Evolución de la dimetilamina en músculo de chicharro a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 144

Figura 80: Evolución del óxido de trimetilamina en músculo de merluza a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 145

Figura 81: Evolución del óxido de trimetilamina en músculo de chicharro a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 145

Figura 82: Evolución de la TMA en el espacio de cabeza de la merluza a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 146

Figura 83: Evolución de la TMA en el espacio de cabeza del chicharro a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 146

Figura 84: Evolución del octanol en muestras de merluza a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 147

Figura 85: Evolución del octanol en muestras de chicharro a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C..... 148

Figura 86: Evolución de la concentración de TMA en el músculo de merluza y chicharro a lo largo de 10 días de almacenamiento en barquetas con atmósfera no modificada..... 149

Figura 87: Reducción del TMAO a TMA en disoluciones patrón como consecuencia del procesado en autoclave, en presencia y ausencia de Fe<sup>2+</sup>. \*= Diferencias significativas entre la disolución autoclavada y la no autoclavada (p<0,05). ..... 151

Figura 88: Evolución de la concentración de TMA en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; b: <i>Serratia proteomaculans</i> ; c: <i>Shewanella baltica</i> y d: <i>Yersinia intermedia</i> . *= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).....	152
Figura 89: Evolución de la concentración de Formaldehído en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; b: <i>Serratia proteomaculans</i> ; c: <i>Shewanella baltica</i> y d: <i>Yersinia intermedia</i> . *= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).....	153
Figura 90: Evolución de la concentración de acetaldehído en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; b: <i>Serratia proteomaculans</i> ; c: <i>Shewanella baltica</i> y d: <i>Yersinia intermedia</i> . *= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).....	154
Figura 91: Evolución de la concentración de propanal en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; b: <i>Serratia proteomaculans</i> ; c: <i>Shewanella baltica</i> y d: <i>Yersinia intermedia</i> . *= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).....	155
Figura 92: Evolución de la concentración de hexanal en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; b: <i>Serratia proteomaculans</i> ; c: <i>Shewanella baltica</i> y d: <i>Yersinia intermedia</i> . *= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).....	156
Figura 93: Gráfica de pesos de los componentes.....	157
Figura 94: Diagrama de dispersión en función de las cepas bacterianas inoculadas. Ctrl: Control; Car: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; Serr: <i>Serratia proteomaculans</i> ; She: <i>Shewanella baltica</i> y Yer: <i>Yersinia intermedia</i> .....	157
Figura 95: Bigráfica resultado de superponer la gráfica de pesos de componentes y el diagrama de dispersión. Ctrl: Control; Car: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; Serr: <i>Serratia proteomaculans</i> ; She: <i>Shewanella baltica</i> y Yer: <i>Yersinia intermedia</i> .....	158
Figura 96: Cromatograma de una muestra de carne de ternera y un calibrado de DMA con sus espectros correspondientes.....	160
Figura 97: Relación de experimentos llevados a cabo con atmósferas de pescado en el capítulo 5. Las distintas coloraciones de los recuadros son para resaltar la correspondencia de los experimentos del presente capítulo con los del capítulo 4.....	169
Figura 98: Montaje experimental para la extracción de volátiles del interior de las barquetas de pescado.....	172
Figura 99: Esquema del montaje diseñado para la captura de aminas volátiles en una sustancia captadora mediante el uso de una bomba de muestreo personal y un sistema de burbujeo.....	176
Figura 100: Montaje experimental para la captura de aminas volátiles mediante una bomba de muestreo personal.....	176
Figura 101: Evolución del acetaldehído en la atmósfera de barquetas de dorada entera envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.....	179
Figura 102: Evolución del butanal en la atmósfera de barquetas de dorada entera envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.....	180
Figura 103: Evolución del acetaldehído en la atmósfera de barquetas de dorada fileteada envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.....	180
Figura 104: Evolución del butanal en la atmósfera de barquetas de dorada fileteada envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.....	181

Figura 105: Evolución del acetaldehído en la atmósfera de barquetas de chicharro envasado en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.....	181
Figura 106: Evolución del butanal en la atmósfera de barquetas de chicharro envasado en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.....	182
Figura 107: Áreas cromatográficas obtenidas en función de las condiciones de flujo y tiempo de trabajo de la bomba de extracción para la MA.....	183
Figura 108: Áreas cromatográficas obtenidas en función de las condiciones de flujo y tiempo de trabajo de la bomba de extracción para la DMA.....	184
Figura 109: Áreas cromatográficas obtenidas en función de las condiciones de flujo y tiempo de trabajo de la bomba de extracción para la TMA.....	184
Figura 110: Intervalo de linealidad para la MA.....	187
Figura 111: Intervalo de linealidad para la DMA.....	187
Figura 112: Intervalo de linealidad para la TMA.....	187
Figura 113: Comparación de la variabilidad intramuestra y la intermuestra en merluza.....	190
Figura 114: Comparación de la variabilidad intramuestra y la intermuestra en chicharro.....	190
Figura 115: Evolución comparativa del amoníaco, DMA, TMA y TVBN a lo largo de 20 días de almacenamiento de pescados demersales a 0°C. (Tomado de <i>Traditional methods in Fishery products: Quality, safety and authenticity</i> , Peter Howgate 2009.....)	191
Figura 116: Correlación entre concentraciones de TMA en músculo y la atmósfera.....	192
Figura 117: Evolución de la concentración de TMA en el espacio de cabeza de chicharro envasado sin atmósfera modificada a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) durante 10 días.....	193
Figura 118: Evolución de la concentración de TMA en el espacio de cabeza de merluza envasada sin atmósfera modificada a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) durante 10 días.....	194
Figura 119: Evolución de la temperatura del músculo de pescado (merluza) expuesto a distintas condiciones térmicas tras ser extraído de una cámara de refrigeración a 4°C.....	196
Figura 120: Evolución de la formación de TMA en pescado fresco y congelado-descongelado expuesto a 15°C durante 24 horas. *Diferencias significativas entre muestra fresco y congelado-descongelado ( $p < 0,05$ ).....	197
Figura 121: Evolución de la concentración de propanal en el espacio de cabeza de caldo de chicharro en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; b: <i>Serratia proteomaculans</i> ; c: <i>Shewanella baltica</i> y d: <i>Yersinia intermedia</i> . *= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).....	197
Figura 122: Correlación entre las concentraciones de propanal determinadas en los caldos de pescado y las determinadas en las atmósferas de los mismos.....	198
Figura 123: Calibrado de diclorofluoresceína de 0,001 $\mu\text{M}$ a 0,1 $\mu\text{M}$ . $\lambda$ excitación: 495 nm. $\lambda$ emisión: 527 nm.....	209
Figura 124: Influencia de la TMA sobre la señal de fluorescencia de la diclorofluoresceína (F). A: diclorofluoresceína 0,001 $\mu\text{M}$ . B: diclorofluoresceína 0,01 $\mu\text{M}$ . C: diclorofluoresceína 0,1 $\mu\text{M}$ . $\lambda$ excitación: 495 nm.....	209
Figura 125: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del naftaleno (1 $\mu\text{M}$ ) pH neutro. $\lambda$ excitación: 273 nm y $\lambda$ emisión: 333 nm. A: tiempo de contacto 10 min. B: tiempo de contacto 2 horas.....	210
Figura 126: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del naftaleno (1 $\mu\text{M}$ ) pH ácido. $\lambda$ excitación: 273 nm y $\lambda$ emisión: 333 nm. A: tiempo de contacto 10 min. B: tiempo de contacto 2 horas.....	210
Figura 127: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del azul de metileno (10 $\mu\text{M}$ ) en MeOH. $\lambda$ excitación: 655 nm y $\lambda$ emisión: 662 nm.....	211

Figura 128: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del azul de la tionina (1 $\mu\text{M}$ ) en MeOH. $\lambda$ excitación: 600 nm y $\lambda$ emisión: 615 nm.....	212
Figura 129: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia de la proflavina (0,05 $\mu\text{M}$ ) en MeOH. $\lambda$ excitación: 465 nm y $\lambda$ emisión: 500 nm.....	212
Figura 130: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del naranja de acridina (0,05 $\mu\text{M}$ ) en MeOH. $\lambda$ excitación: 500 nm y $\lambda$ emisión: 522 nm.....	213
Figura 131: Estructura química del naftaleno (A) y del 2-vinil naftaleno (B).....	214
Figura 132: Estructura química del naranja de acridina (A) y del N-vinil carbazol (B).....	214
Figura 133: Viales de síntesis con los materiales poliméricos sintetizados en su interior.....	215
Figura 134: Concentración de TMA encontrada en los distintos lavados realizados a los polímeros. Valores promedio de las dos réplicas de cada polímero fabricado con su desviación estándar correspondiente....	218
Figura 135: Comparativa del rendimiento de la reacción de la TMA con el BATB en distintos medios de reacción y a dos concentraciones.....	219
Figura 136: Isotherma de afinidad del polímero sintetizado con N-vinil carbazol en MeCN y su polímero blanco.....	220
Figura 137: Isotherma de afinidad del polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeCN y su polímero blanco.....	220
Figura 138: Isotherma de afinidad del polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeOH: H <sub>2</sub> O y su polímero blanco.....	221
Figura 139: Isotherma de afinidad del polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeOH y su polímero blanco.....	221
Figura 140: Rectas de regresión lineal utilizadas para la obtención de los parámetros a y n para los distintos polímeros sintetizados (MIP).....	222
Figura 141: Rectas de regresión lineal utilizadas para la obtención de los parámetros a y n para los distintos polímeros no improntados sintetizados (NIP).....	222
Figura 142: Distribución de las constantes de afinidad de los polímeros 1-3.....	224



Tabla 1: Composición nutricional resumida de merluza, chicharro y trucha. Fichas de principales alimentos consumidos en España (AESAN & RedBEDCA, n.d.; Fundación Española de Nutrición, 2013) .....	8
Tabla 2: Resumen de los distintos procesos de degradación que tienen lugar en el pescado tras su muerte.....	17
Tabla 3: Estructuras químicas de algunos de los componentes más utilizados en la síntesis de polímeros de impresión molecular.....	29
Tabla 4: Distintas ecuaciones de las isotermas de adsorción (Baggiani et al., 2004).....	33
Tabla 5: Gradiente de elución utilizado con el ácido octanosulfónico y ácido butanoico.....	60
Tabla 6: Valores del espectrómetro de masas utilizando ácido octanosulfónico y ácido butanoico.....	60
Tabla 7: Experimentos llevados a cabo en la optimización de la reacción entre el cloruro de benzoilo y TMA.....	67
Tabla 8: Gradiente de elución utilizado con cloruro de benzoilo.....	67
Tabla 9: Valores del espectrómetro de masas utilizando cloruro de benzoilo como agente derivatizante.....	68
Tabla 10: Estructura química de los cromóforos utilizados en los experimentos del capítulo 3 y su longitud de onda de máxima absorción en las condiciones estudiadas.....	73
Tabla 11: Gradiente de elución utilizado con el sulfato de dipropilo.....	79
Tabla 12: Valores del espectrómetro de masas utilizando el sulfato de dipropilo como agente derivatizante.....	79
Tabla 13: Valores del espectrómetro de masas utilizando bromoacetato de etilo como agente derivatizante.....	84
Tabla 14: Diseño experimental propuesto para los experimentos de optimización.....	85
Tabla 15: Parámetros espectrométricos óptimos para cada analito.....	86
Tabla 16: Estructuras químicas propuestas para los productos de reacción del método BATB.....	97
Tabla 17: Límites de detección y cuantificación de cada uno de los compuestos en pescado de agua dulce y marina. Los valores están corregidos por la dilución correspondiente en pescado de agua dulce (1:625) y en pescado marino (1:25000).....	112
Tabla 18: Valores de recuperación para pescados de agua dulce y marinos.....	113
Tabla 19: Estabilidad de los extractos a -80°C.....	116
Tabla 20: Composición y permeabilidad a los gases de la barqueta y el film utilizados para el envasado del pescado.....	130
Tabla 21: Gradiente de elución utilizado para la determinación de aldehídos y cetonas.....	131
Tabla 22: Reducción del número de bacterias en filetes de bacalao después de distintos tiempos de almacenamiento a -25°C. Tomado de (Magnusson & Martinsdottir, 1995).....	142
Tabla 23: Gradiente utilizado para la determinación de DMA mediante HPLC-DAD a 262 nm.....	173
Tabla 24: Parámetros del espectrómetro de masas óptimos para cada amina (MS/MS).....	175
Tabla 25: Áreas cromatográficas obtenidas con distintos flujos y tiempos de extracción. En todos los casos las áreas cromatográficas se encontraban por encima del LOQ. Las condiciones óptimas seleccionadas han sido las resaltadas.....	186
Tabla 26: Porcentajes de recuperación de la extracción de MA, DMA y TMA, sus desviaciones estándar y estándar relativas.....	189
Tabla 27: Composición de cada material sintetizado (pesos y volúmenes de los distintos componentes). Las filas resaltadas se corresponden a los polímeros con problemas en la síntesis.....	216

*Tabla 28: Porcentajes de recuperación obtenidos en los distintos lavados hechos en el disolvente de síntesis de cada material sintetizado. La cantidad de material que se utilizó fueron 350 mg de un tamaño de partícula de entre 20 y 45  $\mu\text{m}$ . Las filas resaltadas se corresponden a los polímeros con problemas en la síntesis. .... 217*

*Tabla 29: Factor de capacidad / afinidad (a) e índice de heterogeneidad (n) de los distintos polímeros sintetizados. .... 223*

*Tabla 30: Relación de constantes de afinidad y número de sitios activos de los polímeros 1-3. .... 225*

**CAPÍTULO**

**1**

INTRODUCCIÓN



## BLOQUE 1: El pescado: Importancia nutricional y socioeconómica. Deterioro y metodologías de análisis

En este bloque se presentarán los datos referentes al consumo, la composición nutricional y la problemática existente en relación a la calidad del pescado. Éste presenta principalmente dos grandes vías de deterioro, la autólisis y el deterioro microbiológico. Durante el deterioro comentado se generan distintos compuestos químicos que sirven como marcadores de calidad y para los cuales existen diversas metodologías entre las que se encuentra la que se ha desarrollado y validado en esta tesis.

### 1.1 -El pescado en la alimentación

#### 1.1.1 -CONSUMO DE PESCADO Y ACUICULTURA

La producción mundial de pescado ha ido en aumento desde mediados del siglo XX hasta el presente (Figura 1). Esto ha sido debido a una mayor demanda provocada por el crecimiento de la población, los salarios y la urbanización, todo ello facilitado por la mejora experimentada en los canales de distribución de alimentos (FAO, 2014).

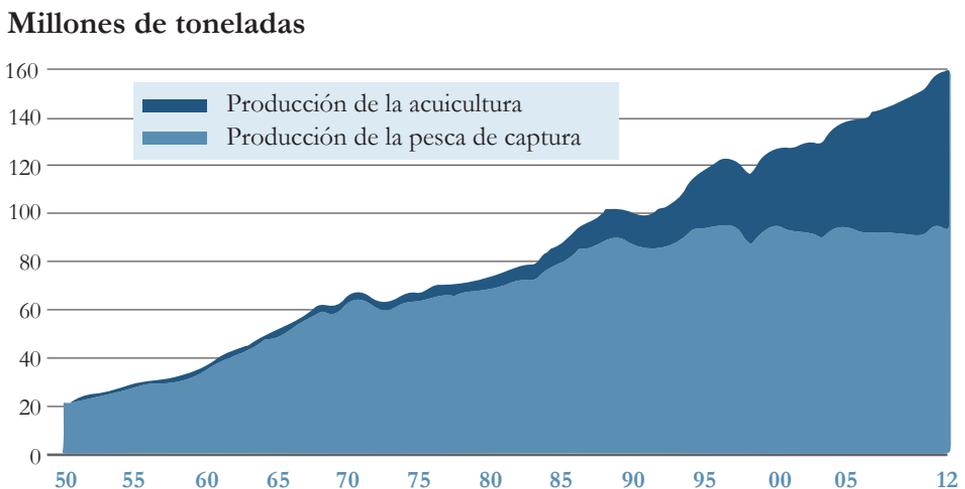


Figura 1: Evolución de la pesca extractiva y la acuicultura en el periodo 1950 -2012 (FAO, 2014)

Teniendo en cuenta que la pesca extractiva se mantiene prácticamente constante desde los años 90, ha sido la acuicultura la encargada de satisfacer el aumento del consumo de pescado, llegando a

proporcionar prácticamente la mitad del pescado destinado al consumo humano en la actualidad. Las exigencias de la clase media emergente y el descenso en las capturas de pescado salvaje, facilitarán que probablemente en el año 2030 esta cifra aumente hasta un 62% (FAO, 2014).

Hoy en día el aumento en el consumo de productos pesqueros, tanto de pesca extractiva como de acuicultura, es fundamentalmente debido a China y su creciente población, que ha experimentado en los últimos años un gran aumento (FAO, 2014).

Para el desarrollo de esta tesis se han seleccionado distintas especies de interés, tanto por resultar representativas a nivel nacional, como por cubrir la variabilidad de la oferta de pescado. Por este motivo se seleccionó un pescado de pesca extractiva magro (merluza), un pescado de pesca extractiva graso (chicharro) y un pescado de acuicultura continental (trucha). A continuación se exponen los datos de capturas y consumo de cada una de estas especies.

La merluza (*Merluccius merluccius*) (Figura 2). Es uno de los pescados blancos más arraigados en la gastronomía española y representa el 15% del total de consumo anual de productos pesqueros. A pesar de existir distintos caladeros, la producción interna (84000 Tm) no es suficiente para satisfacer la demanda, por lo que el mercado español se abastece de terceros países y del comercio intercomunitario (116700 Tm). Además, *Merluccius merluccius* es la especie más demandada, pero existen otras especies que también tienen mucha cuota de mercado como *Merluccius senegalensis* o *Merluccius hubbsi*.

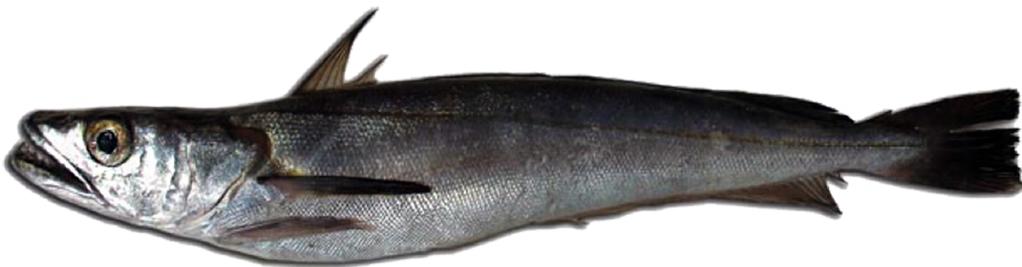


Figura 2: Foto de *Merluccius merluccius*. Autor: ICTIOTERM. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (<http://www.ictioterm.es/>). (Accedido 12/2015)

Por otra parte, el chicharro o jurel (*Trachurus trachurus*) (Figura 3) una especie graso, también es una de las especies de interés para la flota pesquera española con unas capturas anuales de 28160 Tm en el año 2012, siendo así el pescado azul más consumido después de la sardina y boquerón (Secretaría General de Pesca, 2014).



Figura 3: Foto de *Trachurus trachurus*. Autor: ICTIOTERM. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (<http://www.ictioterm.es/>). (Accedido 12/2015)

Al ser considerado un pescado menor por su bajo precio, le hace ser una de las especies más consumidas en fresco.

Y por último la trucha arcoíris, *Oncorhynchus mykiss* (Figura 4), un pescado de acuicultura continental cuya producción ha ido en aumento desde los años 50 del siglo pasado hasta la actualidad con una producción mundial de unas 856000 Tm en el año 2012. A nivel nacional, las comunidades autónomas con mayor producción acuícola de trucha son Castilla y León (34,5%) seguida de Galicia (26,1 %), siendo Navarra (0,7%), el País Vasco (0,6%) y las Islas Canarias (0,1%) las de menor producción (APROMAR et al., 2014).



Figura 4: Foto de *Oncorhynchus mykiss*. Autor: Lander Baliño.

### 1.1.2 -IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DEL PESCADO

Históricamente la actividad pesquera en España ha sido muy importante y hoy en día continúa siendo un sector estratégico en la economía española. Muestra de esto es que la UE es un potencia pesquera mundial, dentro de la cual España tiene un elevado peso específico, siendo el principal productor de pescado con algo más de 1 millón de toneladas en 2009 (16,2% del total comunitario) (Consejo Económico y Social de España, 2013).

Si nos referimos únicamente a la pesca extractiva, las estadísticas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de 2011 indican que las capturas marítimas fueron de 860.000 toneladas, de las cuales el 57,5% fueron destinadas a su consumo en fresco, aunque también es cierto que esta tendencia se está alterando por el ascenso de los productos transformados del pescado (Consejo Económico y Social de España, 2013).

En el caso de la acuicultura española, ésta ocupa la primera posición de la UE en cuanto a volumen obtenido (268.565 toneladas, 20% del total UE). De esta producción, el 89% se obtiene en el litoral atlántico, el 10% en aguas interiores y el 1% en el Mediterráneo. Estos valores suponen económicamente 448 millones de euros (Consejo Económico y Social de España, 2013).

Si hablamos ahora del consumo de pescado, tomando cifras de 2007, España ocupa el segundo lugar como mayor consumidor de pescado en términos per cápita (45 kg/persona/año) por detrás de Portugal, siendo las especies más consumidas la merluza, sardina y anchoa.

Para entender la importancia del sector pesquero, las industrias de productos de la pesca facturaron en el año 2010 un total de 3785 millones de euros a través de 552 empresas y dando trabajo a 18581 personas, encontrándonos a la cabeza europea del sector transformador pesquero (Consejo Económico y Social de España, 2013).

Si nos centramos ahora en los datos del País Vasco, este pueblo históricamente ha estado muy ligado a la mar. Los puertos más importantes, Bilbao y Pasaia, se dedican a transacciones comerciales quedando la pesca localizada en los 5 puertos pesqueros más importantes: Bermeo, Ondarroa, Getaria, Hondarribia y Pasaia. Con estos puertos, Euskadi ocupa el tercer lugar en capturas y número de pescadores a nivel nacional, después de Galicia y Andalucía (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2015).

En cuanto a empleo se refiere, la pesca extractiva es una actividad que tiene asociada trabajadores en tierra con un ratio de 3,5 trabajadores por cada empleado directo en la extracción. Por lo que si existen aproximadamente 2450 personas embarcadas en los buques vascos, existen unas 7000 que trabajan en tierra para el sector, que en el año 2013 contaba con un censo de 220 buques entre altura y bajura (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2015)

Si además tenemos en cuenta las cifras referentes a la industria transformadora de pescado, este subsector aporta el 8% del empleo y de la facturación a la industria pesquera estatal. (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2015).

A continuación nos centramos en el consumidor final del producto. El principal perfil de comprador tipo es una mujer, de más de 35 años, que trabaja fuera de casa y en jornada continua. En cuanto al formato de productos que compran, en los últimos años se ha apreciado un aumento en la venta de productos fileteados en detrimento del pescado entero, siendo las especies de pescado más consumidas el atún, la anchoa, la merluza, bacalao, chicharro y sardina (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2009).

En lo referente a la acuicultura, el País Vasco no presenta unas infraestructuras que le permitan competir con otras comunidades en las que ha existido mucha tradición en este tipo de industria. Los principales obstáculos que existen son la localización de este tipo de industrias debido a la difícil orografía, la consecución de permisos de distintas administraciones y la gran inversión a realizar (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2009).

A pesar de esto, en el plan estratégico de la acuicultura del País Vasco, se establecen determinadas especies pesqueras como estratégicas prioritarias como puedan ser la angula, el lenguado y el bacalao. De forma menos prioritaria se señalan la trucha, el mero y el rodaballo (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2009). En el nuevo Plan Estratégico de Pesca y Acuicultura del País Vasco 2020 se vuelve a hacer hincapié en la necesidad de fomentar y potenciar este sector empresarial, así como impulsar la investigación relacionada (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2015).

### 1.1.3 -COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL PESCADO

El principal componente del pescado es el agua, que conforma el 80% del peso en especies magras y algo menos en las especies semigrasas y grasas (Haard, 1992).

En cuanto a la composición lipídica, ésta varía enormemente en cantidad y en composición de ácidos grasos. El contenido en grasa depende principalmente del estado nutricional, la madurez, la edad y la época del año. Su distribución corporal no es homogénea, en especies magras se sitúa fundamentalmente en el hígado a modo de reserva mientras que en las especies grasas se sitúa en el músculo a modo de capa subcutánea o en los intestinos.

Los lípidos marinos se caracterizan por un alto contenido de ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) y con un alto grado de insaturación. En el pescado encontramos ácidos grasos con 5 y 6 dobles enlaces mientras que en los mamíferos raramente aparecen ácidos grasos que tengan más de 2. Recientemente las investigaciones en este campo se centran en la serie  $\omega 3$  por su efecto positivo en determinadas enfermedades, el DHA (ácido docosahexaenóico) y el EPA (ácido eicosapentaenóico). A pesar de los beneficios que aportan desde el punto de

vista nutricional son, por otra parte, los responsables de la alta susceptibilidad de los pescados grasos a la oxidación lipídica. Así mismo, otros ácidos grasos esenciales presentes en el pescado son también interesantes por no ser sintetizados por el cuerpo humano (linoleico, linolénico y araquidónico) (Huss, 1995; Uauy & Valenzuela, 2000).

En cuanto al contenido de vitaminas, éste es comparable con el de los mamíferos excepto en el caso de las vitaminas A y D, que se encuentran en grandes cantidades en la carne de las especies grasas y en abundancia en el hígado de especies como el bacalao. Debe señalarse que el contenido de sodio en la carne de pescado es relativamente bajo lo cual le hace apropiado para regímenes alimenticios de tal naturaleza (Huss, 1995).

En la Tabla 1 se muestra la composición nutricional de las especies seleccionadas en esta tesis: merluza, chicharro y trucha.

Tabla 1: Composición nutricional resumida de merluza, chicharro y trucha. Fichas de principales alimentos consumidos en España (AESAN & RedBEDCA, n.d.; Fundación Española de Nutrición, 2013)

	100 g de porción comestible		
	Merluza	Chicharro	Trucha
<b>Energía (Kcal)</b>	89	124	90
<b>Proteínas (g)</b>	15,9	15,7	15,7
<b>Lípidos totales (g)</b>	2,8	6,8	3
<b>Ácidos grasos <math>\omega</math>-3 (g)</b>	0,59	0,3	1,626
<b>Ácidos grasos <math>\omega</math>-6 (g)</b>	0,043	0,054	0,097
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	0	0	0
<b>Agua (g)</b>	81,3	77,5	81,3
<b>Calcio (mg)</b>	28	17	26
<b>Hierro (mg)</b>	0,8	1	1
<b>Yodo (<math>\mu</math>g)</b>	2	10	3
<b>Sodio (mg)</b>	74	64	58
<b>Potasio (mg)</b>	363	360	250
<b>Selenio (<math>\mu</math>g)</b>	36	47	25
<b>Vitamina A: Eq. Retinol (<math>\mu</math>g)</b>	Tr	36	14
<b>Vitamina B6 (mg)</b>	0,16	0,63	0,43
<b>Vitamina B12 (<math>\mu</math>g)</b>	1	10	5,2
<b>Vitamina C (mg)</b>	Tr	Tr	0
<b>Vitamina D (<math>\mu</math>g)</b>	Tr	16	Tr
<b>Vitamina E (mg)</b>	0,35	3,7	1,5
<b>Tiamina (mg)</b>	0,08	0,09	0,08
<b>Riboflavina (mg)</b>	0,08	0,3	0,1

0: Virtualmente ausente en el alimento; Tr: Trazas

En cuanto a la composición proteica del pescado, podemos encontrar 3 grandes grupos:

1. Proteínas estructurales (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 70-80 % del contenido total de proteínas (comparado con el 40 por ciento en mamíferos).
2. Proteínas sarcoplasmáticas (mioalbúmina, globulina y enzimas), que son solubles en soluciones salinas neutras de baja fuerza iónica (0,15 M). Esta fracción constituye el 25-30 % del total de proteínas.
3. Proteínas del tejido conectivo (colágeno), que constituyen aproximadamente el 3 % del total de las proteínas en teleósteos y cerca del 10 % en elasmobranquios (comparado con el 17 % en mamíferos) (Huss, 1995).

Por lo general, la calidad nutritiva de la proteína marina tiene un alto valor biológico y un alto coeficiente de digestibilidad (Oehlenschläger & Rehbein, 2009).

Además, en el músculo de pescado existen varios compuestos nitrogenados no protéicos como son la creatina (200-700 mg/100g), el óxido de trimetilamina (100-1000 mg/100g), adenosin nucleótidos (200-400 mg/100g) así como aminoácidos y dipéptidos libres (Oehlenschläger & Rehbein, 2009). Estos compuestos son minoritarios en la composición química del músculo de pescado pero entre ellos se encuentran las bases volátiles y el óxido de trimetilamina, que a nivel tecnológico, resultan compuestos interesantes. En teleósteos conforman un 9-18% del nitrógeno total mientras que en el caso de los elasmobranquios puede alcanzar un 38% (Huss, 1995).

Como se ha visto en este apartado, el pescado es un producto ampliamente consumido que resulta beneficioso para la salud y que, directa e indirectamente, genera numerosos puestos de empleo. Su consumo va en aumento, sobre todo el que proviene de la acuicultura, y los requerimientos de calidad de los consumidores van en aumento por lo que es importante conocer bien cuáles son los procesos de deterioro y sus consecuencias, para poderlos controlar o evitar.

## **1.2 -Deterioro del pescado y marcadores químicos de calidad**

El pescado, tras su muerte y posterior conservación, pasa por cuatro fases de deterioro, independientemente de la temperatura a la que se manipule (Ghaly et al., 2010; Tejada, 2009):

-*Pre-rigor*: en la que el pescado presenta unas características sensoriales externas máximas, destacando su textura firme y elástica. Comienzan los procesos autolíticos de alteración.

-*Rigor mortis*: el cuerpo del pescado pierde flexibilidad, volviéndose totalmente rígido y duro; es el mejor síntoma de frescura. Continúan los procesos autolíticos del deterioro.

-*Post-rigor*: cuando la carne del pescado se encuentra flácida, ligeramente firme pero con una pérdida clara de elasticidad. Comienza el deterioro bacteriano.

-*Alteración*: el deterioro bacteriano es evidente. El pescado presenta una carne más blanda y olor desagradable.

Las dos grandes vías de deterioro que presentan los productos pesqueros a lo largo de su distribución son la autólisis y el deterioro microbiológico. Cada uno de ellos presenta distintas reacciones químicas enzimáticas o de oxidación en la que se generan distintos compuestos químicos que sirven como marcadores químicos del deterioro (Gram, 1992).

### 1.2.1 -AUTOLISIS

Esta vía consiste en el deterioro ocasionado por las distintas enzimas proteolíticas existentes en el músculo y las vísceras de los individuos cuando estos han muerto (Ghaly et al., 2010) y que debido a rupturas de estructuras celulares son liberadas a espacios intercelulares donde llevan a cabo su actividad utilizando como sustrato compuestos estructurales del organismo. De esta manera comienza una especie de autodigestión.

#### 1.2.1.1 -Carbohidratos

A pesar de que los niveles de glucógeno existentes en el pescado son significativamente inferiores a los presentes en mamíferos, éste es el principal carbohidrato presente en el músculo del pescado. Una vez éste ha muerto y el corazón detiene el bombeo de sangre a través del cuerpo, y por ende el suministro de oxígeno, el único proceso para poder obtener energía es la glucólisis, que tiene como último producto de reacción el ácido láctico. Esto provoca una disminución del pH en el músculo a valores de 6,1-6,5 (Huss, 1995). Este periodo tiene una duración que varía entre especies y en el que debido al descenso del pH se liberan otros compuestos y enzimas por la ruptura de membranas celulares.

### 1.2.1.2 -Nucleótidos

La vía de la glucólisis agota rápidamente las existencias de glucógeno en el músculo y entonces para la obtención de energía se recurre al metabolismo de los nucleótidos. Esta vía, degrada gradualmente el trifosfato de adenosina (ATP) hasta dar lugar a la xantina.  $ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow Ino \rightarrow Hx \rightarrow Xa$  (Howgate, 2006).

La determinación de estos compuestos ha sido utilizada en numerosos estudios para la determinación de la calidad del pescado mediante lo que se conoce como el índice K (ver Ecuación 1) (Saito et al., 1959). Existen grandes diferencias en las velocidades a las que generan estos compuestos, y aunque hay un amplio consenso en que el tramo  $ATP \rightarrow IMP$  es común a la mayoría de los pescados, existen diferencias en función de la especie en la degradación del IMP (Howgate, 2006). En este índice K, un mayor valor, indica un peor estado de conservación del pescado.

$$K(\%) = \frac{[Ino][Hx]}{[ATP][ADP][AMP][IMP][Ino][Hx]} \times 100$$

Ecuación 1. Índice K

Cuando los niveles de ATP intracelular llegan a situarse por debajo de los 1-2  $\mu\text{mol/g}$  tejido, la actina y miosina se interconectan de manera irreversible dando lugar al complejo actomiosina (Tejada, 2009). La bomba de calcio deja de funcionar y los iones  $Ca^{2+}$  se acumulan en el interior de las células musculares, lo que trae consigo el *rigor mortis*. Este proceso comienza entre 1-6 horas después de la muerte del animal y depende de numerosos factores como la especie, la talla, el estrés, el método de pesca, como se ha producido la muerte, etc... (Tejada, 2009). Normalmente comienza en la cola del pescado y se extiende a los músculos del resto del cuerpo, aunque existen excepciones como en el caso del salmón, donde el rigor comienza en la zona del cuello (Berg et al., 1997).

### 1.2.1.3 -Proteólisis y compuestos nitrogenados no proteícos

Una vez la máxima rigidez del músculo es alcanzada, comienza el ablandamiento de éste. El descenso en el pH y la acumulación de iones  $Ca^{2+}$  en el sarcoplasma, activa las enzimas autolíticas. Principalmente existen dos tipos, las calpainas y las catepsinas, ambas responsables de degradar proteínas estructurales, dañando la estructura miofibrilar compuesta por titina, nebulina, proteínas de la línea M y Z, entre otras. Así mismo, proteínas del tejido conectivo son degradadas ayudadas por la acción de enzimas glucosidasas provenientes de lisosomas.

La acción de estas enzimas tiene un efecto de ablandamiento sobre el músculo del pescado, que hace que pierda firmeza a lo largo de su almacenamiento en refrigeración.

El nitrógeno protéico conforma el mayor porcentaje del nitrógeno total pero en la parte no proteica, que puede alcanzar el 18%, se encuentran determinados componentes importantes (Huss, 1995), como puede ser el óxido de trimetilamina (TMAO).

Este compuesto, se encuentra en numerosos organismos marinos, y en los peces teleósteos, su función está relacionada con la osmoregulación y la protección de las proteínas frente a iones salinos (Kelly & Yancey, 1999). En los pescados de agua dulce su presencia tiene menos importancia, pero también existe (Niizeki et al., 2002). Cuando el pescado se encuentra almacenado a temperaturas de congelación, el enzima TMAO demetilasa rompe el TMAO para dar lugar a una molécula de dimetilamina (DMA) y otra de formaldehído. Esta enzima no se encuentra en todos los peces teleósteos, sino que principalmente se encuentra en los pescados pertenecientes al orden gadiforme (Amano & Yamada, 1964; Nielsen & Jorgensen, 2004). Estos compuestos colaboran en el acortamiento de la vida útil de los productos pesqueros en congelación (Rey-Mansilla et al., 2001). El formaldehído es responsable de unirse a proteínas musculares con el consiguiente endurecimiento de los tejidos (Leelapongwattana et al., 2005). Se ha demostrado que este proceso puede ser activado por la presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) o inhibido por la presencia de oxígeno o cianuro potásico (Reece, 1983).

Además del mecanismo enzimático ya comentado, existen evidencias de que la conversión de TMAO a trimetilamina (TMA) se produce también de manera no-enzimática ayudada por la presencia del sistema  $Fe^{2+}$  - cisteína en sistemas modelo congelados (Kimura et al., 2002). Este mecanismo, en muestras reales, puede ser acelerado mediante la presencia de taurina o hierro no hemo (Mizuguchi et al., 2011). La conversión de TMAO a TMA será tratada en el apartado del deterioro microbiológico, ya que son los microorganismos los máximos responsables de este proceso.

Un parámetro ampliamente utilizado para la determinación del estado cualitativo del pescado es el TVBN (Total Volatile Base Nitrogen) que consiste en la suma del amoníaco y las aminas volátiles primarias (metilamina), secundarias (dimetilamina) y terciarias (trimetilamina). En el apartado de metodologías se comentará más en profundidad la utilidad de este parámetro y las distintas metodologías para su determinación.

Existen otras aminas presentes durante el deterioro del pescado, como son las aminas biógenas, pero se hablará de ellas en el apartado de deterioro microbiológico.

### 1.2.1.4 -Lipolisis

El pescado es un producto rico en ácidos grasos insaturados, lo que lo convierte en un alimento muy susceptible a la oxidación y sobre todo a la oxidación de los fosfolípidos de membrana, algo que puede estar catalizado por proteínas hemo, el hierro, así como por la enzima lipooxigenasa (Maqsood & Benjakul, 2011; Sohn et al., 2005; Thiansilakul et al., 2007; Tokur & Korkmaz, 2007). Esta oxidación es un proceso autocatalítico que da lugar a radicales libres. Una vez el primer ácido graso portador de un radical libre se ha formado por la pérdida de un hidrógeno, reacciona con el oxígeno para dar lugar a un radical peróxido (Ladikos & Lougovois, 1990). Éste a su vez, interacciona con otras moléculas de ácidos grasos insaturados convirtiéndose en hidroperóxidos. Estos compuestos resultan inestables y fácilmente se transforman en productos de oxidación secundarios (aldehídos, cetonas, alcoholes, etc.). Entre las principales consecuencias de estos productos se encuentran la aparición de malos olores, sabores rancios y decoloraciones (Frankel, 2005).

## 1.2.2 -DETERIORO MICROBIOLÓGICO

La carga microbiana presente en el pescado en el momento de su captura se centra principalmente en la piel, las agallas y en el interior del tracto digestivo, en cambio el músculo se considera prácticamente estéril en el momento de la captura (Huss, 1995). En el momento de la muerte, las defensas del animal desaparecen y las bacterias comienzan a colonizar el resto del cuerpo del animal aprovechando las roturas y desgarros que se producen en la manipulación del pescado, de aquí la importancia que tiene una buena manipulación para aumentar la vida útil del producto (Ashie et al., 1996).

A pesar de la existencia de gran variedad de flora microbiana, solo unos pocos microorganismos son los responsables de generar sustancias que confieren malos olores y sabores al pescado, estos son los microorganismos específicos de deterioro (SSO, Specific Spoilage Organisms) (Gram & Dalgaard, 2002). Estos microorganismos catalizan reacciones en las que se producen compuestos químicos de naturaleza diversa como puedan ser aminas, aldehídos/cetonas o compuestos azufrados entre otros.

### 1.2.2.1 -Aminas biógenas y volátiles

Debido a la proteólisis, se generan numerosos péptidos y aminoácidos libres, que unido a las condiciones favorables para el crecimiento bacteriano generan las aminas biógenas mediante la descarboxilación de estos aminoácidos (Ver Figura 5).

Estos compuestos pueden ser divididos en aminas alifáticas, aminas aromáticas y poliaminas. Su origen es mayoritariamente bacteriano, aunque en algunos casos algunas tienen origen fisiológico como la espermidina y espermina, o pueden tener origen endógeno como la cadaverina o putrescina (Bardócz, 1995; Halász et al., 1994).

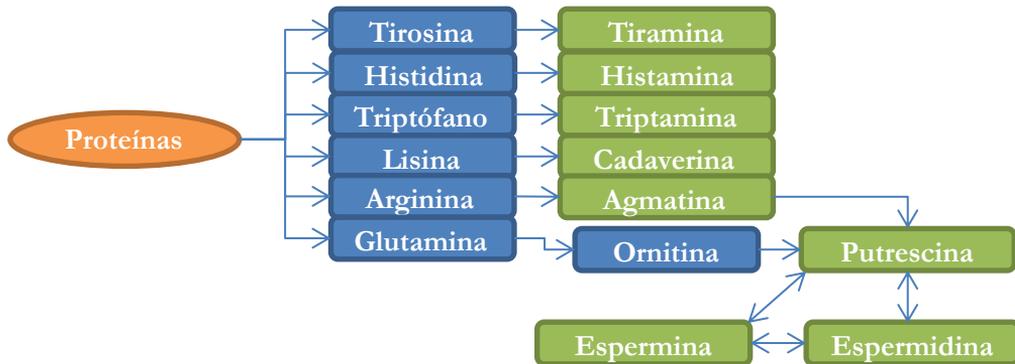


Figura 5: Formación de las aminas biógenas a partir de aminoácidos.

El interés de estos compuestos radica en su toxicidad cuando se ingieren no solo pescado en mal estado, sino una gran variedad de alimentos como quesos, vinos y gran variedad de alimentos fermentados, sobre todo en individuos que tienen su actividad monoaminooxidasa inhibida por algún medicamento (Lippman & Nash, 1990).

Debido a que histamina y tiramina presentan efectos nocivos por sí solas, se pensó que eran las únicas tóxicas, pero se descubrió que otras aminas biógenas potencian la toxicidad de éstas (Taylor & Eitenmiller, 1986). En un principio, estos compuestos se encontraron principalmente en pescados de la familia *Scombridae*, por lo que se denominó escombroidosis, más tarde se descubrió en otras especies de pescado y en carnes por lo que el nombre cambió a intoxicación histamínica (Taylor & Eitenmiller, 1986). Otras como putrescina o cadaverina pueden reaccionar con nitritos para formar nitrosaminas potencialmente carcinógenas (Hotchkiss et al., 1977).

Los microorganismos típicos presentes en el pescado presentan poca actividad descarboxilasa, por lo que el hecho de encontrar aminas biógenas en un pescado es indicativo de malas condiciones higiénicas en algún punto de la cadena logística. Son las bacterias psicrófilas gram-

como enterobacterias, *Pseudomonas* o bacterias gram+ como las bacterias del ácido láctico (LAB) las responsables de su aparición (Huss, 1995).

En lo referente a las aminas volátiles, la de mayor importancia por cantidad producida y por su utilidad a la hora de determinar el estado de calidad de un pescado, es la trimetilamina (TMA).

Esta amina aparece a concentraciones bajas en el pescado recién capturado y comienza a aumentar acorde al crecimiento bacteriano, originando el típico olor a pescado estropeado. Estas bacterias utilizan el óxido de trimetilamina como último aceptor de electrones generando la trimetilamina. Para esto utilizan la enzima óxido de trimetilamina reductasa.

Los principales microorganismos responsables de generar este compuestos son los pertenecientes al género *Shewanella*, así como *Photobacterium phosphoreum*. Aunque otros microorganismos como los pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Vibrio* o enterobacterias también se encuentran presentes en el pescado y son capaces de reducir el TMAO (Gram & Dalgaard, 2002).

En el caso de la DMA, existen evidencias de que se forman pequeñas cantidades en refrigeración, pero este no es el mecanismo por el que mayores concentraciones se encuentran. Como se explicó en el apartado anterior, aparecen altas concentraciones a lo largo del almacenamiento del pescado en temperaturas de congelación.

Por otra parte la metilamina (MA), ha sido estudiada en diversas matrices y aunque su presencia en pescado está poco documentada, ha sido utilizado como marcador en crustáceos (Chan et al., 2006) y también entre otros alimentos como los jamones curados (Jones et al., 1998).

### 1.2.2.2 -Aldehídos y cetonas

En cuanto a los aldehídos y cetonas, su principal origen es el de la lipólisis autolítica. No obstante existen determinados microorganismos que presentan enzimas lipasas que pueden degradar las grasas dando lugar a este tipo de compuestos.

### 1.2.2.3 -Compuestos azufrados

En lo referente a los compuestos azufrados *Pseudomonas*, *Shewanella* y enterobacterias son responsables de la producción de H<sub>2</sub>S u otros productos azufrados que confieren malos olores al pescado.

Los aminoácidos metionina y cisteína y en menor proporción tiamina y glutatión son los principales sustratos a partir de los cuales el metabolismo bacteriano genera los distintos compuestos azufrados que pueden ser encontrados en los productos pesqueros (Varlet & Fernández, 2010).

En algunos trabajos que versan sobre las reacciones enzimáticas mediadas por microorganismos en pescado (Herbert & Shewan, 1975; Herbert et al., 1975), se desarrollan experimentos relacionados con bacterias del género *Pseudomonas* (Herbert & Shewan, 1976). A pesar de esto, algunas otras rutas metabólicas encontradas en otros alimentos como queso o en vegetales pertenecientes al orden crucífera o especies del género *Allium* pueden ser aplicadas a los productos pesqueros (Arfi, 2003; Brodnitz et al., 1969; Gainey & Greenberg, 2005; Joyner et al., 2003). A modo de curiosidad, el aminoácido taurina, el principal aminoácido azufrado en pescado, presenta resistencia a las enzimas tanto endógenas como microbianas (Varlet & Fernández, 2010).

### 1.2.3 -LEGISLACIÓN

En el caso de compuestos individuales, TMA,  $\text{NH}_3$ , DMA o MA, no existe legislación que regule su contenido, pero si la hay para el parámetro TVBN que supone un sumatorio de todos ellos. Esta normativa aparece en el reglamento europeo EC No 2074/2005 que propone distintos límites para este parámetro en función de la especie. Así, para las *Sebastes spp.*, *Helicolenus dactylopterus* y *Sebastichthys capensi* establece un límite de 25 mg N/100 g de pescado. Para las especies pertenecientes a la familia *Pleuronectidae*, a excepción del halibut (*Hippoglossus spp.*), establece un límite de 30 mg N/100 g pescado. Y finalmente para los pertenecientes a las familias *Merluroidae* y *Gadidae* establece un límite de 35 mg N/100 g de pescado.

Por otro lado, existe otra regulación referente al contenido en histamina, los reglamentos europeos EC No. 1441/2007 y EC No. 1019/2013 que modifican los límites establecidos en el reglamento EC No. 2073/2005. Estos límites se establecen en distintas categorías, por un lado se refiere al pescado con alto contenido en histidina, es decir, a las familias: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombrosidae*, para las cuales establece unos límites de entre 100-200 mg/kg de pescado. Estos límites se duplican en estas mismas familias de pescado cuando han sufrido un tratamiento de fermentación o salmuera, y finalmente para las salsas de pescado fermentado establece un límite de 400 mg/kg de pescado.

Para finalizar este apartado, a continuación se presenta la Tabla 2, en la cual quedan resumidos todos los procesos de degradación que se han comentado previamente.

Tabla 2: Resumen de los distintos procesos de degradación que tienen lugar en el pescado tras su muerte.

Origen	Marcador	Efectos organolépticos	Riesgos asociados
<b>Autolítico</b>	Índice K		
	Degradación proteica	Pérdida de firmeza	
	Aldehídos	Malos olores, rancidez y decoloración	Compuestos altamente reactivos (radicales peróxidos, hidroperóxidos...)
<b>Microbiológico</b>	Aminas biógenas		Intoxicación con histamina o tiramina. Aparición de nitrosaminas
	TMA	Malos olores	
	TVBN	Malos olores	
	Aldehídos	Malos olores, rancidez y decoloración	Compuestos altamente reactivos (radicales peróxidos, hidroperóxidos...)
	Compuestos azufrados	Malos olores	

### 1.3 -Métodos de conservación

Como se ha visto el pescado es un producto perecedero que se degrada rápidamente, por lo que son necesarios procesos de modificación o conservación para retrasar su evolución. Históricamente los métodos de conservación de pescado se han basado en el control de la actividad del agua, secando o añadiendo cloruro sódico, algo que inhibe el crecimiento bacteriano. A este respecto existen dos variantes, la salazón y la salmuera en distintos porcentajes de cloruro sódico, que han demostrado reducir la actividad de las catepsinas, un tipo de enzimas autolíticas (Reddi et al., 1972).

Otras técnicas, más utilizadas en el pasado, incluyen la fermentación, marinado, o adición de ácidos cítrico o acético, que consiguen bajar el pH del producto por debajo de 4,5, límite a partir del cual la mayoría de las bacterias no proliferan (Ababouch, 2005).

A partir de mediados del siglo XIX se comenzaron a utilizar metodologías relacionadas con el descenso de la temperatura, que reducen la actividad microbiana pero no matan a los microorganismos. Los refrigeradores caseros permiten alargar la vida útil del pescado y el congelador alarga más aun estos tiempos, ya que las temperaturas de congelación utilizadas inhiben por completo el metabolismo bacteriano, aunque no conlleva una mejora en la calidad del producto (Johnston et al., 1994).

Las metodologías que permiten almacenar por periodos de tiempo más largos el pescado, implican un tratamiento térmico como el cocinado, pasteurizado o esterilizado, este último combinado habitualmente con el enlatado para permitir almacenamientos a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo (Ababouch, 2005).

Otras técnicas más modernas incluyen el envasado al vacío o la utilización de atmósferas modificadas, habitualmente compuestas de  $N_2$ ,  $CO_2$  y  $O_2$  capaces de inhibir el crecimiento de determinados microorganismos en función de su composición y los procesos de oxidación (Sivertsvik et al., 2002).

Así mismo otras tecnologías como las altas presiones hidrostáticas (Aubourg et al., 2013; Chevalier, 2001; Gou et al., 2010; Karim et al., 2011) han sido aplicadas con éxito para alargar la vida útil del producto reduciendo su carga bacteriana. Del mismo modo, los resultados positivos en la descontaminación de bacterias aisladas de productos pesqueros mediante la tecnología de luz pulsada (Lasagabaster & Martínez de Maraño, 2012) podría permitir en un futuro próximo la aplicación de esta tecnología directamente sobre el pescado para disminuir su carga microbiana.

## 1.4 -Metodologías de análisis

A continuación se comentarán las principales metodologías de análisis para la determinación de aminas en matrices alimentarias o biológicas, en particular en los productos pesqueros. Nos centraremos únicamente en estos compuestos porque, a pesar de que también se han determinado aldehídos en determinados experimentos, estas determinaciones se llevaron a cabo con metodologías muy extendidas (como es el uso de la derivatización con dinitrofenilhidracina y el posterior análisis de las dinitrofenilhidrazonas) y no se han desarrollado nuevas metodologías para ello.

A pesar de que los métodos sensoriales son considerados los más apropiados para determinar el estado de frescura del pescado (Olafsdottir et al., 1997), existen numerosas técnicas analíticas que nos ayudan a conocer el estado de calidad del pescado.

### 1.4.1 -MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

El fin de estas metodologías es determinar la calidad higiénico sanitaria de los productos pesqueros. Estas metodologías son de dos tipos, las inespecíficas que determinan el crecimiento total bacteriano y las que permiten discriminar el crecimiento de un grupo en concreto (enterobacterias, productoras de  $H_2S$ , *Pseudomonas spp...*) (Huss, 1995). En concreto la legislación

española propuso unos límites por encima de los cuales el pescado pasaba a considerarse no apto para el consumo humano, estos valores son  $10^6$  ufc/g para bacterias mesófilas y  $10^3$  ufc/g para enterobacterias (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1991). En la actualidad esta orden del Ministerio de Sanidad y Consumo quedó derogada en su totalidad por el R.D. 135/2010 y hoy en día sirve únicamente a modo de referencia.

Las metodologías no específicas sirven para llevar a cabo recuentos en placa de bacterias totales, pero para tener una idea de cuáles son las bacterias responsables del deterioro del pescado, es necesario aislar las distintas colonias, purificarlas e identificarlas mediante pruebas morfológicas, bioquímicas o test inmunoquímicos (Broekaert et al., 2011).

Estos métodos clásicos tienen el inconveniente de necesitar entre 1 y 3 días para obtener los resultados y en ocasiones no dan lugar a una identificación correcta (Svanevik & Lunestad, 2011). Por ese motivo los métodos genéticos se han convertido en una alternativa muy interesante, aunque más cara, con la que hacer frente a la identificación de estos microorganismos. Estos métodos mayoritariamente se basan en la amplificación de parte del material genético de las bacterias mediante la técnica PCR de alguna secuencia concreta o el uso de PCR a tiempo real (Lee & Levin, 2007; Romero & Navarrete, 2006).

## 1.4.2 -MÉTODOS SENSORIALES

Los métodos sensoriales son considerados los más apropiados para determinar la frescura o deterioro del pescado (Olafsdottir et al., 1997) y los atributos más importantes a la hora de llevar a cabo un análisis sensorial son fundamentalmente la apariencia externa, olor y color (Olafsdottir et al., 2004). Para ello existen numerosos métodos y escalas, pero a modo general existen varias que están ampliamente difundidas y aceptadas como la escala Torry, el índice QIM o la escala de la Unión Europea.

- La escala Torry:  
Fue desarrollada en 1953 (Shewan et al., 1953) y fue la primera escala que se utilizó para determinar el estado de calidad del bacalao. Posteriormente han sido numerosos los esquemas de evaluación sensorial que se han desarrollado utilizando esta escala como base. Se basa en una escala descriptiva desarrollada para pescados magros, medianamente grasos y grasos en la que 3 equivale al pescado deteriorado y 10 equivale a olor y sabor a pescado fresco. Los valores por debajo de 3 se consideran innecesarios ya que no son aptos para el consumo y el punto 5.5 ha sido considerado como el límite para el consumo humano (Martinsdottir et al., 2001).

- La escala de la Unión Europea:  
Esta escala está basada en el reglamento de la UE (EC) No. 2406/96 de 26 de noviembre de 1996 y está diseñada para ser usada en el primer punto de venta por parte de expertos o en su lugar por la autoridad competente. Se basa en la frescura y otros parámetros como aparición de parásitos, manchas en la piel del pescado, golpes, etc ...Existen diferentes esquemas para pescados, cefalópodos o crustáceos pero presenta la desventaja de no existir disponible un plan de entrenamiento o esquema para realizar los muestreos. Es una metodología no apropiada para calcular la vida útil ni para llevar a cabo análisis estadísticos (Martinsdottir et al., 2009).
- El índice QIM:  
Originalmente fue desarrollado por Bremner en 1985 (Bremner H.A., 1985) y está basado en los cambios característicos que experimenta el pescado durante su almacenamiento en hielo. Dado un pescado a analizar sensorialmente, los distintos parámetros (color u olor de la piel, forma y color de los ojos y pupilas, olor color y mucus en las agallas, etc...) se puntúan de cero a tres, siendo cero el valor que se da al pescado más fresco y tres al peor conservado. Después se suman los resultados de todos los parámetros y se obtiene el índice de calidad. Normalmente los parámetros a analizar con este índice rondan los 10 y existen variantes para cada pescado debido a las grandes diferencias que existen entre ellos.  
Según el índice QIM un pescado recién capturado debería obtener un índice de calidad de 0, esto es, pasando por la intersección (0,0) y debería llegar al máximo en el día de su rechazo sensorial.  
Debido a la gran variabilidad existente entre los distintos pescados incluso dentro de un mismo lote, es muy importante realizar un correcto muestreo para asignar un valor de índice de calidad real (Martinsdottir et al., 2001, 2009).

### 1.4.3 -COLORIMETRÍA

Dentro de este apartado y relacionado con el estudio de la calidad del pescado, podría decirse que la utilización del ácido pícrico está muy extendida (Dyer, 1945) y también ha sido utilizado por otros autores con distintas modificaciones. Consiste en la adición de formaldehído para reaccionar con las aminas primarias y secundarias de manera que solo las terciarias puedan interaccionar con el ácido pícrico, añadido posteriormente en medio básico y aplicando calor para favorecer la reacción. Esta metodología dio lugar posteriormente a un método oficial, AOAC 971.14 (AOAC, 2000) y posteriores modificaciones han tratado de adaptarlo y automatizarlo mediante el uso cromatografía líquida (Leon et al., 1994) o su miniaturización para acabar realizando la lectura espectrofotométrica en una gota de xileno (Pena-Pereira et al., 2010).

Otros reactivos utilizados han sido la fluoresceína (Cobo et al., 1997) o el azul de bromotimol utilizado para cuantificar TMA directamente o reduciendo previamente el TMAO a TMA en muestras de pescado y agua marina (Sadok et al., 1996a, 1996b).

Otra metodología, en este caso capaz de discriminar entre 14 aminas, consiste en la utilización de ciclodextrinas y cucurbiturilos en combinación con distintos tintes sobre placas de 96 pocillos alcanzándose unos límites de detección de  $10^{-5}$ M (Montes-Navajas et al., 2009). Este mecanismo se basa en la unión entre los tintes y las distintas cápsulas. Las aminas, al entrar en contacto con los complejos formados, actúan desplazando estas uniones y generando un cambio de color. De esta manera se generan mapas de color distintos para cada amina. El único inconveniente es que no se puede cuantificar una mezcla de aminas.

#### 1.4.4 -CROMATOGRAFÍA

En este apartado podemos distinguir entre dos tipos de metodologías, por un lado, las desarrolladas para trabajar en cromatografía gaseosa, con utilización de distintas columnas y detectores como puedan ser FID o un detector de masas y por otro lado, las metodologías de cromatografía líquida.

En los trabajos realizados con cromatografía gaseosa, se analizan los perfiles de compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza del pescado mediante técnicas como la micro extracción en fase sólida (SPME) (Bianchi et al., 2007a, 2007b; Duflos et al., 2010, 2006, 2005; Iglesias & Medina, 2008; Iglesias et al., 2010, 2009; Triqui & Bouchriti, 2003; Triqui, 2006; R L Wierda et al., 2006; Rana Lori Wierda et al., 2006; Zhang et al., 2009), espacio de cabeza estático o dinámico (Aro et al., 2003; Chung et al., 2007) e incluso narices electrónicas (Ampuero et al., 2002; Huang et al., 2014; Olafsdottir, 2005; Olafsdottir et al., 2005; Peris & Escuder-Gilabert, 2009). Mediante estas técnicas se determinan concentraciones de diversos compuestos, no solo aminas, sino también aldehídos/cetonas, compuestos azufrados, ácidos, alcoholes, ésteres etc...

En el caso de las metodologías desarrolladas para cromatografía líquida, el detector puede ser ultravioleta-visible (UV-vis), Fluorescencia o, de nuevo, detección por espectrometría de masas.

En el caso de las aminas volátiles, su bajo peso molecular y el hecho de no poseer grupos cromóforos, hace casi siempre necesario un paso previo de derivatización en función del detector utilizado.

Por ejemplo utilizando un detector de UV, el cloruro de benzoílo ha sido ampliamente utilizado en el análisis de distintas matrices biológicas (pescado y alimentos fermentados). En la mayoría de los casos se utiliza para analizar aminas biógenas (putrescina, cadaverina, histamina...) (Ozdestan & Uren, 2009; Paleologos et al., 2003; Yegin & Uren, 2008; Yen & Hsieh, 1991) pero en algunos casos ha sido utilizada para la determinación de trimetilamina en pescado junto a otras aminas (Anderson, 2008; Ozogul et al., 2002). Agentes similares a éste han sido utilizados en otros estudios, como el cloruro de dinitrobenzoilo (Kirschbaum et al., 2000).

Otros agentes derivatizantes típicamente utilizados en la determinación de aminas biógenas son el cloruro de dansilo (Dadakova et al., 2009; Mao et al., 2009; Zhai et al., 2012) y el cloruro de dabsilo (De Mey et al., 2012; Krause et al., 1995), que también pueden ser utilizados para la derivatización de grupos amino de determinados aminoácidos. Así mismo el cloruro de dansilo ha sido utilizado para la determinación de aminas primarias y secundarias en agua (Meseguer Lloret et al., 2002) utilizando cartuchos de extracción en fase sólida.

El FMOC (cloroformiato de fluorenilmetilo) también ha sido utilizado a modo de cromóforo para la determinación de las aminas volátiles metilamina, dimetilamina y trimetilamina en distintas matrices (Cháfer-Pericás et al., 2006, 2005, 2004a, 2004b; Herráez-Hernández et al., 2006; Rodríguez Lopez et al., 1996; Teerlink et al., 1997), así como de grupos amino de distintos aminoácidos (Melucci et al., 1999; Zhou et al., 2011)

La cromatografía iónica ha sido también utilizada en la determinación de aminas volátiles y óxido de trimetilamina en extractos ácidos de pescado, aditivos alimentarios, muestras de aire e incluso cosméticos (Erupe et al., 2010; Li et al., 2009; Zhang & Zhu, 2007; Zhong et al., 2012).

En referencia ahora a la espectrometría de masas, existe bibliografía referente a distintos compuestos reactivos con aminas volátiles. El bromoacetato de etilo y el bromoacetato de tert-butilo fueron utilizados (Johnson, 2008; Kyu Lee et al., 2010) para analizar muestras de orina en pacientes con trimetilaminuria, una enfermedad por la que la conversión de la TMA al TMAO por parte del enzima flavina monooxigenasa 3 (FMO<sub>3</sub>) queda bloqueada, generándose así un mal olor corporal, motivo por el que esta enfermedad también se denomina síndrome del olor a pescado. En los datos publicados por Johnson tan solo se utiliza el bromoacetato de etilo ya que no se necesita la sensibilidad extra que aporta el uso del bromoacetato de tert-butilo en la síntesis de la amina cuaternaria que se genera en la reacción y que se utiliza para la determinación. Para la determinación de esta enfermedad mediante la cuantificación de la trimetilamina en orina, también se ha utilizado el yoduro de trideuterometilo (Mamer et al., 2010).

La propia TMA ha sido utilizada a modo de agente derivatizante para la determinación de residuos de sulfatos o sulfonatos de esteres alquílicos en productos farmacéuticos, generando aminas cuaternarias que posteriormente fueron cuantificadas (An et al., 2008).

## 14.5 -SENSORES Y OTRAS METODOLOGÍAS

Alternativos a los métodos clásicos como la cromatografía y métodos colorimétricos existen nuevas técnicas como biosensores enzimáticos que utilizan enzimas como la FMO<sub>3</sub> humana, que convierte la trimetilamina en óxido de trimetilamina (Fillit et al., 2008; Mitsubayashi et al., 2004; Saito et al., 2007) o la enzima diaminooxidasa, que cataliza la reacción de aminas y diaminas para convertirlos en NH<sub>3</sub> y su correspondiente aldehído generando un déficit de O<sub>2</sub>, que es cuantificado (Hernandez-Cazares et al., 2011).

Del mismo modo, existen numerosos composites químicos distintos que han sido aplicados sobre distintos sistemas transductores como pueden ser la microbalanza de cuarzo (QCM) o distintos electrodos funcionalizados.

Otros autores han elegido la electroforesis capilar para realizar determinaciones simultáneas de amoniaco, dimetilamina, trimetilamina y óxido de trimetilamina en extractos de pescado (Timm & Jørgensen, 2002) o determinaciones de histamina en distintos pescados (Gardana et al., 1999).

De gran utilidad resulta también el uso de la tecnología NIR (Near infrared = Infrarrojo cercano), con la cual algunos autores han conseguido discriminar entre pescado fresco y congelado-descongelado (Bøknæs et al., 2002; Ottavian et al., 2013) o simplemente han determinado el estado de frescura en carnes y pescados (Grau et al., 2011; Sivertsen et al., 2011).

## BLOQUE 2: Polímeros de impresión molecular. Síntesis, caracterización y aplicaciones

---

### 1.5 -Los sensores y su importancia

Los sensores pueden ser definidos como instrumentos que detectan o miden alguna propiedad física o química y dan una respuesta a la información recibida. De esta forma convierten un estímulo en una señal medible. Este estímulo puede ser de naturaleza física, como la temperatura, presión y aceleración o puede referirse a la concentración de un material químico o biológico.

Nosotros nos centraremos en los biosensores y sensores químicos, que de acuerdo a la definición de la IUPAC, son instrumentos que pueden detectar la presencia o cuantificar la concentración de una familia de compuestos químicos o una sola sustancia química cuando son puestos en contacto con ellos (Hulanicki et al., 1991). Estos sensores constan de un transductor físico y de un receptor, que en algunos casos pueden estar separados físicamente mediante una membrana. Cuando el analito y el receptor interactúan, se genera un cambio en las propiedades físicas o químicas del transductor. Este cambio es traducido a una señal medible por el transductor, lo que nos permite obtener un resultado analítico (Korotcenkov & Cho, 2011).

Los biosensores tienen la peculiaridad de tener una biomolécula (enzimas, anticuerpos...) o incluso una célula como elemento de reconocimiento. Resultan de gran utilidad en numerosas aplicaciones que van desde las medio-ambientales hasta las industrias alimentarias, pasando por otras áreas como investigación médica, agricultura o petroquímica por nombras algunas.

Frente a los métodos analíticos clásicos, los sensores presentan las ventajas de su simplicidad, bajo coste, bajos tiempos de respuesta y la posibilidad de crear equipos de campo para utilizar en exteriores sin la necesidad del equipamiento presente en un laboratorio (J. M. Barrero Moreno, 2003).

Tradicionalmente, los receptores utilizados en los biosensores han sido los anticuerpos, cuya fabricación es costosa, presentan poca estabilidad térmica y baja reproducibilidad entre distintos lotes, así como la dificultad para generar respuestas inmunogénicas sobre moléculas orgánicas pequeñas (Fodey et al., 2011). Además, con su uso continuado se producen cambios que alteran la especificidad inicial (Yaqub et al., 2011). A pesar de esto, presenta ventajas como una alta especificidad frente a su antígeno y la robustez que presenta frente al efecto matriz. Aun así, durante las últimas décadas las investigaciones se han centrado en el desarrollo de otros elementos de reconocimiento que permitiesen modificar las características a medida en cada experimento, como los aptámeros, oligonucleótidos o pequeñas cadenas de ácidos nucleicos que se unen a moléculas diana con gran especificidad y sensibilidad (Fodey et al., 2011).

Otro ejemplo de imitar la interacción anticuerpo – antígeno son los polímeros de impresión molecular. Material sintético 100% que se une a su molécula diana de manera específica y que puede utilizarse en sustitución de los receptores naturales en distintos sensores (Piletsky et al., 2001).

## 1.6 -Polímeros de impresión molecular (MIPs)

Un polímero de impresión molecular se define como un entramado polimérico altamente entrecruzado y artificial con propiedades de reconocimiento molecular selectivo hacia los compuestos para los cuales ha sido sintetizado.

Su origen se remonta a los años 70-80 cuando varios autores demostraron la presencia de esta impronta en polímeros orgánicos (Andersson et al., 1984; Takagishi & Klotz, 1972; Wulff & Sarhan, 1972) y desde entonces la investigación con este tipo de matrices ha ido en aumento (Ver Figura 6).

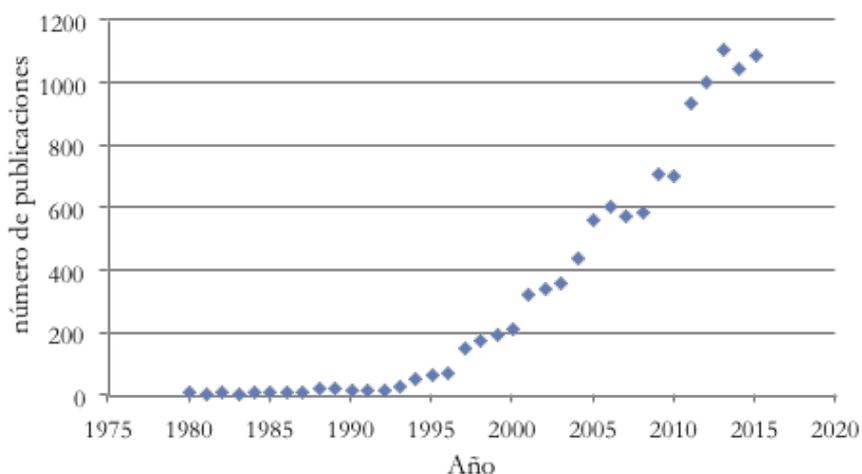


Figura 6: Evolución de las publicaciones sobre MIPs desde 1980-2015. Tomado de [http://mipdatabase.com/all\\_items.php](http://mipdatabase.com/all_items.php). [Accedido 04/2016]

A la hora de cuantificar determinados compuestos en matrices complejas, existe por un lado interés en preconcentrar esos compuestos antes de llevar a cabo el análisis y al mismo tiempo resulta interesante eliminar cualquier otro compuesto que no resulta de interés y que puede interferir con la determinación.

Con este objetivo, durante mucho tiempo se han intentado imitar las interacciones naturales entre enzimas y sustratos o anticuerpos y antígenos. La obtención de éstas moléculas en muchos casos resulta muy laborioso, por lo que se necesitan alternativas que no requieran condiciones muy específicas y personal altamente cualificado para su obtención. De esta manera surgieron los polímeros de impresión molecular.

### 1.6.1 -VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MIPs

Las principales ventajas del uso de los polímeros de impresión molecular son:

- Se pueden desarrollar MIPs frente a analitos muy variados, incluyendo aquellos para los que todavía no se han desarrollado sistemas antígeno-anticuerpo o enzimas.
- Se pueden llevar a cabo estudios teóricos sobre su especificidad, lo que la hace predecible, aunque también existen interacciones inespecíficas.
- Su precio de fabricación resulta muy interesante.
- Presentan una gran estabilidad química y mecánica frente a distintas condiciones de pH, temperatura y disolventes orgánicos.

Pero también existen limitaciones en esta tecnología:

- Presentan los mejores rendimientos en medios orgánicos y presentando problemas a la hora de trabajar con muestras acuosas (Piletska et al., 2008).
- En general las constantes de afinidad son menores que las que presentan anticuerpos y enzimas, por lo que las cinéticas de unión son más lentas.
- El procedimiento de síntesis requiere varias etapas en función del método de síntesis elegido, lo que conlleva la pérdida de material útil y una distribución de los sitios activos poco homogénea.

## 1.7 -Síntesis

En la síntesis de un polímero de impresión molecular los componentes necesarios son: el analito molde o “template”, el monómero, el agente reticulante o “crosslinker”, el disolvente o “porogen” y el iniciador.

A la hora de sintetizar un polímero, primeramente se pone en contacto el analito molde con el monómero, lo que se conoce como mezcla de prepolimerización. A esta mezcla se añade el agente entrecruzante, disolvente y agente iniciador para que comience a darse la reacción de polimerización, que en función del agente iniciador utilizado será inducida por temperatura o por luz UV.

Una vez se ha obtenido el material polimérico, se debe eliminar el contenido de molécula molde de la matriz creada, para dejar así libres las cavidades que se han generado. Estas cavidades serán las encargadas posteriormente de reconocer químicamente el analito al entrar en contacto

con él, así como otras moléculas análogas que puedan interferir en esta unión haciéndola más o menos específica.

### 1.7.1 –TIPOS DE POLÍMEROS EN FUNCIÓN DE LA UNIÓN MOLÉCULA MOLDE–MONÓMERO

Uno de los criterios más utilizados para la clasificación de los polímeros de impresión molecular es la interacción que tiene lugar entre la molécula molde y el monómero. Atendiendo a este criterio de clasificación se pueden distinguir polímeros con uniones covalentes, uniones semicovalentes y uniones no covalentes (Mayes & Whitcombe, 2005).

- **Los polímeros covalentes** se caracterizan porque la unión entre la molécula molde y el monómero se da a través de un enlace covalente. Este enlace se da tanto en la síntesis como en el momento posterior de reconocimiento del analito por parte del polímero. Suelen utilizarse moléculas molde sintetizadas en el laboratorio y que contengan grupos diol de manera que se formen ésteres cíclicos con monómeros que contengan moléculas de ácido borónico, carboxílico, bases de Schiff, etc... en su estructura. En este tipo de síntesis se trabaja de forma estequiométrica, por lo que las interacciones inespecíficas están bastante minimizadas (Mayes & Whitcombe, 2005). Las principales desventajas de este tipo de síntesis son por un lado, la escasez comercial de monómeros capaces de formar un enlace covalente que sea reversible y por otro, la necesidad de sintetizar en el laboratorio previamente el complejo molécula molde-monómero, cuyo enlace covalente debe ser posteriormente eliminado mediante el uso de tratamientos químicos agresivos. Por estos motivos sus aplicaciones son escasas, a pesar de que los primeros polímeros desarrollados pertenecen a esta categoría (Takagishi & Klotz, 1972; Wulff & Sarhan, 1972).
- **Los polímeros semicovalentes.** En este caso la interacción inicial en la síntesis del polímero es covalente, pero el posterior reconocimiento del polímero con la molécula molde no se da mediante un enlace covalente. Aquí no hace falta crear un enlace covalente reversible, por lo que la variedad de monómeros a utilizar es mayor así como la variedad de moléculas molde que se pueden utilizar. Esto permite generar un enlace covalente más fuerte y estable en la síntesis como pueda ser un enlace tipo éster (Mayes & Whitcombe, 2005).
- **Los polímeros no covalentes** son aquellos que presentan enlaces intermoleculares débiles entre la molécula molde y el monómero, como puedan ser puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones dipolo-dipolo. Esto ocurre tanto en la síntesis como en el momento posterior de reconocimiento de la molécula molde por el material

polimérico. Debido a la gran disponibilidad de monómeros comerciales de este tipo hace que dichos materiales sean los más utilizados hoy en día (Alexander et al., 2006). El inconveniente que presentan estos materiales es la menor selectividad y la menor homogeneidad en la distribución de sitios activos del polímero.

## 1.7.2 –COMPONENTES DE LOS POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR

Como se ha explicado anteriormente en el caso de los polímeros covalentes y semicovalentes resulta complicado encontrar o diseñar el monómero que interaccione con la molécula molde, por contra, en el caso de los polímeros no covalentes, se pueden encontrar una gran variedad disponibles comercialmente y se clasifican en ácidos, básicos y neutros en función de su naturaleza química. En la Tabla 3 se muestran los monómeros más utilizados en la síntesis de MIPs.

Los monómeros derivados de ácidos carboxílicos son de los más utilizados por su facilidad a la hora de interactuar con gran variedad de moléculas molde siendo aceptores o dadores de protones en la formación de puentes de hidrógeno, pares iónicos o enlaces dipolo-dipolo. De entre todos ellos el más utilizado sin duda es el ácido metacrílico (Mayes & Whitcombe, 2005).

Como es deseable que entre el monómero y molécula molde se den interacciones que aumenten la afinidad y selectividad de las cavidades que se generan en la síntesis (Selligren, 1999), en las ocasiones en que la molécula molde presenta naturaleza ácida suele utilizarse monómeros básicos como pueda ser la vinilpiridina, aunque presenta el inconveniente de que trae asociadas muchas interacciones inespecíficas (Mayes & Whitcombe, 2005).

Por último el monómero neutro más utilizado es la acrilamida, que consigue establecer puentes de hidrógeno más estables en medios apolares, por lo que resulta una opción muy interesante para elaborar fases estacionarias para cromatografía líquida (Yu & Mosbach, 1998).

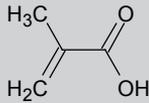
Otro componente de vital importancia a la hora de sintetizar el entramado polimérico es el agente entrecruzante o crosslinker (Ver Tabla 3), ya que sin él no se podría mantener la morfología del entramado polimérico. Así mismo resulta un estabilizante de los sitios activos, siendo también el responsable de la estabilidad mecánica y de proporcionar la porosidad al necesaria al material fabricado (Piletsky & Turner, 2002).

A pesar de que existen agentes entrecruzantes de naturaleza muy diversa, los más extendidos y utilizados son el etilenglicoldimetacrilato (EGDMA), divinilbenceno (DVB) y el trimetilpropano trimetacrilato (TRIM) (Ver Tabla 3).

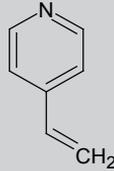
Tabla 3: Estructuras químicas de algunos de los componentes más utilizados en la síntesis de polímeros de impresión molecular.

## ESTRUCTURA QUÍMICA

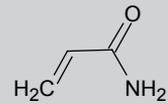
Monómeros



ÁCIDO METACRÍLICO

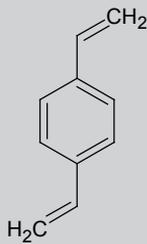
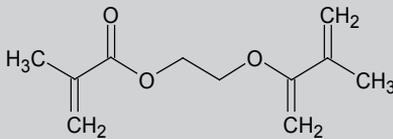
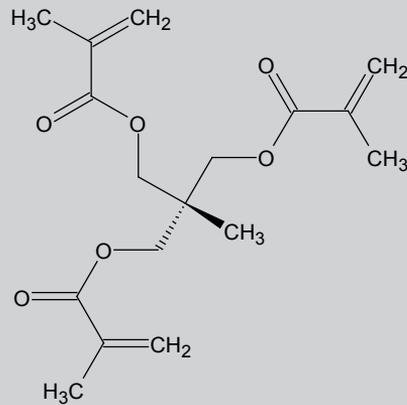


4-VINILPIRIDINA

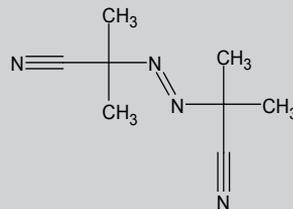


ACRILAMIDA

Agente entrecruzante (crosslinker)

DIVINILBENCENO  
(DVB)ETILENGLICOLDIMETACRILATO  
(EGDMA)TRIMETILPROPANO  
TRIMETACRILATO  
(TRIM)

Iniciador



AZOISOBUTIRONITRILLO (AIBN)

En cuanto al disolvente, siempre se intenta trabajar con disolventes que tengan una baja constante dieléctrica o apróticos, que típicamente son el tolueno, cloroformo o acetonitrilo, ya que confieren estabilidad a los enlaces de tipo puente de hidrógeno o fuerzas electrostáticas. Los disolventes próticos como puedan ser agua o metanol, tienden a desestabilizar ese tipo de uniones, pero resultan adecuados cuando se quiere fomentar las interacciones de tipo hidrofóbico. Por este motivo en general hay que llegar a un compromiso entre la polaridad del disolvente y la solubilidad de la molécula molde (Mayes & Whitcombe, 2005).

Los ratios típicos en los que se añaden estos compuestos varían habitualmente de 1:4:20 a 1:8:40 para molécula molde, monómero y agente reticulante respectivamente.

Finalmente el último componente y el responsable del comienzo de la polimerización es el iniciador, una molécula que se activa mediante la aplicación de temperatura o de la incidencia de luz UV de una determinada longitud de onda. Este compuesto se fragmenta y aporta radicales al sistema de manera que comienza una reacción en cadena. El iniciador que más se utiliza es el azo-bis-isobutironitrilo (AIBN) y este presenta la característica de poder activarse tanto mediante temperatura (60°C) como mediante aplicación de luz UV (Lanza et al., 2001).

### 1.7.3 -TIPOS DE POLIMERIZACIÓN

Este proceso puede llevarse a cabo de distintas maneras, dando lugar a partículas amorfas, esféricas o de tamaño controlado, o de otro tipo. Esto resulta de vital importancia a la hora del reconocimiento de la molécula molde por parte del polímero. Esto queda demostrado en el estudio que llevaron a cabo Perez Moral y Mayes en 2003, en el que sintetizaron polímeros de impresión molecular para el propanolol en distintos formatos: en bloque, por suspensión, precipitación o en presencia de una emulsión de tolueno y agua. En todos ellos se obtuvieron distintos resultados de reconocimiento de la molécula molde por parte del polímero, lo cual pone de manifiesto la importancia de realizar una buena elección del método de síntesis de los polímeros de impresión molecular.

Los principales tipos de polimerización son los siguientes:

- Polimerización tradicional o síntesis en bloque:

Este fue el primer método de síntesis utilizado (Mayes & Whitcombe, 2005) y comienza con la mezcla de todos los componentes en un vial del que hay que extraer el aire al máximo, ya que éste inhibe el comienzo de la polimerización. Para ello, se llevan a cabo varios ciclos de Ar/vacío a través del septum del vial. Después se aplica la luz ultravioleta o se introduce el vial en una estufa a 60°C y se forma el bloque polimérico.

Una vez el bloque ha finalizado su formación, hay que molerlo y tamizarlo para obtener las partículas del tamaño deseado, las que habrá que limpiar a posteriori para eliminar la molécula molde y para que el polímero pueda volver a ser utilizado para el reconocimiento del analito.

El principal inconveniente de esta metodología es el bajo rendimiento que presenta debido a la gran pérdida de material que tiene lugar en el momento del tamizado. Así mismo la gran variabilidad en el tamaño de partícula hace difícil su utilización en aplicaciones como la extracción en fase sólida o fases estacionarias para cromatografía líquida. Por ese motivo se comenzaron a diseñar polímeros con partículas esféricas, con tamaños de partícula homogéneos.

- Síntesis de partículas esféricas

- » Polimerización mediante dispersión – precipitación:

La principal diferencia con la polimerización en bloque es que en esta se trabaja con un exceso de disolvente, de manera que se produce una dispersión de partículas esféricas independientes en el disolvente que no llegan a conectarse entre sí por la gran cantidad de disolvente (Li et al., 2003; Ye et al., 2001, 1999).

Al obtenerse partículas ya esféricas, no es necesario llevar a cabo un proceso de tamizado, por lo que el rendimiento de este proceso es mayor que en una polimerización en bloque. Así mismo, se ha demostrado experimentalmente que este tipo de polímeros presenta una distribución más homogénea de los sitios activos (Baggiani et al., 2005; Wei & Mizaikoff, 2007), aunque también presenta la desventaja de generar tamaños de partícula muy pequeños, lo que hace difícil su aplicación a cromatografía líquida. Uno de los factores que afecta en el tamaño de la partícula formada es la velocidad de agitación durante la polimerización (Turiel et al., 2005).

- » Polimerización mediante suspensión – emulsión:

En este caso se mezclan por un lado un medio orgánico con la mezcla de polimerización y por otro un disolvente polar inmiscible con el anterior. Estas dos disoluciones se agitan y al ser inmiscibles, se generan unas microgotas en las que se da el proceso de polimerización. Se forman unas partículas esféricas cuyo tamaño de partícula puede ser controlado mediante la adición de un estabilizante iónico (Hong et al., 2006) o controlando la agitación (Maggioris et al., 2000).

- » Polimerización mediante hinchamiento multipasos o “sweling”:

Este método se basa en recubrir de distintas capas de polímero de impresión molecular una partícula esférica previamente hinchada mediante el uso de un agente plastificante. El paso de adición de capa de polímero de impresión molecular puede

ser repetido hasta obtener el tamaño de partícula deseado (Tsukagoshi et al., 1995). El principal problema con este protocolo es que se lleva a cabo en un medio acuoso y las interacciones entre monómero y molécula molde pueden estar desfavorecidas.

## **1.8 -Caracterización de los polímeros de impresión molecular**

### **1.8.1 -MORFOLÓGICA**

Las principales herramientas utilizadas en la caracterización morfológica de los polímeros de impresión molecular son la microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica y la adsorción-desorción de nitrógeno.

Las dos primeras se utilizan para poder caracterizar la superficie del material polimérico y observar el tamaño de los poros (González et al., 2006; Yin et al., 2005).

La tercera de ellas, la técnica basada en la adsorción-desorción de nitrógeno permite obtener información de la accesibilidad de la molécula molde a los sitios activos situados en el interior de la partícula. Mide el tiempo que tarda el nitrógeno en atravesar las partículas de polímero para obtener información acerca del área superficial o la distribución del tamaño de poros y su diámetro medio (Rosengren et al., 2013).

### **1.8.2 -QUÍMICA**

Las técnicas más utilizadas en la caracterización morfológica del polímero son las espectroscopia FTIR o UV, a través de las cuales se puede sacar información útil sobre los grupos funcionales que posee el material sintetizado, puentes de hidrógeno (Gore et al., 2004; Shea & Sasaki, 1989; Wang et al., 2004) o la relación estequiométrica que existe entre el monómero y la molécula molde (Andersson & Nicholls, 1997).

Así mismo se utiliza la resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono para la determinación de los dobles enlaces presentes y la estabilidad del complejo de prepolimerización (Mahony et al., 2006; Shea & Sasaki, 1989).

### **1.8.3 -CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN ANALITO – MIP**

Para caracterizar estas uniones, lo más habitual es recurrir a la evaluación de la isoterma de adsorción que aporta información sobre la densidad de los sitios activos y su constante de

afinidad. De esta manera se puede saber si las uniones que se dan son específicas o inespecíficas y cuantas hay.

Esta evaluación se lleva a cabo poniendo en contacto el material polimérico (tanto MIP como NIP) con distintas concentraciones de nuestra molécula molde para posteriormente analizar qué cantidad ha quedado adsorbida en el polímero y qué cantidad no se ha unido. Los resultados experimentales se representan gráficamente para poder obtener los parámetros necesarios y ajustar a los distintos modelos posibles el comportamiento de cada polímero (ver Tabla 4).

Tabla 4: Distintas ecuaciones de las isothermas de adsorción (Baggiani et al., 2004)

MODELO DE LA ISOTERMA	FÓRMULA
Freundlich	$B = aF^n$
Langmuir	$B = \frac{qkF}{1 + kF}$
Bi-Langmuir	$B = \frac{q_1 k_1 F}{1 + k_1 F} + \frac{q_2 k_2 F}{1 + k_2 F}$
Freundlich-Langmuir	$B = \frac{qkF^n}{1 + kF^n}$
Jovanovic	$B = q(1 - e^{-kF})$
Bi-Jovanovic	$B = q_1(1 - e^{-k_1 F}) + q_2(1 - e^{-k_2 F})$

*B: cantidad de molécula molde que ha quedado adsorbida en el polímero.*

*F: cantidad de la molécula molde que no ha quedado adsorbida en el polímero.*

*k: constante de afinidad.*

*q: densidad de sitios activos*

*n: parámetro de heterogeneidad*

De estos modelos, el más sencillo es el de Freundlich, que explica los procesos de adsorción con una distribución heterogénea y de baja afinidad.

Los modelos de Langmuir o Jovanovic, se utilizan en polímeros que presentan una distribución homogénea de los sitios activos y en el caso de existir sitios activos con afinidades distintas (altas y bajas) se puede aplicar el bi-langmuir o el bi-jovanovic.

El modelo Langmuir-Freundlich se puede utilizar en ambos casos, en polímeros con distribuciones homogéneas o heterogéneas, algo que puede ser aplicado a la mayoría de los materiales sintetizados.

## 1.9 -Aplicaciones

Los principales campos en los que se han aplicado los polímeros de impresión molecular son los siguientes.

### 1.9.1 -SPE

Esta es la técnica donde se puede encontrar un mayor número de aplicaciones dentro del campo de los polímeros de impresión molecular. Esto es debido a la mayor selectividad que presentan respecto a otras resinas utilizadas para la extracción en fase sólida, como puedan ser el  $C_{18}$  u otras.

Una vez el polímero ha sido sintetizado, se debe moler y tamizar para utilizar únicamente el tamaño de partícula deseado y llevar a cabo un proceso de lavado para eliminar la molécula molde. Este proceso suele llevarse a cabo mediante extracción Soxhlet utilizando disolventes en los que la molécula molde quede retenida para ser expulsada del material sintetizado. Una vez el material se encuentra libre de la molécula molde, se procede a empaquetarlo en los cartuchos y a partir de aquí se puede trabajar de la manera típica de la extracción en fase sólida.

Primero se acondiciona el material con el disolvente en el que va a ser aplicada la muestra. A continuación se lleva a cabo la carga del cartucho con la muestra para que los analitos queden retenidos y posteriormente se lava el polímero utilizando una combinación de disolventes que favorezca la elución en distintas etapas de los analitos de interés y de las posibles interferencias.

De esta manera se pueden personalizar los procesos de extracción en fase sólida como queda reflejado en las numerosas publicaciones que existen en la bibliografía para por ejemplo colesterol en queso (Puoci et al., 2007), cloranfenicol en miel de abeja (Schirmer & Meisel, 2006), acetaldehído en el espacio de cabeza de bebidas (Rajabi Khorrami y Narouenezhad, 2011), teofilina en orina humana (Rajabi Khorrami y Rashidpur, 2009), pesticidas organofosforados en aguas (Zhu et al., 2005), triazinas en aguas (Chapuis et al., 2003), nicotina en pelo (Yang et al., 2007), ciprofloxacino en leche (Yan et al., 2008) o tintes en distintas matrices alimentarias (Puoci et al., 2005). Hoy en día existen ya empresas que se dedican a realizar cartuchos de extracción

en fase sólida para determinadas moléculas de amplio interés como puedan ser la patulina, distintos antibióticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos u otras moléculas de interés clínico o alimentario (SupelMIP: [Sigma-Aldrich](#), Afinimip: [Polyintell](#), Affinilute: [Biotage](#), MIPSeries: [Nanomyp](#)) de manera industrial.

## 1.9.2 -FASE ESTACIONARIA EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

### 1.9.2.1 -HPLC

El uso de polímeros como fases estacionarias es la aplicación más utilizada para la evaluación de los mismos polímeros. Mediante la cromatografía frontal se puede llevar a cabo una rápida determinación de las interacciones entre analito y polímero.

Aunque se han desarrollado aplicaciones con polímeros de impresión molecular para este tipo de cromatografía, presentan ciertas desventajas como el hecho de que se requiere cierta homogeneidad en las cavidades creadas en la síntesis, es necesario sintetizar partículas esféricas con tamaños homogéneos y por último hay que mencionar la baja velocidad a la que tienen lugar los procesos de transferencia de masa hasta las cavidades.

Alguna de las aplicaciones desarrolladas incluye la separación enantiomérica de compuestos quirales, que es de utilidad en diseño de por ejemplo nuevos fármacos (Ansell, 2005; Spivak, 2005).

### 1.9.2.2 -Electrocromatografía capilar

Esta técnica, híbrida entre la electroforesis capilar y la cromatografía de alta resolución, consiste en la utilización de una fase estacionaria compuesta por un polímero de impresión molecular en la que se da una separación electroforética mediante una fase móvil dirigida por ósmosis. Mediante esta técnica se producen separaciones altamente eficaces y selectivas y al trabajar en un sistema capilar con el que se puede trabajar con cantidades muy pequeñas de molécula molde (nmol), resulta muy apropiado para analitos muy caros o difíciles de obtener en estado puro (Quaglia et al., 2004, 2001).

No obstante, presenta dificultades, la más importante de ellas la elección acertada de los disolventes, ya que el medio necesario para mantener el flujo osmótico (soluciones acuosas y salinas) y el disolvente en el que más favorecidas están las interacciones analito-MIP (disolventes apolares), son muy distintos.

### 1.9.3 -SENSORES

Los sensores químicos son alternativas baratas que han ganado mucha importancia en los últimos años debido a su gran aplicabilidad. Utilizando MIPs se pueden distinguir principalmente dos tipos de sensores: de adsorción y aquellos que detectan cambios en las propiedades del polímero al unirse con su analito.

En el caso de los sensores de adsorción, la aplicación más desarrollada es la de aplicar una capa de MIP sobre un transductor acústico, como pueda ser una microbalanza de cuarzo, y que se aprecien cambios por el aumento de masa al unirse el analito sobre el MIP. Siguiendo esta técnica se han desarrollado numerosas metodologías para determinar una gran variedad de compuestos de interés clínico y alimentario como bilirrubina (Wu & Syu, 2006), triptófano (Liu et al., 2006), albumina (Lin et al., 2004), bisfenol A (Tsuru et al., 2006), distintos tipos de virus (Dickert et al., 2004; Jenik et al., 2009), glucosa (Ersöz et al., 2005), formaldehído (Feng et al., 2005) o vainillina (Ávila et al., 2007).

En cuanto a los sensores que detectan cambios en las propiedades del polímero al unirse con su analito, existen dos alternativas, por un lado se puede utilizar un monómero que cambie sus propiedades al interaccionar con el analito o bien se puede incorporar en el polímero un fluoróforo que variará su señal en función de la cantidad de analito enlazado. Esto es necesario ya que los polímeros de impresión molecular no permiten por sí mismos determinar de manera visual la interacción con el analito y el posterior cambio debido a esta unión.

Utilizando esta variante, por ejemplo se han sintetizado monómeros fluorescentes para la determinación de D-fructosa. Mediante su grupo diol en *cis*, dada una fluorescencia basal del polímero sintetizado que, al ponerlo en contacto con la D-fructosa, aumenta en función de la concentración (Wang et al., 1999). Algo similar fue llevado a cabo para la determinación de L-triptófano. Se sintetizó un polímero con un monómero fluorescente y se le añadió un agente inhibidor de la fluorescencia, de modo que al poner en contacto el polímero con el L-triptófano, este desplaza el agente inhibidor de la fluorescencia y se aprecia la señal (Liao et al., 1999). Otros autores han desarrollado un sensor para aminas aromáticas que es capaz de discriminar entre siete distintas en función de la fuerza con la que se desplazan las moléculas de tinte y quedan unidos los analitos al polímero. La intensidad de la fluorescencia varía en función de cada analito (Greene & Shimizu, 2005).

## 1.10 -Bibliografía

- Ababouch, L., 2005. Fisheries and aquaculture topics. Preservation techniques. [WWW Document].  
FAO Top. fact sheet.
- AESAN, RedBEDCA, n.d. Base de datos española de composición de alimentos [WWW Document].
- Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I. a, O'Mahony, J.,  
Whitcombe, M.J., 2006. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature  
for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognit.* 19, 106–180.
- Amano, K., Yamada, K., 1964. A biological formation of formaldehyde in the muscle tissue of  
gadoid fish. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.* 30, 430–435.
- Ampuero, S., Zesiger, T., Gustafsson, V., Lunden, A., Bosset, J.O., 2002. Determination of  
trimethylamine in milk using an MS based electronic Nose. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 163–167.
- An, J., Sun, M., Bai, L., Chen, T., Q.Liu, D., Kord, A., 2008. A practical derivatization LC/MS approach  
for determination of trace level alkyl sulfonates and dialkyl sulfates genotoxic impurities in drug  
substances. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48, 1006–1010.
- Anderson, A.K., 2008. Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold  
at Kuwait fish markets. *Food Chem.* 107, 761–767.
- Andersson, H.S., Nicholls, I. a., 1997. Spectroscopic Evaluation of Molecular Imprinting  
Polymerization Systems. *Bioorg. Chem.* 25, 203–211.
- Andersson, L., Sellergren, B., Mosbach, K., 1984. Imprinting of amino acid derivatives in macroporous  
polymers. *Tetrahedron Lett.* 25, 5211–5214.
- Ansell, R.J., 2005. Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs. *Adv.  
Drug Deliv. Rev.* 57, 1809–35.
- AOAC, 2000. 971.14 method. Trimethylamine nitrogen in seafood, in: AOAC Official Methods of  
Analysis. p. 9.
- APROMAR, ESACUA, OPP, FOESA, 2014. La acuicultura en España 2014.
- Arfi, K., 2003. Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens*  
and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *J. Biotechnol.*  
105, 245–253.
- Aro, T., Tahvonen, R., Koskinen, L., Kallio, H., 2003. Volatile compounds of Baltic herring analysed  
by dynamic headspace sampling–gas chromatography–mass spectrometry. *Eur. Food Res.  
Technol.* 216, 483–488.
- Ashie, I.N.A., Smith, J.P., Simpson, B.K., Haard, N.F., 1996. Spoilage and shelflife extension of fresh  
fish and shellfish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 87–121.
- Aubourg, S.P., Torres, J.A., Saraiva, J.A., Guerra-Rodríguez, E., Vázquez, M., 2013. Effect of  
high-pressure treatments applied before freezing and frozen storage on the functional and  
sensory properties of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *LWT - Food Sci. Technol.* 53,  
100–106.

- Ávila, M., Zougagh, M., Escarpa, A., Ríos, Á., 2007. Supported liquid membrane-modified piezoelectric flow sensor with molecularly imprinted polymer for the determination of vanillin in food samples. *Talanta* 72, 1362–1369.
- Baggiani, C., Baravalle, P., Anfossi, L., Tozzi, C., 2005. Comparison of pyrimethanil-imprinted beads and bulk polymer as stationary phase by non-linear chromatography. *Anal. Chim. Acta* 542, 125–134.
- Baggiani, C., Giraudi, G., Giovannoli, C., Tozzi, C., Anfossi, L., 2004. Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template. *Anal. Chim. Acta* 504, 43–52.
- Bardócz, S., 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 341–346.
- Berg, T., Erikson, U., Nordtvedt, T.S., 1997. Rigor Mortis Assessment of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Effects of Stress. *J. Food Sci.* 62, 439–446.
- Bianchi, F., Careri, M., Musci, M., Mangia, A., 2007a. Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC–MS analysis. *Food Chem.* 100, 1049–1053.
- Bianchi, F., Careri, M., Musci, M., Mangia, A., 2007b. Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC–MS analysis. *Food Chem.* 100, 1049–1053.
- Bøknaes, N., Jensen, K.N., Andersen, C.M., Martens, H., 2002. Freshness Assessment of Thawed and Chilled Cod Fillets Packed in Modified Atmosphere Using Near-infrared Spectroscopy. *LWT - Food Sci. Technol.* 35, 628–634.
- Bremner H.A., 1985. A convenient easy to use system for estimating the quality of chilled seafood, in: Scott, D., Summers, C. (Eds.), *Proceedings of the fish processing conference*. Nelson, New Zealand, pp. 59–703.
- Brodnitz, M.H., Pollock, C.L., Vallon, P.P., 1969. Flavor components of onion oil. *J. Agric. Food Chem.* 17, 760–763.
- Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F., Vlaemynck, G., 2011. Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiol.* 28, 1162–9.
- Cháfer-Pericás, C., Campíns-Falcó, P., Herráez-Hernández, R., 2006. Comparative study of the determination of trimethylamine in water and air by combining liquid chromatography and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Talanta* 69, 716–23.
- Cháfer-Pericás, C., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., 2004a. Liquid chromatographic determination of trimethylamine in water. *J. Chromatogr. A* 1023, 27–31.
- Cháfer-Pericás, C., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., 2005. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with o-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Talanta* 66, 1139–45.

- Cháfer-Pericás, C., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., 2004b. Selective determination of trimethylamine in air by liquid chromatography using solid phase extraction cartridges for sampling. *J. Chromatogr. A* 1042, 219–223.
- Chan, S.T., Yao, M.W.Y., Wong, Y.C., Wong, T., Mok, C.S., Sin, D.W.M., 2006. Evaluation of chemical indicators for monitoring freshness of food and determination of volatile amines in fish by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 67–74.
- Chapuis, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, S., Hennion, M.C., 2003. Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism. *J. Chromatogr. A* 999, 23–33.
- Chevalier, D., 2001. Effects of high pressure treatment (100–200 MPa) at low temperature on turbot (*Scophthalmus maximus*) muscle. *Food Res. Int.* 34, 425–429.
- Chung, H.Y., Yeung, C.W., Kim, J.-S., Chen, F., 2007. Static headspace analysis-olfactometry (SHA-O) of odor impact components in salted-dried white herring (*Ilisba elongata*). *Food Chem.* 104, 842–851.
- Cobo, M., Silva, M., Perez-Bendito, D., 1997. Chemiluminescence measurement of tertiary amines using continuous addition of reagent technique. Determination of TMA in fish. *Anal. Chim. Acta* 356, 51–59.
- Consejo Económico y Social de España, 2013. Informe 01: La reforma de la política pesquera común.
- Dadakova, E., Krizek, M., Pelikanova, T., 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem.* 116, 365–370.
- De Mey, E., Drabik-Markiewicz, G., De Maere, H., M.C., P., Derdelinckx, G., Paelinck, H., Kowalska, T., 2012. Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 130, 1017–1023.
- Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2009. Plan Estratégico de Pesca de la CAPV 2009-2013.
- Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco, 2015. Plan Estratégico de Pesca y Acuicultura del País Vasco 2020 178.
- Dickert, F.L., Hayden, O., Bindeus, R., Mann, K.J., Blaas, D., Waigmann, E., 2004. Bioimprinted QCM sensors for virus detection - screening of plant sap. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1929–1934.
- Duflos, G., Coin, V.M., Cornu, M., Antinelli, J.-F., Malle, P., 2006. Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 86, 600–611.
- Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewinski, F., Kol, O., Malle, P., 2010. Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2568–75.
- Duflos, G., Moine, F., Coin, V.M., Malle, P., 2005. Determination of volatile compounds in whiting (*Merlangius merlangus*) using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* 43, 304–12.

- Dyer, W.J., 1945. Amines in Fish Muscle I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *J. Fish. Res. Board Canada* 6, 351–358.
- Ersöz, A., Denizli, A., Ozcan, A., Say, R., 2005. Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2197–202.
- Erupe, M.E., Liberman-Martin, A., J. Silva, P., G.J. Malloy, Q., Yonis, N., R. Cooker, D., L. Purvis-Roberts, K., 2010. Determination of methylamines and trimethylamine-N-oxide in particulate matter by non-suppressed ion chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217, 2070–2073.
- FAO, 2014. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2014* FAO. Rome.
- Feng, L., Liu, Y., Zhou, X., Hu, J., 2005. The fabrication and characterization of a formaldehyde odor sensor using molecularly imprinted polymers. *J. Colloid Interface Sci.* 284, 378–382.
- Fillit, C., Jaffrezic-Renault, N., Bessueille, F., Leonard, D., Mitsubayashi, K., Tardy, J., 2008. Development of a microconductometric biosniffer for detection of trimethylamine. *Mater. Sci. Eng. C* 28, 781–786.
- Fodey, T., Leonard, P., O'Mahony, J., O'Kennedy, R., Danaher, M., 2011. Developments in the production of biological and synthetic binders for immunoassay and sensor-based detection of small molecules. *TrAC Trends Anal. Chem.* 30, 254–269.
- Frankel, E.N., 2005. *Lipid oxidation*, 2nd ed. P.J. Barnes & Associates.
- Fundacion Española de Nutricion, 2013. *Características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta*.
- Gainey, L.F., Greenberg, M.J., 2005. Hydrogen sulfide is synthesized in the gills of the clam *Mercuraria mercenaria* and acts seasonally to modulate branchial muscle contraction. *Biol. Bull.* 209, 11–20.
- Gardana, C., Pietta, P., Ciappellano, S., Testolin, G., 1999. Determination of histamine in fish products by capillary electrophoresis and ion-pair liquid chromatography with diode-array detection. *J. Sci. Food Agric.* 79, 91–94.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Budge, S., Brooks, M.S., 2010. *Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques : Review*. *Am. J. Appl. Sci.* 7, 859–877.
- González, G.P., Hernando, P.F., Alegría, J.S.D., 2006. A morphological study of molecularly imprinted polymers using the scanning electron microscope. *Anal. Chim. Acta* 557, 179–183.
- Gore, M. a, Karmalkar, R.N., Kulkarni, M.G., 2004. Enhanced capacities and selectivities for cholesterol in aqueous media by molecular imprinting: role of novel cross-linkers. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 804, 211–21.
- Gou, J., Lee, H.-Y., Ahn, J., 2010. Effect of high pressure processing on the quality of squid (*Todarodes pacificus*) during refrigerated storage. *Food Chem.* 119, 471–476.
- Gram, L., 1992. Evaluation of the bacteriological quality of seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 16, 25–39.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 262–266.
- Grau, R., J. Sanchez, A., Giron, J., Iborra, E., Fuentes, A., Barat, J.M., 2011. Nondestructive assessment of freshness in packaged sliced chicken breasts using SW-NIR spectroscopy. *Food Res. Int.* 44, 331–337.

- Greene, N.T., Shimizu, K.D., 2005. Colorimetric Molecularly Imprinted Polymer Sensor Array using Dye Displacement. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 5695–5700.
- Haard, N.F., 1992. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Res. Int.* 25, 289–307.
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42–49.
- Herbert, R.A., Ellis, J.R., Shewan, J.M., 1975. Isolation and identification of the volatile sulphides produced during chill-storage of north sea cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 26, 1187–1194.
- Herbert, R.A., Shewan, J.M., 1975. Precursors of the volatile sulphides in spoiling north sea cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 26, 1195–1202.
- Herbert, R.A., Shewan, J.M., 1976. Roles played by bacterial and autolytic enzymes in the production of volatile sulphides in spoiling North Sea cod (*Gadus morhua*). *J. Sci. Food Agric.* 27, 89–94.
- Hernandez-Cazares, A.S., Aristoy, M.C., Toldrá, F., 2011. An enzyme sensor for the determination of total amines in dry-fermented sausages. *J. Food Eng.* 106, 166–169.
- Herráez-Hernández, R., Cháfer-Pericás, C., Verdú-Andrés, J., Campíns-Falcó, P., 2006. An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1104, 40–46.
- Hong, S., Albu, R., Labbe, C., Lasuye, T., Stasik, B., 2006. Preparation and characterization of colloidal dispersions of vinyl alcohol – vinyl acetate copolymers: application as stabilizers for vinyl chloride suspension polymerization. *Polym. Int.* 55, 1426–1434.
- Hotchkiss, J.H., Scanlan, R.A., Libbey, L.M., 1977. Formation of bis (hydroxyalkyl)-N-nitrosamines as products of the nitrosation of spermidine. *J. Agric. Food Chem.* 25, 1183–1189.
- Howgate, P., 2006. A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 341–353.
- Huang, L., Zhao, J., Chen, Q., Zhang, Y., 2014. Nondestructive measurement of total volatile basic nitrogen (TVB-N) in pork meat by integrating near infrared spectroscopy, computer vision and electronic nose techniques. *Food Chem.* 145, 228–236.
- Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., 1991. Chemical sensors: definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* 63, 1247–1250.
- Huss, H.H., 1995. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO Documento Técnico de Pesca 348.
- Iglesias, J., Gallardo, J.M., Medina, I., 2010. Determination of carbonyl compounds in fish species samples with SPME with on fiber derivatization. *Food Chem.* 123, 771–778.
- Iglesias, J., Medina, I., 2008. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr. A* 1192, 9–16.
- Iglesias, J., Medina, I., Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., 2009. Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea

- breem fish by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 115, 1473–1478.
- J. M. Barrero Moreno, 2003. Review on the Application of (Bio) chemical Sensors for Air Monitoring of Volatile Organic Compounds. Italia.
- Jenik, M., Schirhagl, R., Schirk, C., Hayden, O., Lieberzeit, P., Blaas, D., Paul, G., Dickert, F.L., 2009. Sensing picornaviruses using molecular imprinting techniques on a QCM. *Anal. Chem.* 81, 5320–5326.
- Johnson, D.W., 2008. A flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous measurement of trimethylamine and trimethylamine N-oxide in urine. *J. mass Spectrom.* 43, 495–499.
- Johnston, W.A., Nicholson, F.J., Roger, A., Stroud, G.D., 1994. Freezing and refrigerated storage in fisheries. FAO Fisheries Technical Paper No. 340. Rome.
- Jones, P.R.H., Ewen, R.J., Ratcliffe, N.M., 1998. Simple Methods for the Extraction and Identification of Amine Malodurs from Spoiled Foodstuffs. *J. food Compos. Anal.* 11, 274–279.
- Joyner, J.L., Peyer, S.M., Lee, R.W., 2003. Possible roles of sulfur-containing amino acids in a chemoautotrophic bacterium-mollusc symbiosis. *Biol. Bull.* 205, 331–338.
- Karim, N.U., Kennedy, T., Linton, M., Watson, S., Gault, N., Patterson, M.F., 2011. Effect of high pressure processing on the quality of herring (*Clupea harengus*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stored on ice. *Food Control* 22, 476–484.
- Kelly, R.H., Yancey, P.H., 1999. High Contents of Trimethylamine Oxide Correlating With Depth in Deep-Sea Teleost Fishes, Skates, and Decapod Crustaceans . *Biol. Bull.* 196, 18–25.
- Kimura, M., Seki, N., Kimura, I., 2002. Enzymic and nonenzymic cleavage of trimethylamine-N-oxide in vitro at subzero temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi* 68, 85–91.
- Kirschbaum, J., Rebscher, K., Bruckner, H., 2000. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *J. Chromatogr. A* 881, 517–530.
- Korotcenkov, G., Cho, B., 2011. Introduction to chemical sensor technologies, in: Korotcenkov, G. (Ed.), *Chemical Sensors: Comprehensive Sensor Technologies. Vol 4: Solid-State Devices.* Momentum Press, pp. 1–38.
- Krause, I., Bockhardt, A., Neckermann, H., Henle, T., Klostermeyer, H., 1995. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *J. Chromatogr.* 715, 67–79.
- Kyu Lee, S., Kim, D.-H., Jin, C., Hyun Yoo, H., 2010. Determination of Urinary Trimethylamine and Trimethylamine N-oxide by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Mixed-Mode Stationary Phases. *Bull. Korean Chem. Soc.* 31, 483–486.
- Ladikos, D., Lougovois, V., 1990. Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food Chem.* 35, 295–314.
- Lanza, F., Hall, a. ., Sellergren, B., Bereczki, a, Horvai, G., Bayoudh, S., Cormack, P. a. ., Sherrington, D., 2001. Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of

- molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine. *Anal. Chim. Acta* 435, 91–106.
- Lasagabaster, A., Martínez de Marañón, I., 2012. Sensitivity to pulsed light technology of several spoilage and pathogenic bacteria isolated from fish products. *J. Food Prot.* 75, 2039–2044.
- Lee, J.-L., Levin, R.E., 2007. Quantification of total viable bacteria on fish fillets by using ethidium bromide monoazide real-time polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.* 118, 312–317.
- Leelapongwattana, K., Benjakul, S., Visessanguan, W., K. Howell, N., 2005. Physicochemical and biochemical changes during frozen storage of minced flesh of lizard fish (*Saurida micropectoralis*). *Food Chem.* 90, 141–150.
- Leon, A., Chica, A., Garcia-Raurich, J., Centrich, F., 1994. Determination of trimethylamine in fish by flow injection analysis. *Quim. Anal.* 13, 78–81.
- Li, F., Liu, H.-Y., Xue, C.-H., Xin, X., Xu, J., Chang, Y., Xue, Y., Yin, L., 2009. Simultaneous determination of dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-n-oxide in aquatic products extracts by ion chromatography with non-suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr. A* 1216, 5924–5926.
- Li, P., Rong, F., Yuan, C., 2003. Morphologies and binding characteristics of molecularly imprinted polymers prepared by precipitation polymerization. *Polym. Int.* 52, 1799–1806.
- Liao, Y., Wang, W., Wang, B., 1999. Building Fluorescent Sensors by Template Polymerization : The Preparation of a Fluorescent Sensor for L -Tryptophan. *Bioorg. Chem.* 27, 463–476.
- Lin, T.-Y., Hu, C.-H., Chou, T.-C., 2004. Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor. *Biosens. Bioelectron.* 20, 75–81.
- Lippman, S., Nash, K., 1990. Monoamine Oxidase Inhibitor Update. *Drug Saf.* 5, 195–204.
- Liu, F., Liu, X., Ng, S., Chan, H., 2006. Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of l-tryptophan. *Sensors Actuators B Chem.* 113, 234–240.
- Maggiaris, D., Goulas, A., Alexopoulos, A.H., Chatzi, E.G., Kiparissides, C., 2000. Prediction of particle size distribution in suspension polymerization reactors : effect of turbulence nonhomogeneity. *Chem. Eng. Sci.* 55, 4611–4627.
- Mahony, J.O., Molinelli, A., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B., 2006. Anatomy of a successful imprint: Analysing the recognition mechanisms of a molecularly imprinted polymer for quercetin. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1383–1392.
- Mamer, O.A., Choinière, L., Lesimple, A., 2010. Measurement of urinary trimethylamine and trimethylamine oxide by direct infusion electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 406, 80–82.
- Mao, H.-M., Chen, B.-G., Qian, X.-M., Liu, Z., 2009. Simultaneous determination of twelve biogenic amines in serum by high performance liquid chromatography. *Microchem. J.* 91, 176–180.
- Maqsood, S., Benjakul, S., 2011. Effect of bleeding on lipid oxidation and quality changes of Asian seabass (*Lates calcarifer*) muscle during iced storage. *Food Chem.* 124, 459–467.

- Martinsdottir, E., Schelvis, R., Hyldig, G., Sveinsdottir, K., 2009. Sensory evaluation of seafood: methods, in: Rehbein, H., Oehlenschläger, J. (Eds.), *Fishery products: Quality, safety and authenticity*. Wiley-Blackwell, pp. 425–443.
- Martinsdottir, E., Sveinsdottir, K., Luten, J., Schelvis-Smit, R., Hyldig, G., 2001. Reference manual for the fish sector: Sensory evaluation of fish freshness. QIM-Eurofish, The Netherlands.
- Mayes, a G., Whitcombe, M.J., 2005. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1742–78.
- Melucci, D., Xie, M., Reschiglian, P., Torsi, G., 1999. FMOCl as derivatizing agent for the analysis of amino acids and dipeptides by the absolute analysis method. *Chromatographia* 49, 317–320.
- Meseguer Lloret, S., Molins Legua, C., Campins-Falco, P., 2002. P reconcentration and dansylation of aliphatic amines using C18 solid-phase packings Application to the screening analysis in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 978, 59–69.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, 1991. Orden de 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y la acuicultura. BOE 195, 27153–27155.
- Mitsubayashi, K., Kuboetara, Y., Yano, K., Hashimoto, Y., Kon, T., Nakakura, S., Nishi, Y., Endo, H., 2004. Trimethylamine biosensor with flavin-containing monooxygenase type 3 (FMO3) for fish-freshness analysis. *Sensors Actuators B* 103, 463–467.
- Mizuguchi, T., Kumazawa, K., Yamashita, S., Safey, J., 2011. Factors that accelerate dimethylamine formation in dark muscle of three gadoid species during frozen storage. *food Sci. Technol.* 77, 143–149.
- Montes-Navajas, P., A.Baumes, L., Corma, A., Garcia, H., 2009. Dual-response colorimetric sensor array for the identification of amines in water based on supramolecular host–guest complexation. *Tetrahedron Lett.* 50, 2301–2304.
- Nielsen, M.K., Jorgensen, B.M., 2004. Quantitative Relationship between Trimethylamine Oxide Aldolase Activity and Formaldehyde Accumulation in White Muscle from Gadiform Fish during Frozen Storage. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3814–3822.
- Nüzeki, N., Daikoku, T., Hirata, T., El-Shourbagy, I., Song, X., Sakaguchi, M., 2002. Mechanism of biosynthesis of trimethylamine oxide from choline in the teleost tilapia, *Oreochromis niloticus*, under freshwater conditions. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 131, 371–86.
- Oehlenschläger, J., Rehbein, H., 2009. Basic facts and figures, in: Oehlenschläger, J., Rehbein, H. (Eds.), *Fishery products: Quality, safety and authenticity*. Wiley-Blackwell, pp. 1–18.
- Olafsdottir, G., 2005. Volatile compounds as quality indicators in chilled fish: Evaluation of microbial metabolites by an electronic nose. *Fac. Sci. Dep. food Sci. Nutr.* University of Iceland, Reykjavik.
- Olafsdottir, G., Jonsdottir, R., Lauzon, H.L., Luten, J., Kristbergsson, K., 2005. Characterization of Volatile Compounds in Chilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets by Gas Chromatography and Detection of Quality Indicators by an Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10140–10147.

- Olafsdottir, G., Martinsdottir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henehan, G., Nielsen, J., Nilsen, H., 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 258–265.
- Olafsdottir, G., Nesvadba, P., Di Natale, C., Careche, M., Oehlenschläger, J., Tryggvadóttir, S. V., Schubring, R., Kroeger, M., Heia, K., Esaiassen, M., Macagnano, A., Jørgensen, B.M., 2004. Multisensor for fish quality determination. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 86–93.
- Ottavian, M., Fasolato, L., Facco, P., Barolo, M., 2013. Foodstuff authentication from spectral data: Toward a species-independent discrimination between fresh and frozen–thawed fish samples. *J. Food Eng.* 119, 765–775.
- Ozdestan, O., Uren, A., 2009. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta* 78, 1321–1326.
- Ozogul, F., Taylor, K.D.A., Quantick, P., Ozogul, Y., 2002. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 515–522.
- Paleologos, E.K., Chytiri, S.D., Savvaidis, J.N., Kontominas, M.G., 2003. Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. A* 1010, 217–224.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., Bendicho, C., 2010. Colorimetric assay for determination of trimethylamine-nitrogen (TMA-N) in fish by combining headspace-single-drop microextraction and microvolume UV–vis spectrophotometry. *Food Chem.* 119, 402–407.
- Perez Moral, N., Mayes, A.G., 2003. Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Anal. Chim. Acta* 504, 15–21.
- Peris, M., Escuder-Gilabert, L., 2009. A 21st century technique for food control: Electronic noses. *Anal. Chim. Acta* 638, 1–15.
- Piletska, E. V., Guerreiro, A.R., Romero-Guerra, M., Chianella, I., Turner, A.P.F., Piletsky, S. a, 2008. Design of molecular imprinted polymers compatible with aqueous environment. *Anal. Chim. Acta* 607, 54–60.
- Piletsky, S. a, Piletska, E. V., Bossi, a, Karim, K., Lowe, P., Turner, a P., 2001. Substitution of antibodies and receptors with molecularly imprinted polymers in enzyme-linked and fluorescent assays. *Biosens. Bioelectron.* 16, 701–7.
- Piletsky, S.A., Turner, A.P.F., 2002. Electrochemical Sensors Based on Molecularly Imprinted Polymers. *Electroanalysis* 14, 317–323.
- Puoci, F., Curcio, M., Cirillo, G., Iemma, F., Spizzirri, U.G., Picci, N., 2007. Molecularly imprinted solid-phase extraction for cholesterol determination in cheese products. *Food Chem.* 106, 836–842.
- Puoci, F., Garreffa, C., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U., Picci, N., 2005. Molecularly imprinted solid phase extraction for detection of sudan I in food matrices. *Food Chem.* 93, 349–353.

- Quaglia, M., De Lorenzi, E., Sulitzky, C., Massolini, G., Sellergren, B., 2001. Surface initiated molecularly imprinted polymer films: a new approach in chiral capillary electrochromatography. *Analyst* 126, 1495–1498.
- Quaglia, M., Sellergren, B., De Lorenzi, E., 2004. Approaches to imprinted stationary phases for affinity capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A* 1044, 53–66.
- Rajabi Khorrami, a, Narouenezhad, E., 2011. Synthesis of molecularly imprinted monolithic fibers for solid-phase microextraction of acetaldehyde from head-space of beverages stored in PET bottles. *Talanta* 86, 58–63.
- Rajabi Khorrami, A., Rashidpur, A., 2009. Design of a new cartridge for selective solid phase extraction using molecularly imprinted polymers: Selective extraction of theophylline from human serum samples. *Biosens. Bioelectron.* 25, 647–651.
- Reddi, P.K., Constantinides, S.M., Dymaza, H.A., 1972. Catheptic activity of fish muscle. *J. Food Sci.* 37, 643–648.
- Reece, P., 1983. The role of oxygen in the production of formaldehyde in frozen minced cod muscle. *J. Sci. Food Agric.* 34, 1108–1112.
- Rey-Mansilla, M. del M., Sotelo, C.G., Aubourg, S.P., Rehbein, H., Havemeister, W., Jorgensen, B., Nielsen, M.K., 2001. Localization of formaldehyde production during frozen storage of european hake (*Merluccius merluccius*). *Eur. food Res. Technol.* 213, 43–47.
- Rodriguez Lopez, M., Gonzalez Alvarez, M.J., Miranda Ordieres, A.J., Tuñon Blanco, P., 1996. Determination of dimethylamine in groundwater by liquid chromatography and precolumn derivatization with 9- fluorenylmethylchloroformate. *J. Chromatogr.* 721, 231–239.
- Romero, J., Navarrete, P., 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microb. Ecol.* 51, 422–30.
- Rosengren, A.M., Karlsson, B.C.G., Nicholls, I. a, 2013. Consequences of morphology on molecularly imprinted polymer-ligand recognition. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1207–1217.
- Sadok, S., Uglow, R.F., Haswell, S.J., 1996a. Determination of trimethylamine oxide in seawater and small volumes of seafood tissue extract using flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 334, 279–285.
- Sadok, S., Uglow, R.F., Haswell, S.J., 1996b. Determination of trimethylamine in fish by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 321, 69–74.
- Saito, H., Kaneko, Y., Hashimoto, Y., Shirai, T., Kudo, H., Otsuka, K., Mitsubayashi, K., 2007. Ammonia bio-sniffer with flavin-containing monooxygenase. *Sensors Actuators B* 123, 877–881.
- Saito, T., Arai, K., Matsuyoshi, M., 1959. A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. japanese Soc. Sci. Fish.* 24, 749–750.
- Schirmer, C., Meisel, H., 2006. Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey. *J. Chromatogr. A* 1132, 325–328.
- Secretaría General de Pesca, 2014. El mercado del jurel 2014. Madrid.
- Secretaría General de Pesca., 2014. El mercado de la merluza 2014. Madrid.

- Sellergren, B., 1999. Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions. *Trends Anal. Chem.* 18, 164–174.
- Shea, K.J., Sasaki, D.Y., 1989. On the control of microenvironment shape of functionalized network polymers prepared by template polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 3442–3444.
- Shewan, J.M., Macintosh, R.G., Tucker, C.G., Ehrenberg, A.S.C., 1953. The development of a numerical scoring system for the sensory assessment of the spoilage of wet white fish stored in ice. *J. Sci. Food Agric.* 4, 283–298.
- Sivertsen, A.H., Kimiya, T., Heia, K., 2011. Automatic freshness assessment of cod (*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *J. Food Eng.* 103, 317–323.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T., 2002. Review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products-significance of microbial growth, activities and safety. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 107–127.
- Sohn, J.-H., Taki, Y., Ushio, H., Kohata, T., Shioya, I., Ohshshima, T., 2005. Lipid Oxidations in Ordinary and Dark Muscles of Fish : Influences on Rancid Off-odor Development and Color Darkening of Yellowtail Flesh During Ice Storage. *J. Food Sci.* 70, 490–496.
- Spivak, D. a, 2005. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 1779–1794.
- Svanevik, C.S., Lunestad, B.T., 2011. Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Int. J. Food Microbiol.* 151, 164–170.
- Takagishi, T., Klotz, I.M., 1972. Macromolecule-small molecule interactions; introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages. *Biopolymers* 11, 483–491.
- Taylor, S.L., Eitenmiller, R.R., 1986. Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* 17, 91–128.
- Teerlink, T., Hennekes, M.W.T., Mulder, C., Brulez, H.F.H., 1997. Determination of dimethylamine in biological samples by highperformance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 691, 269–276.
- Tejada, M., 2009. ATP derived products and K value determination, in: Oehlenschläger, J., Rehbein, H. (Eds.), *Fishery products: Quality, safety and auntheticity*. Wiley-Blackwell, pp. 68–88.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *J. Food Biochem.* 31, 266–287.
- Timm, M., Jørgensen, B.M., 2002. Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-n-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chem.* 76, 509–518.
- Tokur, B., Korkmaz, K., 2007. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chem.* 104, 754–760.
- Triqui, R., 2006. Sensory and flavor profiles as a means of assessing freshness of hake (*Merluccius merluccius*) during ice storage. *Eur. food Res. Technol.* 222, 41–47.

- Triqui, R., Bouchriti, N., 2003. Freshness Assessments of Moroccan Sardine (*Sardina pilchardus*): Comparison of Overall Sensory Changes to instrumentally determined volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7540–7546.
- Tsakagoshi, K., Yu-Yu, K., Maeda, M., Tagaki, M., Miyajima, T., 1995. Surface imprinting: Characterization of a latex resin and the origin of the imprinting effect. *Bull. Chem. Soc. Japan* 68, 3095–3103.
- Tsuru, N., Kikuchi, M., Kawaguchi, H., Shiratori, S., 2006. A quartz crystal microbalance sensor coated with MIP for “Bisphenol A” and its properties. *Thin Solid Films* 499, 380–385.
- Turiel, E., Tadeo, J.L., Cormack, P. a G., Martin-Esteban, A., 2005. HPLC imprinted-stationary phase prepared by precipitation polymerisation for the determination of thiabendazole in fruit. *Analyst* 130, 1601–1607.
- Uauy, R., Valenzuela, A., 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition* 16, 680–684.
- Varlet, V., Fernández, X., 2010. Sulfur containing volatile compounds in seafood: occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Review. Food Sci. Technol. Int.* 16, 463–503.
- Wang, H.Y., Xia, S.L., Sun, H., Liu, Y.K., Cao, S.K., Kobayashi, T., 2004. Molecularly imprinted copolymer membranes functionalized by phase inversion imprinting for uracil recognition and permselective binding. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 804, 127–134.
- Wang, W., Gao, S., Wang, B., Carolina, N., 1999. Building Fluorescent Sensors by Template Polymerization : The Preparation of a Fluorescent Sensor for D -Fructose. *Org. Lett.* 1, 1209–1212.
- Wei, S., Mizaikoff, B., 2007. Binding site characteristics of 17 beta-estradiol imprinted polymers. *Biosens. Bioelectron.* 23, 201–209.
- Wierda, R.L., Fletcher, G., Xu, L., Dufour, J.P., 2006. Analysis of Volatile Compounds as Spoilage Indicators in Fresh King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) During Storage Using SPME -GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8480–8490.
- Wu, A.-H., Syu, M.-J., 2006. Synthesis of bilirubin imprinted polymer thin film for the continuous detection of bilirubin in an MIP/QCM/FIA system. *Biosens. Bioelectron.* 21, 2345–2353.
- Wulff, G., Sarhan, A., 1972. Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung. *Angew. Chemie* 84, 364.
- Yan, H., Tian, M., Row, K.H., 2008. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in milk using molecularly imprinted solid-phase extraction. *J. Sep. Sci.* 31, 3015–3020.
- Yang, J., Hu, Y., Cai, J.B., Zhu, X.L., Su, Q.D., Hu, Y.Q., Liang, F.X., 2007. Selective hair analysis of nicotine by molecular imprinted solid-phase extraction: an application for evaluating tobacco smoke exposure. *Food Chem. Toxicol.* 45, 896–903.
- Yaqub, S., Latif, U., Dickert, F.L., 2011. Plastic antibodies as chemical sensor material for atrazine detection. *Sensors Actuators B Chem.* 160, 227–233.
- Ye, L., Cormack, P. a G., Mosbach, K., 1999. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. *Anal. Commun.* 36, 35–38.
- Ye, L., Cormack, P.A.G., Mosbach, K., 2001. Molecular imprinting on microgel spheres. *Anal. Chim. Acta* 435, 187–196.

- Yegin, S., Uren, A., 2008. Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. *Food Chem.* 111, 983–987.
- Yen, G.C., Hsieh, C.L., 1991. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *J. Food Sci.* 56, 158–160.
- Yin, J., Yang, G., Chen, Y., 2005. Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its l-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers. *J. Chromatogr. A* 1090, 68–75.
- Yu, C., Mosbach, K., 1998. Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group. *J. Mol. Recognit.* 11, 69–74.
- Zhai, H., Yang, X., Li, L., Xia, G., Cen, J., Huang, H., Hao, S., 2012. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China. *Food Control* 25, 303–308.
- Zhang, J., Zhu, Y., 2007. Determination of betaine, choline and trimethylamine in feed additive by ion-exchange liquid chromatography/ non-suppressed conductivity detection. *J. Chromatogr. A* 1170, 114–117.
- Zhang, Z., Li, G., Luo, L., Chen, G., 2009. Study on seafood volatile profile characteristics during storage and its potential use for freshness evaluation by headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 659, 151–158.
- Zhong, Z., Li, G., Luo, Z., Zhu, B., 2012. Multi-channel purge and trap system coupled with ion chromatography for the determination of alkylamines in cosmetics. *Anal. Chim. Acta* 715, 49–56.
- Zhou, W., Zhang, X.Y., Duan, G.L., 2011. Liquid-Chromatography Quantitative Analysis of 20 Amino Acids after Derivatization with FMOC-Cl and Its Application to Different Origin Radix isatidis. *J. chinese Chem. Soc.* 58, 509–515.
- Zhu, X., Yang, J., Su, Q., Cai, J., Gao, Y., 2005. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. *J. Chromatogr. A* 1092, 161–169.



**CAPÍTULO**

**2**

**OBJETIVOS**



El objetivo principal de esta tesis ha sido el diseño de nuevos sistemas de detección con los que poder evaluar la calidad de los productos pesqueros en estadios de deterioro muy tempranos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Desarrollar una metodología multianalito capaz de determinar concentraciones bajas de aminas volátiles y correlacionarla con una metodología de referencia. Asimismo evaluar su aplicabilidad a distintos tipos de productos pesqueros para demostrar su validez.
2. Caracterizar el contenido en aminas volátiles y aldehídos del músculo de pescado y de la atmósfera de pescado envasado en distintas condiciones de almacenamiento para establecer el mejor biomarcador para cada condición.
3. Poner a punto una metodología para capturar la atmósfera que rodea el pescado de un modo eficaz y reproducible con el fin de conseguir un método no destructivo para la evaluación de la calidad de los productos pesqueros.
4. Determinar si el pescado ha sufrido un proceso de congelación. Aprovechar la adaptación del metabolismo de los microorganismos de deterioro específico a las distintas temperaturas de almacenamiento para discriminar entre el pescado fresco y el congelado-descongelado.
5. Desarrollar nuevos materiales sintéticos (polímeros de impresión molecular) con afinidad específica por la TMA para poder ser utilizados como elementos de reconocimiento en sensores o materiales de envasado. Utilizar cromóforos o fluoróforos en la síntesis de MIPs para basar la detección en una medida colorimétrica o fluorimétrica.



**CAPÍTULO**

**3**

SELECCIÓN Y DESARROLLO  
DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS  
PARA AMINAS PRIMARIAS,  
SECUNDARIAS Y TERCIARIAS



En este capítulo se abordará el proceso de selección de un agente derivatizante que permita mejorar las metodologías existentes para la cuantificación de aminas terciarias, secundarias y primarias. Para ello se seleccionaron distintas metodologías ya existentes para intentar mejorar sus características o adaptarlas como puedan ser la metodología desarrollada por Dyer con ácido pícrico, el cloruro de benzoilo o el sulfato de dipropilo por enumerar algunas. Por otro lado se desarrolló y validó una nueva metodología a partir del bromoacetato de tertbutilo.

### 3.1 -Materiales, equipos y software

En este apartado se enumeran los distintos reactivos, equipos y softwares utilizados en común a lo largo de los distintos experimentos del capítulo 3.

#### 3.1.1 -REACTIVOS Y DISOLVENTES:

El hidrocloreto de trimetilamina (98%), hidrocloreto de dimetilamina (99%), hidrocloreto de metilamina (purum), dihidrocloreto de histamina (>99%), dihidrato de óxido de trimetilamina (>99%), así como los agentes derivatizantes bromoacetato de etilo y sulfato de dipropilo fueron comprados en Sigma (St. Louis, EEUU). Se prepararon soluciones stock en agua que fueron almacenadas a 4°C durante no más de un año y las diluciones pertinentes se prepararon a diario.

El hidrato de cloruro de tetraetilamonio (99%) y el bromoacetato de tert-butilo (98%) fueron comprados en Acros organics (Geel, Bélgica).

El cloruro de benzoilo (PA-ACS), ácido clorhídrico (37%), ácido acético (glacial) y azul de metileno fueron comprados en Panreac (Barcelona, España), el resto de cromóforos utilizados, la tionina, el naranja de acridina, la pironina (99%), el hidrocloreto de proflavina (95%), así como las ciclodextrinas que se utilizaron para determinados experimentos con cromóforos,  $\alpha$  - ciclodextrina (98%) y  $\gamma$  - ciclodextrina, fueron suministradas por Sigma, así como el Tween 20, ácido butanoico (99%) y la sal sódica del ácido 1-octanesulfónico.

El ácido fórmico (98-100%) fue suministrado por Scharlau (Barcelona, España).

En cuanto a los disolventes utilizados, el acetonitrilo y el metanol han sido suministrados por ROMIL (Cambridge, Reino Unido) en calidad ultrapura para cromatografía líquida acoplada

a espectrometría de masas, mientras que el agua milli Q fue dispensada mediante un sistema Q-pod de Millipore (Bedford, EEUU).

El hidróxido sódico, hidróxido potásico y cloruro sódico fueron adquiridos a Fisher (Watham, EEUU) con calidad de grado analítico.

### **3.1.2 -EQUIPOS:**

El equipo de cromatografía que se utilizó fue un cromatógrafo de líquidos Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 Series equipado con una bomba binaria, desgasificador, inyector automático, horno para columnas y detector de diodos acoplado a un equipo de espectrometría de masas Agilent Ion trap XCT-Plus operando en modo positivo con ionización en electrospray (ESI).

En el caso de los experimentos llevados a cabo con cromóforos y ciclodextrinas se utilizó un lector de placas TECAN Sunrise Remote A-5082 y el software de la misma casa comercial para obtener los valores de absorbancia a cada longitud de onda.

Para la determinación de los espectros de absorción de los distintos cromóforos así como para tomar las medidas de las muestras analizadas mediante el método del ácido pícrico se utilizó un espectrofotómetro Genesys 6 de Thermo Spectronic.

### **3.1.3 -SOFTWARE**

Para el análisis de datos generados en el HPLC-MS se utilizó el software Agilent 6300 series Ion Trap 6.1 Bruker Daltonics (Bremen, Alemania) y Chemstation software de Agilent.

Para el diseño experimental se utilizó el programa Unscrambler (Camo, Suecia).

## **3.2 -Utilización de par iónico**

### **3.2.1 -INTRODUCCIÓN.**

La trimetilamina y la dimetilamina son moléculas de bajo peso molecular que carecen de grupos cromóforos que faciliten su detección por métodos colorimétricos. Además, su alta polaridad hace que sean poco retenidas en una columna cromatográfica de fase inversa. La utilización

de un par iónico favorece la retención de las aminas volátiles debido a la formación de un complejo neutro (por una interacción iónica) con el par iónico.

En el campo de la alimentación, son numerosos los casos en que se ha utilizado esta técnica para la determinación de moléculas como aminas biógenas o sustancias como tintes, azúcares o determinados contaminantes como por ejemplo la melamina (Arlorio et al., 1999; Hernández-Jover et al., 1996; Ibáñez et al., 2009; Sánchez-López et al., 2009)

Para llevar a cabo el par iónico se utilizan moléculas de naturaleza iónica contraria a las moléculas de interés, de esta forma, para sustancias catiónicas se suelen utilizar sales de ácidos orgánicos y para sustancias aniónicas resultan de utilidad las sales de aminas cuaternarias o compuestos amino terciarios.

En esta tesis doctoral se han utilizado a modo de agentes de par iónico el ácido octanosulfónico y el ácido butanoico (Ver Figura 7).

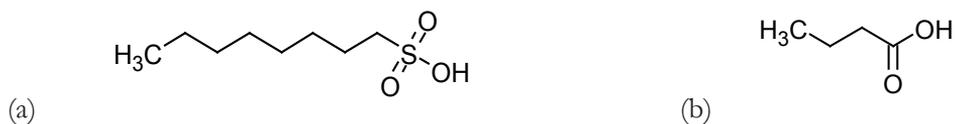


Figura 7: Estructura química del ácido octanosulfónico (a) y el ácido butanoico (b).

### 3.2.2 -MATERIALES Y MÉTODOS

Por pruebas hechas con TMA sin derivatizar ni añadir aditivo alguno en la fase móvil se sabía que este compuesto no se quedaba retenido en una columna tipo C18. Por eso se intentó con la ayuda de un par iónico, utilizando el ácido octanosulfónico y el ácido butanoico a un nivel de concentración 5 mM. Esta misma estrategia también se siguió para la determinación de la DMA e histamina a distintas concentraciones.

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna Luna C18 (150 x 2 mm, I.D. 5 μm) con una precolumna de la misma fase estacionaria. El horno de la columna se mantuvo a 30°C y la fase móvil estaba constituida por H<sub>2</sub>O 5 mM ácido octanosulfónico pH 3,6 (A) y MeCN 5 mM ácido octanosulfónico (B) o H<sub>2</sub>O 5 mM ácido butanoico pH: 4 (A) y MeCN 5 mM ácido butanoico (B) utilizando el gradiente de elución que aparece en la Tabla 5. Se trabajó a un flujo de 0,4 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μL.

Tabla 5: Gradiente de elución utilizado con el ácido octanosulfónico y ácido butanoico.

Tiempo (min)	%A	%B
0	95	5
15	0	100
20	0	100
22	95	5

Las condiciones del espectrómetro de masas utilizadas se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6: Valores del espectrómetro de masas utilizando ácido octanosulfónico y ácido butanoico.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Skimmer, V	40	Lens 1, V	-5
Capillary exit, V	106	Lens 2, V	-60
Octopole 1, V	12	Capillary, V	3500
Octopole 2, V	1,7	Nebulizer, psi	60
Trap Drive	30,7	Dry gas, L	7
Octopole RF, V	131,2	Dry temperature, °C	350

### 3.2.3 -RESULTADOS

Debido al bajo peso molecular de la trimetilamina, la sensibilidad del equipo de espectrometría de masas no resultó suficiente para poder utilizar esta técnica como metodología de análisis. Asimismo la ausencia de grupos cromóforos en su estructura química hace que su detección mediante metodologías UV o utilizando DAD resulte imposible.

Cuando se utilizó el ácido octanosulfónico para crear un par iónico con la TMA, solo se observaron resultados positivos al alcanzar una concentración de 100 ppm. En la Figura 8 a un tiempo de retención de 2 min, se observa un pico cuyo espectro de masas se corresponde con la TMA.

Sin embargo, al utilizar el ácido butanoico 5 mM como aditivo la sensibilidad aumentó a pesar de que en este caso, se apreciaba un mayor ruido de fondo. En estas condiciones se realizó un calibrado desde 1 ppm hasta 100 ppm.

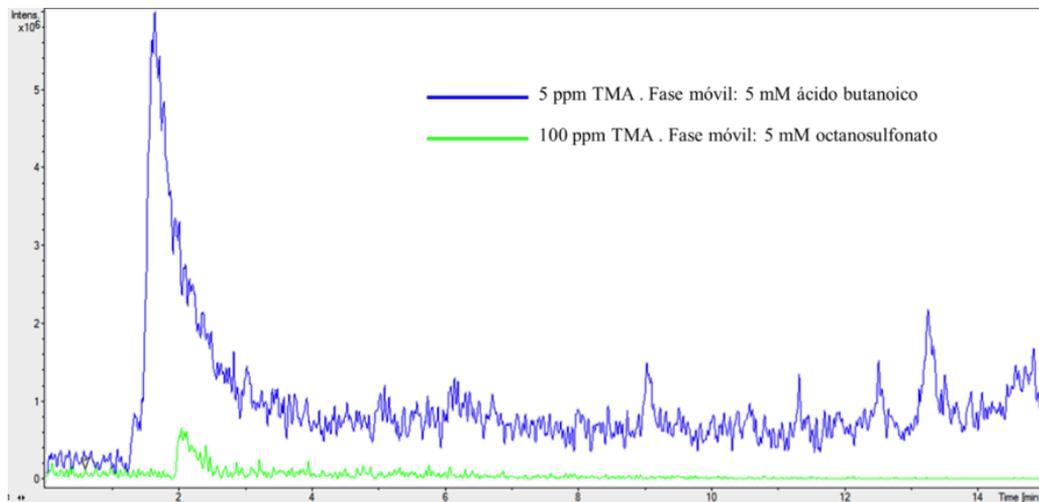


Figura 8: Diferencias entre el octanosulfonato y el ácido butanoico utilizados para crear un par iónico. Los cromatogramas se corresponden a la extracción del  $m/z$ : 60, correspondiente a la TMA.

Como se aprecia en la Figura 9, aunque a simple vista se aprecia una buena linealidad, con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,997, de la recta de calibrado se extrae un valor de límite de cuantificación (LOQ) de 1,08 ppm, un valor insuficiente para nuestro objetivo de cuantificar a concentraciones bajas. La TMA tiene un bajo  $m/z$ , algo que también impide obtener unos mejores resultados si no se derivatiza.

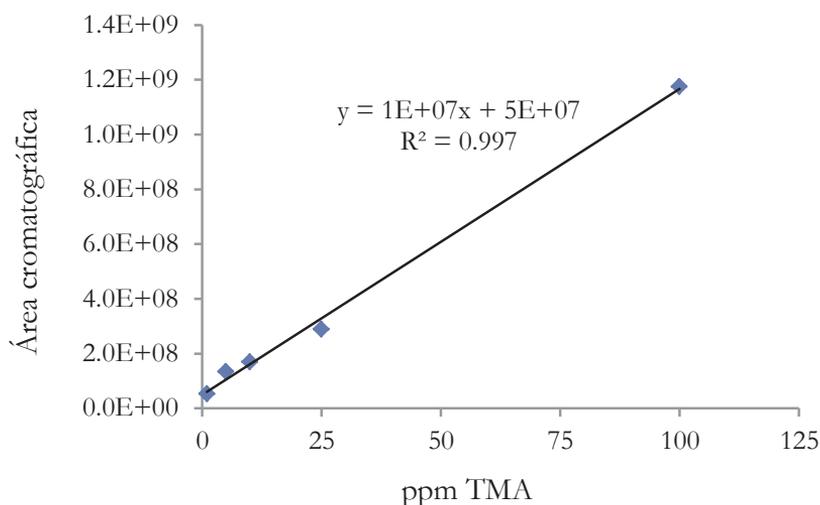


Figura 9: Calibrado de 1 a 100 ppm de TMA Fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua con ácido butanoico 5 mM.

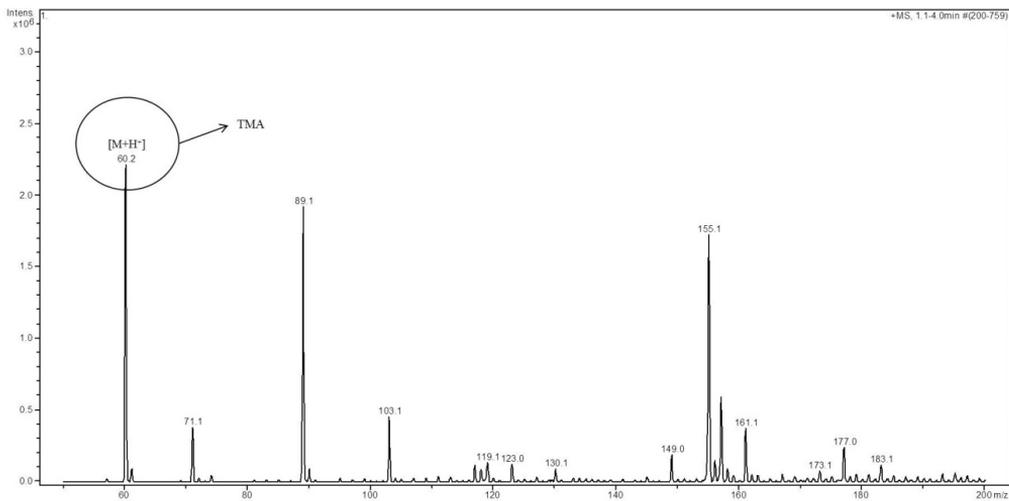


Figura 10: Espectro de masas del pico correspondiente a la TMA. Fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua con ácido butanoico 5 mM.

En el espectro de la Figura 10, se puede ver que el ion mayoritario es el  $m/z$ : 60, que se corresponde con el de la trimetilamina ( $M+H^+$ ), con lo que se confirma la identidad del pico integrado. El hecho de que este compuesto aparezca junto al volumen muerto y no pueda separarse de este lo hace poco interesante ya que las interferencias de la muestra aparecerían siempre junto a él empeorando el nivel de sensibilidad. Por ese motivo se decidió seguir buscando una metodología que permitiese aumentar la sensibilidad y que al mismo tiempo pudiese ser multianalito.

En el caso de la histamina (HIS) utilizando el ácido octanosulfónico el compuesto quedó retenido en la columna (minuto 12). La detección fue posible tanto por su señal UV (210 nm) como confirmada por su espectro de masas ( $m/z$ : 112). En estas condiciones se obtuvo un LOQ de 0,7 ppm.

### 3.3 -Adaptación del método del ácido pícrico de Dyer

#### 3.3.1 -INTRODUCCIÓN

El método de Dyer para la determinación de la trimetilamina en pescado mediante la determinación espectrofotométrica del compuesto que se forma tras reaccionar con el ácido pícrico (Ver Figura 11), es el método de referencia adoptado por la AOAC (974.14) y su uso está ampliamente extendido en los laboratorios de análisis de alimentos. Publicado en

1945 (Dyer, 1945), consiste en una extracción con ácido perclórico del músculo de pescado para posteriormente eliminar de ese extracto las aminas primarias y secundarias mediante su condensación con el formaldehído (Howgate, 2009) (Figura 12).

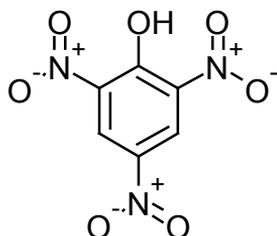


Figura 11: Estructura química del ácido pícrico.

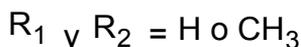
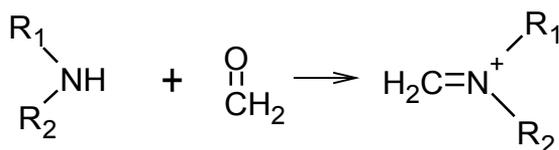


Figura 12: Esquema de reacción entre formaldehído y aminas primarias y secundarias.

Mediante la adición de tolueno e hidróxido potásico para basificar el medio, se lleva a cabo una extracción líquido-líquido en la que la trimetilamina pasa a la fase orgánica superior, de donde se tomará una alícuota para hacerla reaccionar con el ácido pícrico y generar el compuesto coloreado que será cuantificado a 410 nm (Ver Figura 13).

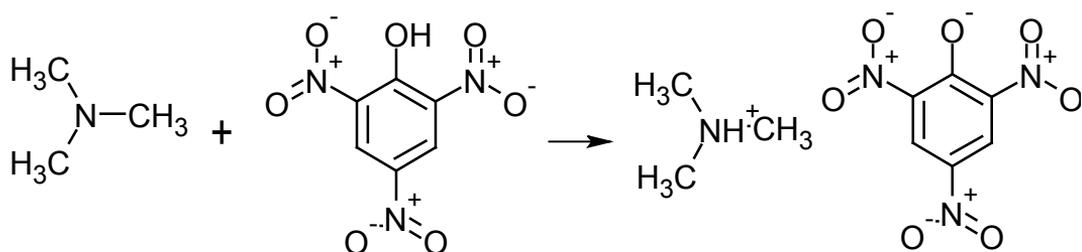


Figura 13: Esquema de la reacción entre al ácido pícrico y la trimetilamina.

Esta metodología clásica ha sido adaptada en ocasiones mediante su automatización en HPLC (Leon et al., 1994) o su miniaturización para llevar a cabo la extracción en un volumen del orden de microlitros (Pena-Pereira et al., 2010).

### 3.3.2 -MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder adaptar la metodología de Dyer al uso de distintos disolventes y aumentar así la sensibilidad, se llevaron a cabo experimentos utilizando como medio de reacción acetona, tetrahidrofurano, diclorometano y cloroformo. Como posibles medios de extracción se han probado ácido fosfórico, ácido perclórico, ácido clorhídrico, ácido acético y agua.

El protocolo seguido para estas pruebas tuvo como base el método oficial de la AOAC 974.14 de 1971 con ligeras modificaciones.

A 1 mL de los extractos (en los distintos medios de extracción) o de las disoluciones de calibrado se le añadieron 250  $\mu$ L de formaldehído al 10%, 2,5 mL de tolueno anhidro y 750  $\mu$ L de KOH al 45%. Se agitaron los tubos durante 2 minutos con la ayuda de un vórtex y se introdujeron en un baño termostatzado a 30°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se tomaron 1,5 mL de la fase superior y se introdujeron en otro tubo de ensayo al que previamente se había añadido sulfato sódico anhidro para eliminar los posibles restos de agua. Se agitó para permitir que el sulfato sódico anhidro entrase en contacto con toda la muestra y se tomó 1 mL del sobrenadante para llevarlo a otro tubo al que se añadió 1 mL de la disolución de ácido pícrico. Esta disolución de ácido pícrico se preparó disolviendo 200 mg de ácido pícrico en 10 mL de tolueno y haciendo una dilución 1/100 (v/v) en tolueno. Posteriormente se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 410 nm con cubetas de cuarzo, limpiando la cubeta con tolueno entre muestras.

Previamente se determinó la concentración de ácido pícrico que debía contener la disolución final.

### 3.3.3 -RESULTADOS

A la hora de sustituir el tolueno por otro disolvente, el hecho de trabajar con el diclorometano no aportó ninguna ventaja, también se formaron dos fases que hubo que separar y no se mejoró la sensibilidad, por lo que no se avanzó nada sobre el hecho de trabajar con tolueno. En el caso de trabajar con cloroformo, al juntarlo con una fase acuosa, éste se desplazó hacia la parte inferior por su menor densidad, lo que dificultó más todavía tomar una alícuota de la fase orgánica. El uso de acetona o el tetrahidrofurano tampoco permitió llevar a cabo la reacción de derivatización debido a la baja solubilidad de la trimetilamina en estos disolventes, que no permitió obtener una solución homogénea a las concentraciones de interés, por lo que en estos medios no fue posible llevar a cabo la reacción de derivatización.

El hecho de sustituir el ácido perclórico por otros ácidos (ácido acético 10 mM o ácido fosfórico 10 mM) no tuvo efectos negativos y se obtuvieron rectas de calibrado prácticamente idénticas (Figura 14).

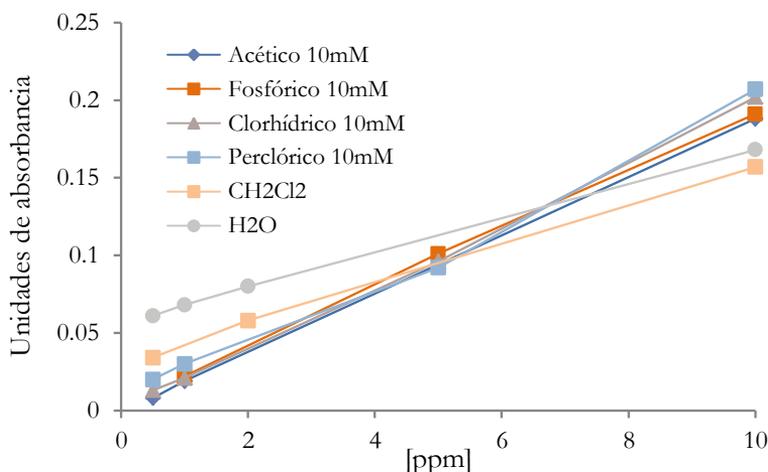


Figura 14: Calibrados de TMA-ácido pícrico en distintos disolventes.

En cuanto a la concentración de ácido pícrico necesaria para la reacción se comprobó que utilizando una dilución 1/100 de la solución madre (200 mg ácido pícrico en 10 mL de tolueno) los resultados eran mejores que utilizando una dilución 1/10, donde había una coloración excesiva de las muestras.

De todas las opciones testadas, la más interesante resultó la llevada a cabo con el ácido acético 10 mM, ya que además de ofrecer una sensibilidad suficiente, es el mismo disolvente utilizado en la metodología desarrollada a posteriori con el bromoacetato de tert-butilo, de modo que las dos metodologías, la desarrollada y la de referencia utilizan el mismo ácido para la extracción.

En cuanto a la sensibilidad, en la figura 14 se aprecia como el ácido acético 10 mM se encuentra entre los disolventes con mayores pendientes en la recta de calibrado junto a menores valores en la ordenada en origen.

### 3.4 -Cloruro de benzoilo

#### 3.4.1 -INTRODUCCIÓN

Se trata de una molécula que ha sido ampliamente utilizada como agente derivatizante para aminas biógenas (Hornero Mendez & Garrido Fernández, 1997; Hwang, et al., 1997; Onal, 2007; Ozogul et al., 2002; Paleologos et al., 2003; Rodrigues, 2013; Tang et al., 2009; Yegin & Uren, 2008), primarias y secundarias, y en algunos casos se ha utilizado para aminas terciarias

como la trimetilamina (Anderson, 2008), molécula de interés para esta tesis. A pesar de existir numerosos agentes derivatizantes para aminas biógenas, la formación de complejos con el cloruro de benzoílo (ver Figura 15) tiene la ventaja de presentar tiempos de retención bajos en columnas de fase reversa y que sus derivados no son sensibles a la luz (Ozdestan & Uren, 2009). Este reactivo fue utilizado por primera vez por Hsieh y Yen (Yen & Hsieh, 1991), basados en el protocolo de derivatización de Redmon y Tseng (Redmond & Tseng, 1979), llevando a cabo la derivatización de 9 aminas (putrescina, cadaverina, triptamina, 2-feniletilamina, espermidina, espermina, histamina, tiramina y agmatina) en conservas de pescado, cuyos productos de reacción fueron determinados mediante HPLC a una longitud de onda de 254 nm.

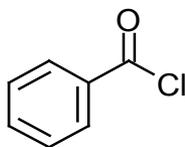


Figura 15: Estructura química del cloruro de benzoílo.

### 3.4.2 -MATERIALES Y MÉTODOS

El primer paso fue comprobar el espectro de masas del agente derivatizante, para lo cual se disolvió en MeOH y se analizó en el equipo HPLC-MS.

El protocolo seguido para llevar a cabo la reacción de derivatización se explica a continuación. En un tubo de ensayo se añadieron 50  $\mu$ L de una disolución de TMA (en agua), a lo cual se añadió 1 mL de NaOH para basificar el medio, posteriormente se añadió 1 mL de cloruro de benzoílo al 2% en MeCN o 10  $\mu$ L del mismo reactivo en estado puro, se agitó en el vórtex durante 1 minuto y se mantuvo a distintas temperaturas y distintos tiempos (Tabla 7). Pasado este tiempo se añadieron 2 mL de NaCl para parar la reacción y se realizaron dos extracciones seriadas (2mL+2mL) con éter dietílico. Se juntaron los dos sobrenadantes y se evaporó a sequedad, tras lo cual se reconstituyó en una mezcla 1:1 (v/v) de MeCN:H<sub>2</sub>O y se encapsuló en un vial de cromatografía para su posterior análisis.

A partir de este protocolo básico de derivatización se realizaron distintas variantes cambiando los parámetros que se consideró que podían afectar al rendimiento de la reacción dando lugar a los siguientes experimentos (ver Tabla 7).

Tabla 7: Experimentos llevados a cabo en la optimización de la reacción entre el cloruro de benzoilo y TMA.

Exp	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Extracción (mL)	NaOH (M)	Cloruro de Benzoilo	Tween (0,1 mL/mL)
1	20	21	4	2	Puro	-
2	30	21	4	4	Puro	-
3	20	21	4	4	Puro	-
4	120	21	4	4	Puro	-
5	20	30	4	4	Puro	-
6	60	30	4	4	Puro	-
7	120	30	4	4	Puro	-
8	20	40	4	4	Puro	-
9	20	40	4	2	Puro	-
10	60	40	4	4	Puro	-
11	20	21	4	2	2% en MeCN	-
12	20	21	-	2	2% en MeCN	-
13	20	4	4	2	2% en MeCN	-
14	20	21	4	2	2% en MeCN	50 µL

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna Luna C18 (150 x 2 mm, I.D. 5µm) con una precolumna de la misma fase estacionaria. El horno de la columna fue calentado a 30°C y la fase móvil estaba constituida por H<sub>2</sub>O (A) y MeCN (B) utilizando el gradiente de elución que aparece en la Tabla 8 y las condiciones del espectrómetro de masas que aparecen en la Tabla 9. Se trabajó a un flujo de 0,4 mL/min y el volumen de inyección fue de 5 µL.

Tabla 8: Gradiente de elución utilizado con cloruro de benzoilo.

Tiempo (min)	%A	%B
0	80	20
12	20	80
14	20	80
15	0	100
20	0	100
21	80	20

Tabla 9: Valores del espectrómetro de masas utilizando cloruro de benzoilo como agente derivatizante.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Skimmer, V	40	Lens 1, V	-5
Capillary exit, V	113,5	Lens 2, V	-60
Octopole 1, V	12	Capillary, V	3500
Octopole 2, V	1,70	Nebulizer, psi	60
Trap Drive	37,4	Dry gas, L	7
Octopole RF, V	152,8	Dry temperature, °C	350

### 3.4.3 -RESULTADOS

En un primer momento, se comprobó que al poner en contacto el reactivo con el MeOH, este reaccionaba, por lo que no se podía observar el espectro de masas del reactivo sino el de su producto de reacción con el MeOH (Figura 16 y Figura 17). Esto obligó a utilizar el MeCN para disolver el reactivo.

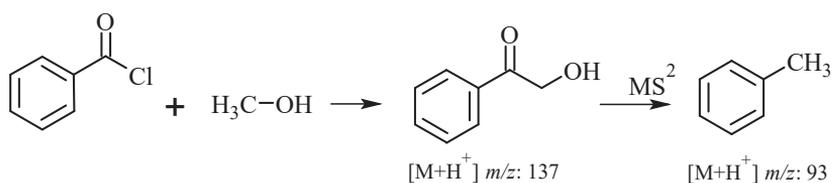


Figura 16: Esquema de reacción entre cloruro de benzoilo y metanol.

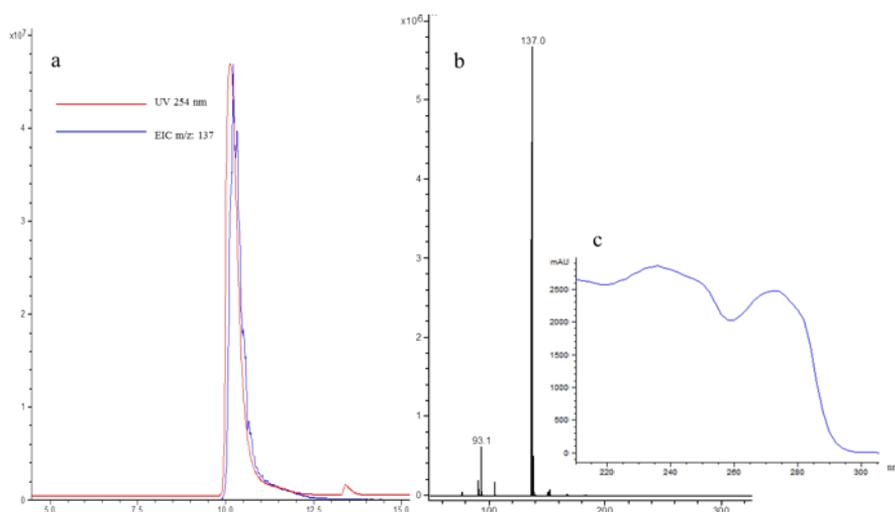


Figura 17: a) Señal UV a 254 nm superpuesta sobre el  $m/z$  137 extraído. b) Espectro de masas del pico cromatográfico. c) Espectro UV del pico cromatográfico.

En ninguno de los experimentos realizados se llegó a observar que la TMA hubiese reaccionado con el cloruro de benzoilo para formar un complejo estable. Se analizaron los datos UV a la longitud de onda a la que el reactivo es sensible (254nm) y también se estudiaron las absorbancias a otras longitudes de onda. En base a los diseños teóricos de la molécula generada (Figura 18) se estudiaron los espectros de masas en busca de esos iones sin que en ningún caso apareciesen.

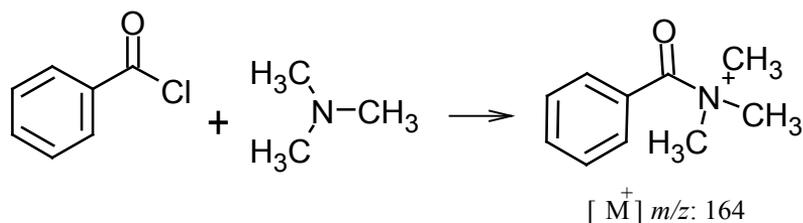


Figura 18: Esquema de la reacción entre el cloruro de benzoilo y la trimetilamina.

Al analizar los resultados del experimento 1, se observó que ninguno de los picos que se podían observar en el cromatograma tenía un máximo de absorbancia a 254 nm y que además ninguno presentaba un aumento en relación a la concentración de TMA, por lo que se procedió a analizar otras longitudes de onda para poder detectar otros posibles productos de reacción. Tras el análisis de otras longitudes de onda no se encontró ningún pico que resultase de interés.

Por este motivo se pasó a realizar los experimentos 2 y 3, en los que se aumentó el tiempo de reacción a 30 min y la concentración de la NaOH (4 M). En este caso en ninguna de las concentraciones se apreció ninguna diferencia con el blanco atribuible a la concentración.

Para obtener mayor información de las muestras se procedió a utilizar el espectrómetro de masas acoplado en tándem al detector DAD, así, en los experimentos 4-10 las muestras fueron analizadas por los dos detectores pero en ningún caso se llegó a identificar ningún ion que fuese resultado de la reacción del cloruro de benzoilo con la TMA.

En base a los trabajos llevados a cabo por Ozogul et al., 2002, que utiliza este reactivo para la derivatización de la trimetilamina, se pasaron a llevar a cabo los experimentos 11 y 12. En estos, el cloruro de benzoilo, se añadió diluido al 2% en MeCN. En el experimento 11 se llevó a cabo una extracción con éter dietílico y ante la falta de resultados positivos se decidió analizar la mezcla de reacción previa extracción, para comprobar así si los compuestos sintetizados estaban siendo mal extraídos y ese era el motivo de no ser detectados. En ambos casos no se encontró ningún compuesto que presentase un máximo de absorción a 254 nm ni se encontró ningún ion que aumentase con la concentración de TMA, indicando que hubiese habido reacción.

Sin embargo al realizar esta misma prueba con la dimetilamina (Figura 19) se observaron diferencias entre el blanco de reactivos y las concentraciones testadas. El ion que se observó fue el  $[M+H^+]$   $m/z$ : 150 .y se pudo establecer un intervalo lineal de 0,5-10 ppm (Figura 20) con un LOQ de 0,12 ppm.

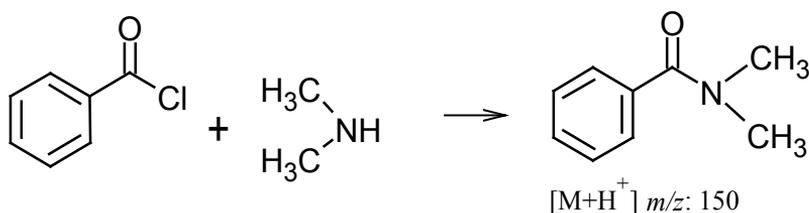


Figura 19: Esquema de reacción entre el cloruro de benzoilo y la dimetilamina.

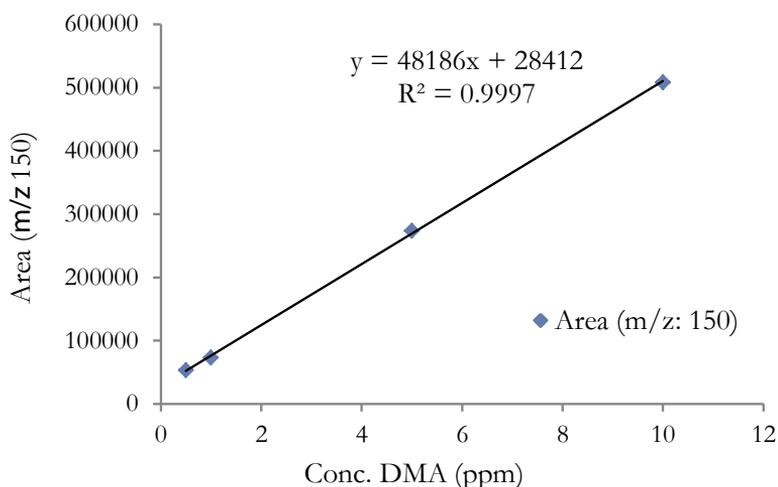


Figura 20: Recta de calibrado de DMA con cloruro de benzoilo (0,5-10 ppm).

Por último, se llevó a cabo la reacción a temperatura de refrigeración por si pudiese esto afectar positivamente a la reacción. Sobre todo teniendo en cuenta que la trimetilamina es un compuesto bastante volátil (a diferencia de las aminas biógenas, comúnmente analizadas con este agente derivatizante), y que el hecho de añadir NaOH 2 M o 4 M puede haber favorecido la volatilización de este compuesto previo a su reacción. Se pensó, por esto, que se podría favorecer su presencia en el medio de reacción disminuyendo su temperatura para evitar que se quedase en el espacio de cabeza de los tubos de reacción. Los resultados demostraron que al igual que en los casos anteriores, no se había formado ningún compuesto que tuviese un máximo de absorbancia a 254 nm ni se encontró ningún ion que aumentase con la concentración de TMA añadida.

Siguiendo los pasos de Paleologos et al., 2003 se intentó abordar la detección de los productos de reacción mediante otro proceso, por el cual estos productos se quedan retenidos en micelas formadas por el agente surfactante Tween y de esta manera suprimir la extracción con éter dietílico. En este caso tampoco se identificó ningún ion que pudiese ser relacionado con la reacción del reactivo con la TMA.

En el caso de las pruebas hechas con histamina, se han observado algunos iones que podrían ser de interés porque aumentan con la concentración. El  $[M+H]^+$  ( $m/z$ : 216) se corresponde con la reacción entre una molécula de histamina y una molécula de cloruro de benzoílo. En el caso de los otros dos ( $m/z$ : 412→291, 279) no se consiguió asociar a ninguna proposición de estructura molecular.

Como conclusión a los experimentos realizados, se podría decir que el cloruro de benzoílo no reacciona con aminas terciarias, por lo que no resulta de utilidad a la hora de determinar la TMA. No obstante, a la hora de analizar tanto aminas primarias (biógenas) como secundarias (DMA, LOQ=0,12 ppm), resulta de gran utilidad y su análisis resulta más barato ya que no sería necesaria la utilización de un equipo de espectrometría de masas.

Descartamos pues este reactivo para nuestro objetivo, por no poderlo utilizar para los 3 tipos de aminas que nos interesa, primarias, secundarias y terciarias.

## 3.5 -Cromóforos y ciclodextrinas

### 3.5.1 -INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas (Figura 21) son oligosacáridos cíclicos compuestos de subunidades de glucopiranosas unidos mediante un enlace  $\alpha$ -(1,4). Se producen como resultado de una transglucosilación intramolecular a partir de la degradación del almidón mediante la acción del enzima ciclodextrin glucanotransferasa (CGTasa) y el mayor interés de estas moléculas reside en su capacidad de crear complejos con otras moléculas en su interior, pudiendo éstas ser de naturaleza sólida, líquida o gaseosa.

El exterior de las cápsulas presentan naturaleza hidrófila, lo que facilita su disolución en agua y el interior de la cavidad es de carácter lipófilo, lo que proporciona un ambiente en el que puedan quedar retenidos compuestos apolares. La lista de moléculas posibles a ser encapsuladas mediante las ciclodextrinas incluyen aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos, sustancias aromáticas, gases y compuestos polares como halógenos, oxoácidos y aminas (Del Valle, 2004).

Para que llegue a tener lugar la interacción entre la molécula hospedadora (ciclodextrina) y la huésped existen dos factores clave. El primero de ellos es que el tamaño de la molécula o un grupo funcional de esta tenga cabida física en su interior. El segundo es relativo a la termodinámica de la interacción, es decir, para que se forme el complejo debe existir una fuerza energética que favorezca que la molécula entre dentro de la cápsula hasta llegar a un equilibrio, que suele ocurrir en pocos minutos (Astray et al., 2009; Del Valle, 2004).

Un factor que puede tener un efecto tanto negativo como positivo sobre los complejos y su formación es la temperatura. Por un lado aumentar la temperatura puede favorecer la mejor solubilización de los componentes, pero la mayoría de los complejos formados comienzan su descomposición por encima de los 50-60°C.

En este estudio se han llevado a cabo experimentos que incluyen únicamente  $\alpha$  y  $\beta$  ciclodextrinas.

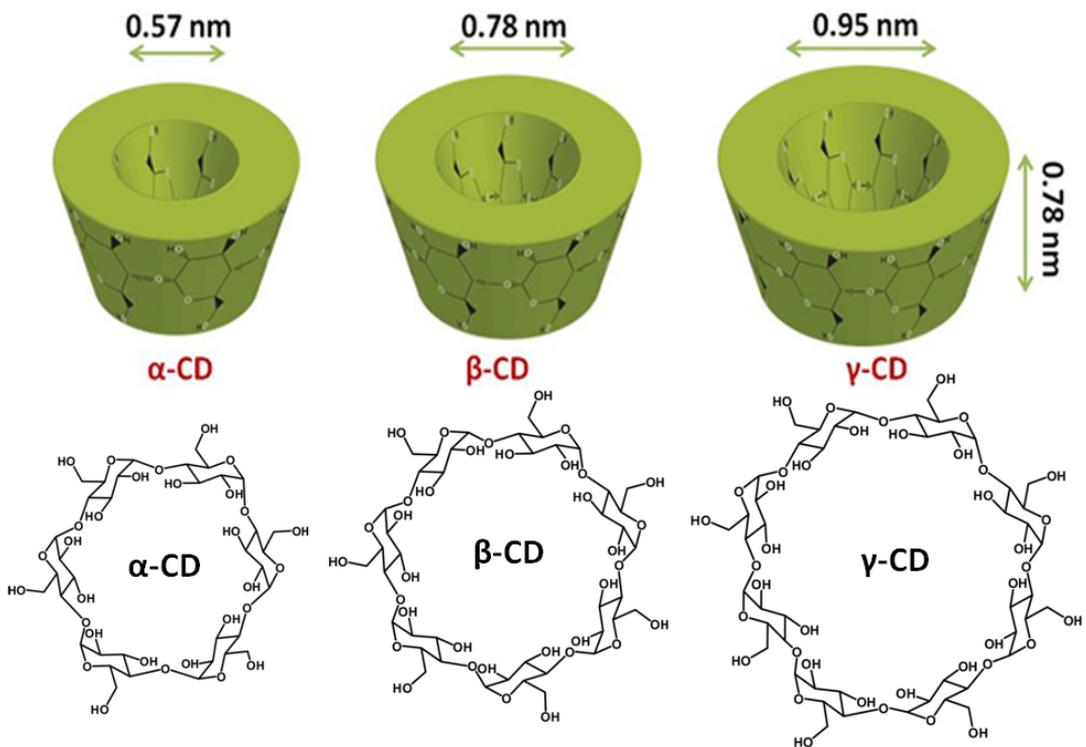


Figura 21: Estructura química y tamaño de los distintos tipos de ciclodextrinas

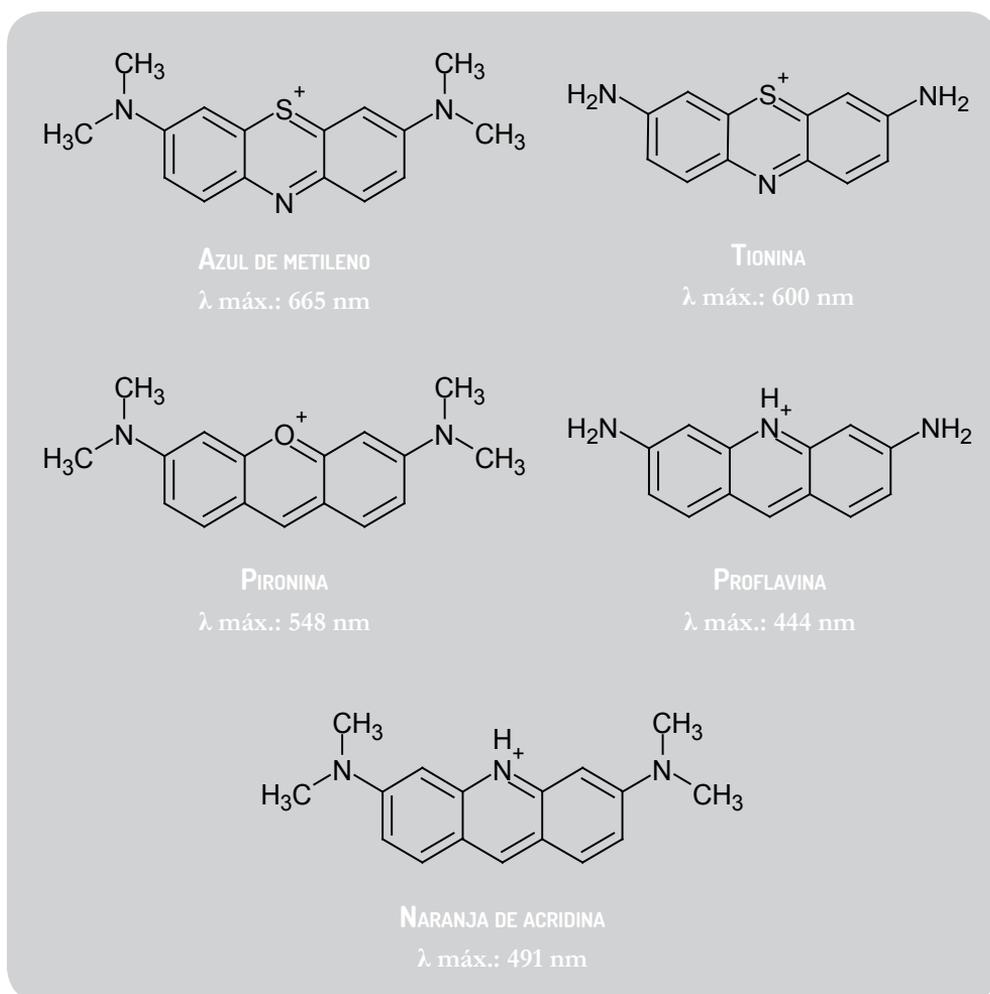
(<http://unam.bilkent.edu.tr/~uyar/Research.html>) [Accedido 06/2015].

Uno de los grupos de moléculas que puede interactuar con estas cápsulas, son algunos cromóforos, como el azul de metileno (MB), tionina, pironina, proflavina y naranja de acridina (Tabla 10),

todos ellos compuestos heterocíclicos con un tamaño que permite la inclusión en el interior de las cápsulas de entre 1 y 3 moléculas de cromóforo.

Basados en este hecho, Montes-Navajas (Montes-Navajas et al., 2009) propusieron que al añadir la amina al medio de reacción, ésta desplaza las moléculas de cromóforo del interior de las cápsulas (en función del cromóforo y la cápsula, el número de moléculas de cromóforo albergadas en la cápsula varía), produciéndose de esta manera un cambio en el color. Como cada amina tiene distintas propiedades, la cantidad de cromóforo desplazado varía y de esta forma, al poner en contacto amina con cápsulas y cromóforos los cambios de color generados permiten crear un mapa de color que sirve para identificar cada amina o distintas concentraciones de una misma amina.

Tabla 10: Estructura química de los cromóforos utilizados en los experimentos del capítulo 3 y su longitud de onda de máxima absorción en las condiciones estudiadas.



### 3.5.2-MATERIALES Y MÉTODOS

Primeramente se identificaron los máximos de absorción de cada cromóforo en un espectrofotómetro con cubeta de cuarzo y se utilizó uno con filtros a distintas longitudes de onda (734 nm, 450 nm, 492 nm, 550 nm y 620 nm) para proseguir con los demás experimentos.

Para estudiar la posible interacción entre los distintos cromóforos, las cápsulas y las aminas, primeramente se llevó a cabo un ensayo para determinar si la sola presencia de la TMA podía tener efecto alguno en los máximos de absorbancia o en las intensidades del azul de metileno. Utilizando una concentración 20  $\mu\text{M}$  del cromóforo se añadió TMA en concentraciones desde 0,1 ppm hasta 10 ppm. Esto se hizo a temperatura ambiente y a 40°C. En cuanto al tiempo, se tomaron medidas a tiempo cero y pasados 10 minutos, para favorecer las posibles interacciones.

Posteriormente se llevó a cabo otro ensayo en el que estaban presentes los 3 tipos de moléculas: cromóforos, cápsulas y amina. Este ensayo se llevó a cabo para verificar si existía el efecto de disminución en la señal emitida por los cromóforos debido a la presencia de la amina. Estos experimentos se llevaron a cabo a distintas concentraciones de cromóforo así como de TMA. Además también se probó el efecto de la DMA.

Para llevar a cabo este experimento se utilizó una concentración tanto de cromóforo como de cápsula de 100  $\mu\text{M}$  y se hizo variar la concentración de la amina (DMA o TMA) desde los 0,5 ppm hasta los 1000 ppm (0,5 ppm; 1 ppm; 10 ppm; 100 ppm y 1000 ppm), dando como resultado distintas relaciones molares entre los distintos componentes de la mezcla, amina: cromóforo: cápsula, 1:28:80; 1:14:40; 1:1,4:4; 1:0,14:0,4; 1:0,014:0,04 y 1:0,0014:0,004 respectivamente.

Los datos de absorbancia para cada cromóforo fueron tomados utilizando el filtro más cercano a su máximo de absorbancia.

### 3.5.3 -RESULTADOS

Primeramente se estudiaron cuáles eran los máximos de absorbancia para cada cromóforo seleccionado (Figura 22). En algunos casos se observó más de un máximo para un mismo cromóforo pero se decidió tomar el máximo más intenso. De este modo se determinaron los valores máximos como 665 nm para el azul de metileno, 600 nm para la tionina, 548 nm para la pironina, 444 nm para la diaminoacridina, 491 nm para el naranja de acridina.

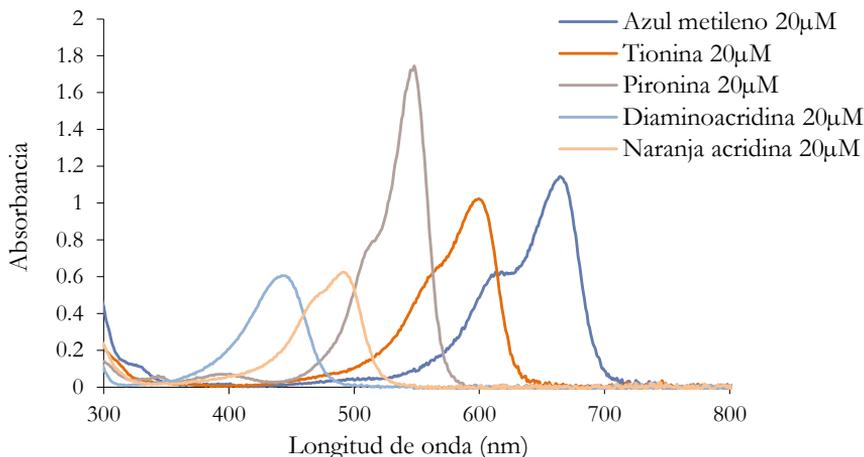


Figura 22: Máximos de absorbancia de los distintos cromóforos utilizados en las condiciones del experimento.

En el estudio preliminar en el que se pusieron en contacto disoluciones de azul de metileno 20 µM con distintas concentraciones de trimetilamina, se comprobó que en ningún caso existió una disminución de la intensidad del cromóforo o una alteración de sus máximos de absorbancia (Figura 23). Esta misma prueba fue realizada dejando en contacto ambas disoluciones durante 10 minutos y aplicando calor (40°C), en ninguno de los dos casos se apreciaron diferencias que pudiesen ser atribuidas a una interacción entre el cromóforo y la amina.

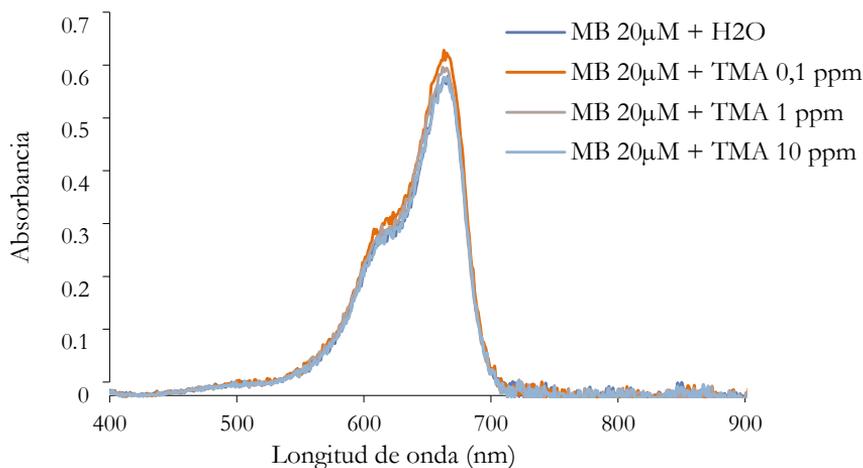


Figura 23: Azul de metileno (MB) 20µM con distintas concentraciones de TMA a temperatura ambiente.

Finalmente, al poner en contacto todos los componentes, cromóforos, cápsulas y aminas, se trabajó en placas multipocillos que fueron analizadas en el lector de placas a distintas longitudes de onda.

A pesar de que Montes-Navajas et al., 2009 utilizaron concentraciones de cromóforo cercanas a 400  $\mu\text{M}$ , se decidió utilizar una concentración menor (100  $\mu\text{M}$ ) en base a los estudios previos realizados en el lector de placas, donde una concentración tan alta daba como resultado una saturación de la absorbancia.

Como se puede apreciar en las Figura 24 (azul de metileno), Figura 25 (tionina) Figura 26 (pironina), Figura 27 (proflavina ) y Figura 28 (naranja de acridina), en ninguno de los casos se observó que la presencia o no de la amina en distintas concentraciones tuviese un efecto sobre los valores de absorbancia del cromóforo en interacción con la cápsula. Esto ocurrió tanto con la DMA como con la TMA y utilizando las ciclodextrinas tanto de tipo  $\alpha$  como de tipo  $\beta$ .

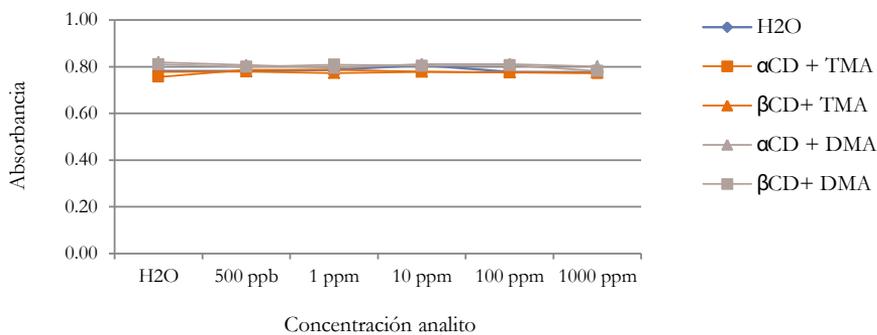


Figura 24: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia del azul de metileno a 620nm.

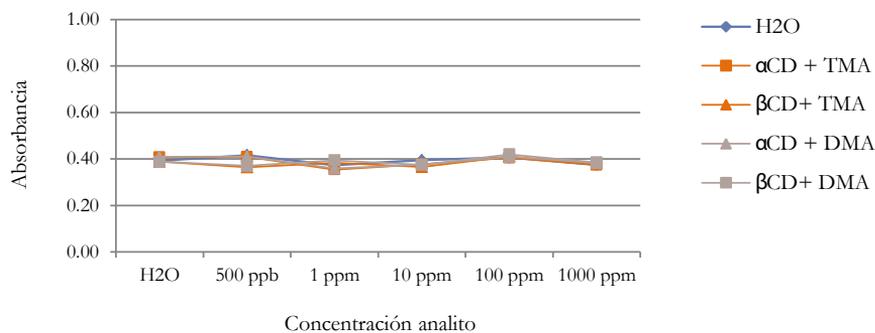


Figura 25: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia de la tionina a 620nm.

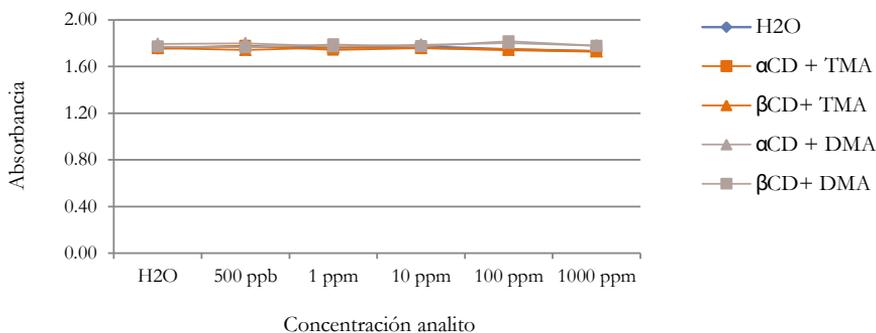


Figura 26: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia de la pironina a 550nm.

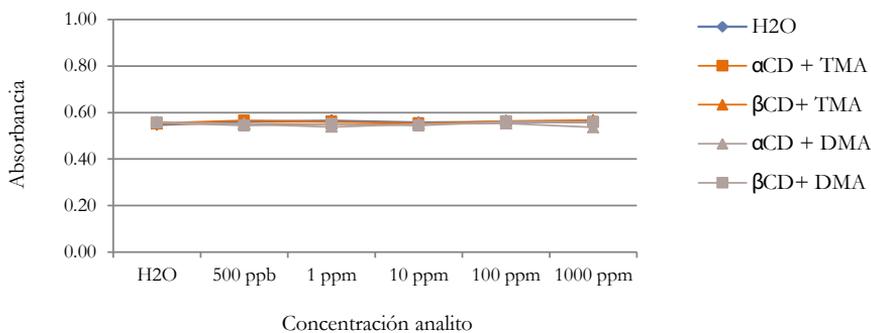


Figura 27: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia de la proflavina a 550nm.

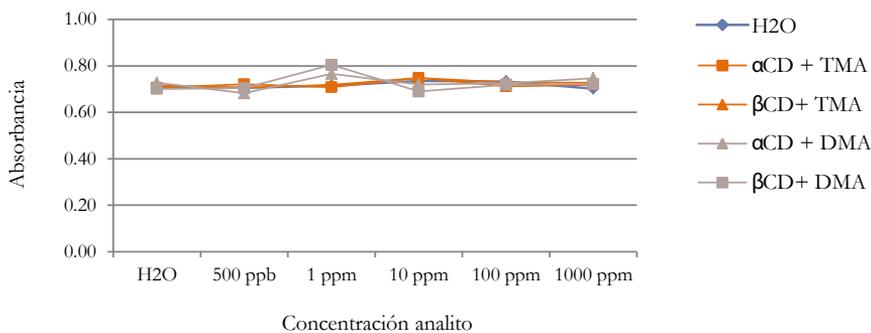


Figura 28: Influencia de las interacciones cromóforo-cápsula-amina sobre la absorbancia del naranja de acridina a 492nm.

Como se aprecia en las distintas figuras, en ninguno de los casos se observó que la adición de la amina al medio de reacción en cualquiera de las concentraciones tuviese efecto alguno en la absorbancia de los distintos cromóforos, por lo que esta metodología no pudo ser utilizada en nuestro caso para la cuantificación de distintas concentraciones de amina.

## 3.6 -Sulfato de dipropilo

### 3.6.1 -INTRODUCCIÓN

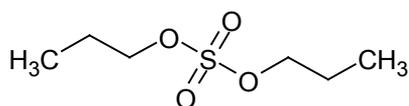


Figura 29: Estructura química del sulfato de dipropilo.

En la industria farmacéutica se utilizan determinados ácidos sulfónicos (metanosulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico...) para la síntesis de principios activos, que posteriormente entran en contacto con distintos alcoholes (metanol, propanol, isopropanol...) que se utilizan para la purificación o cristalización. Al entrar en contacto ambas sustancias se forman sus correspondientes ésteres alquílicos, como el sulfato de dipropilo (Figura 29), los cuales son de naturaleza genotóxica según las agencias reguladoras pertinentes. Con el propósito de detectar estas impurezas tóxicas, An et al., 2008, utilizaron la trimetilamina y trietilamina como agentes derivatizantes para generar distintos compuestos que fuesen detectables por espectrometría de masas y resueltos en una columna de interacción hidrofílica (HILIC) debido a su naturaleza amino cuaternaria.

Aprovechando este mecanismo de reacción, se aplicó este protocolo invirtiendo las funciones de los compuestos, es decir, la trimetilamina paso a ser el analito y el sulfato de dipropilo se convirtió en el agente derivatizante.

### 3.6.2 -MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la reacción de derivatización de la trimetilamina con el sulfato de dipropilo, en un tubo de ensayo se añadió 1 mL de 1500 ppm de DPS (8230  $\mu\text{M}$ ) en MeCN y posteriormente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de TMA en agua a distintas concentraciones (Blanco, 1 ppm, 10 ppm y 50 ppm). Esto dio como resultado unas relaciones molares entre TMA:DPS de 1:5000, 1:500 y 1:100. Se cerró el tubo y se introdujo en un baño termostatzado a 55°C

durante una hora para favorecer la formación del producto de reacción. A continuación se encapsuló y se analizó en el equipo de cromatografía.

Para su análisis cromatográfico se utilizó una columna Luna HILIC (150 x 2 mm, I.D. 3  $\mu$ m) con una precolumna con la misma fase estacionaria. El horno de la columna se mantuvo a 30°C y se llevó a cabo tanto una elución isocrática como en gradiente. En el caso de la elución isocrática se utilizó una fase móvil compuesta de 85:25 de MeOH:NH<sub>4</sub>Ac 50 mM. Para la elución en gradiente se utilizó una fase de 10%MeCN/90% NH<sub>4</sub>Ac 5,5 mM (A) y otra de 90% MeCN/10%NH<sub>4</sub>Ac 50 mM (B) utilizando el gradiente de elución que aparece en la Tabla 11 y las condiciones del espectrómetro de masas que aparecen en la Tabla 12. Se trabajó a un flujo de 0,3 mL/min y el volumen de inyección fue de 5  $\mu$ L.

Tabla 11: Gradiente de elución utilizado con el sulfato de dipropilo.

Tiempo (min)	%A	%B
0	0	100
2	0	100
15	100	0
20	100	0
22	0	100
27	0	100

También se realizaron experimentos mediante infusión directa de los productos de reacción para comprobar cuáles eran los productos de reacción y sus fragmentos.

Tabla 12: Valores del espectrómetro de masas utilizando el sulfato de dipropilo como agente derivatizante.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Skimmer, V	40	Lens 1, V	-5
Capillary exit, V	98,7	Lens 2, V	-60
Octopole 1, V	12	Capillary, V	3500
Octopole 2, V	1,70	Nebulizer, psi	35
Trap Drive	24,1	Dry gas, L	10
Octopole RF, V	103,7	Dry temperature, °C	350

### 3.6.3 -RESULTADOS

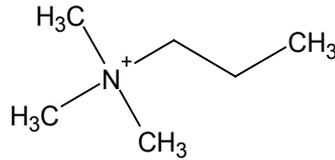


Figura 30: Estructura química del producto de reacción generado entre TMA y DPS ( $m/z$ : 102).

En cuanto a los resultados trabajando en modo isocrático se observó que el pico del compuesto  $m/z$ : 102 (Figura 30) aparece en el minuto 2, pero no muy bien definido. En la Figura 31 se puede apreciar que entre la muestra blanco y la de 1 ppm no existen diferencias significativas, lo que de primeras hace al método poco sensible, algo que no interesó ya que se estaba buscando una metodología que permitiese analizar concentraciones por debajo de 1 ppm. Además se aprecia que las diferencias entre 10 ppm y 50 ppm no son lineales, que probablemente podría ser atribuido a la necesidad de una mayor concentración del agente derivatizante.

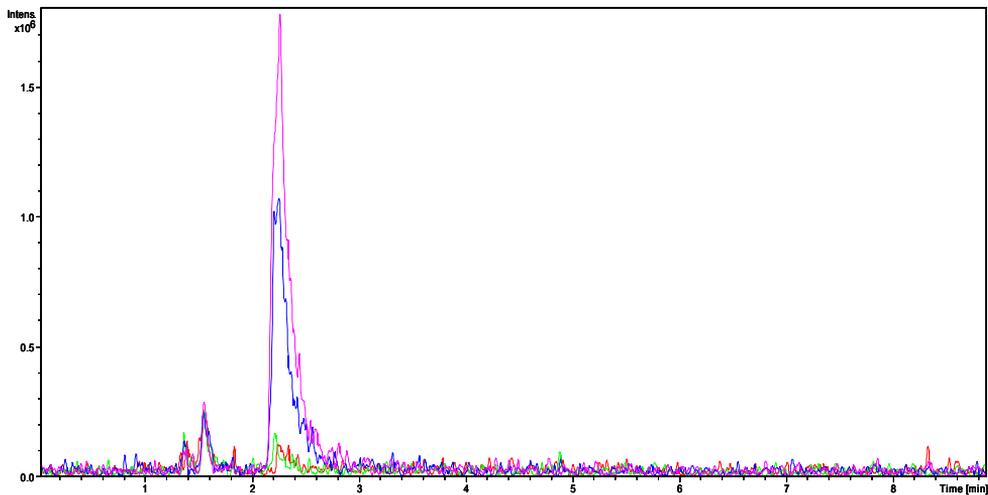


Figura 31: Cromatograma correspondiente la extracción del  $m/z$ : 102 a los productos de reacción del DPS con la trimetilamina en isocrático. Rojo: muestra blanco; verde:1ppm; azul:10ppm y lila:50ppm.

En lo referente al trabajo en gradiente se apreció que los picos mejoraron mucho su definición y adelantaban su elución (Figura 32). Se aprecian áreas mayores a comparación de las obtenidas en isocrático pero en todas las concentraciones aparecen áreas muy similares.

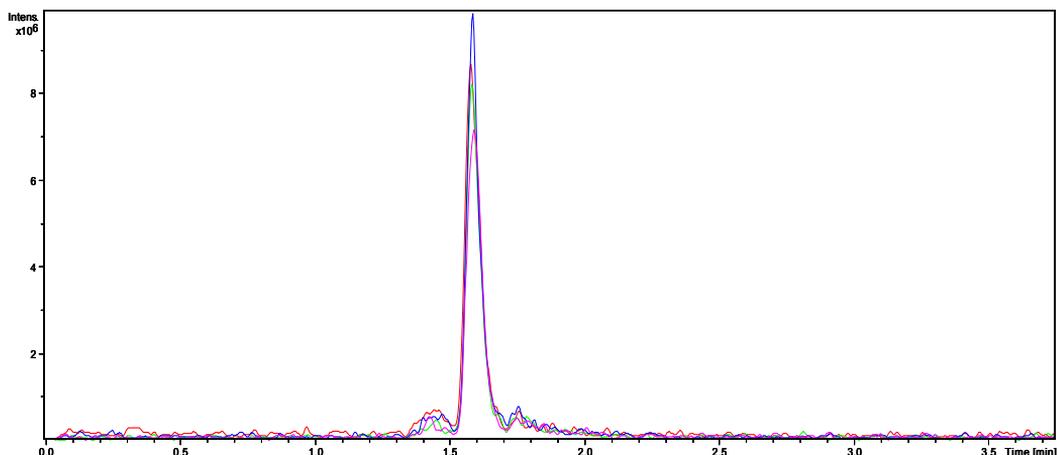


Figura 32: Cromatograma correspondiente a la extracción del  $m/z$ : 102 a los productos de reacción del DPS con la trimetilamina en gradiente. Rojo: muestra blanco; verde: 1ppm; azul: 10ppm y lila: 50ppm.

Finalmente se realizaron las mismas pruebas en FIA para comprobar la fragmentación del  $m/z$ : 102 (Figura 33). Se apreció que al romperlo, el fragmento que se genera es el  $m/z$ : 60, probablemente la TMA. Se trabajó con muestras blancas (agua) y con TMA (10 ppm) y en ambos casos la intensidad del  $m/z$ : 102 fue la misma (Figura 33).

Por ese motivo se llevaron a cabo varias pruebas a distintas temperaturas (25°C, 30°C y 60°C) y tiempos de reacción (0 min, 30 min y 60 min) con muestras blanco y muestras con TMA. En estas pruebas se observó que a mayores tiempos de reacción y temperaturas las áreas obtenidas para el  $m/z$ : 102 eran mayores. Pero esto ocurría tanto en la muestra blanco como en la de TMA, por lo que la metodología volvía a no ser válida para el propósito de esta tesis.

No se han encontrado las condiciones adecuadas para ver diferencias entre las distintas concentraciones de TMA, posiblemente porque en algunos casos no haya sido suficiente la concentración de DPS utilizada. Los mencionados autores utilizaron concentraciones muy altas de TMA (al 10%) para que reaccionase con el DPS mientras que en nuestro caso el reactivo no se encontraba en tanto exceso. Además, con esta metodología, la molécula de interés aparece en una zona en la que existen numerosas interferencias provenientes de la fase móvil en el espectrómetro de masas.

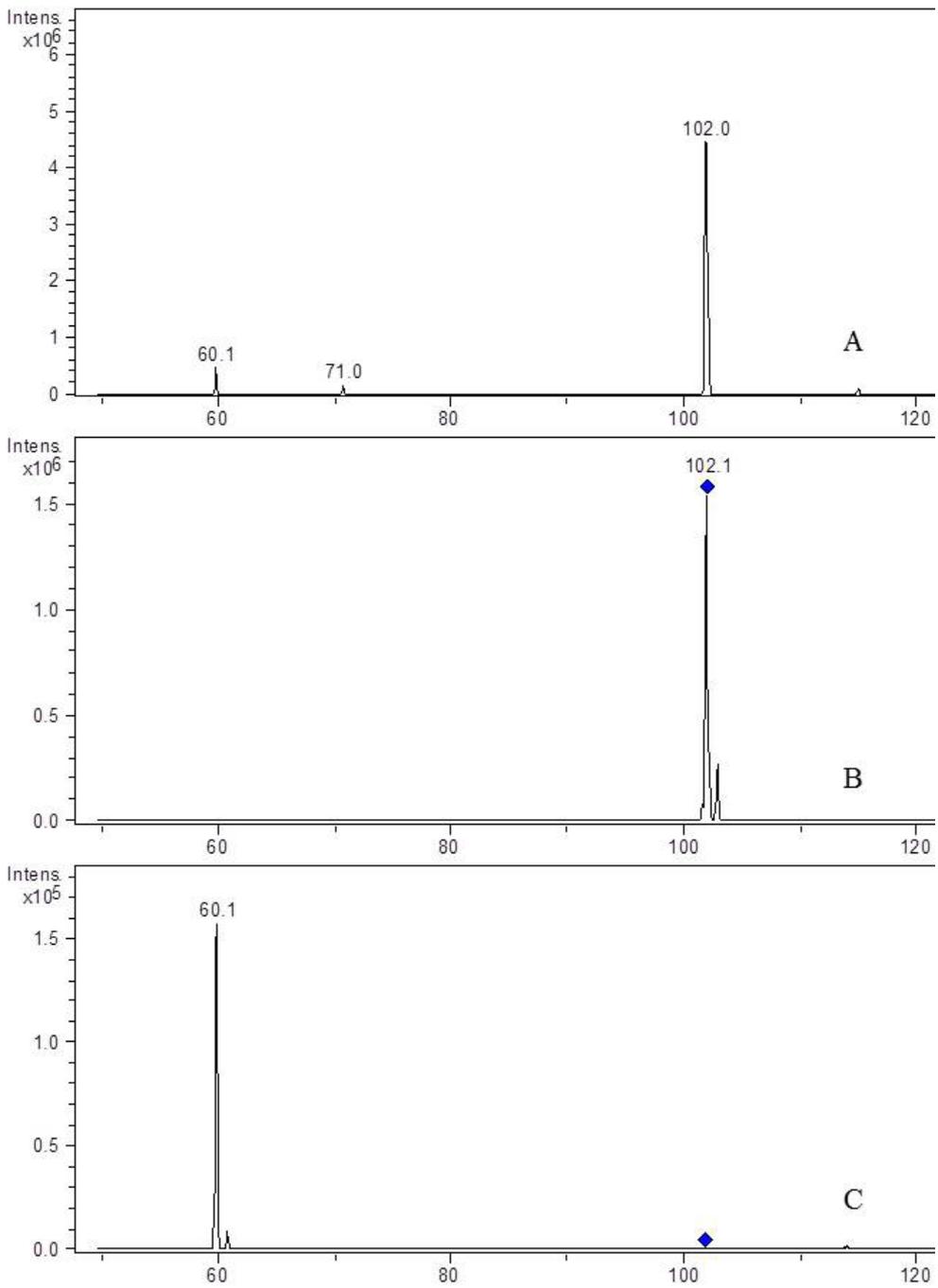


Figura 33: cromatogramas de inyección en FIA de los productos de reacción entre el sulfato de dipropilo y la trimetilamina. A: espectro MS1; B:  $m/z$ : 102 aislado; C:  $m/z$ : 102 fragmentado.

### 3.7 -Bromoacetato de etilo y de tert-butilo

#### 3.7.1 -INTRODUCCIÓN

El bromoacetato de etilo así como el bromoacetato de tert-butilo (BATB) (Figura 34) son agentes alquilantes ampliamente utilizados en síntesis química (Aye Mar et al., 2009; McMahon et al., 2002) y que históricamente han sido utilizados como agentes lacrimógenos durante la I Guerra mundial o como agentes odorantes en gases inodoros.

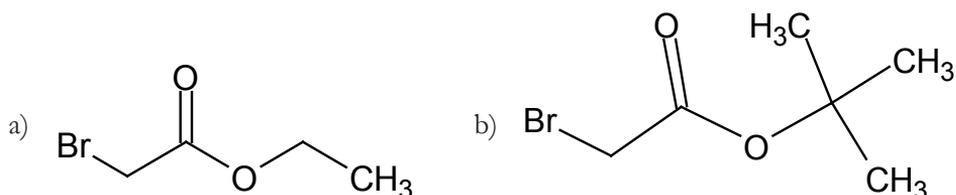


Figura 34: Estructura química del bromoacetato de etilo (a) y el bromoacetato de tert-butilo (b).

Estos compuestos son moléculas electrófilas (aceptoras de electrones), que son atraídas por las zonas ricas en electrones que presentan las moléculas neutrófilas (dadoras de electrones), en nuestro caso las aminas, lo que provoca que la molécula de reactivo pierda su átomo de Br para formar un enlace covalente con el átomo de nitrógeno de la amina (Figura 35).

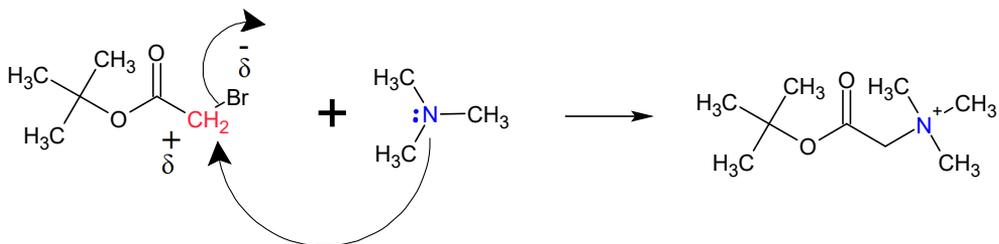


Figura 35: Esquema de reacción entre la trimetilamina y el BATB.

Los compuestos generados entre estos reactivos y las aminas, son aminas cuaternarias, compuestos polares que no quedan retenidos en las columnas clásicas de fase inversa (C18) por lo que se requiere otro tipo de columna con un mecanismo de retención diferente. En este caso fue una columna HILIC.

### 3.7.2 -MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.7.2.1 -Bromoacetato de etilo

Siguiendo el protocolo de Johnson (Johnson, 2008), en un vial se añadieron 25 µL de la disolución de amina (TMA), 1 µL de una disolución de NH<sub>3</sub> concentrado y 30 µL de una disolución de 20 mg/mL de bromoacetato de etilo en acetonitrilo, posteriormente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1 mL de una solución de infusión compuesta de acetonitrilo/agua/ácido fórmico, 50/50/0,025 (v/v/v) y se analizó mediante espectrometría de masas en modo FIA.

Se estudió la influencia de las variables temperatura, tiempo de reacción y pH utilizando la TMA como modelo.

En el equipo cromatográfico se trabajó a un flujo constante de 0,2 mL/min y con una fase móvil compuesta por A (acetonitrilo: agua: ácido fórmico; 50:50:0,025) y B (acetonitrilo: ácido fórmico; 100:0,025). El gradiente utilizado en este experimento fue el siguiente, desde el comienzo hasta el minuto 2, se utilizó un 100% de A, del minuto 2 al 3 se pasó a un 100% de B donde se mantuvo durante un minuto a modo de fase de lavado y desde el minuto cuatro hasta el minuto 5 se volvió a las condiciones originales. Las condiciones del espectrómetro de masas se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13: Valores del espectrómetro de masas utilizando bromoacetato de etilo como agente derivatizante.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Skimmer, V	40	Lens 1, V	-5
Capillary exit, V	100,4	Lens 2, V	-60
Octopole 1, V	12	Capillary, V	3000
Octopole 2, V	1,70	Nebulizer, psi	35
Trap Drive	25,6	Dry gas, L	9
Octopole RF, V	111	Dry temperature, °C	350

#### 3.7.2.2 -Bromoacetato de tert-butilo

En busca de una mayor sensibilidad se testó el rendimiento de la reacción con el bromoacetato de tertbutilo. El producto de reacción generado presentaba un mayor  $m/z$  por lo que se esperaba poder alcanzar una mayor sensibilidad.

## 3.7.2.2.1 -Optimización de la derivatización

Mediante el uso de un diseño compuesto central se estudió la influencia del pH (3-13), la temperatura de incubación (25°C-75°C) y el tiempo de reacción (7,5 min-82,5 min). El software utilizado para este propósito fue Unscrambler© (Camo, Suecia) y todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (Tabla 14).

Tabla 14: Diseño experimental propuesto para los experimentos de optimización.

Experimento	Factores		
	$X_1^a$	$X_2^b$	$X_3^c$
1	2,5	0	0
2	-2,5	0	0
3	0	2,5	0
4	0	-2,5	0
5	0	0	2,5
6	0	0	-2,5
7	-1	-1	-1
8	1	-1	-1
9	-1	1	-1
10	1	1	-1
11	-1	-1	1
12	1	-1	1
13	-1	1	1
14	1	1	1
15	0	0	0

<sup>a</sup>  $X_1$ : pH. niveles: -2,5 (3), -1 (6), 0 (8), 1 (10), 2,5 (13)

<sup>b</sup>  $X_2$ : Temperatura, °C. niveles: -2,5 (25), -1 (40), 0 (50), 1 (60), 2,5 (75)

<sup>c</sup>  $X_3$ : Tiempo, min. niveles: -2,5 (7,5), -1 (30), 0 (45), 1 (60), 2,5 (82,5)

Los experimentos se llevaron a cabo con mezclas de aminas (50 µg/L para MA, DMA y TMA; y 1,25 µg/mL para TMAO) y la concentración de BATB utilizada fue de 5 mg/mL. A modo de variable de respuesta se utilizó el área obtenida al integrar el pico cromatográfico de cada amina derivatizada y con esto se obtuvo la superficie de respuesta para cada compuesto.

Una vez obtenidos los valores óptimos para cada variable, se utilizaron éstas para llevar a cabo la reacción de derivatización con el resto de aminas disponibles para comprobar si reaccionaba o no con todas. Esto se llevó a cabo tanto con el bromoacetato de etilo como con el bromoacetato de tertbutilo.

### 3.7.2.2.2 -Separación cromatográfica y espectrometría de masas

Del mismo modo, se decidió añadir previo análisis por HPLC un compuesto a modo de patrón interno. Se testaron varios posibles compuestos (cloruro de tetraetilamonio, bromuro de trimetilfenilamonio y el pesticida mepiquat), todos ellos con grupos amino cuaternarios.

Una vez comprobado que los compuestos de interés (a excepción de la metilamina, que no reacciona para convertirse en una amina cuaternaria en la reacción y aparece muy cerca del pico de inyección) se quedaban retenidos en la columna se seleccionaron las fases móviles y los gradientes más adecuados para eluir todos los compuestos de interés en el menor tiempo posible.

Para ello, a parte del H<sub>2</sub>O, MeCN y MeOH, se testaron el isopropanol (IPA), el tetrahidrofurano (THF) y el acetato de etilo en distintas proporciones, así como el acetato y formiato amónico.

Tabla 15: Parámetros espectrométricos óptimos para cada analito.

Parámetro	MA <sup>a</sup>	DMA <sup>b</sup> , TMA <sup>c</sup>	TEAC <sup>d</sup>	TMAO <sup>e</sup>
Skimmer, V	34	35	15,8	27,4
Capillary exit, V	60	72,5	22,5	27,5
Octapole 1, V	9,91	12,11	5,6	20
Octapole 2, V	5	5,6	0	0
Trap Drive	31,6	33,8	27,8	23,2
Octapole RF, V	150	132,5	42,5	35
Lens 1, V	5	5	-8	-6,5
Lens 2, V	-58,3	-100	-100	-100
Fragmentation amplitude	0,36	0,43	0,94	-----

<sup>a</sup> Ion monitorizado, m/z: 260→204; ion cualificador, m/z: 260→147

<sup>b</sup> Ion monitorizado, m/z: 274→218; ion cualificador, m/z: 274→162

<sup>c</sup> Ion monitorizado, m/z: 174→118

<sup>d</sup> Ion monitorizado, m/z: 130→86

<sup>e</sup> Ion monitorizado, m/z: 76

Del mismo modo, las condiciones de ionización en el espectrómetro de masas fueron optimizadas mediante infusión para cada compuesto cuando era posible crear ventanas independientes (Tabla 15). En el caso de la DMA y la TMA, la poca diferencia en sus tiempos de retención no lo permitió, por lo que se llegó a un compromiso entre la sensibilidad de ambas, sacrificando ligeramente la sensibilidad de la DMA para obtener un mejor resultado para la TMA. En el caso del TMAO ( $m/z$ : 76) se optimizaron las condiciones para evitar la formación de un dímero ( $m/z$ : 151) cuya aparición resultó ser dependiente de la concentración.

El capilar (3500 V), nebulizador (40 psi), gas de secado (9 L/min) y la temperatura de secado (350°C) se mantuvieron constantes a lo largo del cromatograma.

### 3.7.2.2.3 -Análisis de muestras reales

Se trabajó con pescado de agua dulce debido a su menor contenido en TMAO y por consiguiente de TMA. Con este fin se utilizaron truchas de piscifactoría, las cuales fueron evisceradas y decapitadas bajo refrigeración (4°C) a su llegada al laboratorio. Para validar la metodología en pescado de agua salada, se utilizaron la merluza y el chicharro, que fueron obtenidos de un mercado local evisceradas y decapitadas. Todas las muestras fueron conservadas en refrigeración (4°C) hasta el momento del análisis y en cada día de muestreo se tomaron 3 individuos de cada especie.

Para analizar el pescado se eliminó la piel y el músculo de cada individuo se homogenizó en una picadora de uso doméstico. Se tomó una muestra de 1 g y se añadieron 5 mL de ácido acético 10 mM (pH 3,45) para aplicarle otra homogenización en un ultraturrax (Kinematica, Suiza). El vástago fue enjuagado 2 veces, la primera con 5 mL y la segunda con 10 mL de la disolución de ácido acético y estas disoluciones fueron mezcladas con el extracto de pescado. Estos extractos fueron filtrados a través de filtros de papel N°1 de Whatman (Maidstone, Reino Unido) y 5 mL extra fueron utilizados para limpiar el tubo falcón en el que se encontraba el extracto y vertidos sobre el papel de filtro y así arrastrar posibles restos de muestra. Finalmente el volumen del filtrado fue ajustado a 25 mL y posteriormente una alícuota (2 mL) se centrifugó a 13400 rpm (MiniSpin, Eppendorf, EEUU) para utilizar el sobrenadante en la reacción de derivatización.

En un vial eppendorf de 2 mL se añadieron 20  $\mu$ L del sobrenadante de la muestra, a lo que se añadieron 480  $\mu$ L de una mezcla acetonitrilo: agua (6:4, v/v) con TEAC (3,2  $\mu$ g/mL), tampón bicarbonato (20  $\mu$ L, 0,5 M) y bromoacetato de tertbutilo (1 mL, 5 mg/mL en acetonitrilo). Esta composición química del medio de reacción vino determinada por la mala solubilidad del BATB en agua y del tampón bicarbonato en acetonitrilo. Después de 1 hora de incubación a 60°C en un baño termostatzado (WN 22, Memmert, Alemania) se

añadieron 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 5M para detener la reacción y se encapsuló el contenido de los eppendorf para analizarlo por HPLC-MS. Las curvas de calibrado fueron preparadas siguiendo el mismo protocolo.

#### 3.7.2.2.4 -Validación

Se llevó a cabo un proceso de validación para determinar así los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), porcentajes de recuperación y repetibilidad. Para el intervalo lineal se utilizaron 7 muestras dopadas y una muestra blanco, todas ellas por triplicado. Debido a la ausencia de un pescado totalmente carente de TMA, TMAO y DMA, los límites de detección y cuantificación fueron calculados mediante las rectas de calibrado. Se calculó la media del área de 6 blancos de reactivos para cada compuesto a lo que se le sumó 3 veces la desviación estándar (LOD) o 10 veces (LOQ). Los valores finales fueron representados como mg N/kg pescado y fueron corregidos por las diluciones llevadas a cabo en la trucha.

Para la repetibilidad, se analizaron 5 muestras blanco y 10 muestras dopadas a distintas concentraciones (0,5  $\mu\text{g/g}$ , 2  $\mu\text{g/g}$  y 10  $\mu\text{g/g}$ ) en tres días distintos. Estos mismos experimentos sirvieron para el cálculo de la recuperación y fueron llevados a cabo en trucha debido al bajo contenido en TMA, DMA y TMAO. Para evitar la variabilidad existente entre los distintos pescados de la misma especie, se realizó una homogenización de 3 individuos antes de tomar la muestra. Para comprobar la variabilidad interdía así como la intradía se aplicó el test F para así confirmar la repetibilidad de la metodología.

Para confirmar la validez del método BATB, se llevó un análisis en paralelo mediante la metodología de referencia de la AOAC, el método 971.14 con ligeras modificaciones (Ver apartado 3.3.2).

#### 3.7.2.2.5 -Estabilidad de los extractos y de los productos de reacción

Para determinar la idoneidad o no del almacenamiento de los extractos de pescado se llevó a cabo un estudio de la estabilidad de los mismos. Como bien es sabido, a 4°C, a pesar de presentar un metabolismo muy lento, las bacterias están vivas y siguen metabolizando determinados compuestos. A -20°C la actividad bacteriana esta inhibida pero tienen lugar reacciones de oxidación y otras reacciones enzimáticas como la conversión de TMAO a DMA, de manera que para evitar cambios químicos en los extractos se decidió almacenarlos a -80°C. Para cada especie se prepararon muestras blanco y muestras dopadas a distintas concentraciones. Para las muestras de trucha, las concentraciones fueron 5  $\mu\text{g/g}$ , 20  $\mu\text{g/g}$  y 100  $\mu\text{g/g}$  y para el chicharro y la merluza 100  $\mu\text{g/g}$ , 250  $\mu\text{g/g}$  y 500  $\mu\text{g/g}$ . Los extractos fueron almacenados a la temperatura seleccionada durante 6 días y fueron analizados a día 0, 2, 3 y 6 por triplicado.

Del mismo modo, los viales de cromatografía con los productos de reacción fueron almacenados a 4°C durante 18 y 48 horas, y a -20°C y -80°C durante 48, 72 y 144 horas.

### 3.7.3 -RESULTADOS

#### 3.7.3.1 -Bromoacetato de etilo

Las primeras pruebas que se llevaron a cabo con este reactivo fueron muy positivas, ya que se vio que se formaban los productos de reacción esperados teóricamente y que estos aumentaban con la concentración de TMA. A pesar de que Johnson (Johnson, 2008) utilizó amoníaco concentrado como modificador de pH, se pensó que probar otros compuestos como el formiato amónico o el hidróxido sódico podría resultar beneficioso para la reacción, pero estos experimentos se llevaron a cabo sin llevar un control sobre el pH resultante.

De estas pruebas, el modificador con el que se obtuvieron los mejores resultados fue el NaOH 10 mM, ya que con él se obtuvieron las mayores pendientes de las rectas de calibrado y por tanto las mayores sensibilidades (Figura 36).

Al realizarse estas primeras pruebas únicamente con TMA, no hubo ningún problema por trabajar en modo FIA, ya que no existían interferencias con los productos de reacción de otras aminas.

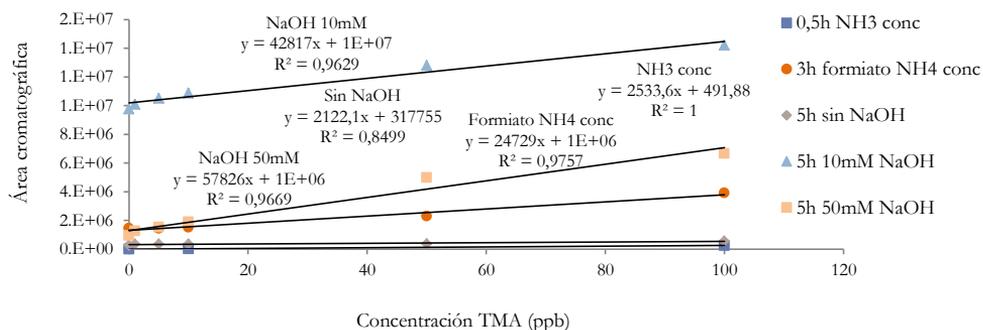


Figura 36: Calibrados utilizando bromoacetato de etilo como agente derivatizante y distintos modificadores de pH a temperatura ambiente. Para la cuantificación se monitorizó el  $m/z$ : 146.

Ya en estas primeras pruebas se apreció que al inyectar un mismo vial a diferentes intervalos de tiempo las áreas de los compuestos aumentaban, de modo que se decidió añadir a la mezcla un ácido que hiciese bajar de nuevo el pH pasado el tiempo de reacción para así detener la

reacción. Se probaron distintas cantidades de ácido fórmico a distintas concentraciones hasta conseguir que las inyecciones seriadas de un mismo vial fuesen estables en el tiempo.

### 3.7.3.2 -Bromoacetato de tert-butilo

En paralelo a la utilización del bromoacetato de etilo, se comenzaron a realizar pruebas con el bromoacetato de tert-butilo. Del mismo modo que en el anterior caso, al comienzo de los experimentos únicamente se trabajó con TMA, por lo que el método de análisis para el HPLC fue también el de FIA, sobre todo por la falta de retención en las columnas C18 de los productos de reacción generados.

Siguiendo el protocolo de derivatización utilizado por Johnson (Johnson, 2008) con bromoacetato de etilo, se observó que se formaban los iones de interés con la TMA y que el ion molecular se podía fragmentar para dar lugar al correspondiente ion hijo, teniendo así una mayor sensibilidad y selectividad.

El uso de este reactivo produjo una mayor sensibilidad, ya que los productos de reacción que se formaban tenían un mayor peso molecular, lo que permitía al mismo tiempo que los fragmentos generados fuesen mayores. Por este motivo se continuó la optimización de la metodología con el bromoacetato de tert-butilo, añadiendo el resto de aminas (primarias y secundarias) al estudio.

En este momento se comprobó que la sensibilidad disminuyó debido al análisis en inyección de flujo, ya que la cuantificación se lleva a cabo en milisegundos y ahora eran varios productos de reacción distintos los que eluían al mismo tiempo.

Debido a la falta de retención en las columnas C18 se comenzó a trabajar con una columna de interacción hidrófila Luna HILIC (150 x 2 mm I.D., 3  $\mu$ m) (Phenomenex Torrance, CA, USA) en la que los compuestos generados, aminas cuaternarias, quedaban retenidas como se requería. Para trabajar con una columna HILIC se suelen utilizar fases móviles con alto contenido en disolventes orgánicos, habitualmente se utilizan mezclas de MeCN/H<sub>2</sub>O, comenzando los cromatogramas con alrededor de un 95% de orgánico.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se probaron distintas fases móviles compuestas por MeCN y agua, en las que bien se añadió un modificador de pH como el formiato o acetato amónico en distintas concentraciones o bien se modificó la composición de los disolventes en distinta proporción. Para esto se utilizó MeOH, acetato de etilo, isopropanol (IPA) o THF. En las distintas condiciones se obtuvieron tiempos de retención distintos (Figura 37) y distintas sensibilidades para las aminas utilizadas.

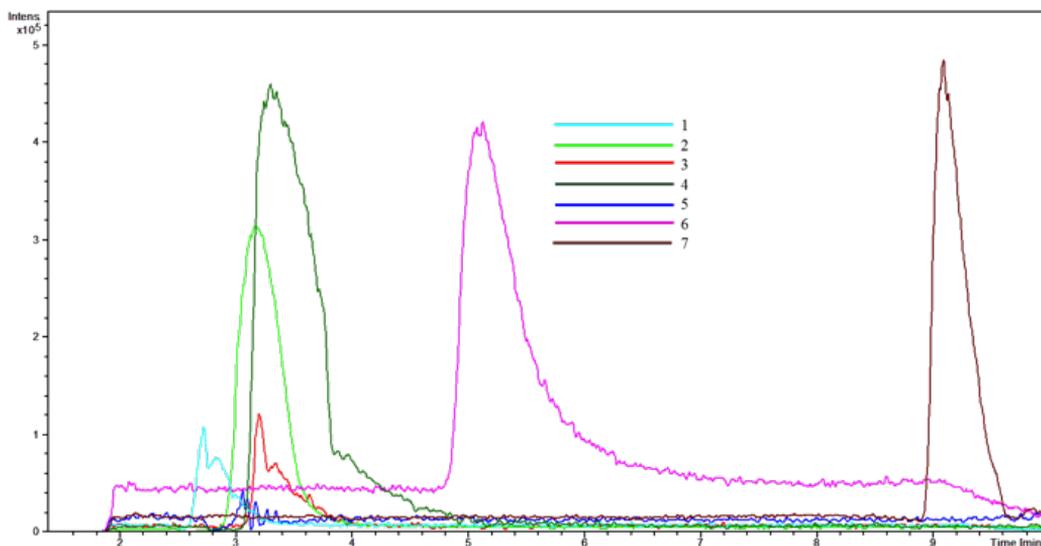


Figura 37: Cromatogramas del producto de reacción de la TMA con el bromoacetato de tert-butilo como agente derivatizante y utilizando distintas composiciones de fase móvil. **1:** fase A: MeOH 10 mM formiato amónico y fase B: 90%MeCN/5% $H_2O$ /5%MeOH 10 mM formiato amónico. **2:** A: 50%IPA/50% $H_2O$  y B: 95%MeCN/2,5%IPA/2,5% $H_2O$ , ambas fases con 5 mM formiato amónico. **3:** A: MeOH 10 mM formiato amónico y B: 90%MeCN/5% $H_2O$ /5%MeOH 10 mM formiato amónico, teniendo ambas fases 0,1% de acetato de etilo. **4:** A:  $H_2O$  10 mM formiato amónico y B: 94%MeCN/6%  $H_2O$  10 mM formiato amónico. **5:** A: 50%  $H_2O$ /50%THF 10 mM formiato amónico y B: 90%MeCN/5%  $H_2O$ /5% THF 10 mM formiato amónico. **6:** A: 50%IPA/50% $H_2O$  y B: 95%MeCN/2,5%IPA/2,5% $H_2O$ , ambas fases con 5 mM formiato amónico. **7:** A: 50% $H_2O$ /50%MeCN y fase B: 3% $H_2O$ /97%MeCN teniendo ambas fases acetato amónico 5 mM.

Al utilizar una fase móvil compuesta por  $H_2O$  10 mM formiato amónico (A) y 94%MeCN/6%  $H_2O$  10 mM formiato amónico (B) con distintos gradientes (todos ellos comenzando con un porcentaje de B de entre 85 y 100%), los compuestos eluyeron cercanos al pico de inyección, de forma muy similar en prácticamente todos los gradientes utilizados.

En el caso de utilizar modificadores orgánicos como el acetato de etilo (A: MeOH 10 mM formiato amónico y B: 90%MeCN/5% $H_2O$ /5%MeOH 10 mM formiato amónico), teniendo ambas fases 0,1% de acetato de etilo o el disolvente THF (A: 50%  $H_2O$ /50%THF 10 mM formiato amónico y B: 90%MeCN/5%  $H_2O$ /5% THF 10 mM formiato amónico), la ionización no resultó óptima por lo que los espectros de masas aparecían con mucho ruido de fondo y la sensibilidad de los compuestos de interés no resultó la deseada. En cuanto a los tiempos de retención, usando como referencia el derivado de la TMA, la elución tuvo lugar en el minuto 3 en ambos casos.

Cuando se sustituyó el agua por MeOH, fase A: MeOH 10 mM formiato amónico y fase B: 90%MeCN/5%H<sub>2</sub>O/5%MeOH 10 mM formiato amónico, se produjo una leve disminución del tiempo de retención, apareciendo la TMA en el minuto 2,5.

En cuanto al uso del isopropanol, este se utilizó en dos fases móviles diferentes, la primera de ellas compuesta por A: 95%IPA/5%H<sub>2</sub>O y B: 80%MeCN/15%IPA/5%H<sub>2</sub>O, ambas fases con 10mM formiato amónico. La segunda estaba compuesta por A: 50%IPA/50%H<sub>2</sub>O y B: 95%MeCN/2,5%IPA/2,5%H<sub>2</sub>O, ambas fases con 5 mM formiato amónico. En el primer caso no se apreció ningún movimiento en el tiempo de retención, pero al utilizar la segunda se produjo un retraso en la elución de los compuestos, apareciendo la TMA en el minuto 5.

Con todas las condiciones anteriores se utilizó el mismo gradiente: del minuto 0 al minuto 2 se mantuvo un 0% de A, del minuto 2 al minuto 7 se aplicó un gradiente lineal desde un 0% de A hasta un 80% de A y estas condiciones se mantuvieron así durante 5 minutos antes de volver a las condiciones originales.

Pero el mayor retraso se obtuvo al utilizar acetato amónico en ausencia de otros aditivos con una composición de fase móvil compuesta por A: 50%H<sub>2</sub>O/50%MeCN y fase B: 3%H<sub>2</sub>O/97%MeCN en el que ambas fases contenían acetato amónico 5 mM. También se testaron mayores concentraciones de acetato de amonio pero al no mejorar, la concentración se fijó en 5 mM. En estas condiciones se alcanzó un pH de 7,1. Con esta composición de fase móvil y un flujo de 0,3 mL./min se utilizó el siguiente gradiente: del minuto 0 al minuto 0,5 se mantuvo un 5% de A, del minuto 0,5 al minuto 6 se aplicó un gradiente lineal desde un 5% de A hasta el 100% de A. Estas condiciones se mantuvieron durante 5 minutos antes de volver a las condiciones originales.

A pesar de que las referencias que se tenían de la metodología de derivatización llevaban a cabo la reacción a temperatura ambiente, se pensó que era un parámetro a optimizar por lo que se llevaron a cabo pruebas a distintas temperaturas para comprobar si aumentaba el rendimiento de la reacción.

En estas pruebas preliminares se comprobó que la temperatura favorecía la reacción y que a mayor tiempo de reacción mejor era el rendimiento de la reacción. En estas pruebas solo se utilizaron la trimetilamina como amina terciaria, la dimetilamina como secundaria y la putrescina a modo de amina primaria, que a pesar de no parecerse a la metilamina, aportó información sobre cómo se comportaría una amina primaria.

En este estudio el pH se controló únicamente añadiendo distintos volúmenes de NaOH a distintas concentraciones hasta conseguir un pH 8. Este valor se había optimizado previamente

en experimentos en que no se controlaban otras variables, por ese motivo se partió de este valor de pH para realizar las primeras pruebas con distintos tiempos y temperaturas.

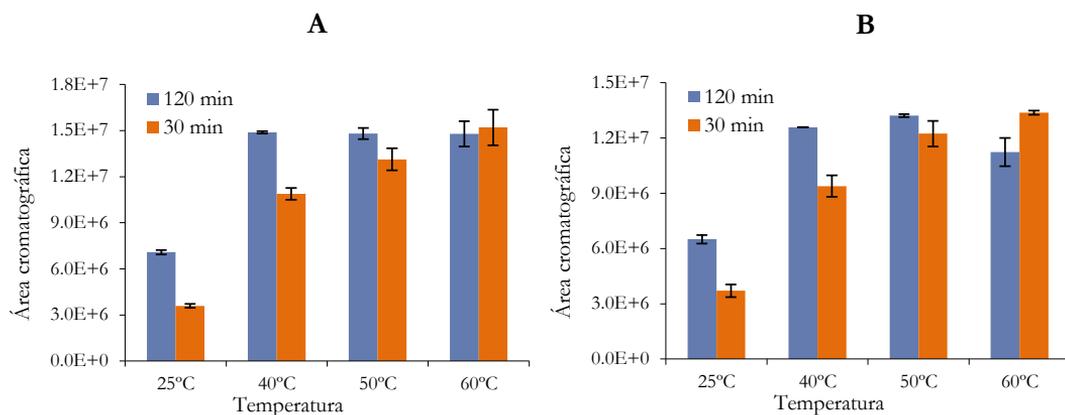


Figura 38: Área cromatográfica obtenida para la TMA ( $m/z$  174) a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (A) y área cromatográfica obtenida para la TMA en mezcla a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (B).

En la Figura 38A se aprecia como a 30 min, a mayor temperatura aumenta el área de la TMA. En el caso de 120 min se aprecia que a 40°C, 50°C y 60°C las áreas son prácticamente iguales, lo que nos indica que ya no se está generando más producto de reacción. En cambio, en la Figura 38B (estudio con una mezcla de aminas) se aprecia como con 120 min a 60°C las áreas comienzan a disminuir, probablemente porque en este último caso el reactivo es más limitante por reaccionar con otras aminas de la mezcla y está menos disponible para la trimetilamina.

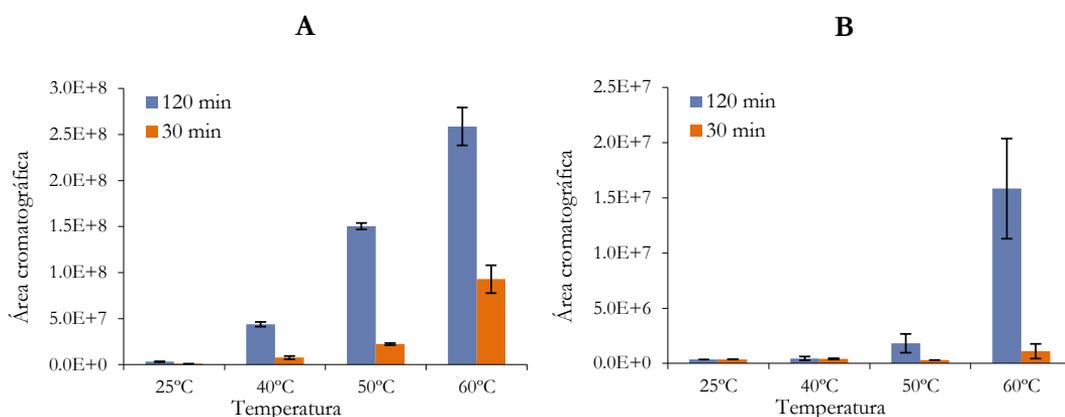


Figura 39: Área cromatográfica obtenida para la DMA ( $m/z$  274) en mezcla a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (A) y área cromatográfica obtenida para la PUT ( $m/z$  567) en mezcla a pH 8 con NaOH y a distintas temperaturas y tiempos (B).

En el caso de la DMA, es evidente que a mayor temperatura y más tiempo de reacción el rendimiento de la reacción es mejor (Figura 39A). Lo mismo que ocurre en el caso de la putrescina (PUT), pero en este caso se aprecia que la reacción es más lenta, ya que a 30 min de reacción prácticamente no hay diferencias entre las distintas temperaturas (Figura 39B). Este efecto de la temperatura será explicado con más detalle en el apartado de la optimización de la reacción.

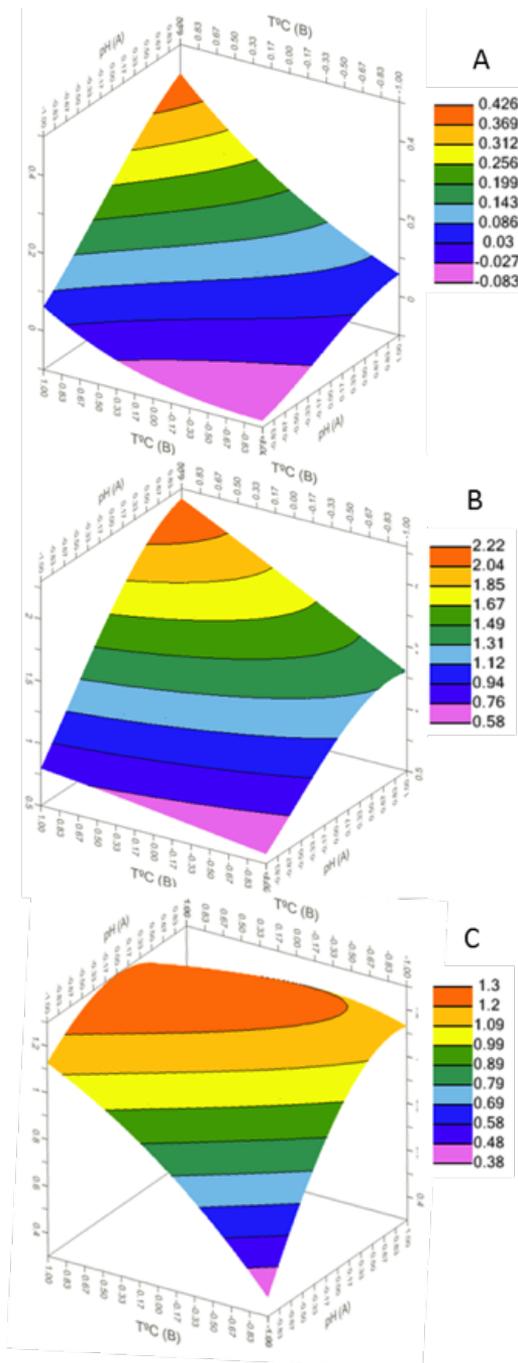


Figura 40: Superficies de respuesta de los productos de reacción de MA, DMA y TMA con bromoacetato de tert-butilo. El factor tiempo está representado en su valor óptimo (1) que corresponde a 60 minutos.

### 3.7.3.2.1 - Optimización de la reacción

Los pKa a 25°C de metilamina, dimetilamina y trimetilamina son 10,63, 10,73 y 9,81 respectivamente. A  $pH > pKa$  se favorece su volatilización por lo que se requiere un medio ácido para que estas aminas volátiles queden retenidas en los extractos. Sin embargo, la reacción con el bromoacetato de tert-butilo tiene lugar a pH básico por lo que se requiere añadir al extracto ácido un agente modificador de pH.

En el primer experimento de optimización se utilizó NaOH con este propósito y a partir de las superficies de respuesta (Figura 40) se obtuvieron los valores óptimos para cada factor (pH8, 60°C y 60 min).

Tanto en el caso de las aminas primarias como de las secundarias, se tomaron como puntos óptimos el pH 10, 60 minutos de tiempo de reacción y 60°C de temperatura. A pesar de estos valores, como se aprecia en la Figura 40, la pendiente de la superficie nos indica que todavía no se ha alcanzado un valor máximo, al menos dentro del espacio del diseño. Valores más altos de temperatura y tiempo hubiesen tenido un mayor rendimiento para ambos tipos de aminas.

En el caso de las aminas terciarias los valores óptimos si se encuentran dentro del espacio del diseño y se aprecia como existe un máximo por encima y por debajo del cual la respuesta disminuye. Este punto máximo corresponde a los valores de pH 8, 60°C de temperatura y 60 minutos de tiempo de reacción.

Una vez conocidos los valores óptimos para cada amina se tuvo que tomar una decisión para elegir los valores finales que serían aplicados a todas las aminas al mismo tiempo. Ya que el método fue pensado con un especial interés en las aminas terciarias, el pH, el factor más influyente en la superficie de respuesta de la TMA se fijó en pH8. Este valor corresponde al punto óptimo para la TMA y al mismo tiempo, la respuesta para aminas primarias y secundarias sigue siendo alta. Como el pKa de la TMA a 25°C es 9,81, probablemente el hecho de aumentar este valor tenga un efecto negativo (probablemente por su volatilización), mientras que para la MA y DMA (pKa: 10,63 y 10,73) no es así.

En el caso de la temperatura, el valor seleccionado fue el de 60°C ya que a esta temperatura los 3 tipos de aminas presentan unos buenos valores de respuesta.

El hecho de que en el caso de aminas primarias y secundarias sea necesario un mayor tiempo de reacción puede ser explicado porque son dos las moléculas de bromoacetato de tert-butilo las que entran a formar parte del producto de reacción mientras que en el caso de la TMA solo una molécula de bromoacetato reacciona. Esto es debido a un mayor impedimento estérico en el caso de la metil y dimetilamina tras haber reaccionado con la primera molécula del reactivo, lo que complica que tenga lugar la reacción con la segunda, siendo ésta más lenta.

Estas condiciones son bastante similares a las utilizadas por Johnson en orina humana, en las que utilizó amoníaco concentrado para asegurar un pH del medio de reacción superior a 7. Este experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente y en un medio acuoso, mientras que nuestra reacción es llevada a cabo en un medio mayormente orgánico (85%MeCN) y a 60°C.

En la Figura 40 se puede apreciar el gran efecto del pH en el rendimiento de la reacción y el NaOH no resultó ser el agente más adecuado para fijar un valor estable de pH. La cantidad necesaria de NaOH para ajustar el pH a 8 variaba considerablemente entre muestras (%CV>20). Por este motivo se probaron dos disoluciones tampón adecuadas para este rango de valores de pH (borato y carbonato). El uso de un tampón implicó una pérdida de sensibilidad, sobretodo en el caso del borato, así que finalmente se seleccionó el tampón carbonato ya que la estabilidad de la medida de pH entre muestras mejoró bastante. A pesar de esto se observó un efecto negativo en el rendimiento de las aminas secundarias (51%) y terciarias (39%), mientras que en el caso de las primarias se apreció una mejoría (54%). Además de esto el tampón carbonato resulta más apropiado para el detector de masas por su volatilidad. De este modo las condiciones finales del experimento quedaron fijadas en pH8 con tampón carbonato, 60 minutos de tiempo de reacción y 60°C de temperatura

## 3.7.3.2.2 -Optimización de la separación y análisis mediante HPLC-MS

Los primeros ensayos realizados con este reactivo se llevaron a cabo trabajando en modo FIA, ya que se había observado previamente que los productos de reacción generados con el bromoacetato de etilo no se podían separar en una columna C18 y la naturaleza química de los generados con el bromoacetato de tertbutilo era similar.

El trabajar en FIA resultó útil mientras se trabajaba con aminas de manera individual, pero en el momento de utilizar una mezcla de varias juntas la sensibilidad disminuyó de manera considerable al no existir separación y realizarse la cuantificación de varios analitos en cuestión de milisegundos. Para evitar esto, se decidió trabajar con una columna que retuviese este tipo de compuestos y se optó por una columna de interacción hidrofílica, Luna HILIC, diseñada para retener compuestos polares por las interacciones que presenta.

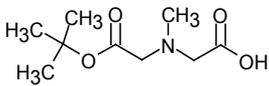
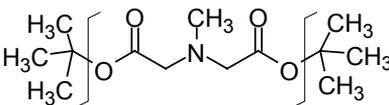
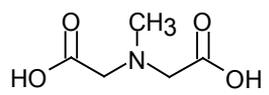
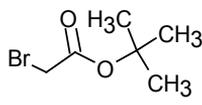
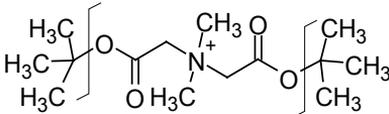
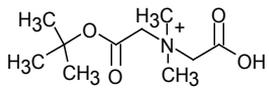
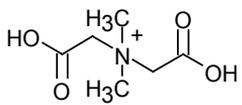
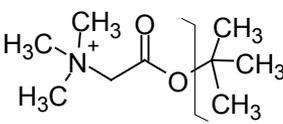
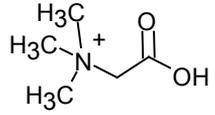
Al reaccionar con el BATB, la DMA y TMA se convierten en aminas cuaternarias, algo que no ocurre en el caso de la MA, que se transforma en una amina terciaria, eluyendo próxima al volumen muerto disminuyendo de esta forma bastante su sensibilidad. De esta manera los compuestos generados a partir de DMA y TMA quedan retenidos y son bien separados en esta columna. Del mismo modo el TMAO también queda retenido y es posteriormente eluido a pesar de no reaccionar con el BATB.

A excepción del TMAO, todos los compuestos fueron cuantificados en modo MS2 pero también se recogieron los espectros de masas en modo MS1 para comprobar si otras aminas estaban presentes en los extractos y habían reaccionado con el BATB.

En cuanto a las estructuras moleculares propuestas para MA, DMA y TMA, éstas aparecen en la Tabla 16. En el caso de la MA y DMA son dos las moléculas del agente derivatizante las que entran a formar parte de la nueva molécula mientras que en el caso de la TMA solo participa una. Los fragmentos propuestos resultan de la pérdida de un fragmento de tertbutilo en el caso de la TMA ( $m/z$ : 118) mientras que en el caso de la MA y DMA se generan dos fragmentos distintos, uno por la pérdida de un solo fragmento de tertbutilo ( $m/z$ : 204 y  $m/z$ : 218, respectivamente) y otro por la pérdida de dos ( $m/z$ : 147 and  $m/z$ : 162, respectivamente). Los primeros fueron utilizados para la cuantificación y los segundos a modo de ion de confirmación.

El mecanismo de reacción propuesto, que aparece representado en la Figura 35, implica la pérdida del bromuro del agente derivatizante, un compuesto electrófilo que es atraído por el nitrógeno de las aminas, nucleófilas, para generar un enlace químico y dar lugar a las moléculas propuestas.

Tabla 16: Estructuras químicas propuestas para los productos de reacción del método BATB.

Bromoacetato de tert-butilo	Amina	Ion precursor	Ion fragmento
			
	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_3$ $\text{CH}_5\text{N}$ $m/z: 31^a$ <b>MA</b>	 $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{NO}_4$ $m/z: 260^a$	$\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_4$ $m/z: 204^{a,b}$  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ $m/z: 147^{c,d}$
 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{BrO}_2$ $m/z: 195^a$	$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_3$ $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ $m/z: 45^a$ <b>DMA</b>	 $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{NO}_4$ $m/z: 274^d$	 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ $m/z: 218^{b,d}$  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_4$ $m/z: 162^{c,d}$
	$\text{H}_3\text{C}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$ $m/z: 59^a$ <b>TMA</b>	 $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_2$ $m/z: 174^{b,d}$	 $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_2$ $m/z: 118^{b,d}$

<sup>a</sup>  $[M+H]^+$ 
<sup>b</sup> Ion de cuantificación

<sup>c</sup> Ion de confirmación

<sup>d</sup>  $[M]^+$

La reacción con otras aminas se confirmó llevando a cabo la reacción en las condiciones optimizadas para MA, DMA y TMA y posteriormente se analizaron mediante infusión directa en el espectrómetro de masas. Esto se hizo utilizando ambos agentes derivatizantes, bromoacetato de etilo y bromoacetato de tert-butilo, con las siguientes aminas: metilamina (Figura 41), etilamina (Figura 42 y Figura 51), butilamina (Figura 43 y Figura 52), trietilamina (Figura 44 y Figura 53), putrescina (Figura 45 y Figura 54), cadaverina (Figura 46 y Figura 55), espermina (Figura 47 y Figura 56), espermidina (Figura 48 y Figura 57), tiramina (Figura 49 y Figura 58) e histamina (Figura 50 y Figura 59).

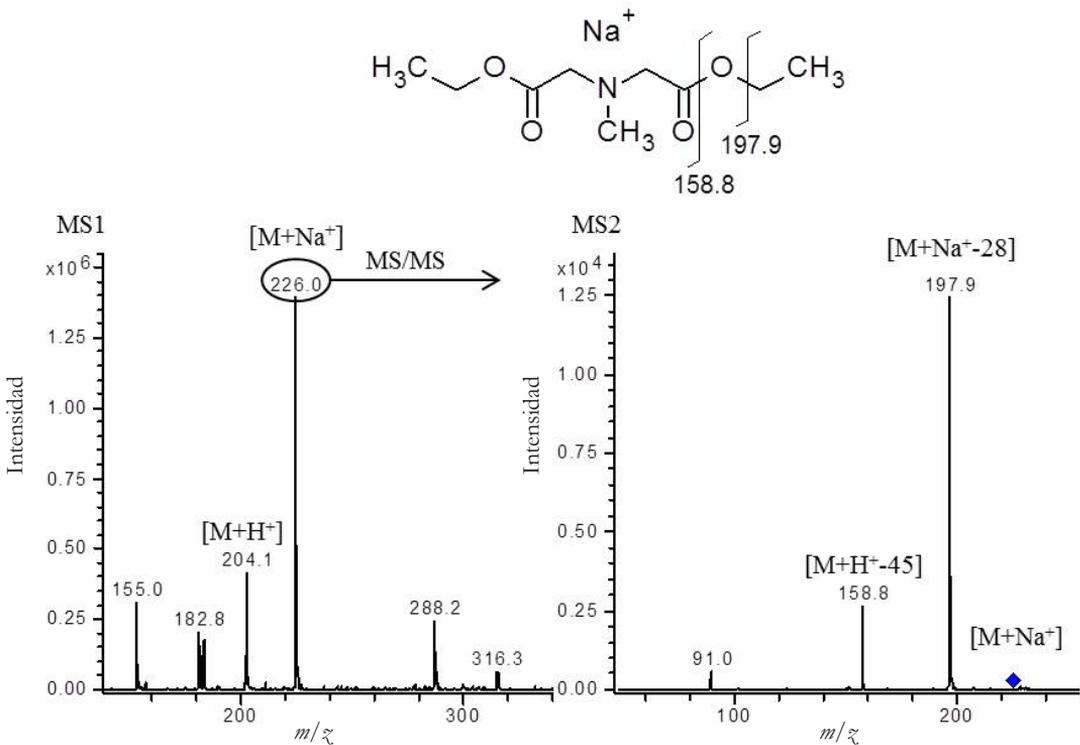


Figura 41: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la metilamina y el bromoacetato de etilo.

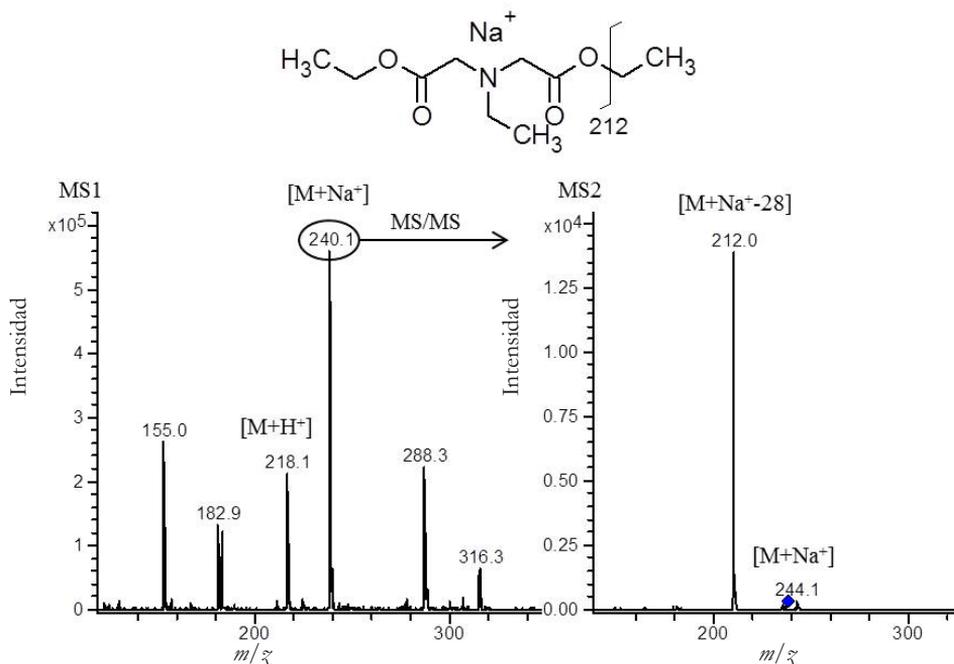


Figura 42: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la etilamina y el bromoacetato de etilo.

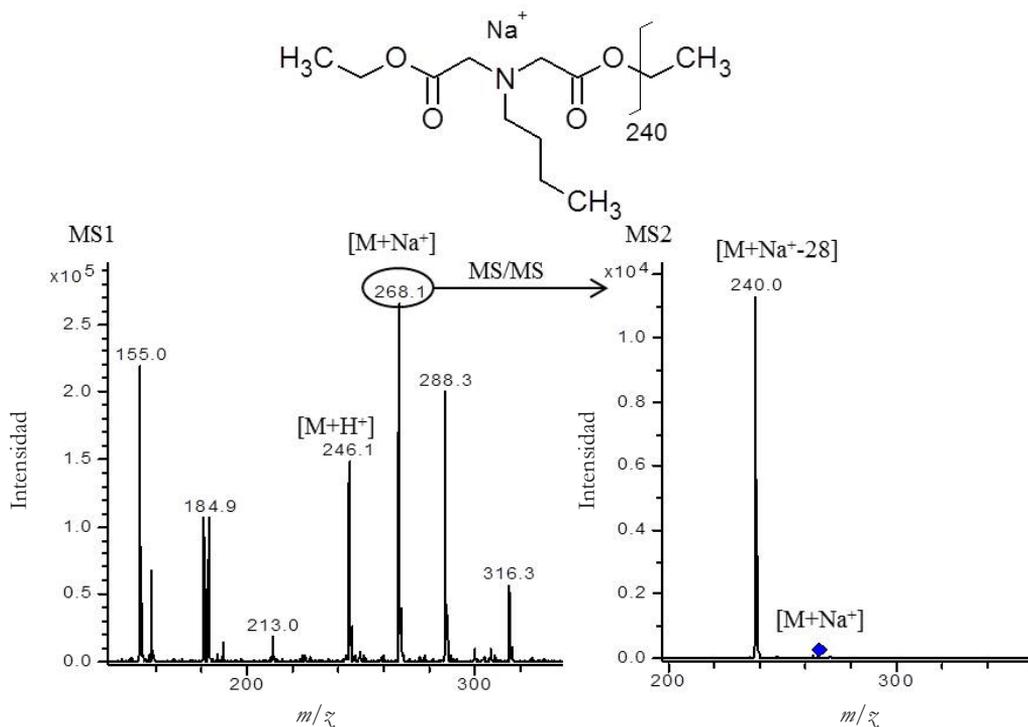


Figura 43: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la butilamina y el bromoacetato de etilo.

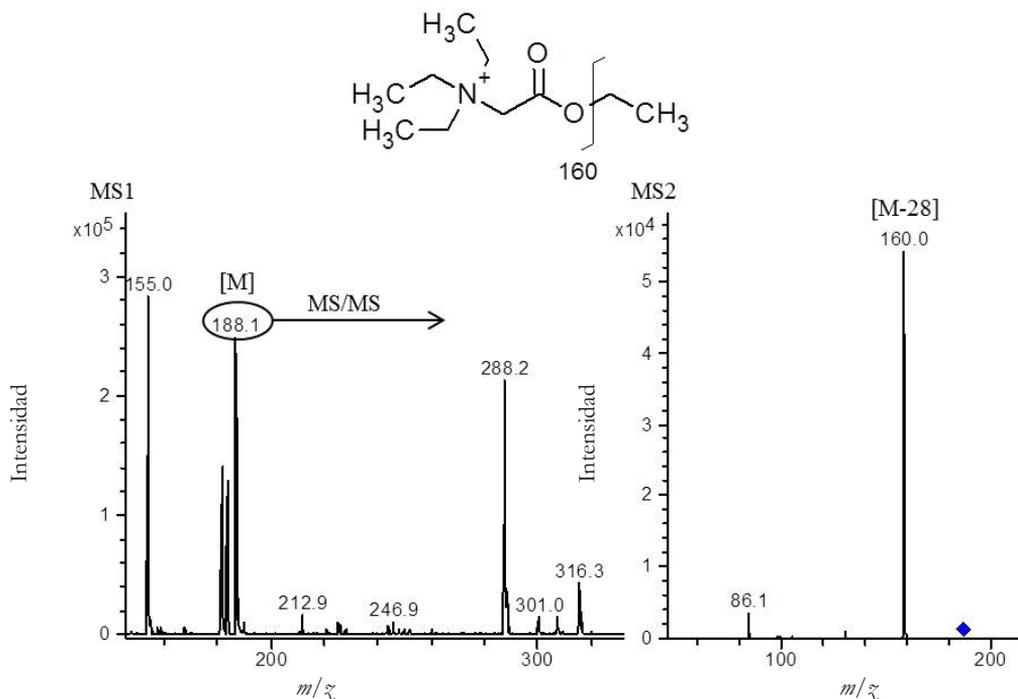


Figura 44: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la trietilamina y el bromoacetato de etilo.

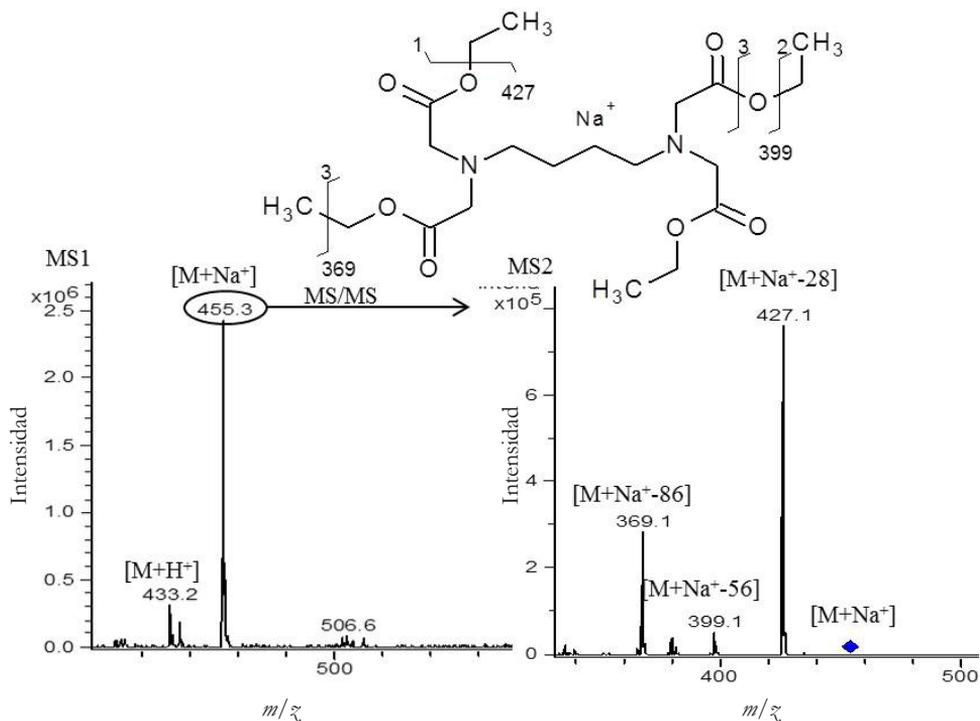


Figura 45: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la putrescina y el bromoacetato de etilo.

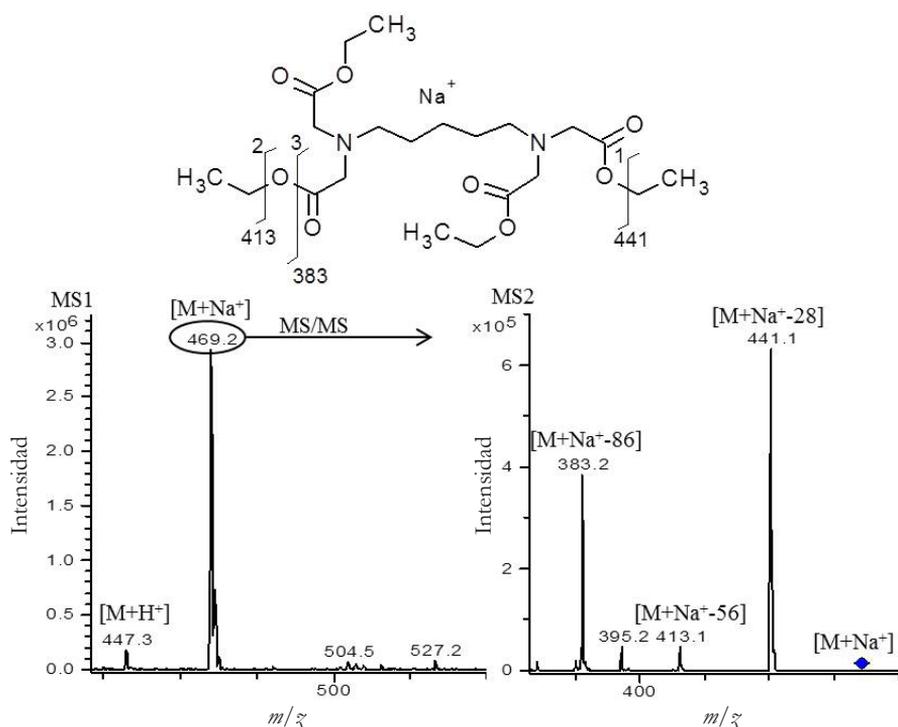


Figura 46: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la cadaverina y el bromoacetato de etilo.

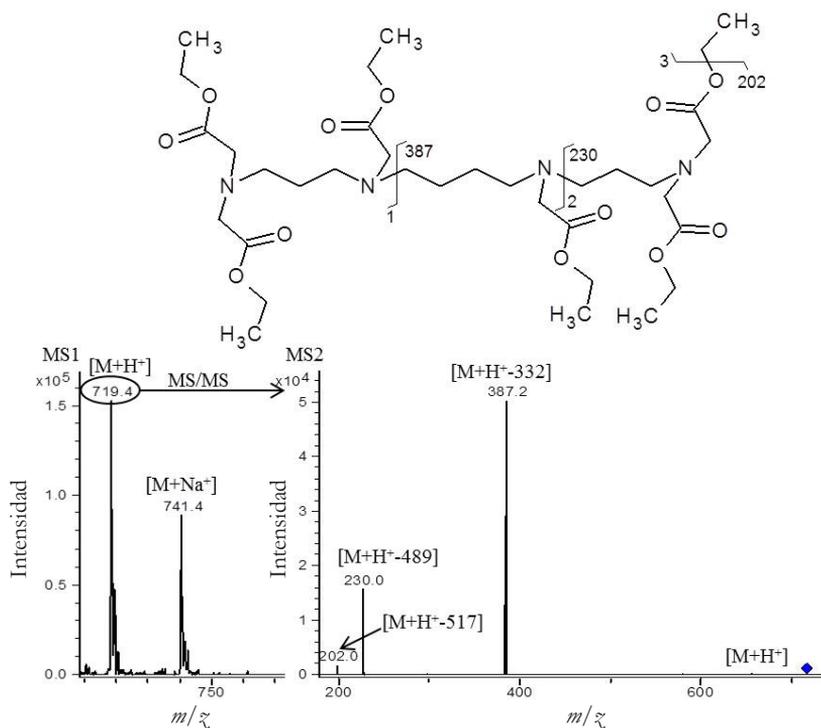


Figura 47: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermina y el bromoacetato de etilo.

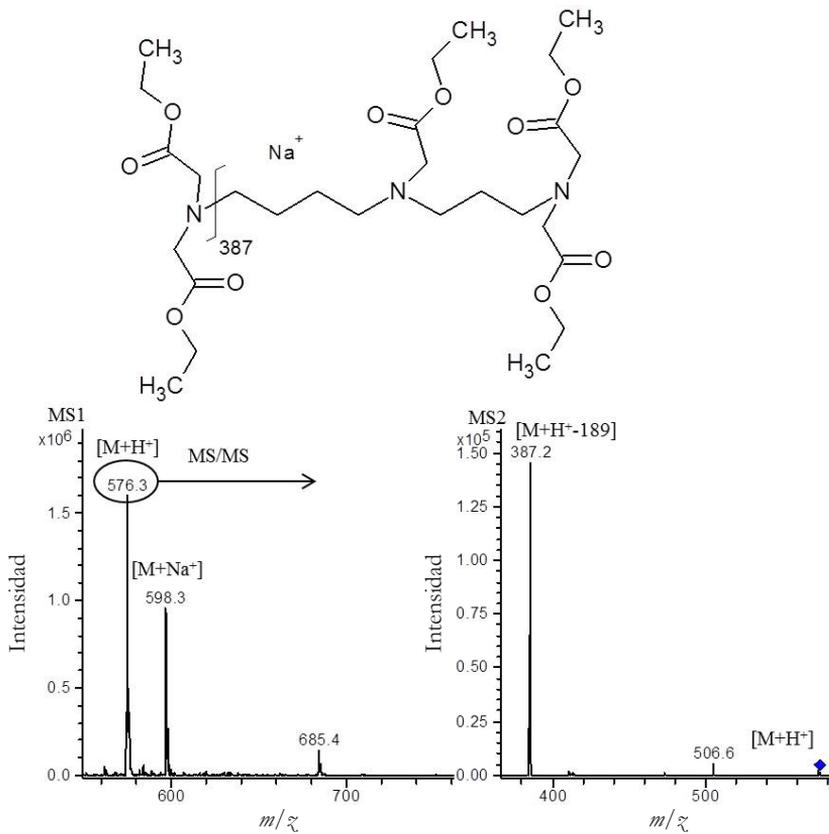


Figura 48: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermidina y el bromoacetato de etilo.

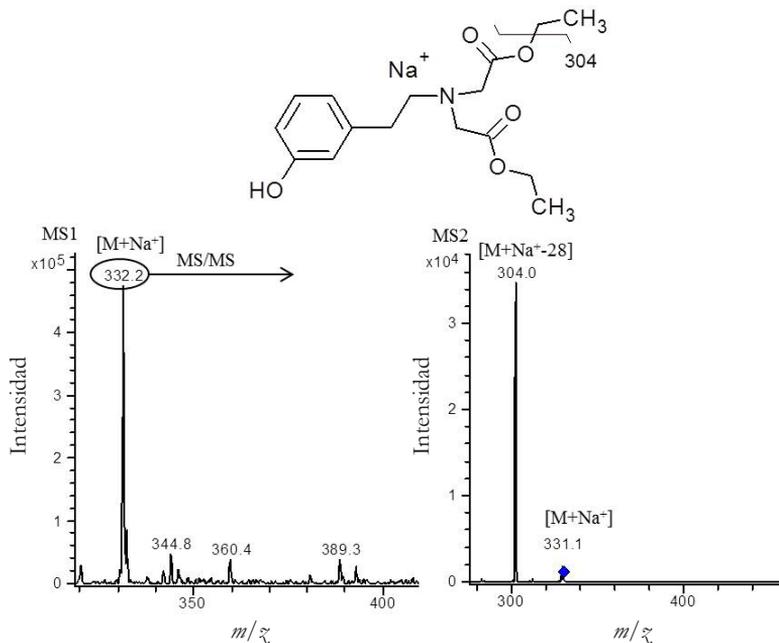


Figura 49: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la tiramina y el bromoacetato de etilo.

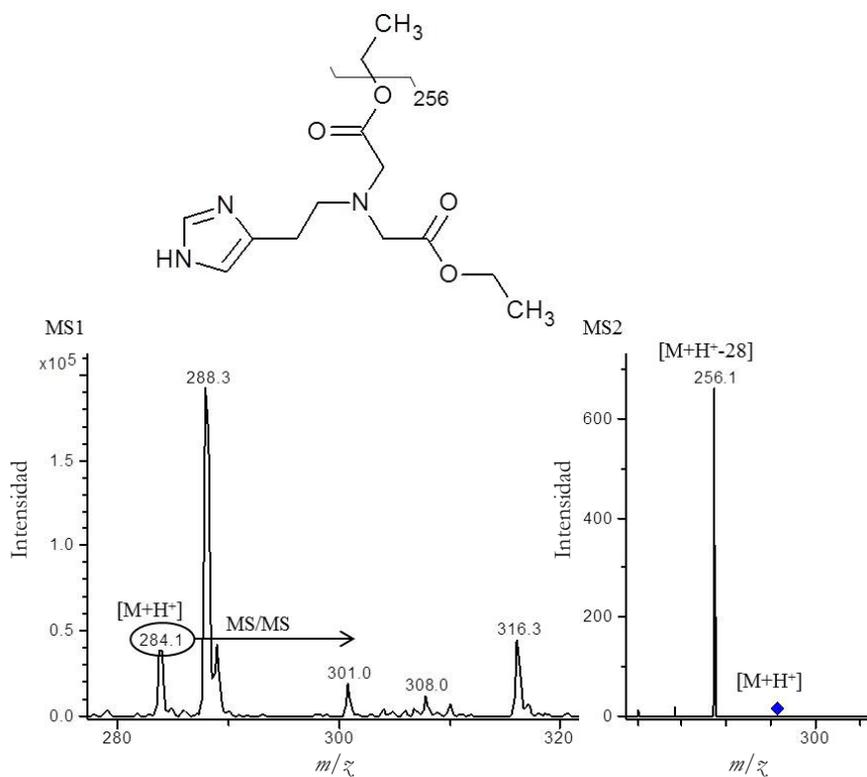


Figura 50: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la histamina y el bromoacetato de etilo.

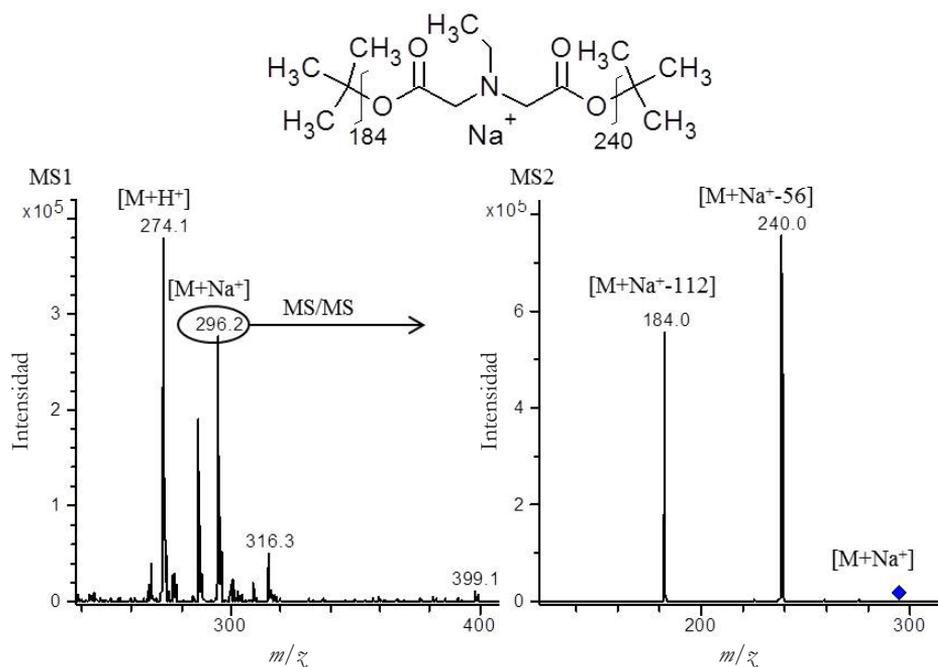


Figura 51: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la etilamina y el bromoacetato de tert-butilo.

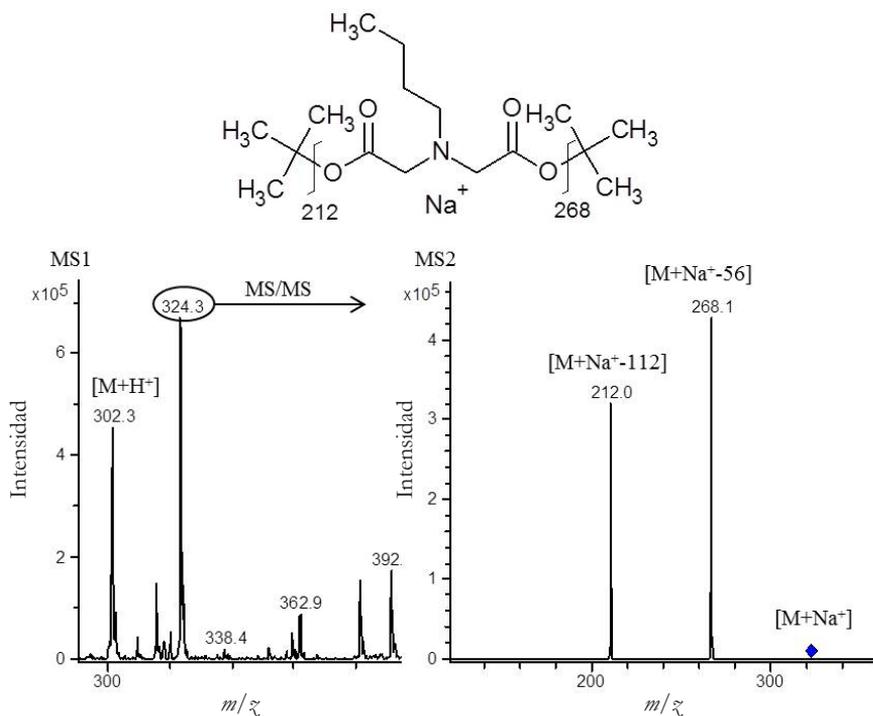


Figura 52: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la butilamina y el bromoacetato de tert-butilo.

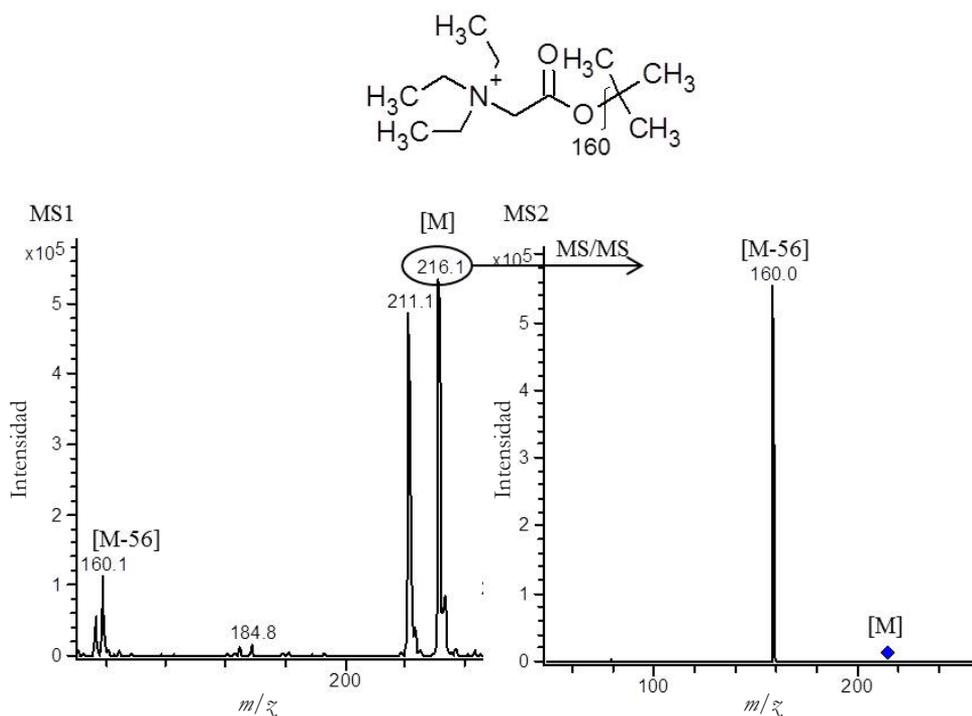


Figura 53: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la trietilamina y el bromoacetato de tert-butilo.

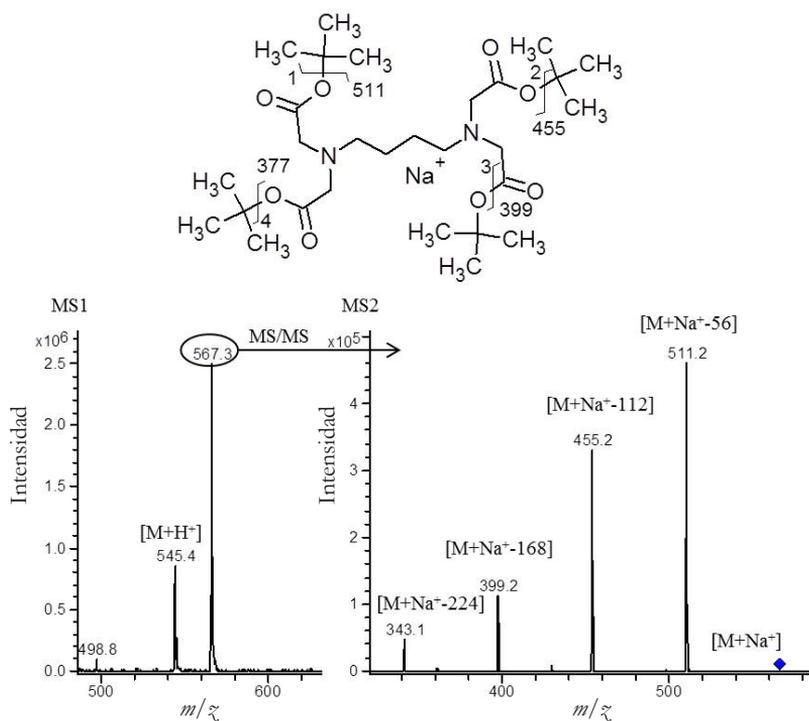


Figura 54: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la putrescina y el bromoacetato de tert-butilo.

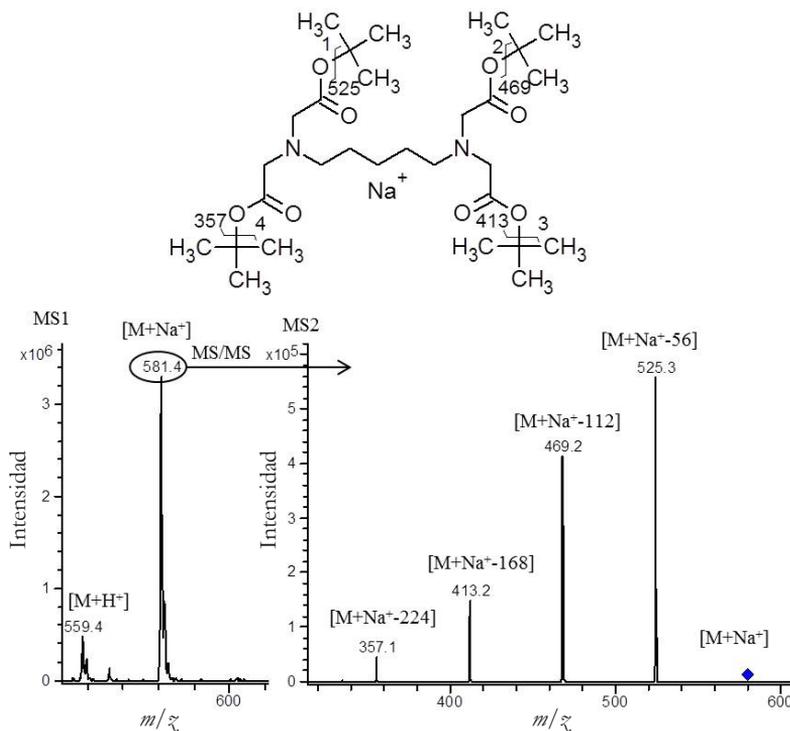


Figura 55: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la cadaverina y el bromoacetato de tert-butilo.

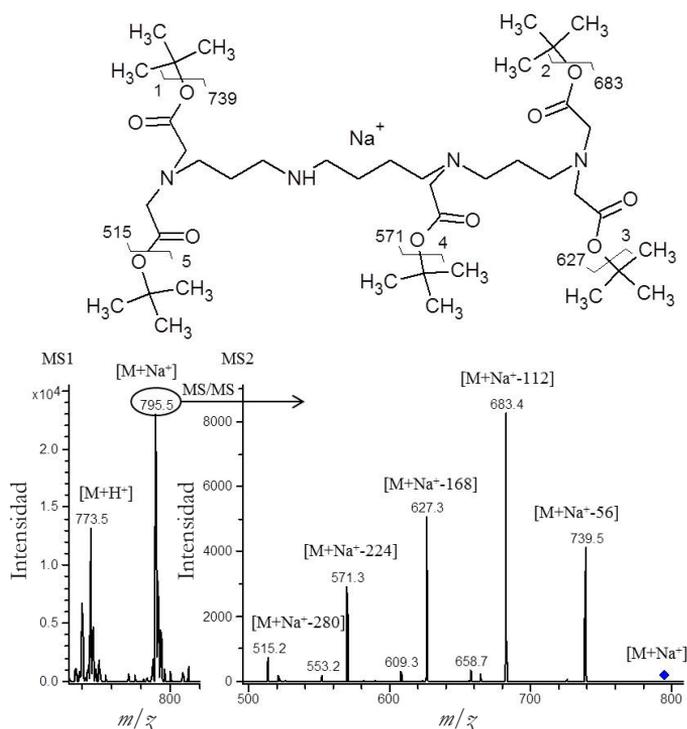


Figura 56: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermina y el bromoacetato de tert-butilo.

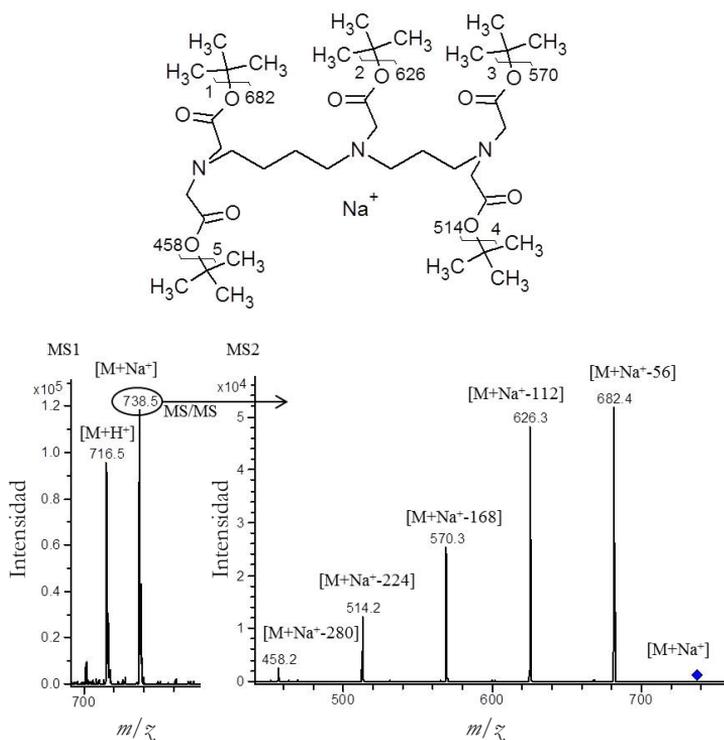


Figura 57: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la espermidina y el bromoacetato de tert-butilo.

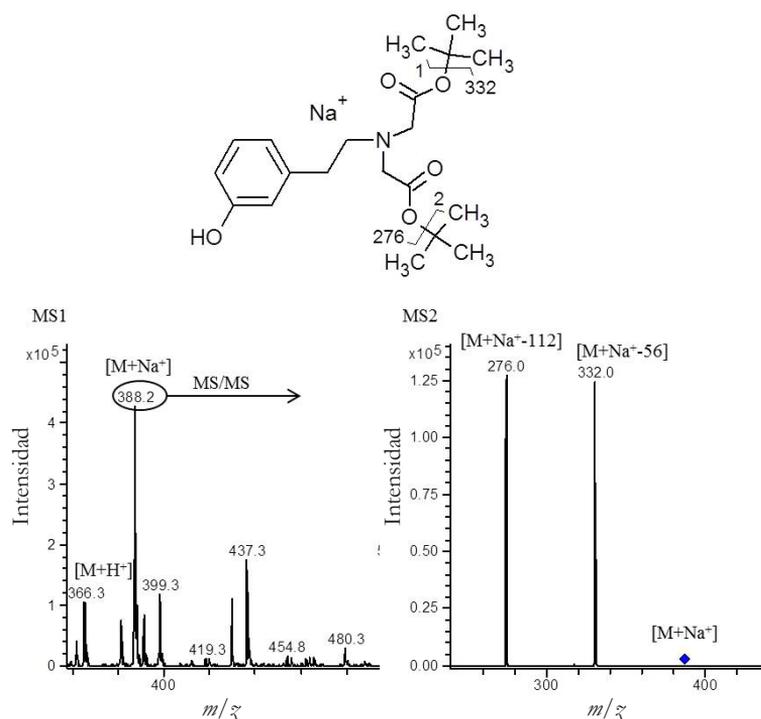


Figura 58: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la tiramina y el bromoacetato de tert-butilo.

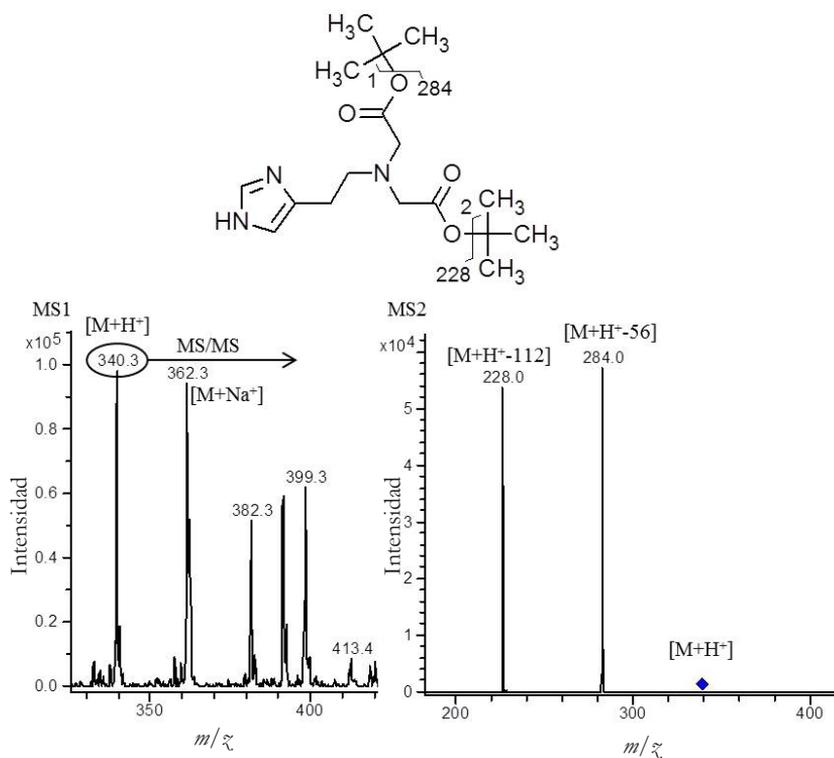


Figura 59: Estructura química y espectro de masas MS1 y MS2 del producto de reacción entre la histamina y el bromoacetato de tert-butilo.

Para determinar el volumen de inyección óptimo se testaron distintos volúmenes de inyección (3  $\mu\text{L}$ , 4  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 6  $\mu\text{L}$  y 8  $\mu\text{L}$ ). Como se puede apreciar en la Figura 60, en el caso de 3 y 4  $\mu\text{L}$ , el tiempo de retención de DMA y TMA es prácticamente el mismo. Al pasar a 5  $\mu\text{L}$  los picos se retrasaron pero también se ensancharon. En el caso del volumen de inyección de 8  $\mu\text{L}$  los picos resultaron demasiado anchos y se perdió ligeramente la simetría de los picos.

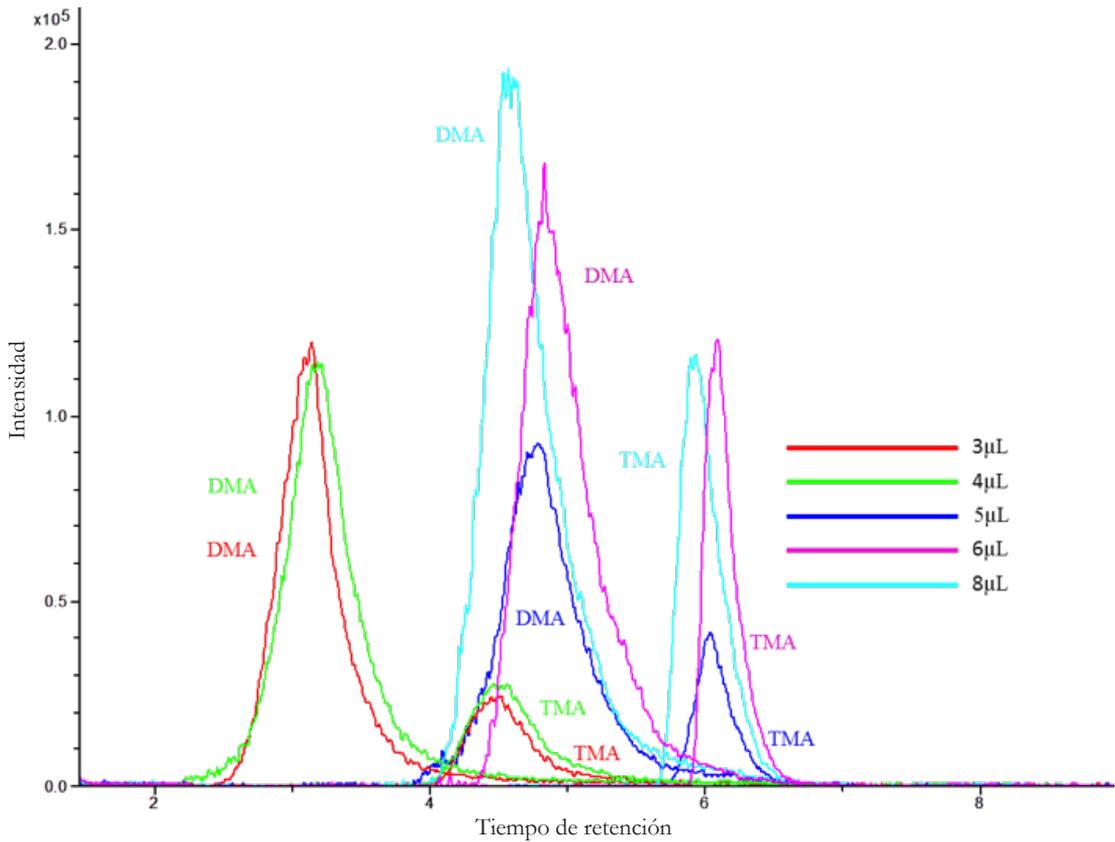


Figura 60: Cromatogramas superpuestos de DMA y TMA en función de los distintos volúmenes de inyección testados.

Por lo explicado anteriormente, el volumen de inyección se fijó en 6  $\mu\text{L}$  ya que fue el mayor volumen admitido por la columna antes de que se deformase la simetría de los picos. En la Figura 61 se puede observar un cromatograma obtenido en las condiciones óptimas con muestras blanco y dopadas a distintas concentraciones.

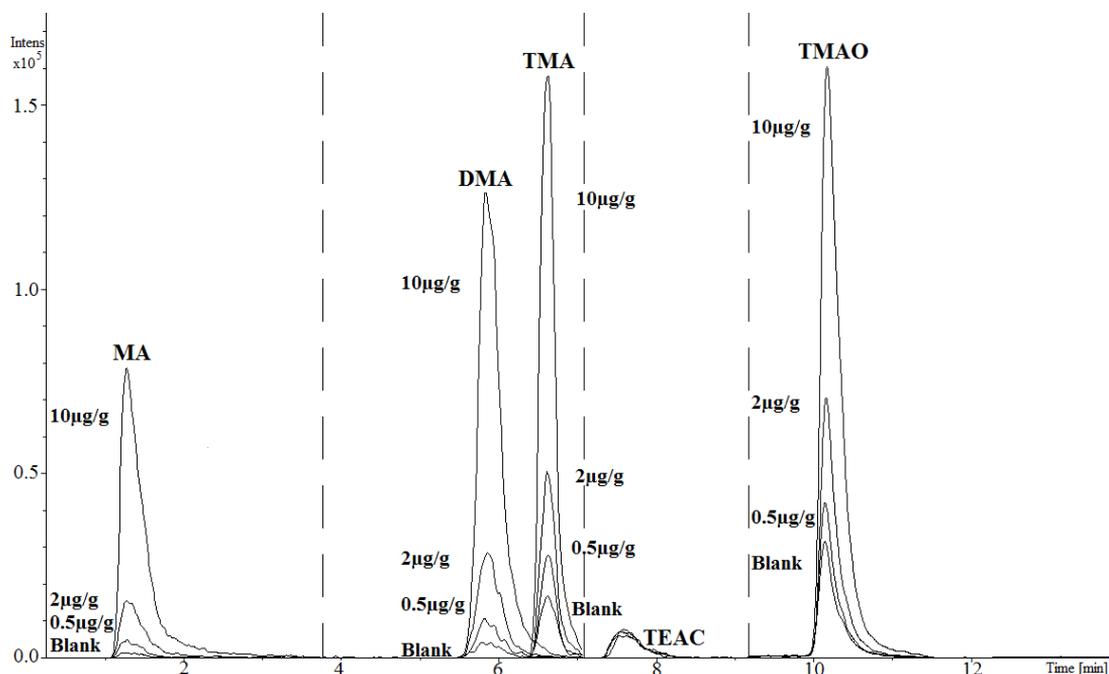


Figura 61: Cromatograma que muestra los distintos compuestos a distintas concentraciones de dopaje.

### 3.7.3.2.3 -Validación

La selectividad del método ha sido demostrada frente a aminas primarias, secundarias y terciarias ya que el tiempo de retención para cada tipo de amina, así como los valores de  $m/z$  de los iones precursores y de los fragmentos son distintos.

#### 3.7.3.2.3.1 -Intervalo lineal

La linealidad del método fue primeramente verificada en disoluciones acuosas y el intervalo lineal fue establecido desde 0,1 µg/L hasta 25 µg/L. Al pasar a muestras reales, se apreció que existía un efecto matriz que obligó a diluir la muestra antes de llevar a cabo la reacción de derivatización. Cuando se trabajó con trucha, se llevó a cabo una dilución 1:25 mientras que en el caso de la merluza y el chicharro se requirió una dilución 1:40 adicional (dilución final 1:1000) en ácido acético para evitar el mayor efecto matriz de estas dos especies. En la Figura 62 se puede apreciar el efecto matriz observado tanto en la merluza como en el chicharro. Estas muestras fueron dopadas a distintas concentraciones con una mezcla de aminas y se llevaron a cabo las distintas diluciones para demostrar la necesidad de una dilución adicional en el caso de

pescados de agua salada. Posterior a esta dilución se llevó a cabo una dilución final (1:25) en la que se utilizó una mezcla de MeCN: H<sub>2</sub>O (6:4, v/v) para conseguir una composición química similar a la de la fase móvil.

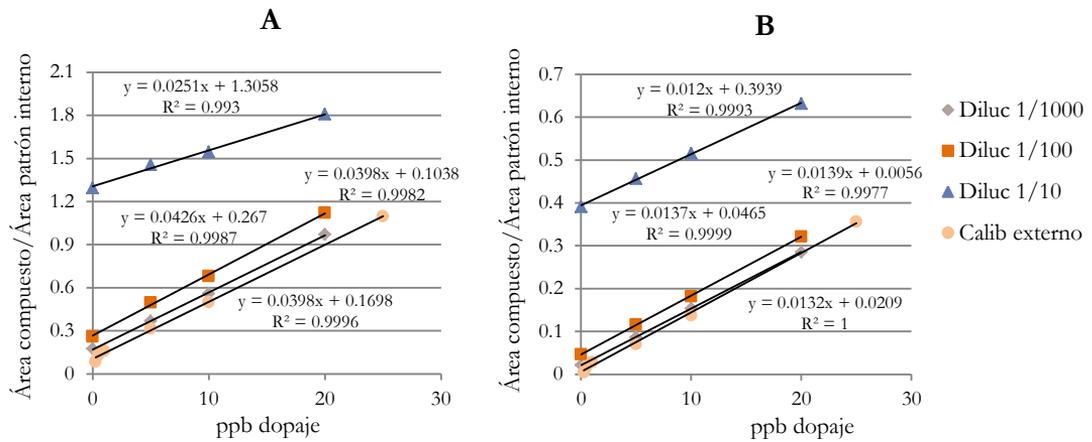


Figura 62: Dopajes a distintas concentraciones y posteriores diluciones para demostrar el efecto matriz en los pescados de agua salada. Pescado utilizado: Merluza. A: DMA y B: TMA.

Las concentraciones utilizadas para analizar la linealidad en muestras de trucha fueron 0,25-10 µg/g para MA, DMA y TMA, y 6,25-500 µg/g para TMAO incluyendo 3 niveles de concentración y una muestra blanco.

En el caso de merluza y chicharro, al presentar un mayor efecto matriz, los niveles de dopaje de las muestras tuvieron que ser mayores a la fuerza. En este caso se utilizaron 3 niveles de concentración (10 µg/g, 25 µg/g y 50 µg/g para MA, DMA y TMA y 250 µg/g, 625 µg/g y 1250 µg/g para TMAO) por triplicado (n=3) y una muestra blanco (n=3), que fueron analizados en el mismo día.

En la Figura 63 se aprecia como en ambos casos, pescado de agua dulce y pescado marino, la linealidad se mantiene a lo largo de todo el rango de concentraciones estudiado. A pesar de la dilución realizada, las pendientes de la recta de calibrado con chicharro fueron mayores que las hechas con disoluciones estándar. Por consiguiente se aprecia una pequeña sobreestimación (alrededor de 120%), que no fue corregida con una mayor dilución de la muestra para evitar perder sensibilidad. En el caso del pescado marino, el contenido inicial de TMA fue mayor que en el pescado de agua dulce, debido a la mayor concentración de TMAO presente en ellos que rápidamente es convertido a TMA por los organismos de deterioro específicos.

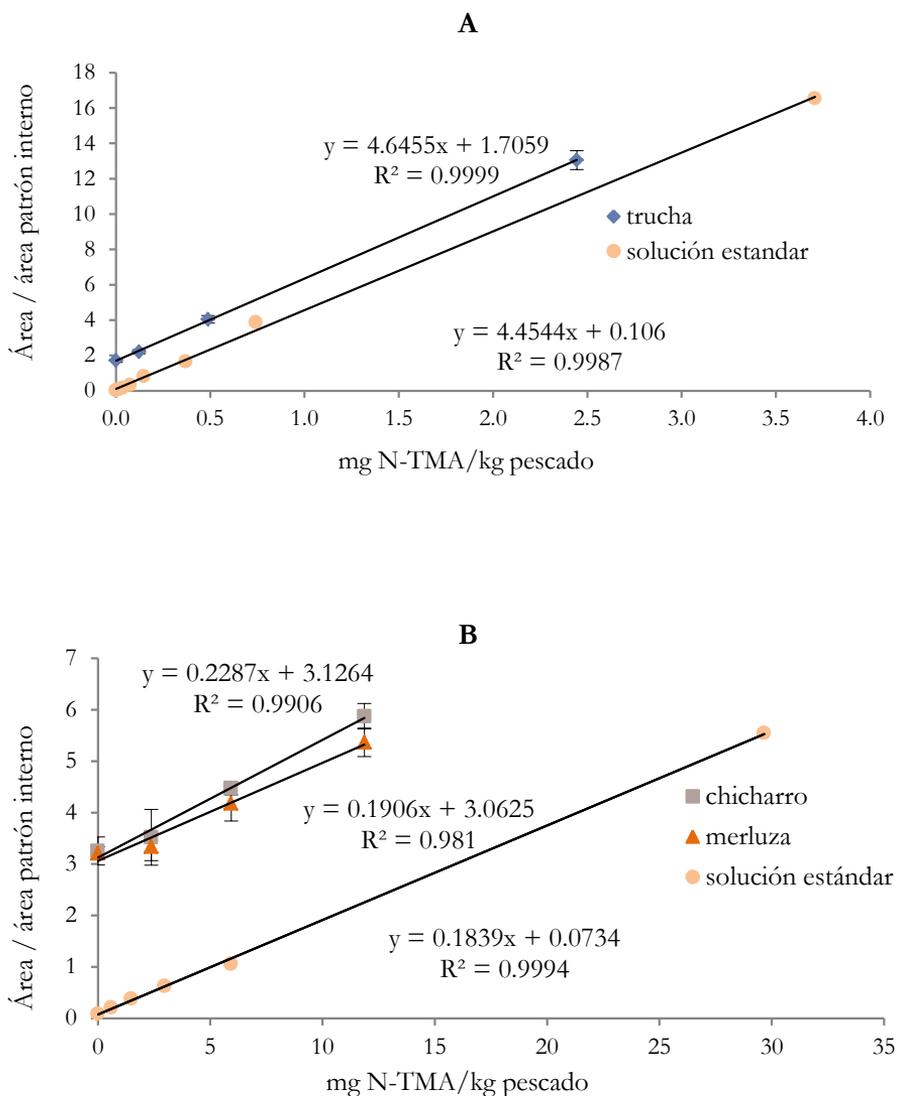


Figura 63: Linealidad en las tres especies de estudio, trucha (A), merluza y chicharro (B).

Los límites de detección y cuantificación para los distintos compuestos en pescado de agua dulce y pescado marino se encuentran en la Tabla 17 y están referidos al músculo del pescado. Estos límites variaron de 0,03 hasta 2,17 mg N/kg en pescado de agua dulce y desde 1,07 a 86,75 mg N/kg en pescados marinos, lo que hizo esta metodología muy útil para cuantificar sus concentraciones en pescado fresco o con muy poco contenido en TMA.

Tabla 17: Límites de detección y cuantificación de cada uno de los compuestos en pescado de agua dulce y marina. Los valores están corregidos por la dilución correspondiente en pescado de agua dulce (1:825) y en pescado marino (1:25000).

Compuesto	LOD		LOQ		Curva de calibración	
	Pescado agua dulce (mg N Kg <sup>-1</sup> )	Pescado marino (mg N Kg <sup>-1</sup> )	Pescado agua dulce (mg N Kg <sup>-1</sup> )	Pescado marino (mg N Kg <sup>-1</sup> )	Ecuación <sup>a</sup>	r <sup>2</sup>
<b>MA</b>	0.11	4.55	0.37	14.88	y=1709.86x + 0.186	0.999
<b>DMA</b>	0.10	4.18	0.28	11.60	y=2689.82x + 0.144	0.999
<b>TMA</b>	0.03	1.07	0.08	3.24	y=2587.53x + 0.062	0.997
<b>TMAO</b>	2.17	86.75	3.50	139.77	y=167.02x - 0.289	0.999

<sup>a</sup> Ecuación calculada con soluciones estándar sin corregir por la dilución

## 3.7.3.2.3.2 -Precisión y exactitud

En las muestras de trucha, los valores de recuperación variaron desde 70% al 87% para MA, del 80% al 96% para la DMA y desde 92% al 107% para la TMA (Tabla 18). Estos valores fueron muy parecidos a los obtenidos en pescado marino excepto para el TMA en chicharro. Estos valores de recuperación serán utilizados como corrección durante la cuantificación de muestras reales. Del mismo modo, en el caso de la trucha también se obtuvieron recuperaciones más altas para el TMAO.

En cuanto a la repetibilidad, se analizó la repetibilidad intra e inter día. Como se puede apreciar en la Tabla 18, los valores intradía de desviación estándar relativa se encuentran entorno al 10% excepto en el caso de la TMA y el TMAO en el nivel más bajo de dopaje (0,5 µg/g TMA y 12,5 µg/g de TMAO). Estos niveles de dopaje se encuentran muy cerca de la cantidad presente en las muestras blanco. En pescado marino, la repetibilidad intradía fue expresada como desviación estándar y en todos los casos los valores se encontraron por debajo o alrededor del 10% excepto en la DMA y la TMA al nivel más bajo de dopaje y en el TMAO en el nivel más alto de dopaje. Estos efectos pueden ser debidos al bajo nivel de dopaje y la alta concentración de estos compuestos encontradas en las muestras blanco.

Tabla 18: Valores de recuperación para pescados de agua dulce y marinos.

Compuesto	Dopaje (µg/g) <sup>a</sup>	Trucha				Chicharro	Merluza
		Recuperación intradía <sup>b</sup>	DER intradía (%) <sup>c1</sup>	DER interdía (%) <sup>c2</sup>	Valor F <sup>d</sup>		
<b>MA</b>	0,5/10	69,4	7,5	12,6	3,83	77±10	73,3±5,2
	2/25	76,7	5,9	13,3	6,37	90,1±2,3	83,2±5,2
	10/50	86,7	5,6	12,1	2,63	93,2±4,6	95±11
<b>DMA</b>	0,5/10	80,1	10,3	13,7	2,28	93±19	50±22
	2/25	86,1	5,8	10,3	4,08	91,1±2,1	74,4±3,1
	10/50	93,1	4,9	7,8	3,79	92,2±4,4	96±12
<b>TMA</b>	0,5/10	91,5	22,0	13,5	0,52	131±56	74 <sup>f</sup>
	2/25	107,2	9,4	10,4	1,37	114±12	90±32
	10/50	104,1	4,7	8,3	4,30	122±11	103±13
<b>TMAO</b>	12,5/250	124,2	20,2	10,4	0,09	129,2±2,8	n.d. <sup>g</sup>
	50/625	127,2	13,3	25,5	3,38	104±14	66±68
	250/1250	115,2	3,6	23,1	13,75	104±20	77±22
Critical value					4,26		

<sup>a</sup> Niveles de dopaje: trucha/merluza y chicharro<sup>b</sup> Valores expresados como la media (n=10) de las recuperaciones de un día de experimento<sup>c1</sup> Desviación estándar relativa de un único día (n=10) y de <sup>c2</sup>tres días de experimento (n=10)<sup>d</sup> Valor F. Calculado como VAR interdía/VAR intradía<sup>e</sup> Valores de recuperación expresados como valores medios (n=3) más la desviación estándar (n=1)<sup>g</sup> No disponible

La repetibilidad interdía estuvo cercana al 10% de DER (7,8-13,7%) para todos los compuestos a excepción del TMAO. La cantidad de TMAO presente en las muestras blanco resulto muy alta y diferente en cada día de análisis lo que hizo aún más difícil encontrar diferencias a los niveles de dopaje seleccionados.

En la Tabla 18. se puede observar que solo un valor excedió el valor crítico de la prueba F, TMAO al nivel de dopaje de 250 µg/g luego se puede concluir que la metodología es repetible para todas las aminos que han sido testadas.

Los resultados obtenidos a diferentes niveles de concentración con la metodología del BATB fueron comparados con la metodología del ácido pícrico (AOAC 971.14). A partir de la Figura 64 se puede deducir una buena correlación entre las dos metodologías en todos los tipos de muestras. Debido a la menor sensibilidad del método del ácido pícrico, se aplicaron niveles de dopaje más altos para poder correlacionar las dos metodologías. Esto implicó una mayor dilución de la muestra en el método del BATB por lo que se realizó una dilución extra (1:10) para poder comparar los resultados de las dos metodologías.

El método del BATB ha permitido la determinación de distintas aminos al mismo tiempo consiguiendo al mismo tiempo una mayor sensibilidad para la TMA. Una vez aplicados los factores de corrección, el análisis de las muestras es rápido y bastante automatizado.

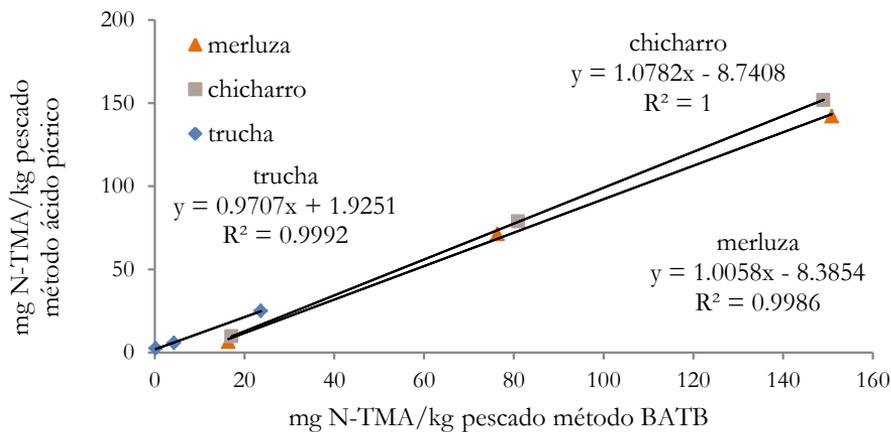


Figura 64: Correlación del método BATB y el método ácido pícrico.

### *3.7.3.2.3.3 -Robustez*

Los factores más críticos a la hora de llevar a cabo la reacción de derivatización de las aminas fueron el pH del medio de reacción, la dilución de la muestra y en menor proporción el tiempo de reacción.

La TMA presentó una máxima área de respuesta en el rango de pH estudiado, donde pequeños cambios no ejercían un gran efecto en el rendimiento de la reacción. Por otro lado, la MA y DMA no alcanzaron un máximo en el rango estudiado y mayores valores de pH hubieran tenido un mejor efecto en los resultados obtenidos. A pesar de este hecho, el hecho de utilizar tampón carbonato 0,5 M permitió obtener rendimientos óptimos para la TMA y bastante buenos para la MA y DMA.

En cuanto a la dilución de la muestra, hay que mencionar que los distintos pescados tuvieron distintos efectos matriz, que pudieron ser apreciados a partir de los valores de recuperación. Se podrían haber llevado a cabo mayores diluciones de matriz, pero la sensibilidad de la metodología habría empeorado, luego se llegó a un compromiso entre estos dos factores.

Los tiempos de reacción fueron optimizados y aunque en el caso de MA y DMA mayores tiempos de reacción hubiesen tenido mejores resultados, los tiempos mayores de 60 minutos tuvieron un efecto negativo en el rendimiento de la TMA.

Se puede concluir que para obtener un buen rendimiento de reacción, es necesario el control del pH y de la dilución de la matriz, mientras que el tiempo de reacción podría ser adaptado en función de la amina de interés (primaria, secundaria o terciaria).

### *3.7.3.2.3.4 -Estabilidad de los extractos y los productos de reacción*

Se observó que al sacar las muestras o las disoluciones patrón del baño termostático las aminas secundarias continuaban reaccionando a pesar de la falta de calor. Mediante inyecciones seriadas del mismo vial se verificó que esto ocurría hasta 24h después de la extracción del baño termostático (Figura 65). Teniendo en cuenta los resultados del proceso de optimización y que la reacción no tiene lugar a pH bajo, se decidió añadir 10  $\mu$ L de ácido fórmico 5 M para parar la reacción. En el caso de aminas primarias y terciarias no se apreció un aumento significativo en sus productos de reacción.

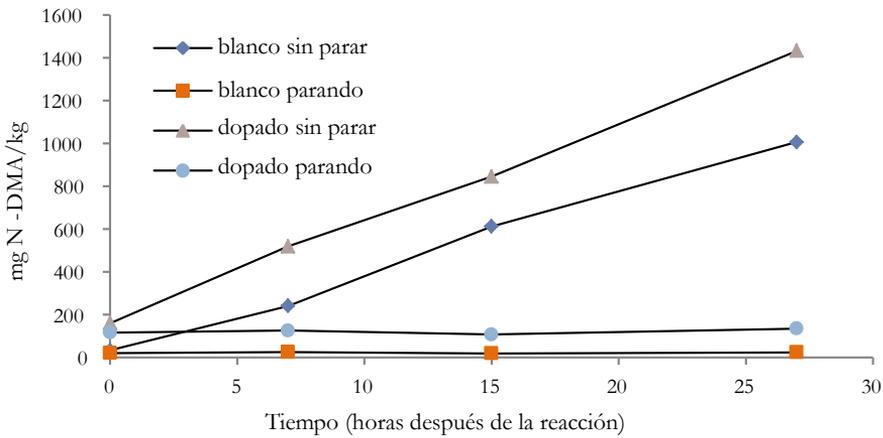


Figura 65: Evolución de los productos de reacción de la DMA parando la reacción y sin pararla.

Los extractos de ácido acético fueron almacenados durante 48, 72 y 144 horas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y los resultados fueron comparados con los de los extractos a tiempo cero (Tabla 19). El único compuesto que mantuvo la misma concentración ( $\geq 90\%$ ) en las muestras dopadas y blancos en las tres especies fue el TMAO. El resto de los compuestos experimentaron un decrecimiento progresivo a lo largo del tiempo de almacenamiento de entre 30% y 90% del valor original. Al parecer el proceso de congelación-descongelación tiene un efecto sobre la estabilidad de estos extractos. Estos resultados hicieron necesario el procesamiento de las muestras el mismo día que se preparaban los extractos.

Tabla 19: Estabilidad de los extractos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

	Trucha				Chicharro				Merluza			
	MA	DMA	TMA	TMAO	MA	DMA	TMA	TMAO	MA	DMA	TMA	TMAO
<b>0h<sup>a</sup></b>	0,59	0,44	0,39	5,35	32,28	20,59	28,07	227,15	28,65	20,74	18,54	223,95
<b>% 48h<sup>b</sup></b>	15,5	<LOD <sup>c</sup>	51,0	97,7	19,6	<LOD <sup>c</sup>	61,0	94,2	16,7	8,2	69,1	97,2
<b>% 72h<sup>b</sup></b>	52,1	<LOD <sup>c</sup>	39,9	101,0	42,5	<LOD <sup>c</sup>	36,7	96,4	24,4	<LOD <sup>c</sup>	34,0	96,9
<b>%144h<sup>b</sup></b>	34,7	49,4	22,6	99,0	29,5	37,9	37,7	95,4	28,9	65,4	43,6	96,7

<sup>a</sup> Valores expresados como mg N-compuesto / kg pescado

<sup>b</sup> Valores expresados como porcentaje del valor del día cero.

<sup>c</sup> Valores por debajo del límite de detección.

Así mismo se comprobó la estabilidad de los productos de reacción a 4°C, -20°C y -80°C. A temperaturas de refrigeración, los viales mostraron una buena estabilidad hasta 48h (83%-120% del valor original de todos los compuestos) y en temperaturas de congelación, a -20°C los viales pudieron ser almacenados hasta 72h sin apreciar pérdidas significativas mientras que a -80°C las concentraciones originales se mantuvieron durante 48h.

### 3.8 -Conclusiones

Después de haber realizado numerosos experimentos con distintos reactivos y metodologías, se han descartado varios por no haber encontrado resultados positivos que indicasen que podrían servir al propósito de esta tesis.

En el caso de la utilización de un par iónico, no se obtuvo la sensibilidad necesaria para poder cuantificar ya que solo se observaron resultados interesantes a concentraciones de 100 ppm. Además el hecho de que las aminas alifáticas no presenten grupos cromóforos y tengan un bajo peso molecular resulta más difícil si cabe su análisis mediante esta metodología.

Al abordar la metodología desarrollada por Dyer en el año 1945 no se consiguieron mejorar sus prestaciones ya que a pesar de testar distintos disolventes, ninguno resultó adecuado para mejorar la medida espectrofotométrica o disminuir los límites de detección establecidos.

En el caso del cloruro de benzoílo sí que se obtuvieron resultados interesantes, ya que al menos con las aminas primarias y secundarias, la reacción tuvo lugar y el producto de reacción se pudo medir tanto mediante su señal UV como por espectrometría de masas. No obstante, el propósito de esta tesis es desarrollar una metodología multianalito para aminas primarias, secundarias y terciarias, algo que no pudo ser posible utilizando este reactivo por la falta de reacción entre el cloruro de benzoílo y la trimetilamina en ninguna de las condiciones testadas.

Al trabajar con las ciclodextrinas no se consiguió ningún resultado positivo, quizás por la modificación de las condiciones utilizadas por los autores originales, pero utilizar estas mismas condiciones en nuestro caso resultó imposible ya que una concentración mayor del cromóforo provocaba una saturación de la señal del lector de placas que impedía observar ningún efecto. Además, esta metodología habría permitido llevar a cabo cuantificaciones de aminas aisladas pero quizás no habría sido posible llevar a cabo cuantificaciones en muestras reales donde la variedad de compuestos, no solo de aminas, es muy alta.

En cuanto a la utilización del sulfato de dipropilo, a pesar de que en un principio pareció adecuado al propósito, terminó por no serlo ya que la metodología, al menos tal como estaba diseñada, no permitió cuantificar concentraciones bajas de TMA (<1ppm). A esto hay que sumar que el compuesto generado en la reacción entre el agente alquilante y la amina no tenía un peso molecular muy grande, con lo que había muchas sustancias en el medio de reacción que coeluyeron junto al compuesto de interés, teniendo como resultado espectros no muy puros.

Por último, con la utilización del BAE y BATB se consiguieron los resultados más interesantes. En ambos casos se consiguió un método multianalito que permitió la reacción de numerosas aminas en un único análisis simultáneo.

El hecho de haber dejado de lado el reactivo BAE no significa que no fuese apto y muy apropiado para el propósito de esta tesis, pero una vez analizados los resultados preliminares de los dos reactivos, se pudo comprobar que los productos de reacción obtenidos con el BATB tenían un mayor peso molecular, algo que facilitó su posterior cuantificación mediante unos fragmentos de mayor  $m/z$  generados durante su fragmentación.

Con este reactivo se llevó a cabo todo el diseño de experimento que permitió establecer las condiciones óptimas para las aminas volátiles de interés (MA, DMA y TMA), aunque con la constancia de que se podría optimizar para numerosas aminas primarias, secundarias o terciarias como ya se ha visto anteriormente.

De esta manera se ha conseguido desarrollar una metodología multianalito con un buen rango lineal y porcentajes de recuperación constantes a lo largo del mismo. Se trata de un método repetible y preciso gracias al control de los factores optimizados en el diseño del experimento, pH, temperatura y tiempo de reacción. Además esta metodología se ha validado en distintas muestras reales marinas como de agua dulce y tanto magras como grasas.

Todo esto, junto con el hecho de su corto tiempo de análisis, hace que sea un buen punto de partida para llevar a cabo el resto de experimentos de la tesis.

### 3.9 -Bibliografía

- An, J., Sun, M., Bai, L., Chen, T., Q.Liu, D., & Kord, A., 2008. A practical derivatization LC/MS approach for determination of trace level alkyl sulfonates and dialkyl sulfates genotoxic impurities in drug substances. *J. Pharmaceut Biomed.* 48, 1006–1010.
- Anderson, A. K., 2008. Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets. *Food Chem.* 107, 761–767.
- Arlorio, M., Coisson, J. D., & Martelli, A., 1998. Ion-pair HPLC determination of biogenic amines and precursor aminoacids. Application of a method based on simultaneous use of heptanesulphonate and octylamine to some foods. *Chromatographia.* 48, 763–769.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloid.* 23, 1631–1640.
- Aye Mar, A., Koohang, A., Majewski, N. D., Szotek, E. L., Eiznhamer, D. a., Flavin, M. T., & Xu, Z. Q., 2009. Synthesis and cytotoxicity of 28-carboxymethoxy lupane triterpenoids. Preference of 28-O-acylation over 28-O-alkylation of betulin by ethyl bromoacetate. *Chinese Chem Lett.* 20, 1141–1144.
- Del Valle, E. M. M., 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* 39, 1033–1046.
- Dyer, W. J., 1945. Amines in Fish Muscle I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *J. Fish. Res. Board Can.* 6, 351–358.
- Gardana, C., Pietta, P., Ciappellano, S., & Testolin, G., 1999. Determination of histamine in fish products by capillary electrophoresis and ion-pair liquid chromatography with diode-array detection. *J. Sci. Food Agr.* 79, 91–94.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., & Vidal-Carou, M. C., 1996. Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Meat and Meat Products. *J. Agr. Food Chem.* 44, 2710–2715.
- Hornero Mendez, D., & Garrido Fernández, A., 1997. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Biogenic Amines in Fermented Vegetable Brines. *J. Food Protect.* 60, 414-419.
- Howgate, P., 2009. Traditional methods. In H. Rehbein & J. Oehlenschläger (Eds.), *Fishery products: Quality, safety and authenticity* (pp. 19–41). Wiley-Blackwell.
- Hwang, D. F., Chang, S.-H., Shiua, C.-Y., & Chai, T., 1997. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *J. Chromatogr. B.* 693, 23-30.
- Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F., 2009. Determination of melamine in milk-based products and other food and beverage products by ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 649, 91–97.
- Johnson, D. W., 2008. A flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous measurement of trimethylamine and trimethylamine N-oxide in urine. *J. Mass. Spectrom.* 43, 495–499.

- Leon, A., Chica, A., Garcia-Raurich, J., & Centrich, F., 1994. Determination of trimethylamine in fish by flow injection analysis. *Quim. Anal.* 13, 78–81.
- McMahon, G., Wall, R., Nolan, K., & Diamond, D., 2002. Characterisation of the ester-substituted products of the reaction of p-t-butyl calix[4]arene and ethyl bromoacetate using LC-UV-MS and LC-DAD. *Talanta.* 57, 1119–1132.
- Montes-Navajas, P., A.Baumes, L., Corma, A., & Garcia, H., 2009. Dual-response colorimetric sensor array for the identification of amines in water based on supramolecular host–guest complexation. *Tetrahedron Lett.* 50, 2301–2304.
- Onal, A., 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103, 1475–1486.
- Ozdestan, O., & Uren, A., 2009. A method for benzoyl chloride derivatization of biogenic amines for high performance liquid chromatography. *Talanta.* 78, 1321–1326.
- Ozogul, F., Taylor, K. D. A., Quantick, P., & Ozogul, Y., 2002. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *Int. J. Food Sci. Tech.* 37, 515–522.
- Paleologos, E. K., Chytiri, S. D., Savva, J. N., & Kontominas, M. G., 2003. Determination of biogenic amines as their benzoyl derivatives after cloud point extraction with micellar liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. A.* 1010, 217–224.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C., 2010. Colorimetric assay for determination of trimethylamine-nitrogen (TMA-N) in fish by combining headspace-single-drop microextraction and microvolume UV–vis spectrophotometry. *Food Chem.* 119, 402–407.
- Redmond, J. W., & Tseng, A., 1979. High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine. *J. Chromatogr.* 170, 479–481.
- Rodrigues, B. L., 2013. Concentration of Biogenic Amines in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Preserved in Ice and its Relationship with Physicochemical Parameters of Quality. *J. Aquac. Res. Development.* 04, 174-178.
- Sánchez-López, J., Camañes, G., Flors, V., Vicent, C., Pastor, V., Vicedo, B., García-Agustín, P., 2009. Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Plant Physiol. Bioch.* 47, 592–598.
- Tang, T., Shi, T., Qian, K., Li, P., Li, J., & Cao, Y., 2009. Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 877, 507-512.
- Yegin, S., & Uren, A., 2008. Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. *Food Chem.* 111, 983–987.
- Yen, G. C., & Hsieh, C. L., 1991. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *J. Food Sci.* 56, 158–160.

A partir de la optimización y validación de la metodología del BATB se redactó el artículo científico que se adjunta a continuación:

*A novel liquid chromatography–mass spectrometric method for the simultaneous determination of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in fishery products.*

Lander Baliño-Zuazo, Alejandro Barranco. *Food Chemistry* 196 (2016): 1207-1214.

## Publicación 1: A novel liquid chromatography-mass spectrometric method for the simultaneous determination of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in fishery products

### A novel liquid chromatography-mass spectrometric method for the simultaneous determination of trimethylamine, dimethylamine and methylamine in fishery products

Lander Baliño-Zuazo<sup>a</sup>, Alejandro Barranco<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Food Research Division, AZTI, Parque Tecnológico de Bizkaia. Astondo Bidea, Edf. 609, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

Corresponding autor: Alejandro Barranco, Food Research Division, AZTI, Parque Tecnológico de Bizkaia. Astondo Bidea, Edf. 609, 48160 Derio, Bizkaia, Spain.

e-mail: [abarranco@azti.es](mailto:abarranco@azti.es)

Tel: +34 946574000

#### KEYWORDS

Trimethylamine; Volatile amines; Hydrophilic interaction liquid chromatography; Liquid chromatography-mass spectrometry; Fish spoilage

#### CHEMICAL COMPOUNDS STUDIED IN THIS ARTICLE:

Trimethylamine (PubChem CID: 1146);  
Dimethylamine (PubChem CID: 674);  
Methylamine (PubChem CID: 6329);  
Tert-butyl bromoacetate (PubChem  
CID: 79177); Trimethylamine n-oxide  
(PubChem CID: 1145)

#### ABSTRACT

A novel multianalyte method has been developed to determine the concentration of trimethylamine (TMA), dimethylamine (DMA) and methylamine (MA) in fish. The optimal points of the key parameters (pH8, 60°C and 60 minutes of reaction time) were determined for the reaction with tert-butyl bromoacetate. An HILIC column was used to elute all the compounds in only twelve minutes and selective quantitation of the compounds was achieved. The methodology was validated in trout, hake and Atlantic horse mackerel and was used to study the shelf life of fish under refrigeration. A good correlation with the picrate method was obtained and the proposed methodology has been proved to be robust, specific and sensible with a limit of detection of 0.08 mg N-TMA kg<sup>-1</sup> in freshwater fish and 1 mg N-TMA kg<sup>-1</sup> in marine fish. In addition, TMA has been proved to be a good spoilage indicator also in freshwater fish.

## 1. Introduction

Fish is a very perishable product that cannot be stored for a long term because of its rapid spoilage. The main cause of this rapid deterioration is bacterial activity, and to a lesser extent autolytic biochemical reactions. Although many different microorganisms are present in fishes, only the metabolic activity of some of them, specific spoilage organisms (SSO), is responsible for the generation of off flavours and off odours that finally cause consumer rejection of fish products (Gram & Dalgaard, 2002).

Amines are considered one of the most important groups for the detection of fish spoilage (Howgate, 2010) and they can be generated from different substrates. Major sources are the decarboxylation of aminoacids giving biogenic amines such as histamine, putrescine or cadaverine (Fadhlaoui-Zid et al., 2012) and trimethylamine oxide (TMAO), a well-known substance occurring in marine fish which plays an important role in the osmoregulation and protein stabilization against denaturation by

hydrostatic pressure (Yancey, 2005). The occurrence of TMAO in freshwater fish is less important but it also exists (Niizeki, Daikoku, Hirata, El-Shourbagy, Song & Sakaguchi, 2002). TMAO may undergo different transformations depending on the storage conditions of fishery products and typical end substances are trimethylamine (TMA), dimethylamine (DMA) and formaldehyde (FA). Under refrigerated conditions, TMAO is reduced into TMA by SSO (Dalgaard, 1995; Gram & Dalgaard, 2002) and endogenous enzymes of pelagic fishes (Hebard, Flick & Martin, 1982). When fish is stored at chilling or frozen temperatures the activity of the microflora is much lower and enzymatic reactions play a more important role in the generation of some of these amine compounds. TMAO aldolase (TMAOase), present in some fishes, especially in gadoids (Nielsen & Jorgensen, 2004), catalyses the breakdown of TMAO into DMA and FA in equimolar amounts with negative effects on the fish quality.

Sensory methods are generally considered to be the most appropriate for measuring freshness or fish spoilage (Olafsdottir et al., 1997). The presence of amines during fish spoilage generates off flavours and off odours, that can be defined as pungent, ammoniacal or fishy above their sensory thresholds.

As consumers demand high quality products there is a need of developing methods for the determination of the quality state at early stages of spoilage. Several methods have been reported for the analysis of volatile amines in different biological matrices. In the field of fish quality, the official method 971.14 (AOAC, 2000) based on Dyer's method (Dyer, 1945) is, by far, the most widely used analytical procedure to determine TMA concentration. Some authors have improved this methodology automating it with the use of FIA (Ruiz-Capillas, Gillyon, & Horner, 2001), or miniaturizing it. (Pena-Pereira, Lavilla, & Bendicho, 2010).

Chromatographic methods are also commonly used with this purpose. Due to their volatility, these volatile amines have been determined in fish muscle and in the headspace of the fish packaging by gas chromatography (GC) coupled to different detectors such as flame ionization detector (FID) or mass spectrometry (MS) (Duflos, Coin, Cornu, Antinelli, & Malle, 2006; Triqui & Bouchriti, 2003; Zhang, Li, Luo & Chen, 2009). Ionic chromatography was used for the simultaneous determination of volatile amines and TMAO in fish acidic extracts, by conductivity detection without prior derivatization (Li et al., 2009). In the case of liquid chromatography coupled to a UV-Vis, fluorescence or mass spectrometric detector (MS), a derivatization process to increase the sensitivity is required. For example, benzoyl chloride (Anderson, 2008; Ozogul, Taylor, Quantick & Ozogul, 2002) and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) (Herráez-Hernández, Cháfer-Pericás, Verdú-Andrés & Campíns-Falcó, 2006; Teerlink, Hennekes, Mulder & Brulez, 1997) have been successfully used for the determination of biogenic and volatile amines in urine, water, fish and other food matrices with a fluorescence detector. Alkylbromoacetate compounds (Johnson, 2008; Kyu Lee, Kim, Jin & Hyun Yoo, 2010) and trideuteromethyl iodide (Mamer, Choinière & Lesimple, 2010) have been reported for the TMA derivatization and detection by MS in urine samples from patients with trimethylaminuria. Timm and Jørgensen (2002) used the capillary electrophoresis technique to determine the concentration of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine oxide in fish extracts.

Alternative methods have been also developed for the determination of fish freshness such as biosensors using enzymes (Fíllit, Jaffrezic-Renault, Bessueille, Leonard, Mitsubayashi & Tardy, 2008; Mitsubayashi et al., 2004; Saito et al., 2007) or different chemical composites (Rodríguez-Méndez, Gay, Apetrei & De Saja, 2009; Zhang & Zhang, 2008) which allow the quantification of quality related amines.

The main objective of this study is to develop a new HPLC-MS method for the simultaneous analysis of MA, DMA, TMA, and TMAO in seafood, improving the main features of existing methodologies and covering the whole range of fish diversity, marine fatty fish (*Trachurus trachurus*), lean fish (*Merluccius merluccius*) and freshwater fish (*Oncorhynchus mykiss*). The aim of this multianalyte method is to provide a rapid determination of some amines that gives relevant information about the spoilage level of fish without the use of expensive reagents and time consuming sample pretreatment.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical and reagents

Methylamine hydrochloride, dimethylamine hydrochloride (99%), trimethylamine hydrochloride (98%) and trimethylamine N-oxide dihydrate (>99%)

were purchased from Sigma-Aldrich (CA, USA). Stock solutions (1000 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared in water and stored at 4°C. Appropriate dilutions of these stock solutions were made each day for calibration and preparation of fortified samples. Tetraethylammonium chloride hydrate (99%) (TEAC), purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), was used as internal standard. Tert-butyl bromoacetate (TBBA) from Sigma-Aldrich was selected as derivatization agent. Sodium bicarbonate (99.7%), formic acid (98%), glacial acetic acid (99.7%) and hydrochloric acid (37%) were supplied from Panreac (Barcelona, Spain) and were used to set the adequate conditions for the derivatization of amines. HPLC grade acetonitrile (>99.9%) from Romil (Cambridge, UK) and Milli-Q water (Millipore, MA, USA) were used to prepare the chromatographic mobile phase and the pH was adjusted with ammonium acetate (>99%) from Sigma-Aldrich.

### 2.2. Liquid chromatographic analysis

#### 2.2.1. Derivatization optimization

A derivatization optimization experiment was carried out to check the influence of pH (3-13), incubation temperature (25-75°C), and reaction time (7.5-82.5 min) on the sensitivity by means of a central composite design. Sodium hydroxide was used to get the desired pH and acetic acid was added when acidic conditions were needed. The software Unscrambler© (Camo, Sweden) was utilized with this purpose and all experiments were done in triplicate (Supplementary Table S1). The experiments were performed with amine mix solutions (50 µg L<sup>-1</sup> for MA, DMA and TMA; and 1.25 µg mL<sup>-1</sup> for TMAO) and TBBA concentration was set at 5 mg mL<sup>-1</sup>. The peak area of each compound was considered as the response variable to obtain the response surface for each analyte.

#### 2.2.2. Chromatographic equipment and conditions

The equipment used for the analysis was an Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 Series liquid chromatograph equipped with a degasser, a binary pump, an autosampler, a column oven and a diode array detector coupled to an Agilent Ion trap XCT-Plus operating in positive ion mode with electrospray ionisation (ESI) and using multiple reaction monitoring (MRM). The separation was conducted on a Luna HILIC (150 X 2 mm I.D., 3 µm) (Phenomenex Torrance, CA, USA) with a guard column filled with the same stationary phase. The column oven was set at 30°C and the mobile phase was constituted by acetonitrile/water (1:1, v/v) (A) and acetonitrile/water (97:3, v/v) (B). Both phases were modified with 5 mM ammonium acetate. The elution conditions applied were: an isocratic step from 0 to 0.5 min with 5% of A, from 0.5 to 6 min a linear gradient from 5% to 100% A, and 100% A was maintained for 5 min before returning the system to the initial conditions. The flow rate was 0.3 mL min<sup>-1</sup> and 6 µL of sample was injected.

Mass spectrometer parameters operating in positive ion mode were optimized for each amine by infusion of the derivatized product. Each amine had its own conditions (Table 1) except for DMA and TMA which eluted too close and were determined using the same parameters. For the quantification, the following ions were monitored: MA ([M+H]<sup>+</sup> + m/z 260 → [M+H]<sup>+</sup> + m/z 204), DMA ([M]<sup>+</sup> + m/z 274 → [M]<sup>+</sup> + m/z 218) and TMA ([M]<sup>+</sup> + m/z 174 → [M]<sup>+</sup> + m/z 118). Qualifier ions were monitored for the MA ([M+H]<sup>+</sup> + m/z 260 → [M]<sup>+</sup> + m/z 147) and the DMA ([M]<sup>+</sup> + m/z 274 → [M]<sup>+</sup> + m/z 162). In the case of TMAO ([M]<sup>+</sup> + m/z 76) the conditions were set to avoid the formation of a dimer ([M]<sup>+</sup> + m/z 151) that was concentration dependant and it was observed in the MS1 mode. The capillary (3500 V), nebulizer (40 psi), drying gas (9 L min<sup>-1</sup>) and dry temperature (350°C) were maintained through all the chromatogram.

**Table 1 Optimum mass spectrometer parameters for each analyte**

Parameter	MA <sup>a</sup>	DMA <sup>b</sup> , TMA <sup>c</sup>	TEAC <sup>d</sup>	TMAO <sup>e</sup>
skimmer, V	34	35	15.8	27.4
capillary exit, V	60	72.5	22.5	27.5
octopole 1, V	9.91	12.11	5.6	20
octopole 2, V	5	5.6	0	0
trap Drive	31.6	33.8	27.8	23.2
octopole RF, V	150	132.5	42.5	35
lens 1, V	5	5	-8	-6.5
lens 2, V	-58.3	-100	-100	-100
fragmentation amplitude	0.36	0.43	0.94	----

<sup>a</sup> Monitoring ion, [M+H]<sup>+</sup> m/z 260→[M+H]<sup>+</sup> m/z 204; qualifier ion, [M+H]<sup>+</sup> m/z 260→[M]<sup>+</sup> m/z 147

<sup>b</sup> Monitoring ion, [M]<sup>+</sup> m/z 274→[M]<sup>+</sup> m/z 218; qualifier ion, [M]<sup>+</sup> m/z 274→[M]<sup>+</sup> m/z 162

<sup>c</sup> Monitoring ion, [M]<sup>+</sup> m/z 174→[M]<sup>+</sup> m/z 118

<sup>d</sup> Monitoring ion, [M]<sup>+</sup> m/z 130→[M]<sup>+</sup> m/z 86

<sup>e</sup> Monitoring ion, [M]<sup>+</sup> m/z 76

Agilent 6300 series Ion Trap 6.1 Bruker Daltonics (Bremen, Germany) and Chemstation software from Agilent were used for instrumental control and data acquisition.

### 2.3. Analysis of fish samples

Rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) were purchased from a local fish-farm and were delivered to the laboratory degutted and beheaded under refrigeration (4°C). Hake (*Merluccius merluccius*) and Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) samples were obtained from a local market. Fishes were stored in heat-sealed plastic bags at 4°C, and three units of each species were taken at each sampling day.

Fishes were skinned and the muscle of a whole fish was homogenized in a chopping tool. Homogenized samples (1 g) were mixed with 5 mL of acetic acid 10 mM (pH 3.45) and submitted to a second homogenization step in an ultraturrax homogenizer (Kinematica, Switzerland). The rod was rinsed twice with 5 and 10 mL of acetic acid 10 mM. These solutions were combined with the fish extract. Extracts were filtrated in a vacuum funnel with Whatman N°1 filter papers (Maidstone, UK) and 5 mL of acetic acid were added to the flask and poured over the filter to drag the remaining sample. Finally the volume was adjusted to 25 mL. The filtrate was centrifuged at 13400 rpm (Mini Spin, Eppendorf, Hamburg, Germany) and the supernatant was used for the reaction of derivatization.

An aliquot (20 µL) of the supernatant was added to a 2 mL vial and mixed with 480 µL of acetonitrile/water (6:4, v/v) containing TEAC (3.2 µg mL<sup>-1</sup>), bicarbonate buffer (20 µL, 0.5 M) and TBBA (1 mL, 5 mg mL<sup>-1</sup> in acetonitrile). After 1 hour incubation at 60°C in a water bath (WN 22, Memmert, Germany) 10 µL of formic acid 5 M was added to stop the reaction and samples were subjected to HPLC-MS analysis. The calibration curves were prepared following the same protocol.

### 2.4. Validation

A validation process was accomplished to determine the linear working range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), recovery and repeatability. The evaluation of the linear range was performed with both standard solutions (7 concentration levels and a reagents blank) and spiked samples in triplicate (3 concentration levels and a blank). As it was not possible to find a fish free of TMA, TMAO and DMA, the limits of detection and quantification were calculated from the calibration curves as the average of the area of 6 reagent blanks for each compound plus 3 (LOD) or 10 (LOQ)

times the standard deviation. The final values are presented as mg N kg<sup>-1</sup> of fish and have been corrected by the dilution made for the trout samples. For the evaluation of recovery and repeatability, 5 blank samples and 10 spiked samples at three different concentrations (0.5, 2 and 10 µg g<sup>-1</sup>) (TMAO spiked concentrations were 25 times higher) were analysed in three different days. These experiments were performed with trout due to their lower content in TMA, TMAO and DMA. To avoid the variability between fishes, three units of each species were mixed before taking the sample. F- test was applied to compare interday and intraday variability and confirm the repeatability of the methodology. Two representative marine fish species consumed in the Basque Country (Spain) were selected to test the suitability of the new method in different types of fishes: Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and hake (*Merluccius merluccius*). Spiked samples were analysed simultaneously with the new proposed method and a reference method, the method 971.14 of AOAC (2000) with slight modifications.

#### 2.4.1. Stability of the extracts and the reaction products

The stability of extracts was also studied to check the suitability of their storage. As it is well known, at 4°C the bacterial activity is low but exists and at -20°C oxidation and enzymatic reactions such as the conversion of TMAO to DMA might take place. Finally -80°C was selected the best storage temperature to avoid chemical changes in the extracts.

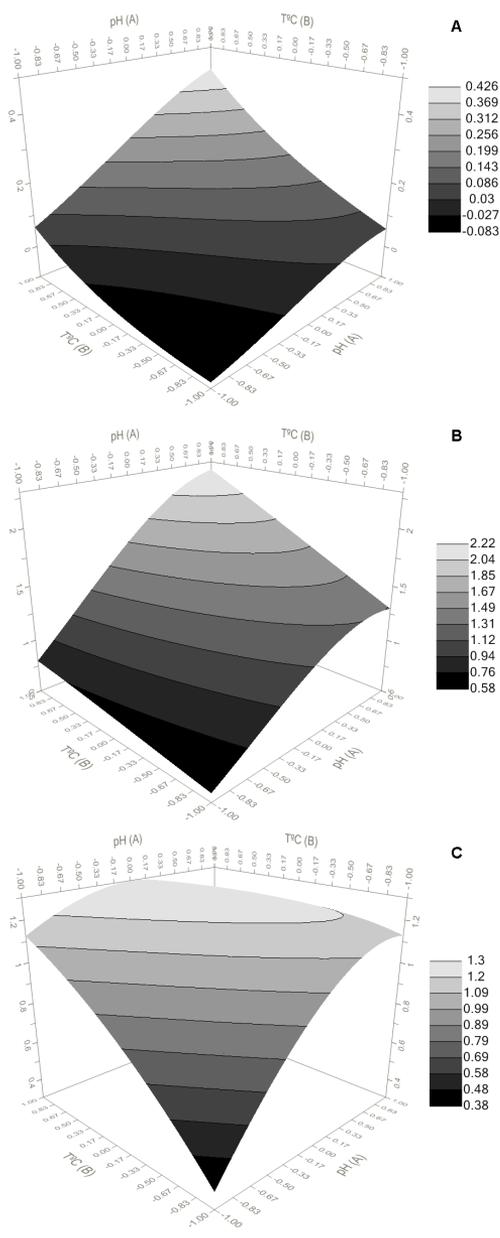
For each species a blank sample and three spiked samples were prepared. For trout samples the spiking levels were 5, 20 and 100 µg g<sup>-1</sup> and for hake and Atlantic horse mackerel 100, 250 and 500 µg g<sup>-1</sup>. Extracts were stored at the selected temperature during 6 days and were analysed at day 0, 2, 3 and 6 in triplicate. Moreover the stability of the derivatised samples was also evaluated. For this purpose vials with the reaction product were stored at 4°C for 48 h, at -20°C for 144h and -80°C for 144h.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Derivatization optimization

The reaction between the TBBA and the volatile amines only occurs when amines are not ionised, that is, in a basic medium. Therefore, pH is an important factor that should be controlled by the addition of a pH modifier agent. In the first optimization experiment NaOH was used for that purpose and the optimal values of each factor were obtained from the analysis of the response surfaces (Figure 1).

In the case of the primary and secondary amines the optimum temperature, pH and time were 60°C, pH 10 and 60 minutes, respectively. As can be seen in Figure 1 A and B the slope of the response surfaces indicates that a maximum has not been reached, being optimum values out of the created design space. It seems that higher values of pH and temperature would have had a better yield. In the case of the tertiary amine (Figure 1C) the highest response was reached inside the design space, where a turning point can be appreciated, after which the response surface undergoes a decline. The maximum response was achieved with a pH value of 8, a temperature of 60°C and a reaction time of 60 minutes. As the method was thought with a particular interest in tertiary amines, the pH, that was the most important variable affecting the response for the TMA, was set at pH 8. At this pH the response is still high for the primary and secondary amines. TMA has lower pKa than MA and DMA, therefore, exceeding that value resulted in a negative effect on the TMA response probably due to its



**Figure 1.** Surface responses of the reacted amines (A: MA, B: DMA and C: TMA). Variables: pH and temperature. Reaction time was fixed at 60 minutes. volatilization. Temperature was finally set at 60°C since it provided a greater response for MA, DMA and TMA at the same time. Regarding the reaction time, the fact that in the case of primary and secondary amines the reaction was slower than in the case of TMA can be explained because two molecules of the derivatizing agent are involved in the reaction whereas only one molecule of TBBA reacts with tertiary amines. This is probably due to a higher steric hindrance in the MA and DMA after having reacted with one molecule of TBBA that makes the reaction with a second molecule more difficult. Fig-

ure 1 shows the great effect of pH on the yield of the derivatization reaction with all amines and NaOH was observed not to be suitable for fixing a stable pH value. The amount of NaOH necessary to get pH 8 varied considerably between samples (%CV>20). For this purpose two buffers suitable for the pH range selected (borate and carbonate) were tested. The addition of a buffer resulted in a decrease of the sensitivity, particularly in the case of borate buffer. Carbonate buffer was finally chosen because the signal stability was highly improved despite the yield decreased in the case of secondary (51%) and tertiary amines (39%). Moreover, the sensitivity for the primary amines improved (54%) and carbonate was more suitable for the mass detector due to its volatility. Therefore, the experimental conditions finally selected were pH 8 with carbonate buffer, 60min and 60°C.

### 3.2 HPLC optimization

The use of the HILIC column provided the necessary selectivity for the separation of target molecules because of their ionic nature. These compounds are well retained in the column, but the chemical nature of the reacted MA (a tertiary amine) made it to be poorly retained and it eluted close to the void volume decreasing its sensitivity.

The HILIC working mode requires mobile phases with high organic content and usually mixtures of acetonitrile and water are used, starting with almost 95% acetonitrile. In order to delay the elution of MA other mobile phase compositions were studied. Methanol and isopropanol were tested instead of water (a very strong solvent in HILIC) in different proportions but the retention times and the resolution did not improve. The addition of organic modifiers such as ethyl acetate and tetrahydrofuran had a negligible effect. Mobile phase pH was adjusted to 7.1 with ammonium acetate because more acidic conditions resulted in shorter retention times. Ammonium acetate concentration (5 mM) was maintained constant along the whole chromatogram to get the best resolution of the column as specified by the manufacturer. Concentrations higher than 5 mM were tested but no improvement was achieved.

Except for TMAO all compounds were detected in MS2 mode but a scan analysis (MS1) was also recorded in order to check whether other amines occur in the extract and have reacted with the TBBA. As we have confirmed, other amines such as histamine, cadaverine, putrescine, spermidine, spermine, tyramine, triethylamine or butylamine also react with the derivatizing agent at the selected conditions, so in the scan mode their reaction products can be detected if present (data not shown).

The injection volume was set as 6  $\mu$ L because was the maximum quantity allowed by the column before the peaks' shape degenerated. Supplementary Figure S1 shows chromatogram obtained with the optimal conditions.

Regarding the chemical reaction between the amines and the TBBA, in the case of MA and DMA two molecules of the derivatizing agent react with the analyte, while in the case of the TMA only one molecule reacts. The proposed reaction implies the loss of bromide from the derivatizing agent, generating an electrophile which is attracted by the nitrogen of the amines, nucleophiles, to create a chemical bond and form the new molecule.

The proposed product ions (Table 2) resulted from the loss of one tert-butyl fragment in the case of TMA ( $[M]^+ m/z 118$ ), while two different fragments were generated in the case of MA and DMA, one corresponding to the loss of one tert-butyl fragment ( $[M+H]^+ m/z 204$  and  $[M]^+ m/z 218$ , respectively) and the other corresponding to the loss of two fragments ( $[M]^+ m/z 147$  and  $[M]^+ m/z 162$ , respectively).

**Table 2** Proposed chemical structures for the reaction products.

t-butyl bromoacetate	Amine	Precursor ion	Product ion
	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_3$ $\text{CH}_3\text{N}$ $m/z:31^a$ MA	 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ $m/z:260^a$	 $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}_4$ $m/z:204^{a,b}$  $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ $m/z:147^{c,d}$
	 $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ $m/z:45^a$ DMA	 $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ $m/z:274^a$	 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ $m/z:218^{b,d}$  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_4$ $m/z:162^{c,d}$
	 $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$ $m/z:59^a$ TMA	 $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_2$ $m/z:174^{b,d}$	 $\text{C}_3\text{H}_{12}\text{NO}_2$ $m/z:118^{b,d}$

 a [M+H]<sup>+</sup>

b Monitoring ion

c Qualifier ion

 d [M]<sup>+</sup>

### 3.3 Validation

The selectivity of the method was demonstrated against primary, secondary and tertiary amines since the retention times of each type of amines and the  $m/z$  values of the precursor ions and fragments were different.

#### 3.3.1 Linear working range

The linearity of the method was firstly tested in aqueous solutions and the working range was established from 0.1 to 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ . When extracts from real samples were analysed, matrix effect occurred and, therefore a dilution step was required before derivatization. In the case of trout extracts a 1:25 dilution was applied whereas in Atlantic horse mackerel and hake, an intermediate dilution (1:40) in acetic acid was required before the final dilution due to a higher matrix effect than in trout. For that final dilution (1:25), acetonitrile/water (6:4, v/v) was utilized to provide a similar chemical composition between the sample and the HPLC mobile phase. The concentrations used for testing the linearity in trout muscle were 0.25-10  $\mu\text{g g}^{-1}$  for MA, DMA and TMA, and 6.25-500  $\mu\text{g g}^{-1}$  for TMAO including three concentration levels and a blank.

For Atlantic horse mackerel and hake samples, the higher matrix effect forced us to increase the spiking level and the sample dilution. In these cases three concentration levels (10, 25 and 50  $\mu\text{g g}^{-1}$  for MA, DMA and TMA and 250, 625 and 1250  $\mu\text{g g}^{-1}$  for TMAO) in triplicate plus a blank sample ( $n=3$ ) were analysed in a single day.

As it can be seen in Figure S2, in both cases, freshwater fish and marine fish, the linearity over the whole studied range was maintained. Despite the matrix dilution, the slopes of the calibration curve with Atlantic horse mackerel real samples were slightly higher than the slope obtained with standard solutions. Thus, a little overestimation was appreciated (around 120%) but a higher dilution was not applied not to lose sensitivity. In marine fish the initial TMA content was higher than in freshwater fish due to the higher amount of TMAO present in it and to its rapid conversion by SSO.

The limits of detection and quantification achieved for the target amines in freshwater and marine fish samples are listed in Table 3 and are referred to fish muscle. Limits of detection ranged from 0.03 to 2.17 mg N  $\text{kg}^{-1}$  in freshwater fish and from 1.07 to 86.75 mg N  $\text{kg}^{-1}$  in marine

fish what made this method very useful for fresh fish or fish with very low TMA content as the freshwater fish.

### 3.3.2 Accuracy and precision

In trout samples, recovery values ranged from 70 to 87% for MA, from 80 to 93% for DMA and from 92 to 107% for TMA (see Table S2). These values were quite similar to those obtained with marine fish except for TMA in Atlantic horse mackerel (from 120 to 130%). These recoveries will be used as a correction factor during the quantitation of real samples. High values were also recorded in the case of TMAO and trout samples.

Regarding the repeatability, intraday and interday results have been analysed. As it is shown in Table S2, intraday RSD% values in trout samples are close to 10% except in the case of TMA and TMAO at the lower spiking level (0.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  TMA and 12.5  $\mu\text{g g}^{-1}$  TMAO). These spiking levels were very close to the amount present in blank samples. In marine fish, intraday repeatability was expressed as standard deviation and in all cases the values were under or close to 10% except for DMA and TMA at the lowest spiking level and TMAO at the higher ones. These effects might be due to the low spiking level and the high amount of these compounds found in blank samples.

Interday repeatability was close to 10%RSD (7.8-13.7%) for all the compounds except for TMAO. The amount of TMAO found in the blank samples was quite high and different each day of analysis which made difficult the detection of differences at the selected spiking levels. In table S2 it is observed that only one value exceeded the critical F value, TMAO in the 250  $\mu\text{g g}^{-1}$  spiking level, so it can be concluded that the method is repeatable for all type of volatile amines tested.

The results at different concentration levels obtained with our new developed method were compared with the picrate method (AOAC, 2000). In all type of fish samples, trout, hake and Atlantic horse mackerel, a good correlation between both methods was achieved (slopes  $\approx 1$ ) (Supplementary Figure S3). Due to the lower sensitivity of the picrate method, higher spiking levels were needed in the method correlation experiment. This implied a higher sample dilution in the TBBA method and thus an intermediate dilution (1:10) step was added in order to compare the results of the two methodologies. The developed TBBA method allows the determination of different amines at the same time and a higher sensitivity for the TMA was achieved. Once the correction factor is applied to the results, the sample analysis is faster and automated.

### 3.3.3. Robustness

The most critical factors affecting the derivatization of amines were the pH of the reaction media, the sample dilution and to a lesser extent the reaction time.

TMA had a maximum area in the studied pH range where small changes did not affect to the reaction yield. On the other hand MA and DMA did not reach a maximum and at higher pH values better sensitivity would have been

obtained. Despite this, the use of 0.5M carbonate buffer allowed optimal values for TMA and high yields for MA and DMA.

Regarding sample dilution, it has to be said that the different fish species had a different matrix effect that could be appreciated from the recovery values. Higher dilutions could have been done but the sensitivity of the method had been lower so a compromise between these two factors was taken.

Reaction times were optimised and despite MA and DMA yield were higher with longer reactions times, TMA experimented a decrease with times longer than 60 minutes.

To sum up, pH and sample dilution control is compulsory if a high yield of the reaction is wanted whereas the reaction time could be adapted according to the target amine (primary, secondary or tertiary)

### 3.4 Stability of the extracts and the reaction products

It was observed that once the reacted samples or stock solutions were taken from the thermostatic bath, secondary amines did not stop reacting despite the lack of heat. Serial injections of the same vial at different time intervals demonstrated that the reaction continued after 24h in the vial tray (Supplementary Figure S4). Taking into account that a low pH is incompatible with the reaction between TBBA and amines, acidifying the medium with 10  $\mu\text{L}$  of formic acid 5M was found to be a good way to stop the reaction. Primary and tertiary amines showed no significant increase in their reaction products.

The acetic acid extracts were stored for 48, 72 and 144 h at  $-80^\circ\text{C}$  and the results were compared with the extracts at time zero (Supplementary Table S3). The only compound that kept the same concentration ( $\geq 90\%$ ) in the spiked and blank samples in the three species was the TMAO. The rest of the compounds experimented a progressive decrease along the storage time between 30 and 60% of the original value. It seems that the freezing-thawing process might have an effect on the stability of extracts. Finally, these results forced us to process all samples in the day the fish extracts were prepared.

The stability of reaction products was also assessed at 4, -20 and  $-80^\circ\text{C}$ . At chilling temperature ( $4^\circ\text{C}$ ) the vials showed good stability up to 48h (83-120% of the original values for all the amines), and under freezing temperature, vials could be stored for 72h with no significant losses. The  $-80^\circ\text{C}$  vials lasted 48h maintaining the day zero values.

Considering these results, acid extracts were processed in the day of each experiment but vials with the reaction products could be stored at chilling or freezing temperatures up to 48h if necessary.

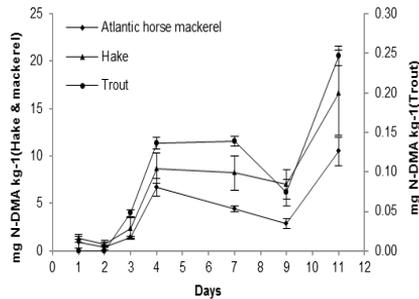
### 3.5. Real samples

The results showed that the MA did not appear in the extracts until day 9 in any of the studied species and its quantity was quite higher in marine fish than in trout. In the case of DMA, Figure 2 shows that it did not appear in

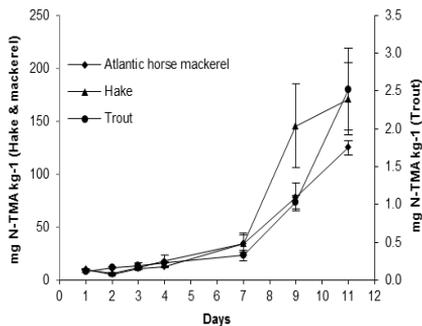
**Table 3:** Limits of detection and quantification of each analyte in freshwater fish and marine fish. Values are calculated taking into account the corresponding dilution factor for freshwater fish (1:625) and marine fish (1:25000).

Compound	LOD freshwater fish (mg N kg <sup>-1</sup> )	LOD marine fish (mg N kg <sup>-1</sup> )	LOQ freshwater fish (mg N kg <sup>-1</sup> )	LOQ marine fish (mg N kg <sup>-1</sup> )	Calibration curve	
					Equation <sup>a</sup>	r <sup>2</sup>
MA	0.11	4.55	0.37	14.88	y=1709.86x + 0.186	0.999
DMA	0.10	4.18	0.28	11.60	y=2689.82x + 0.144	0.999
TMA	0.03	1.07	0.08	3.24	y=2587.53x + 0.062	0.997
TMAO	2.17	86.75	3.50	139.77	y=167.02x - 0.289	0.999

<sup>a</sup> Equation calculated with standard solutions without applying a dilution factor



**Figure 2.** Dimethylamine evolution along 11 days of storage at 4°C in trout, hake and Atlantic horse mackerel. Main vertical axis for hake and mackerel. Secondary vertical axis for trout.



**Figure 3.** Trimethylamine evolution along 11 days of storage at 4°C in trout, hake and Atlantic horse mackerel. Main vertical axis for hake and mackerel. Secondary vertical axis for trout.

trout samples until day 3 while in the case of hake and mackerel it appeared since the first day of experiment. The evolution profile showed two tendencies, from day 1 to day 4 the amount of DMA increased from 1 mg N-DMA kg<sup>-1</sup> to 8-12 mg N-DMA kg<sup>-1</sup> and from day 4 to day 9 it decreased to 5 mg N-DMA kg<sup>-1</sup>, increasing again in the last day to reach 15-20 mg N-DMA kg<sup>-1</sup>. In the case of trout the maximum value of DMA was found at day 11 (0.24 mg N-DMA kg<sup>-1</sup>), showing the same profile as the two other species.

In the case of the TMA a tendency to increase was observed in the three species. This change is the major contribution to the TVB-N change (Howgate, 2009). In freshwater fish the amount found was almost the same from day 1 to day 7 and only in the two final days of experiment a significant increase could be seen, reaching a maximum of 2.52 mg N-TMA kg<sup>-1</sup>. The starting TMA values for hake and Atlantic horse mackerel were 10.17 and 9.74 mg N-TMA kg<sup>-1</sup>, respectively. These values were maintained stable until day 4, when showed an increase that reached 170 and 124 mg N-TMA kg<sup>-1</sup>, respectively at day 11 (see Figure 3). Much lower concentrations were found in trout probably due to the lower content of TMAO in freshwater fishes. Despite the low concentration observed, the proposed method allowed the monitoring of TMA during the shelf-life of trout. TMAO is metabolized by the fish microflora to form trimethylamine so in fishes with low concentration of TMAO low amounts of TMA will be expected. Referring to trout, the amount of TMAO is stable from the starting day until the final day of the experiment probably because the amount of converted TMAO was not enough to distinguish changes in the final TMAO concentration. In the case

of the marine fishes the concentration of this compound is remarkably higher and showed a tendency to decrease during the storage. This fact correlates well with the increase in the TMA and DMA concentration.

The fact that so low TMA concentrations were achieved in freshwater fish even when the TMAO concentration allowed higher amounts could be explained because SSO in marine and freshwater fishes are different and as a result, their metabolic products (Gram & Dalgaard, 2002). In marine ones *Photobacterium phosphoreum* or *Shewanella spp* are two of the main responsible of the generation of TMA while in freshwater fish the low concentration of sodium makes less viable their growth (Gram & Huss, 1996).

In addition, farmed fish usually have lower bacterial load than wild ones (Rodríguez, Barrios-Velázquez, Ojea, Piñeiro, & Aubourg, 2003) so lower levels of metabolites are expected. When samples were taken from plastic bags, odours, aromas, general appearance and texture were briefly evaluated. Until day 4, all fishes had a fresh appearance and smell. On day 7 the aroma of the marine fish started being fishy but the river fish had a rancid aroma probably coming from the lipid degradation. Despite the odours, in our opinion, it could have been accepted by a sensory panel. Fishes analysed under this study did not reach the amount of TMA often related with pungent fishy odours and the sensory rejection of the samples (50-100 mg N-TMA kg<sup>-1</sup>) (Marrakchi, Bennour, Bouchriti, Hamama, & Tagafait, 1990). After 9 days the odour made the three species of fish unacceptable for its consumption, which correlates well with the amounts of amines found. It is important to mention that the freshwater fish lasted more time being apparently apt for the consume, in spite of the high lipid content and therefore the generation of aldehydes. Its low TMAO levels did not generate the typical fishy odour that make sensory panellists reject the marine fishes. Some authors have noted that TMA remained at low concentrations in trout during chilling storage (Rodríguez, Besteiro, & Pascual, 1999), however our results show that this compound can also be considered as a useful spoilage indicator also in trout.

### 4. Conclusions

TMA has been proved to be a good spoilage marker and this has been possible due to the low limits of quantification achieved by the proposed methodology: 0.08 mg N kg<sup>-1</sup> in freshwater fish. In addition it has been proved that TMA serves as a spoilage indicator in freshwater fish, even when the TMAO concentration is lower than in marine ones. The proposed methodology has a good linear working range with constant recoveries within it and has proved to be repeatable and precise. The factors affecting the reaction (pH, temperature and reaction time) have been optimised and controlled and the frozen storage of the reaction products allows reliable results when necessary. A novel HPLC-MS multianalyte method has been developed and validated with the clear application of measuring fish spoilage with high selectivity against the different analytes and with a twelve minutes chromatogram.

### Acknowledgements

This study was funded by the Economic Development and Competitiveness Department of the Basque Government (Project FOODBASK). Lander Baliño thanks the Basque Government for a PhD fellowship (Young researchers programme 2009)

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.086>.

## References

- Anderson, A. K. (2008). Biogenic and volatile amine-related qualities of three popular fish species sold at Kuwait fish markets. *Food Chemistry*, 107(2), 761–767.
- AOAC (2000). 971.14 method: Trimethylamine nitrogen in seafood. In *AOAC Official Methods of Analysis* (p. 9)
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 319–333.
- Duflos, G., Coin, V. M., Cornu, M., Antinelli, J.-F., & Malle, P. (2006). Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(4), 600–611.
- Dyer, W. J. (1945). Amines in Fish Muscle I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 6, 351–358.
- Fadhilou-Zid, K., Curiel, J. A., Landeta, G., Fattouch, S., Reverón, I., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2012). Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food Control*, 25(1), 89–95.
- Fillit, C., Jaffrezic-Renault, N., Bessueille, F., Leonard, D., Mitsubayashi, K., & Tardy, J. (2008). Development of a microconductometric biosniffer for detection of trimethylamine. *Materials Science and Engineering C*, 28, 781–786.
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262–266.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121–137.
- Hebard, C. E., Flick, G. J., & Martin, R. E. (1982). Occurrence and significance of TMAO and its derivatives in Fish and Shellfish. In R. E. Martin, G. J. Flick, C. E. Hebard, & D. R. Ward (Eds.), *Chemistry and biochemistry of marine food products*. (pp. 149–304). AVI Publishing company.
- Herráez-Hernández, R., Cháfer-Pericás, C., Verdú-Andrés, J., & Campíns-Falcó, P. (2006). An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, 1104(1-2), 40–6.
- Hovgate, P. (2009). Traditional methods. In H. Rehbein & J. Oehlenschläger (Eds.), *Fishery products: Quality, safety and authenticity* (pp. 19–41). Wiley-Blackwell.
- Hovgate, P. (2010). A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 1. Determination. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9, 29–57.
- Johnson, D. W. (2008). A flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous measurement of trimethylamine and trimethylamine N-oxide in urine. *Journal of Mass Spectrometry*, 43, 495–499.
- Kyu Lee, S., Kim, D.-H., Jin, C., & Hyun Yoo, H. (2010). Determination of Urinary Trimethylamine and Trimethylamine N-oxide by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Mixed-Mode Stationary Phases. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(2), 483–486.
- Li, F., Liu, H.-Y., Xue, C.-H., Xin, X., Xu, J., Chang, Y., & Yin, L. (2009). Simultaneous determination of dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-n-oxide in aquatic products extracts by ion chromatography with non-suppressed conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5924–5926.
- Mamer, O. A., Choinière, L., & Lesimple, A. (2010). Measurement of urinary trimethylamine and trimethylamine oxide by direct infusion electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 406(1), 80–82.
- Marrakchi, A. El, Bennour, M., Bouchriti, N., Hamama, A., & Tagafait, A. (1990). Sensory, chemical, and microbiological assessments of moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, 53(7), 600–605.
- Mitsubayashi, K., Kuboetara, Y., Yano, K., Hashimoto, Y., Kon, T., Nakakura, S., & Endo, H. (2004). Trimethylamine biosensor with flavin-containing monooxygenase type 3 (FMO3) for fish-freshness analysis. *Sensors and Actuators B*, 103, 463–467.
- Nielsen, M. K., & Jørgensen, B. M. (2004). Quantitative Relationship between Trimethylamine Oxide Aldolase Activity and Formaldehyde Accumulation in White Muscle from Gadiform Fish during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3814–3822.
- Nizzeqi, N., Daikoku, T., Hirata, T., El-Shourbagy, I., Song, X., & Sakaguchi, M. (2002). Mechanism of biosynthesis of trimethylamine oxide from choline in the teleost tilapia, *Oreochromis niloticus*, under freshwater conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 131(3), 371–386.
- Olafsdottir, G., Martindottir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., & Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 258–265.
- Ozogul, F., Taylor, K. D. A., Quantick, P., & Ozogul, Y. (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 515–522.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2010). Colorimetric assay for determination of trimethylamine-nitrogen (TMA-N) in fish by combining headspace-single-drop microextraction and microvolume UV-vis spectrophotometry. *Food Chemistry*, 119(1), 402–407.
- Rodríguez, C. J., Besteiro, I., & Pascual, C. (1999). Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(February), 1473–1480.
- Rodríguez, Ó., Barrios-Velázquez, J., Ojeda, A., Piñeiro, C., & Aubourg, S. P. (2003). Evaluation of Sensory and Microbiological Changes and Identification of Proteolytic Bacteria during the Iced Storage of Farmed Turbot (*Psetta maxima*). *Journal of Food Science*, 68(9), 2764–2771.
- Rodríguez-Méndez, M. L., Gay, M., Apeteci, C., & De Saja, J. A. (2009). Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta*, 54(27), 7033–7041.
- Ruiz-Capillas, C., Gillyon, C. M., & Horner, W. F. A. (2001). Determination of different volatile base components as quality control indices by official methods and flow injection analysis. *Journal of Food Biochemistry*, 25(6), 541–553.
- Saito, H., Kaneko, Y., Hashimoto, Y., Shirai, T., Kudo, H., Otsuka, K., & Mitsubayashi, K. (2007). Ammonia bio-sniffer with flavin-containing monooxygenase. *Sensors and Actuators B*, 123, 877–881.
- Teerlink, T., Hennekes, M. W. T., Mulder, C., & Brulez, H. F. H. (1997). Determination of dimethylamine in biological samples by highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 691, 269–276.
- Timm, M., & Jørgensen, B. M. (2002). Simultaneous determination of ammonia, dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-n-oxide in fish extracts by capillary electrophoresis with indirect UV-detection. *Food Chemistry*, 76(4), 509–518.
- Triqui, R., & Bouchriti, N. (2003). Freshness Assessments of Moroccan Sardine (*Sardina pilchardus*): Comparison of Overall Sensory Changes to instrumentally determined volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7540–7546.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology*, 208, 2819–2830.
- Zhang, W.-H., & Zhang, W.-D. (2008). Fabrication of SnO<sub>2</sub>-ZnO nanocomposite sensor for selective sensing of trimethylamine and the freshness of fishes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(2), 403–408.
- Zhang, Z., Li, G., Luo, L., & Chen, G. (2009). Study on seafood volatile profile characteristics during storage and its potential use for freshness evaluation by headspace solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 659, 151–158.



**CAPÍTULO**

**4**

CARACTERIZACIÓN  
DEL CONTENIDO  
DE AMINAS VOLÁTILES  
DEL MÚSCULO DE PESCADO



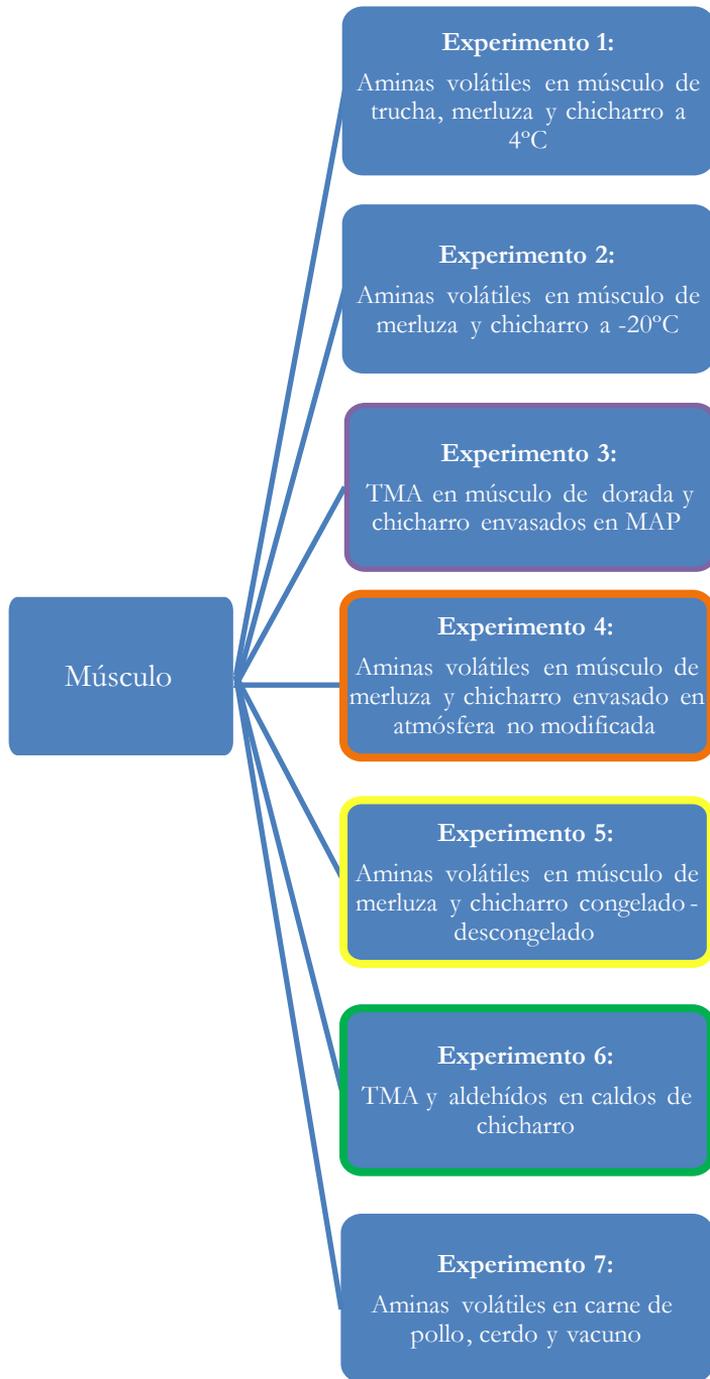


Figura 66: Relación de experimentos con músculo de pescado en el capítulo 4. Las distintas coloraciones de los recuadros son para resaltar la correspondencia de los experimentos del presente capítulo con los del capítulo 5. La ausencia de color en el recuadro indica que el experimento no tiene correspondencia con el siguiente capítulo.

## 4.1 -Introducción

La evaluación del grado de frescura del músculo de pescado se llevó a cabo mediante la determinación de distintos biomarcadores. Por un lado se analizaron las concentraciones de aminas volátiles mediante la metodología desarrollada en el capítulo 3, aunque también se determinaron concentraciones de ciertos aldehídos/cetonas en algunos de los experimentos.

Los experimentos que se llevaron a cabo fueron los siguientes:

***Experimento 1: Determinación del contenido en aminas volátiles de trucha, merluza y chicharro en refrigeración (4°C).***

Con el objetivo de valorar la validez de la metodología desarrollada para la evaluación del grado de frescura del pescado, se seleccionaron la trucha, la merluza y el chicharro y se llevó a cabo un experimento de 11 días de duración en el que en cada día de muestreo se tomaron muestras por triplicado.

***Experimento 2: Determinación del contenido en aminas volátiles en merluza y chicharro durante distintos tiempos de congelación (-20°C).***

Para determinar la concentración de DMA que se genera en el músculo de pescado durante la congelación debido a la acción del enzima TMAO demetilasa y observar la evolución de otras aminas volátiles, se tomaron muestras de merluza y chicharro a distintos tiempos de congelación.

***Experimento 3: Determinación del contenido en TMA en músculo de dorada y chicharro envasados en MAP a distintas temperaturas.***

Con el objetivo de analizar la influencia de la temperatura de almacenamiento en el deterioro o grado de frescura de las especies de estudio, se determinó la concentración de TMA en los músculos de los pescados en los distintos días de muestreo.

***Experimento 4: Determinación del contenido de compuestos volátiles en músculo de merluza y chicharro congelados-descongelados.***

Con la finalidad de estudiar qué cambios se producen en el pescado debido a su congelación y posterior descongelación, se congelaron chicharros y merluzas para posteriormente descongelarlos y almacenarlos a 4°C. Se analizó su músculo en busca de aminas volátiles y el espacio en cabeza estático de porciones de músculo en busca de algún marcador que pudiese indicar que el pescado había sido congelado y descongelado para poder así detectar posibles fraudes y el grado de frescura/deterioro.

***Experimento 5: Determinación del contenido de aminas volátiles en músculo de merluza y chicharro envasados para su correlación con el contenido en la atmósfera del envase.***

Para la determinación de la calidad de pescado se suelen tomar muestras de músculo, lo que implica la destrucción del mismo en la mayoría de los casos. En el capítulo 5 se muestra el desarrollo de una metodología que permitiese capturar la atmósfera que rodea el pescado, aire en nuestro caso, en búsqueda de las aminas volátiles que sirvan para caracterizar su deterioro sin necesidad de destruir el músculo. En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de los contenidos encontrados en el músculo del pescado.

***Experimento 6: Determinación de TMA y aldehídos/cetonas en caldos de chicharro inoculados con distintas cepas bacterianas.***

Utilizando cepas bacterianas identificadas como microorganismos de deterioro específico para el chicharro, se inocularon réplicas distintas de caldos de este pescado y se almacenaron en refrigeración a lo largo de 10 días. La concentración de TMA y de aldehídos/cetonas fue determinada en el propio caldo y en la atmósfera de los viales. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de componentes principales para identificar cuáles fueron los compuestos con mayor peso en la evolución de la calidad de los caldos.

***Experimento 7: Determinación de aminas volátiles en carne de pollo vacuno y cerdo.***

Debido a que la alimentación que recibe mucho ganado estabulado proviene de piensos elaborados con harinas animales, entre los que se utilizan descartes de pescado, se pensó que quizás algún compuesto útil en la determinación de la calidad del pescado pudiera estar presente en el músculo de la carne de vacuno, porcina o de pollo. Además el metabolismo anaerobio de algunas bacterias presentes en el aparato digestivo de los rumiantes, permite la conversión de la colina directamente en TMA. Por eso se pensó que la TMA o la DMA pudiesen utilizarse como marcadores de calidad de este tipo de carnes.

## **4.2 -Material y métodos**

### **4.2.1 -SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS VOLÁTILES.**

El equipo utilizado para los análisis fue un Agilent (Santa Clara, CA, USA) 1100 Series equipado con un desgasificador, una bomba binaria, un inyector automático, un horno de columna y un detector DAD acoplado a una trampa iónica Agilent Ion trap XCT-plus operando en modo positivo con ionización en electrospray (ESI) y trabajando en modo MRM (multiple reaction monitoring). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Luna HILIC (150 x

2 mm, I.D. 3  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex Torrance, CA, USA) con una precolumna rellena de la misma fase estacionaria. La temperatura del horno de la columna fue fijada en 30°C y la fase móvil estaba constituida por acetonitrilo: agua (1:1, v/v) (A) y acetonitrilo: agua (97:3, v/v) (B). Ambas fases fueron modificadas con 5mM de acetato amónico. Las condiciones de elución aplicadas fueron: un primer tramo isocrático del minuto cero al minuto 0,5 con un 5% de A, del minuto 0,5 al minuto 6 se llevó a cabo un gradiente lineal del 5% A al 100% A y estas condiciones se mantuvieron durante 5 minutos, para después volver a las condiciones iniciales. El flujo se mantuvo a 0,3 mL/min durante todo el cromatograma y el volumen de inyección fue de 3  $\mu\text{L}$ .

En cuanto a las condiciones de espectrometría de masas, el capilar (3500 V), nebulizador (40 psi), gas de secado (9 L/min) y temperatura de secado (350°C) se mantuvieron a lo largo de todo el cromatograma. El resto de los parámetros fueron los que aparecen en la Tabla 15, que previamente habían sido optimizados, como se explicó en el apartado 3.7.2.2.2.

#### **4.2.2 -ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE PESCADO (EXPERIMENTO 1 Y 3)**

La merluza y el chicharro fueron obtenidos del puerto de Ondarroa (Bizkaia, España) y fueron enviados en hielo por carretera. Una vez recibidos, el pescado fue eviscerado y se le quitó la cabeza. En el caso de la trucha, estas fueron compradas en la piscifactoría más cercana (Santa Cruz de Campezo, Álava) y enviadas evisceradas y en refrigeración el mismo día de su muerte. Se utilizaron bolsas de plástico termoselladas para almacenar el pescado sin realizar vacío, de modo que en el interior de las bolsas quedaba aire. Se almacenaron a 4°C y a -20°C y en cada día de experimento, 3 unidades de cada especie fueron analizadas. En el caso de las muestras congeladas, fueron colocadas a 4°C con un día de antelación a su análisis para asegurar así que todo el pescado estuviese descongelado. Para el pescado congelado-descongelado (7 días, 21 días, 35 días, 63 días, 91 días y 180 días) se utilizó el mismo proceso, con un día de antelación se descongeló todo el lote y se mantuvo a 4°C hasta el momento de su análisis. La piel de las piezas de pescado se retiró y se homogenizó cada unidad en una picadora de cocina.

Para el análisis mediante HPLC-MS se tomó una muestra de 1g y se utilizó el mismo protocolo del apartado 3.7.2.2.3 para obtener el extracto final ya centrifugado.

Posteriormente en un vial eppendorf de 2 mL se añadieron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del extracto centrifugado, 480  $\mu\text{L}$  de una mezcla acetonitrilo: agua (6:4, v/v) con TEAC (3,2  $\mu\text{g}$  /mL), tampón bicarbonato (20  $\mu\text{L}$ , 0,5 M) a pH 8 y BATB (1 mL, 5 mg/mL en acetonitrilo). Después de 1 hora de incubación a 60°C en un baño termostatzado (WN 22, Memmert, Alemania) se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 5 M para detener la reacción y se encapsuló el contenido de los eppendorf para analizarlo por HPLC-MS. Las curvas de calibrado fueron preparadas siguiendo el mismo protocolo.

Las muestras de dorada, dorada fileteada y chicharro (experimento 3) fueron proporcionadas por una cadena de distribución alimentaria. Las muestras estaban envasadas en una atmósfera modificada compuesta por 40%CO<sub>2</sub> y 60% N<sub>2</sub> y fueron almacenadas a 4°C desde su recepción a día 0 del experimento hasta el momento de su análisis el día de muestreo correspondiente.

La metodología utilizada para el análisis del TMA en estas muestras de pescado fue la del ácido pícrico (apartado 3.3.2).

#### **4.2.3 -ESPACIO EN CABEZA ESTÁTICO Y CONDICIONES DE CROMATOGRAFÍA GASEOSA (EXPERIMENTO 4)**

Para el análisis por cromatografía de gases, se tomó 1 g de muestra (cortado de la zona central del filete) y se introdujo en un vial (20 mL) al que en el momento de análisis se añadieron 5 mL de NaOH 1M y 20 µL de alcohol isoamílico 100 µg/mL a modo de patrón interno.

El equipo utilizado fue un Agilent 7890GC acoplado a un muestreador de espacio de cabeza 7694E. La detección se llevó a cabo con un detector 5975 inert MSD triple axis. Se utilizó Helio para presurizar los viales y para llevar el espacio de cabeza hasta el puerto de inyección, que estaba conectado a una columna HP-INNOWAX (30 m x 0,32 mm I.D. 0,25 µm film thickness). La inyección se llevó a cabo en modo Split (1:1) y la temperatura del inlet fue establecida en 200°C. El gradiente de temperaturas comenzó a 45°C durante 5 minutos, seguido de una rampa hasta 150°C a 10°C/min, se mantuvo así durante 2 minutos para después subir hasta 200°C a 50°C/min y mantenerse así por 5 minutos. El flujo de gas portador (Helio) fue de 1,8 mL/min.

Las condiciones para el muestreador automático de los espacios en cabeza fueron las siguientes: tiempo de equilibrio del vial, 2 min; temperatura de calentamiento del vial, 75°C; tiempo de presurización del vial, 30 s; tiempo de llenado del loop, 0,2 min; temperatura del loop, 120°C; temperatura de la línea de transferencia, 150°C y tiempo de inyección, 1 min.

#### **4.2.4 -ENVASADO DE PESCADO (EXPERIMENTO 3 Y 5)**

En el caso del experimento 3, el pescado fue entregado por la cadena de distribución ya envasado en barquetas y con una composición gaseosa del 48% CO<sub>2</sub>, 50%N<sub>2</sub> y 2% O<sub>2</sub>.

Para el envasado del pescado del experimento 5, se utilizaron barquetas LINPAC 15-45 fabricadas en Poliespan-Etilen vinil alcohol-Polietileno y un film LINPAC Lintop 80 fabricado en Poliamida-Polietileno. Las especificaciones referentes a la permeabilidad de las distintas especies gaseosas están recogidas en la Tabla 20. Para el envasado se utilizó la envasadora Smart 400 (Ulma, España), y las barquetas fueron termoselladas a una temperatura de 155°C

sin realizar vacío ni utilizando atmósfera modificada alguna. Para cada día se envasó una barqueta vacía para tomar la medida blanco. Estas barquetas fueron almacenadas en una cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su análisis.

Tabla 20: Composición y permeabilidad a los gases de la barqueta y el film utilizados para el envasado del pescado.

	Composición	Permeabilidad al O <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /24h/bar)	Permeabilidad al CO <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /24h/bar)	Permeabilidad al H <sub>2</sub> O (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /24h/bar)
<b>Film (LINTOP 80)</b>	Poliamida / Poliétileno	<45	<225	<5
<b>Barqueta (LINPAC 15-45)</b>	Poliespan- EVOH- Poliétileno	Alta barrera	Alta barrera	Alta barrera

## 4.2.5 -CALDOS DE PESCADO (EXPERIMENTO 6)

### 4.2.5.1-Preparación e inoculación de los caldos

A partir de filetes de pescado (chicharro) se prepararon bolsas para preparar un homogeneizado con la ayuda de un stomacher . Se utilizó la proporción 0,5 kg de pescado por cada litro de agua. Tras obtener el homogeneizado se filtró para eliminar escamas o espinas y se hirvió. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se distribuyó en los distintos viales a los que se inoculó la cepa de interés. Los viales utilizados tenían una capacidad de 22 mL y en cada uno de ellos se echaron 10 mL de caldo. Para este experimento se utilizaron viales con tapones de cierre hermético ya que a parte del caldo en sí, interesaba mantener el espacio de cabeza aislado del exterior para su posterior extracción.

Para hacer crecer las cepas se utilizaron crioviales, en los que se inoculó la cepa correspondiente y se hizo crecer durante 20 horas a 10°C en caldo Long & Hammer.

Las cepas utilizadas fueron: *Carnobacterium maltaromaticum* (viales A), *Serratia proetamaculans* (Viales B), *Shewanella baltica* (Viales C) *Yersinia intermedia* (Viales D) y muestras sin bacteria (viales E).

### 4.2.5.2 -Determinación de biomarcadores

Para la determinación de trimetilamina se diluyó la muestra del caldo (1:10 en agua) y la muestra se procesó para su análisis mediante HPLC-MS siguiendo el protocolo del apartado 3.7.2.2.3.

Para la separación cromatográfica se utilizó el protocolo desarrollado en el apartado 3.7.3.2. El calibrado correspondiente fue realizado de la misma manera.

En el caso de las disoluciones patrón de TMAO, se utilizó el mismo protocolo salvo la dilución de la muestra.

Para la determinación de aldehídos y cetonas, a 0,5 mL de caldo de pescado se le añadieron 666  $\mu$ L de MeCN. Esta disolución se centrifugó y se filtró por tamaño de partícula 0,22  $\mu$ m. Una vez filtrado se tomaron 0,5 mL y se le añadieron otros 0,5 mL de una disolución de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (1 mL en 100 mL de MeCN), un reactivo ampliamente utilizado por su capacidad de reacción con grupos carbonilos de aldehídos y cetonas. Se calentó en un baño termostatizado a 40°C durante 45 minutos. Se encapsuló e inyectó en el cromatógrafo.

Se utilizó una columna Luna C18 (150 x 2 mm, I.D. 5  $\mu$ m) con una precolumna de la misma fase estacionaria. El horno de la columna fue calentado a 30°C y la fase móvil estaba constituida por H<sub>2</sub>O (A) y MeCN (B) utilizando el gradiente de elución que aparece en la Tabla 21. Se trabajó a un flujo de 0,4 mL./min y el volumen de inyección fue de 25  $\mu$ L. Se midieron las áreas cromatográficas a una longitud de onda de 360 nm.

Tabla 21: Gradiente de elución utilizado para la determinación de aldehidos y cetonas.

Tiempo ( min)	%A	%B
<b>0,0</b>	60,0	40,0
<b>2,0</b>	60,0	40,0
<b>30,0</b>	25,0	75,0
<b>31,0</b>	0,0	100,0
<b>34,0</b>	0,0	100,0
<b>35,0</b>	60,0	40,0
<b>40,0</b>	60,0	40,0

#### 4.2.5.3 -Análisis de componentes principales

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales con los valores de los distintos compuestos determinados en los caldos utilizando el software Statgraphics Centurion XVII Versión 17.0.16 (Statpoint Technologies, EEUU). Para ellos primeramente se llevó a cabo una normalización de los datos.

### 4.3 -Resultados y discusión

#### 4.3.1 -EXPERIMENTO 1: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN AMINAS VOLÁTILES EN MÚSCULO DE TRUCHA, MERLUZA Y CHICHARRO EN REFRIGERACIÓN (4°C)

A lo largo de los 11 días del experimento se analizaron las muestras de las 3 especies de pescado almacenadas a 4°C. En las Figuras 67-70 se representan los valores de su concentración final en el músculo.

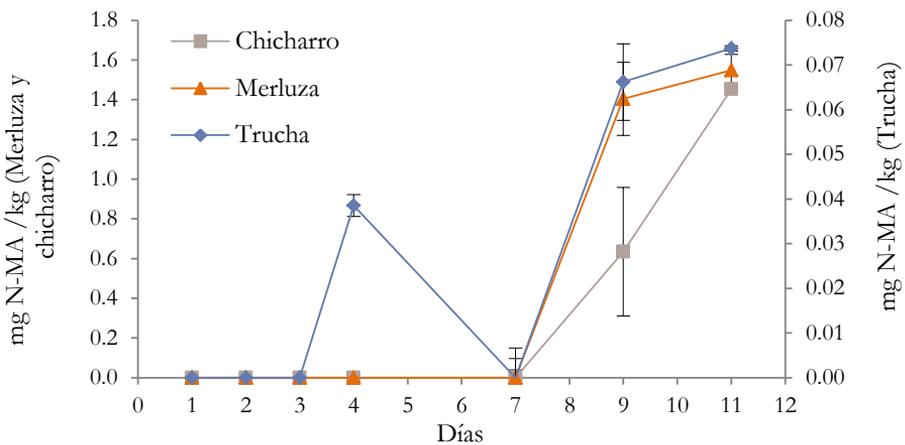


Figura 67: Evolución de la metilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C).

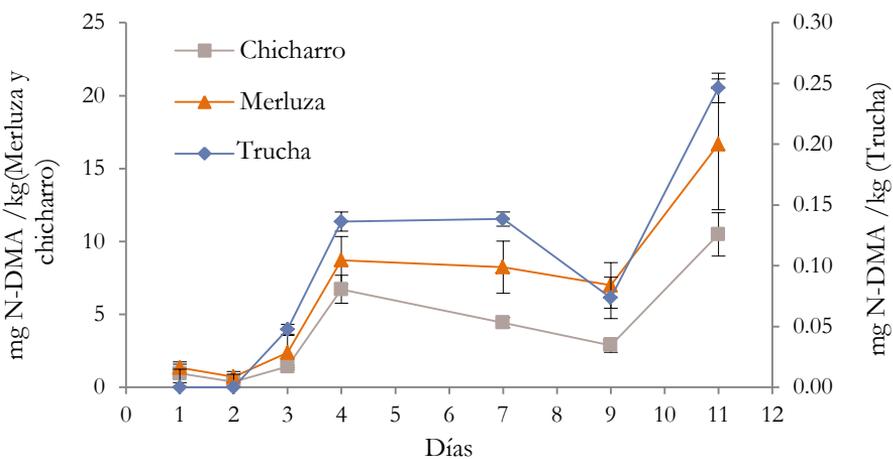


Figura 68: Evolución de la dimetilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C).

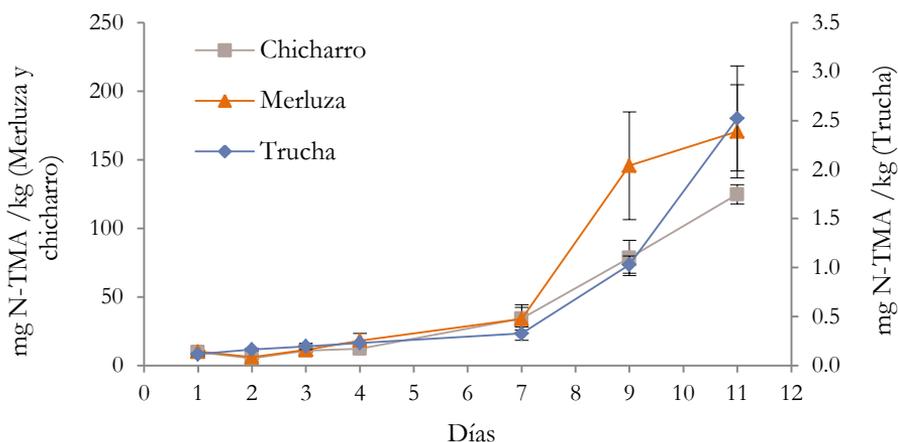


Figura 69: Evolución de la trimetilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración (4°C).

En los resultados se pudo apreciar que la metilamina no apareció en los extractos hasta el día 9 del experimento en ninguna de las especies estudiadas y cuando estuvo presente, su concentración fue mayor en los pescados marinos que en los de río, aproximadamente 20 veces más (Figura 67).

En el caso de la dimetilamina, la Figura 68 muestra como en las muestras de trucha, no apareció hasta el día 3 mientras que en merluza y chicharro apareció desde el primer día de experimento. El perfil de su evolución mostró dos tendencias, desde el día 1 hasta el día 4, la cantidad de DMA aumentó desde 1 mg N-DMA/kg hasta 8-12 mg N-DMA/kg y desde el día 4 hasta el día 9 disminuyó hasta 5 mg N-DMA/kg, aumentando de nuevo el último día para alcanzar el rango de valores de 15-20 mg N-DMA/kg.

En cuanto al descenso ocurrido entre los días 4 y 9 del experimento, podría ser debido a la inhibición de la enzima por parte de un cofactor como el FAD o incluso por sus propios productos de reacción, DMA, TMA y formaldehído (Sotelo & Rehbein, 2000). En el caso de la trucha el mayor valor de DMA fue hallado a día 11 (0,24 mg N-DMA/kg), con un perfil muy similar al de las otras dos especies.

En el caso de la trimetilamina, se observó una tendencia al crecimiento en las tres especies. En pescado de agua dulce la concentración fue prácticamente la misma desde el día 1 hasta el día 7 y solo en los dos días finales de experimento se apreció un crecimiento significativo, alcanzando el valor máximo de 2,52 mg N-TMA/kg (Figura 69).

Los valores iniciales de TMA para merluza y chicharro fueron 10,17 mg N-TMA/kg y 11,69 mg N-TMA/kg, respectivamente. Estos valores se mantuvieron estables hasta el día 4, cuando experimentaron un incremento que hizo alcanzar los 170 mg N-TMA/kg y 149 mg N-TMA/kg respectivamente a día 11 (Figura 69). En el caso de los pescados de río se encontraron menores concentraciones de TMA, probablemente por las bajas concentraciones de TMAO encontradas en los pescados de agua dulce. A pesar de esto, la metodología permitió monitorizar la concentración de este compuesto en la trucha a lo largo de su vida útil.

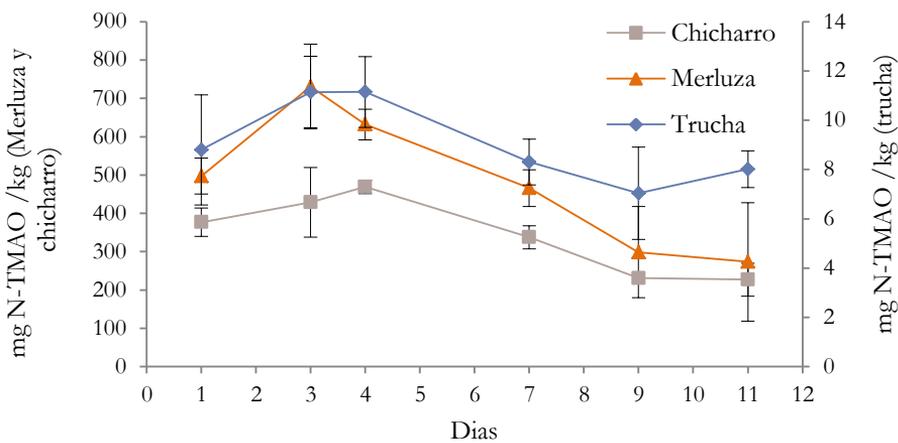


Figura 70: Evolución del óxido de trimetilamina a lo largo de 11 días en trucha, chicharro y merluza en refrigeración [4°C].

El óxido de trimetilamina es metabolizado por la microflora presente en el pescado para formar la trimetilamina, luego es lógico pensar que pescados con concentraciones bajas de TMAO presentaran bajas concentraciones de TMA.

En referencia a la trucha, la cantidad de TMAO (Figura 70) es estable desde el primer hasta el último día de experimento, probablemente porque la cantidad de TMAO convertida sea tan baja que no sea suficiente para distinguir cambios en la concentración final.

En el caso de los pescados de agua marina, la concentración de este compuesto es marcadamente mayor y se aprecia una tendencia a una ligera disminución a lo largo del almacenamiento, lo cual se correlaciona bien con el aumento en la concentración de TMA como se puede apreciar en la Figura 69.

El hecho de que en trucha se alcance una concentración tan baja de TMA cuando la concentración de TMAO permitiría mayores valores podría ser explicado por la distinta composición de la microflora en pescados marinos y pescados de agua dulce, es decir, presentan distintos organismos de deterioro específicos (SSO) (Gram & Dalgaard, 2002).

En los pescados marinos *Photobacterium phosphoreum* y *Shewanella spp* son dos de los principales responsables de la producción de TMA mientras que en pescado de agua dulce la baja concentración de sodio hace poco viable su crecimiento (Gram & Huss, 1996). Además, el pescado de piscifactoría, habitualmente presenta menor carga bacteriana que los pescados salvajes (Rodríguez et al., 2003), por lo que también son esperadas concentraciones más bajas de estos metabolitos.

Al sacar el pescado de las bolsas de plástico, se evaluaron rápidamente los olores, aromas, apariencia general y textura al tacto. Hasta el día 4, todos los pescados presentaron una buena apariencia y olor. El día 7, el pescado marino comenzó a tener un ligero olor a pescado pasado y el pescado de agua dulce olor a rancio, probablemente por la degradación lipídica, ya que la trucha es un pescado graso. A pesar de estos olores, en nuestra opinión, los pescados podrían haber sido aceptados por un panel sensorial.

En este día los pescados no llegaron a los valores a menudo relacionados con olores a pescado pasado y pungentes, valores que van de 50 a 100 mg N-TMA/kg (Marrakchi et al., 1990). Fue en el día 9 cuando los pescados fueron considerados inaceptables por sus olores al extraerlos de las bolsas de almacenamiento. Esto se correlaciona bien con los valores de aminas volátiles determinados.

Es importante remarcar que el pescado de agua dulce permaneció más tiempo aparentemente apto para el consumo a pesar del alto contenido lipídico y la consiguiente generación de aldehídos. Los bajos valores de TMAO presentes, no generaron los típicos olores a pescado deteriorado que hacen a los panelistas sensoriales rechazar un pescado. Algunos autores han determinado que la concentración de TMA en trucha refrigerada se mantiene en valores muy bajos (Rodríguez et al., 1999), sin embargo nuestros resultados muestran que este compuesto también puede resultar de utilidad como marcador de calidad en la trucha.

Además, en las especies marinas, merluza y chicharro, la metodología ha demostrado ser interesante para poder llevar a cabo estudios de vida útil mediante las concentraciones de las aminas volátiles estudiadas con una metodología sencilla y multianalito.

### 4.3.2 -EXPERIMENTO 2: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINAS VOLÁTILES EN MERLUZA Y CHICHARRO DURANTE DISTINTOS TIEMPOS DE CONGELACIÓN (-20°C)

En el caso de la TMA (Figura 71) se ve como los valores se sitúan en todo el intervalo de tiempo entre 10-20 mg N-TMA/kg pescado, algo esperable ya que el metabolismo de la microflora bacteriana presente en el pescado está prácticamente inhibido a estas temperaturas de congelación (-20°C) y el origen de este compuesto es la degradación bacteriana del TMAO para convertirlo en TMA.

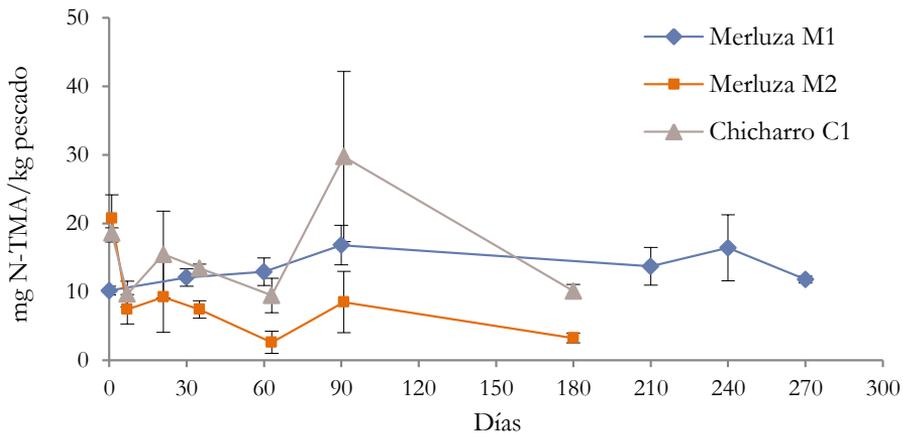


Figura 71: Contenido en TMA en merluza M1 y M2 y chicharro C1.

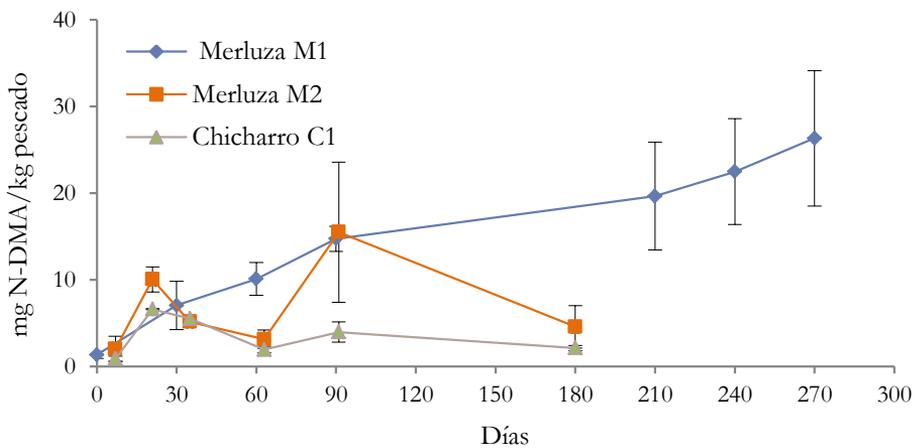


Figura 72: Contenido en DMA en merluza M1 y M2 y chicharro C1.

Esta inhibición no afecta del mismo modo a algunas reacciones enzimáticas, que sí tienen lugar, aunque a velocidades de reacción bajas. Este es el caso de la enzima TMAO demetilasa (EC 4.1.2.32), que cataboliza la ruptura de una molécula de TMAO para dar lugar a una molécula de DMA y otra de formaldehído. Según la FAO, esto se puede evitar congelando a temperaturas por debajo de  $-30^{\circ}\text{C}$  (Huss, 1995) evitando las fluctuaciones de temperatura y con una manipulación apropiada desde el momento de la captura.

Como se puede apreciar en la Figura 72 el contenido de DMA de la merluza M1, durante los 3 primeros meses de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  aumenta de forma considerable llegando a alcanzar los 15 mgN-DMA/kg pescado. Posteriormente, este crecimiento se ve ralentizado y el valor máximo que se alcanza en el mes 9 de almacenamiento es de 26 mg N-DMA/kg pescado, aunque el error existente entre las réplicas en estos tres puntos de muestreo es mucho mayor.

En el caso de la merluza M2 y el chicharro C1, el perfil que se observa es muy similar entre sí, parten de unos valores cercanos a cero (2,08 en el caso de la merluza y 0,88 para el chicharro). Transcurridos 21 días estos valores aumentan hasta situarse cercanos a los 10 mg N-DMA/kg pescado, aunque posteriormente sufrirán un descenso para situarse próximos a los valores iniciales a día 60 de congelación.

Transcurridos ya los 6 meses del experimento, los valores alcanzados en M2 y C1 no son “significativamente” superiores a los encontrados en el día cero del experimento.

En el caso de la merluza, sorprende el distinto comportamiento de las muestras en los dos experimentos, ya que en el experimento M1 el aumento de la concentración es progresivo y no existen descensos en ninguno de los puntos de muestreo. Este hecho puede ser debido a la variabilidad de las muestras tomadas o al distinto momento de la toma de las mismas, ya que como se ha explicado anteriormente, el estado nutricional o la estación del año en que el animal es capturado, hace que su composición no sea la misma.

Por otra parte, el hecho de que la concentración en chicharro no haya aumentado no es extraño ya que en esta especie no se espera actividad del enzima TMAO demetilasa, presente básicamente en los pescados del orden gadiforme, al que no pertenece esta especie.

En el caso de la MA, no se han encontrado concentraciones significativas en ninguno de los puntos de muestreo ni se han apreciado aumentos o disminuciones en su concentración.

Como era esperable a temperaturas de congelación, la concentración de TMA no experimentó grandes aumentos en ninguno de los experimentos realizados tanto en merluza como en chicharro. Sin embargo si resulta curioso el comportamiento de la DMA, ya que solo en una de las muestras, M1, aumenta como se esperaba mientras que las muestras M2 y C1 permanecen estables. Estas diferencias pueden estar causadas por la distinta temporada de captura, siendo la muestra M1 de finales de invierno, mientras que las muestras M2 y C1 son de mayo.

De estos datos se puede concluir que la TMA y DMA no resultan marcadores apropiados de calidad para la merluza (por su distinto comportamiento en función de la época de captura) y el chicharro almacenados en congelación.

### 4.3.3 -EXPERIMENTO 3: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN TMA EN MÚSCULO DE DORADA Y CHICHARRO ENVASADOS EN MAP A DISTINTAS TEMPERATURAS

A continuación se exponen las concentraciones de TMA obtenidas en los 3 tipos de muestras: dorada entera, dorada fileteada y chicharro entero.

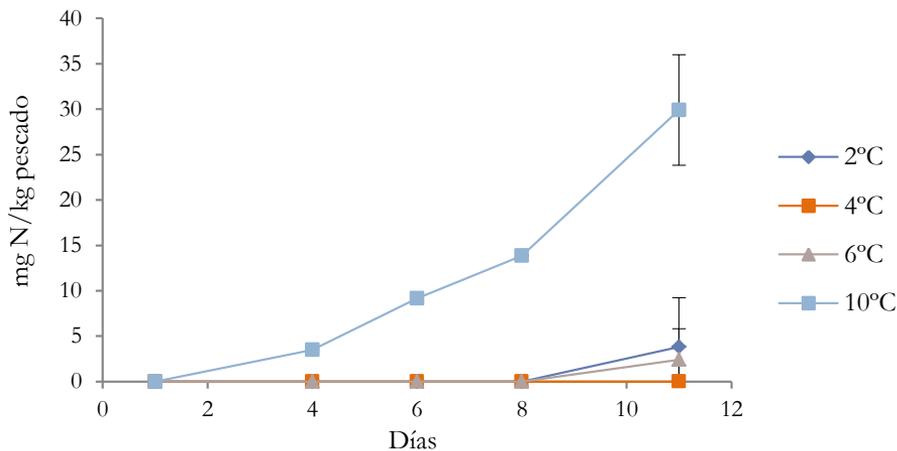


Figura 73: Evolución de la TMA a lo largo de los 11 días de experimento a 2°C, 4°C, 6°C y 10°C en la dorada entera.

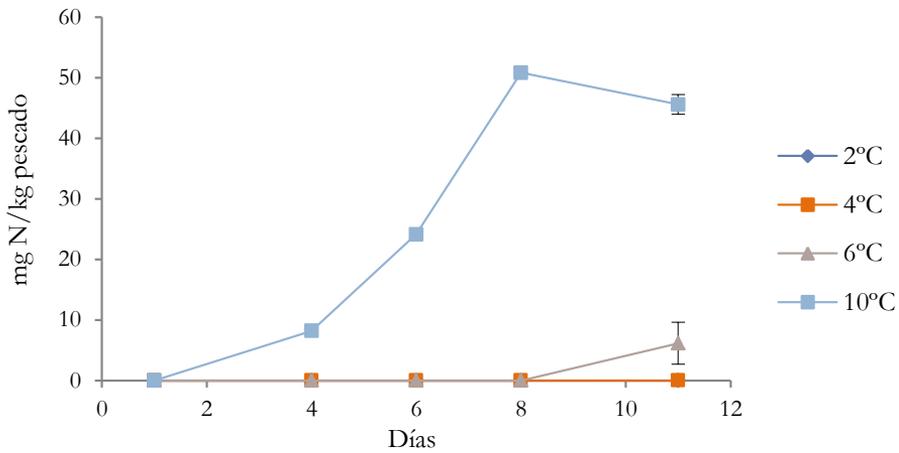


Figura 74: Evolución de la TMA a lo largo de los 11 días de experimento a 2°C, 4°C, 6°C y 10°C en la dorada fileteada.

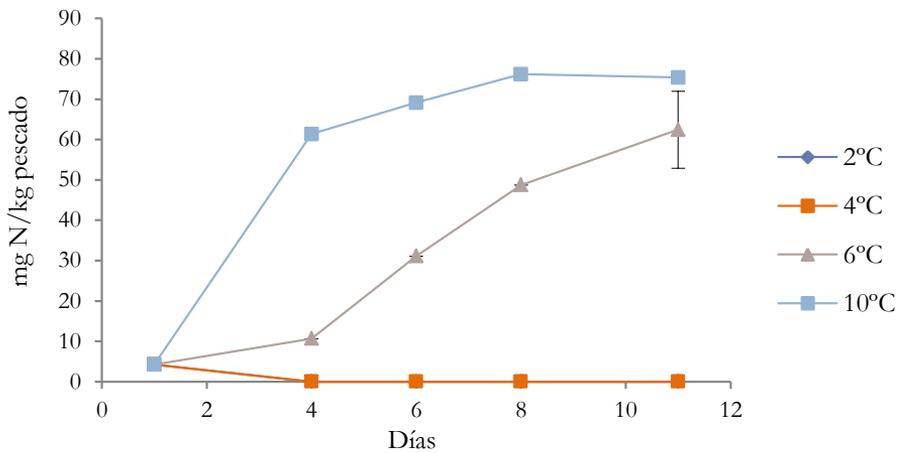


Figura 75: Evolución de la TMA a lo largo de los 11 días de experimento a 2°C, 4°C, 6°C y 10°C en el chicharro.

En el caso de la dorada entera (Figura 73) se aprecia como la única temperatura a la que no hay ningún crecimiento bacteriano es la de 4°C. En el caso de 2°C y 6°C tan solo se aprecia crecimiento en el último día del experimento y a niveles bajos. Es a 10°C donde se aprecia un crecimiento en la concentración de TMA desde el comienzo del experimento hasta alcanzar los 30 mg N TMA/kg pescado en el día 11.

La dorada fileteada (Figura 74) sin embargo presenta una tendencia distinta. A 2°C y 4°C no se aprecia ningún aumento en la concentración de TMA pero a 6°C y día 11 la concentración de TMA es de 6 mg N TMA/kg pescado. A 10°C su concentración aumenta desde el comienzo pero con una mayor pendiente que la dorada entera hasta alcanzar un máximo el día 8 de 50 mgN-TMA/kg pescado para mantenerse prácticamente estable hasta el día 11 con 46 mgN TMA/kg pescado. Esta diferencia entre la dorada entera y la fileteada puede ser debida a una mayor presencia de flora bacteriana por la manipulación del producto durante el fileteado por parte de los operarios.

En el chicharro (Figura 75) se observa que la concentración de TMA no solo aumenta a 10°C sino también a 6°C alcanzando valores similares a día 11 de experimento en ambas temperaturas.

En el caso de las muestras a 6°C se aprecia un aumento más lento con valores de 10 mgN TMA/kg pescado a día 4 mientras que a 10°C se alcanzan concentraciones de 61 mg N TMA/kg pescado. Las concentraciones en ambas temperaturas continúan aumentando hasta llegar a alcanzar los 62 mg N TMA/kg pescado a 6°C y los 75 mg N TMA/kg pescado (Alfaro et al., 2013a). Las diferencias entre las muestras a 6°C y 10°C se deben a un mayor crecimiento bacteriano a 10°C. A mayores temperaturas la proporción de CO<sub>2</sub> disuelto en el producto es menor, con lo que el efecto inhibitorio de la atmósfera modificada disminuye (Sivertsvik et al., 2002).

Si comparamos las concentraciones alcanzadas en el caso del chicharro con las alcanzadas en la dorada, tanto entera como fileteada, se aprecia que las del primero son mayores. Este hecho está relacionado con que la dorada provenía de acuicultura, donde la carga bacteriana presente es menor que en pescados salvajes (Rodríguez et al., 2003) mientras que el chicharro fue obtenido mediante pesca extractiva.

#### **4.3.4 -EXPERIMENTO 4: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MÚSCULO DE MERLUZA Y CHICHARRO CONGELADOS-DESCONGELADOS**

##### **4.3.4.1 -Contenido en aminas volátiles (HPLC-MS)**

A continuación se muestran los resultados de las muestras de merluza y chicharro que han permanecido en congelación durante distintos periodos de tiempo y posteriormente han sido descongelados y mantenidos a temperaturas de refrigeración (4°C) durante un periodo de 15 días.

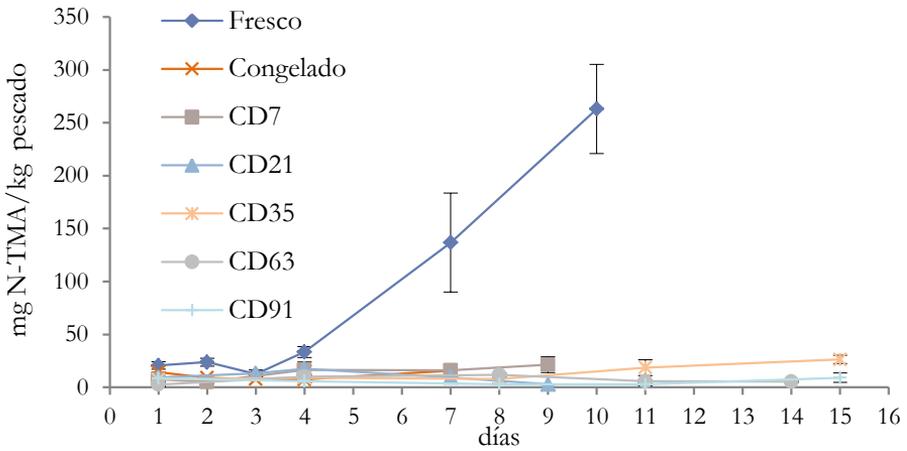


Figura 76: Evolución de la trimetilamina en músculo de merluza a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

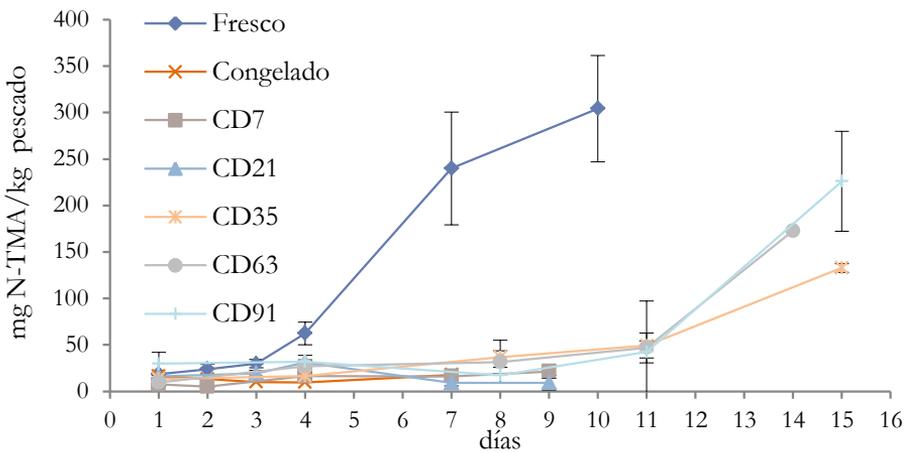


Figura 77: Evolución de la trimetilamina en músculo de chicharro a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

En este experimento se ha apreciado el efecto de la temperatura de congelación sobre la microflora presente en el pescado, responsable de la generación de la TMA.

En las Figuras 76-77 se aprecia como en el pescado fresco la producción de TMA entre el día 4 y el día 7 comienza a aumentar de manera notable. En el caso de congelar el pescado, al detenerse prácticamente el metabolismo de la flora es lógico no apreciar que a distintos tiempos de congelación se observen aumentos de concentración, la cual se mantiene sobre los 10 mg N-TMA/kg pescado. En el caso del pescado congelado-descongelado, se aprecia que el aumento en la concentración de TMA está muy inhibido. En el caso del pescado CD7 y CD21, el experimento no se extendió más del día 11, por lo que se apreció que no había incremento en la concentración de TMA, tanto en el chicharro como en la merluza. En los experimentos CD35, CD63 y CD91, la duración estos experimentos se extendió hasta el día 15 con el objetivo de poder determinar en qué momento comenzaba a aumentar la concentración de TMA. En el caso del chicharro (Figura 77) fue el día 11 cuando se apreció un aumento que prosiguió hasta el día 15. Sin embargo en el caso de la merluza (Figura 76) no se llegó a apreciar este aumento, probablemente por falta de tiempo de adaptación de los microorganismos de deterioro específicos.

Estos resultados van acorde con los presentados por (Baixas-Nogueras et al., 2007) en los que sucede lo mismo con la merluza alcanzando valores muy similares de TMA-N tanto en el pescado fresco como en el congelado-descongelado, a pesar de que los tiempos de congelación son superiores (6 meses a -20°C) a los testados en nuestro experimento.

En nuestro caso no se han llevado a cabo análisis microbiológicos, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con los de otros autores, pero la coincidencia en las concentraciones de TMA-N hace pensar que los perfiles microbiológicos hayan seguido tendencias similares a las descritas por otros autores (Magnusson & Martinsdottir, 1995; Martinsdottir & Magnusson, 2001) en pruebas realizadas en bacalao y merluza. Estos autores describen como un almacenamiento corto de 1 día a temperaturas de congelación no produce ninguna disminución en el número de bacterias psicrófilas, mesófilas o coliformes mientras que en el caso de almacenamientos a temperaturas de congelación por largos periodos de tiempo se ha llegado a apreciar un descenso de entre el 70 y el 91% después de 50 semanas a -25°C (Tabla 22).

Tabla 22: Reducción del número de bacterias en filetes de bacalao después de distintos tiempos de almacenamiento a -25°C. Tomado de (Magnusson & Martinsdottir, 1995).

Tiempo de almacenamiento	%Reducción n° bacterias		
	mesófilas	psicrófilas	coliformes
<b>1 día</b>	0	0	0
<b>18 semanas</b>	28	37	60
<b>23 semanas</b>	53	43	80
<b>50 semanas</b>	70	90	91

Algo similar ocurre en el trabajo realizado por (Baixas-Nogueras et al., 2007) en que los niveles bacterianos de las muestras congeladas-descongeladas se encuentran por debajo de los niveles de las muestras frescas. En este caso se atribuye a *Shewanella putrefaciens* la generación de TMA a partir de TMAO y se puede observar como los niveles de esta bacteria en el pescado fresco alcanzan los 6 logaritmos a día final de experimento, mientras que en el pescado congelado-descongelado solo se llega a los 2 logaritmos.

El hecho de que en nuestro caso la merluza necesite más tiempo para alcanzar mayores niveles de TMA-N que en el chicharro probablemente esté relacionado con su evisceración en alta mar, mientras que el chicharro es eviscerado posteriormente, previa venta en los establecimientos correspondientes. Esto provocaría que las bacterias presentes en todo el aparato digestivo de la merluza tuviesen menos tiempo para poder migrar y contaminar zonas de músculo (Borderías & Sánchez-Alonso, 2011).

De esta manera se podría diferenciar el pescado fresco del congelado-descongelado si se mantuviesen en refrigeración al menos 7 días, que es el tiempo mínimo para apreciar diferencias significativas entre el pescado fresco y congelado-descongelado.

La manera en que afecta el proceso de congelación-descongelación al pescado puede ser aprovechada para determinar si el pescado es fresco o congelado-descongelado, en el próximo capítulo se detallan en profundidad los experimentos llevados a cabo con tal fin.

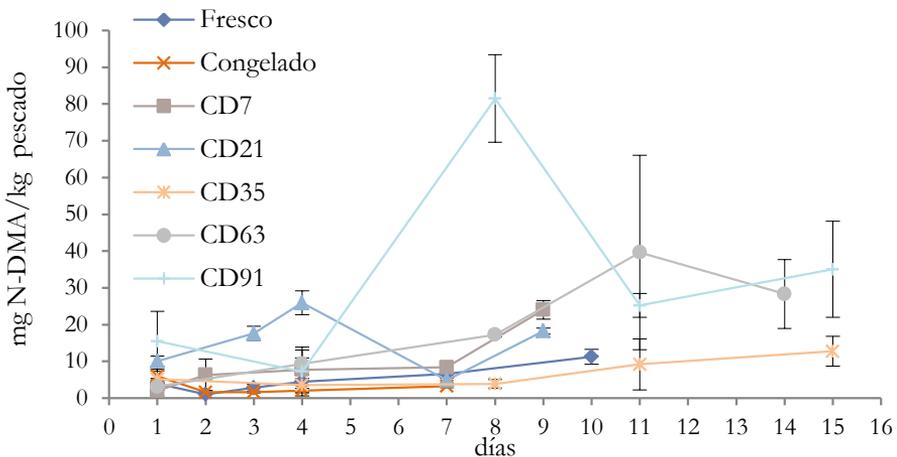


Figura 78: Evolución de la dimetilamina en músculo de merluza a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

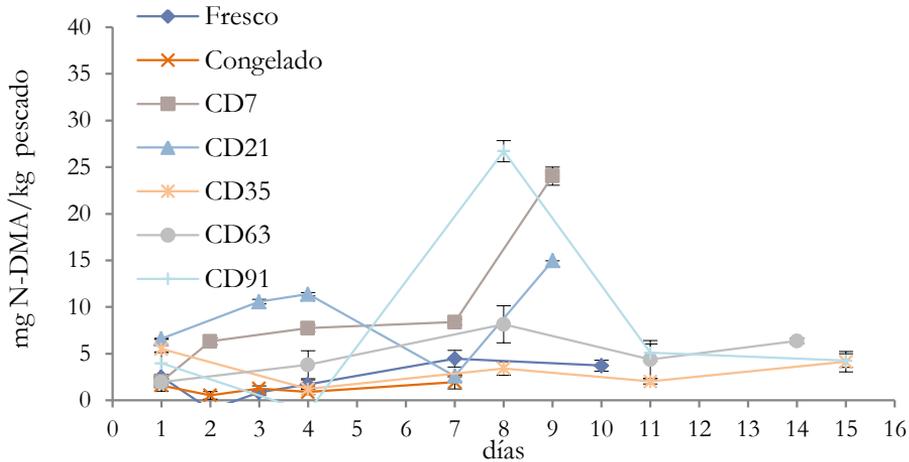


Figura 79: Evolución de la dimetilamina en músculo de chicharro a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

En el caso de la DMA tanto en merluza como en chicharro no se aprecia que los valores iniciales superen los 10 mg N-DMA/kg en ninguno de los casos. En relación a la evolución de este compuesto a lo largo de su almacenamiento en refrigeración, se puede apreciar que en el caso de la merluza (Figura 78) a los 2 y 3 meses de almacenamiento congelado alcanza valores a día 15 de 28 y 35 mg N-DMA/kg pescado respectivamente. Si comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Rey-Mansilla (Rey-Mansilla et al., 2001) son ligeramente inferiores, ya que en su trabajo con merluza, después de 3 meses de congelación a -18°C se alcanzaron concentraciones de 27-68 mg N-DMA/kg en muestras completamente evisceradas. Según esta misma autora, a pesar de tratarse de una especie con actividad TMAOasa, esta actividad se encuentra muy localizada en órganos como riñón o bazo entre otros y no es esperable encontrar grandes concentraciones de DMA en el músculo salvo en excepciones como pueda ser el caso de la merluza roja (*Urophycis chuss*) (Rey-Mansilla et al., 2002).

En el caso del chicharro (Figura 79) estos valores se mantienen bastante estables independientemente del tiempo de almacenamiento congelado, a excepción de un punto de muestreo central en el que los valores fueron mucho mayores, algo que también ocurrió en el caso de la merluza. En cualquier caso, no parece que la DMA pueda ser un buen marcador para determinar si un pescado ha sido congelado y descongelado ya que no sigue un patrón característico.

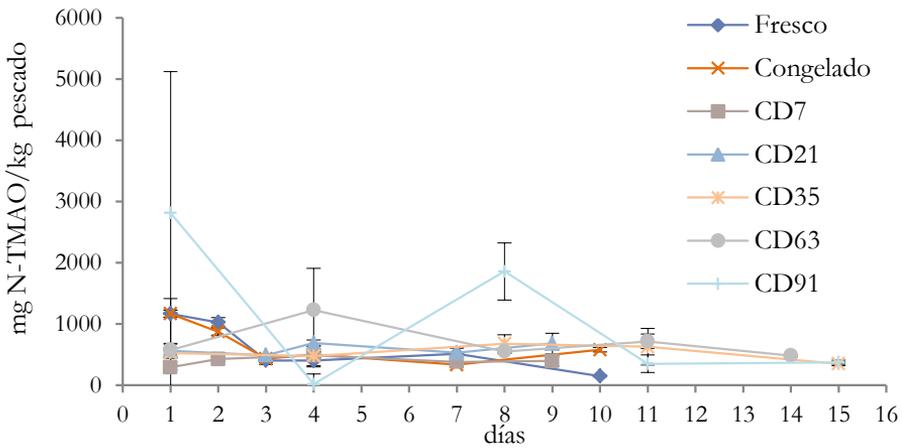


Figura 80: Evolución del óxido de trimetilamina en músculo de merluza a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

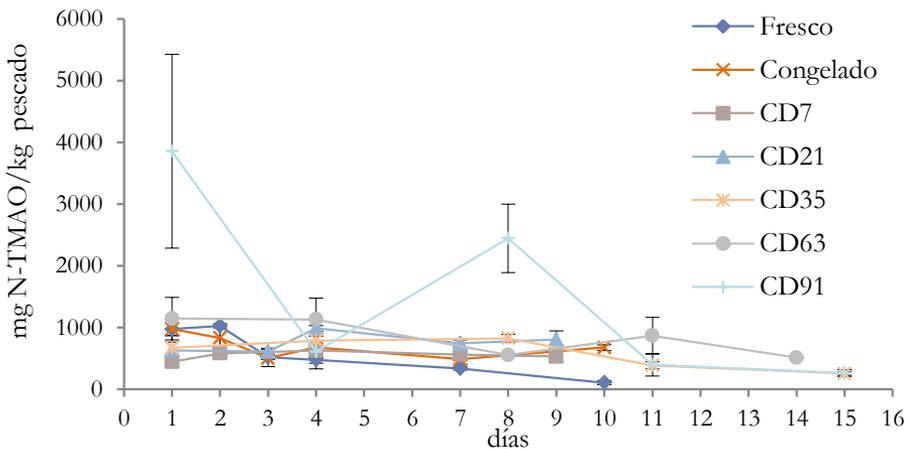


Figura 81: Evolución del óxido de trimetilamina en músculo de chicharro a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

En el caso del TMAO (Figura 80 y Figura 81), a pesar de que las concentraciones que se encuentran en el músculo son muy altas, se pueden apreciar tendencias a disminuir a lo largo del tiempo de refrigeración. Estas tendencias se ven enmascaradas en muchos casos por la gran variabilidad muestral que existe entre cada individuo, que se puede ver reflejada en los errores estándar que aparecen en las gráficas.

4.3.4.2 -Contenido en aminas volátiles y otros compuestos volátiles

Con la finalidad de determinar la presencia de otras sustancias volátiles las mismas muestras del apartado anterior fueron analizadas mediante muestreo del espacio en cabeza acoplado cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (HS-GC-MS).

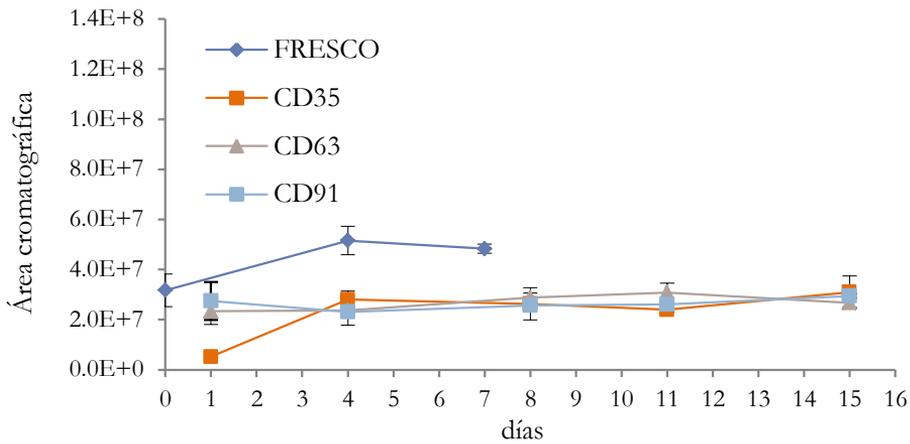


Figura 82: Evolución de la TMA en el espacio de cabeza de la merluza a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

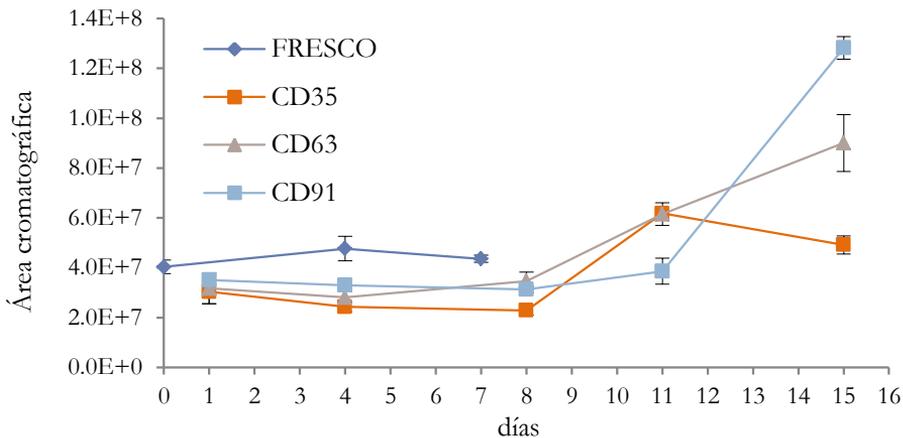


Figura 83: Evolución de la TMA en el espacio de cabeza del chicharro a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

Mediante esta técnica también se ha podido detectar la presencia de trimetilamina. En este caso la tendencia observada es la misma que se ha visto en las muestras analizadas mediante HPLC-MS. En el caso de la merluza (Figura 82), se aprecia que los valores de partida del pescado fresco y el congelado-descongelado son prácticamente los mismos y del mismo modo que ocurría en las muestras analizadas mediante HPLC-MS, estas concentraciones se mantienen estables hasta el día 14 en el caso de la merluza congelada-descongelada.

Para el chicharro (Figura 83) se aprecia una tendencia creciente para el pescado congelado-descongelado, donde a partir del día 10 se aprecian diferencias significativas.

El hecho de que coincidan las tendencias en las dos metodologías aporta robustez a los resultados y de nuevo las diferencias entre merluza y chicharro podrían ser atribuidas a las diferencias en el momento de evisceración y los distintos niveles de migración de las bacterias (Huss, 1995).

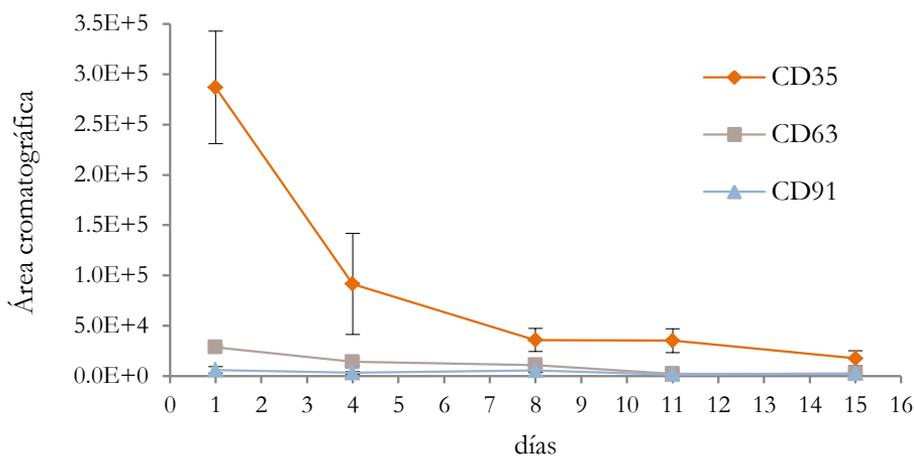


Figura 84: Evolución del octanol en muestras de merluza a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelada por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelada. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

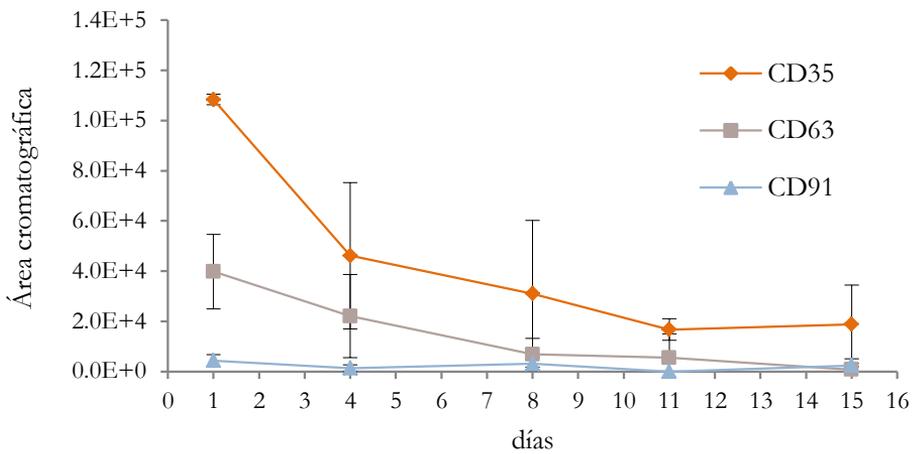


Figura 85: Evolución del octanol en muestras de chicharro a lo largo de su almacenamiento en refrigeración (4°C) tras haber permanecido congelado por distintos periodos de tiempo y haber sido descongelado. CD indica que el pescado ha sido congelado durante el número de días que prosigue y posteriormente descongelado para luego permanecer 15 días a 4°C.

De entre el resto de compuestos analizados mediante GC, tan solo se ha encontrado uno en el que se aprecia una tendencia a aumentar o disminuir. Se trata del octanol (Figura 84y Figura 85), un alcohol que experimenta una disminución a lo largo del tiempo de almacenamiento en refrigeración y en el que se pueden apreciar diferencias en función del tiempo de congelación (-18°C).

Este compuesto ha sido determinado en numerosos estudios de calidad de pescado (Duflos et al., 2010; Iglesias & Medina, 2008; Iglesias et al., 2009; Jónsdóttir et al., 2005; Selli et al., 2006) pero en ninguno de ellos se ha estudiado su tendencia a aumentar o disminuir y mucho menos se ha analizado su evolución en pescado congelado-descongelado.

#### 4.3.5 -EXPERIMENTO 5: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINAS VOLÁTILES EN MÚSCULO DE MERLUZA Y CHICHARRO ENVASADOS EN BARQUETAS PARA SU CORRELACIÓN CON EL CONTENIDO EN ATMÓSFERA

En este apartado solo se explican los resultados obtenidos con los músculos del pescado, dejando las atmósferas para el siguiente capítulo, en el que se explica todo el proceso de validación de la extracción y análisis llevados a cabo.

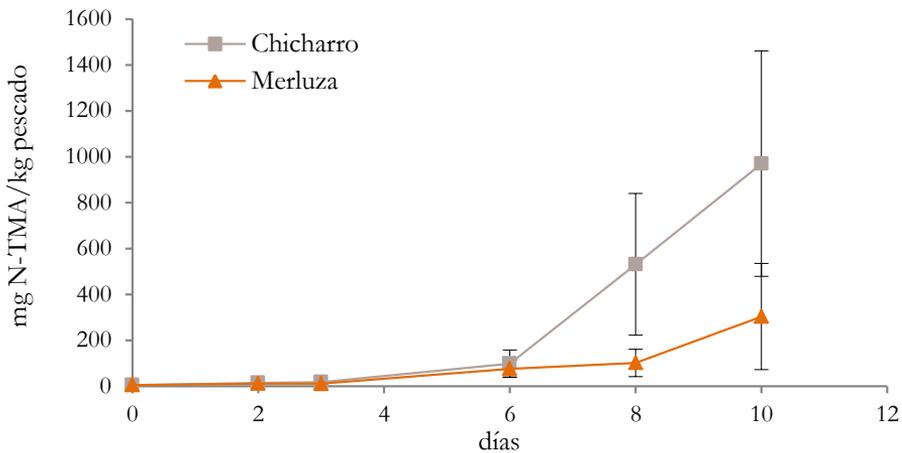


Figura 86: Evolución de la concentración de TMA en el músculo de merluza y chicharro a lo largo de 10 días de almacenamiento en barquetas con atmósfera no modificada.

En la Figura 86 se aprecia cómo la concentración de TMA tanto en chicharro como en merluza comienza a aumentar en el día 6 donde alcanzan valores muy parecidos de concentración. A partir de este punto, el chicharro aumenta a mayor rapidez que la merluza, alcanzando un valor final de 1200 mg N-TMA/kg de pescado. La merluza por contrario solo llega a los 332 mg N-TMA/kg pescado.

A pesar de que los valores en el chicharro puedan parecer demasiado altos, comparados con otros experimentos con chicharro, hay que tener en cuenta que la época del año influye mucho en el estado nutricional del animal por lo que se pueden encontrar distintas concentraciones de TMAO o distintas cargas bacterianas en función de los requerimientos energéticos que presente el animal en función de las condiciones climatológicas. La desviación estándar que presenta el chicharro en este experimento los dos días finales es muy alta por la gran variedad intermuestra existente.

Los chicharros son utilizados enteros como una muestra independiente pero en el caso de la merluza, cada individuo fue partido en 3 subunidades, cola, zona intermedia y zona próxima a la cabeza y cada una de estas partes fue utilizada como una muestra. En el día cero de experimento se repartieron de manera uniforme para evitar la presencia de dos piezas de la misma merluza en el mismo triplicado de muestras.

En experimentos preliminares llevados a cabo con merluza se comprobó que la distribución del TMA no era igual en las distintas zonas del músculo, algo que ayudó más a que las diferencias en los triplicados de merluza fueran mayores. Por este motivo en algunos casos se eliminó del triplicado el valor significativamente diferente. Este efecto también ha sido observado por otros autores en especies como *Pagellus bogaraveo* o *Lophius piscatorius* (Álvarez et al., 2009; Prego et al., 2012).

#### **4.3.6 -EXPERIMENTO 6: DETERMINACIÓN DE TMA Y ALDEHÍDOS/CETONAS EN CALDOS DE CHICHARRO INOCULADOS CON DISTINTAS CEPAS BACTERIANAS**

La selección de las cepas se llevó a cabo en base a un estudio previo (Alfaro et al., 2013b) en el que se estudió la vida útil de filetes de chicharro envasados en atmósfera modificada. El día del rechazo sensorial se caracterizaron las cepas encontradas mediante secuenciación del RNA16S y se observó que los microorganismos predominantes fueron *Carnobacterium maltaromaticum*, *Serratia proteomaculans*, *Shewanella baltica* y *Yersinia intermedia*.

En base a estos resultados se decidió realizar un estudio en el que observar por separado el efecto del metabolismo de estas bacterias. Este estudio se llevó a cabo utilizando los caldos que ya se han comentado previamente.

##### **4.3.6.1 -TMA**

###### 4.3.6.1.1 -Conversión térmica

Al analizar los resultados referentes a la trimetilamina en los caldos de pescado, se observó que en las muestras autoclavadas los valores iniciales de TMA eran superiores ( $\approx 3$  ppm) a las muestras control que no habían sido autoclavadas ( $\approx 0,5$  ppm). Esto hizo pensar en algún mecanismo de reducción del óxido de trimetilamina a trimetilamina por algún agente reductor.

Mediante una revisión bibliográfica se observó que existe un mecanismo de conversión térmica mediante el cual el óxido de trimetilamina se reduce a TMA. Este hecho tiene mucha importancia ya que las muestras sufrieron un proceso térmico al ser hervidas y posteriormente autoclavadas.

Por ese motivo se llevó a cabo un ensayo con disoluciones patrón de TMAO en el que se compararon las disoluciones autoclavadas y las disoluciones control, para comprobar si podría tener algún efecto en las muestras reales.

En los resultados se apreció que el hecho de autoclavar estas disoluciones hizo que el valor de TMA aumentase de forma significativa.

Como el pescado se encontraba completamente homogeneizado, todo el contenido celular estaba ahora presente en todo el caldo, con lo que se podría acelerar determinados procesos. Por otras referencias (Vaisey, 1956; Zhu et al., 2013, 2012) es sabido que la presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  combinado con cisteína tiene un efecto acelerador de la reducción de TMAO a TMA en extractos de pescado y es muy probable que con la homogenización se hubiesen liberado todos estos compuestos al medio. Por este motivo se llevó a cabo la adición de  $\text{FeCl}_2$  para comprobar el efecto del ion ferroso en el caldo. Esta adición tuvo un gran efecto en la conversión del TMAO a TMA tanto en caldos autoclavados como no autoclavados (Figura 87).

En cualquier caso, es evidente que el hecho de autoclavar las muestras hace aumentar la concentración de TMA en la muestra a partir del óxido de trimetilamina, efecto observado incluso sin la adición del ion ferroso.

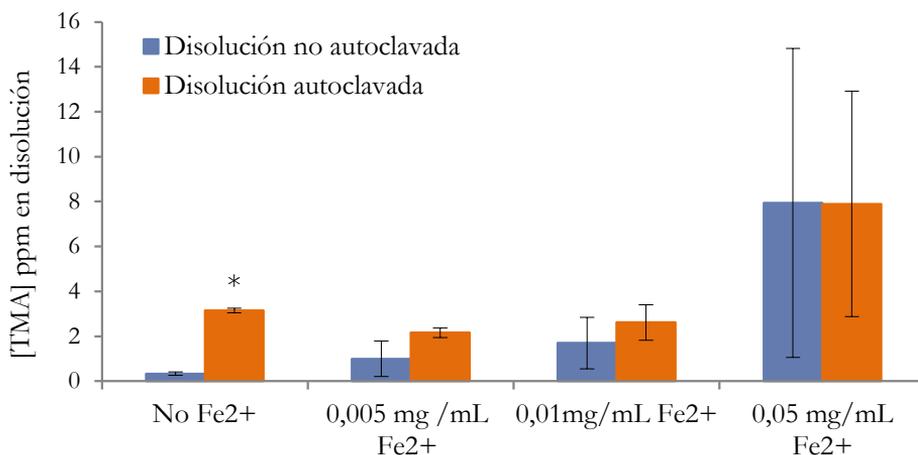


Figura 87: Reducción del TMAO a TMA en disoluciones patrón como consecuencia del procesado en autoclave, en presencia y ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$ . \*= Diferencias significativas entre la disolución autoclavada y la no autoclavada ( $p < 0,05$ ).

4.3.6.1.2 -Evolución de la TMA en los caldos

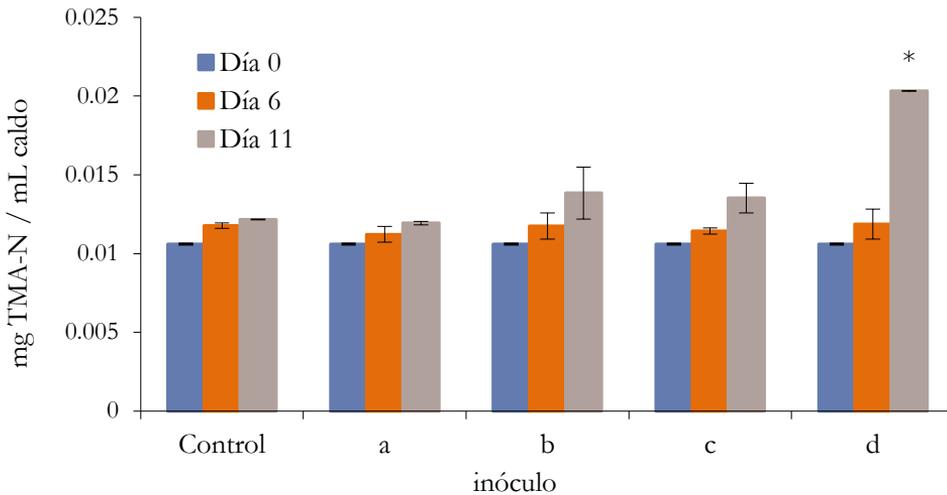


Figura 88: Evolución de la concentración de TMA en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: *Carnobacterium maltaromaticum*; b: *Serratia proteomaculans*; c: *Shewanella baltica* y d: *Yersinia intermedia*. \*= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

Como se puede apreciar en la Figura 88 en todos los inóculos existe un crecimiento de la TMA a lo largo de los 11 días de duración del experimento a excepción del inóculo A, que corresponde con *Carnobacterium maltaromaticum*. De los 3 que si han experimentado un crecimiento, el que más ha aumentado ha sido el inóculo D, *Yersinia intermedia*, seguido del B, *Serratia proteomaculans* y el C, *Shewanella baltica*.

En base a bibliografía (Dalgaard, 1995; Gram & Huss, 1996; Vogel et al., 2005) habría sido de esperar que el mayor nivel de TMA se hubiese alcanzado en el inóculo de *S. baltica* por la reconocida capacidad de este género en la reducción del TMAO, pero en su lugar ha sido *Y. intermedia*, una especie que ha sido aislada e identificada en diferentes productos pesqueros como carpas (Zamora & Enriquez, 1987), salmón (Macé et al., 2012) o trucha (Lyons et al., 2015).

## 4.3.6.2 -Evolución de los aldehídos en los caldos

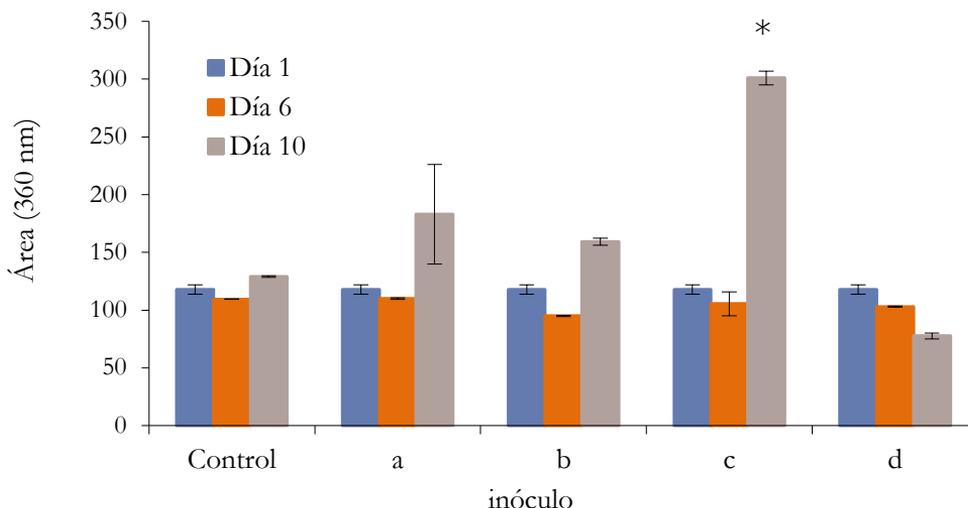


Figura 89: Evolución de la concentración de Formaldehído en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: *Carnobacterium maltaromaticum*; b: *Serratia proteomaculans*; c: *Shewanella baltica* y d: *Yersinia intermedia*. \*= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a los distintos aldehídos determinados, los inóculos que se han generado una mayor concentración dependen del aldehído detectado.

En el caso del formaldehído (Figura 89), la mayor concentración ha sido encontrada en el inóculo del *S. baltica*, seguido de *C. maltaromaticum* y *S. proteomaculans*, siendo el menor de todos el inóculo de *Y. Intermedia*, en el que se aprecia un descenso progresivo en la concentración de este compuesto, algo que podría ser explicado por la condensación del formaldehído, debido a su alta reactividad, con alguna proteína (Srinivasa et al., 2015) o por la utilización de este compuesto como sustrato en alguna reacción de su metabolismo, como puedan ser la ruta de la serina, la ribulosa monofosfato o la xilulosa monofosfato (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2015).

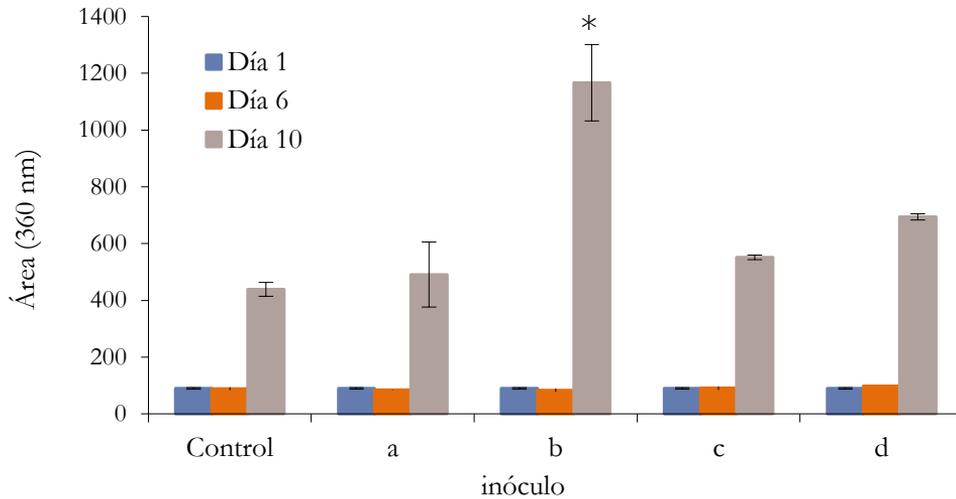


Figura 90: Evolución de la concentración de acetaldehído en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: *Carnobacterium maltaromaticum*; b: *Serratia proteamaculans*; c: *Shewanella baltica* y d: *Yersinia intermedia*. \*= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

En el caso del acetaldehído (Figura 90) ha sido *S. proteamaculans* el inóculo en que mayor concentración ha generado, seguido de *Y. Intermedia*. El resto de los inóculos han presentado concentraciones muy similares a las del control.

En estudios previos ya se observó que tanto el acetaldehído como el butanal podían ser marcadores de deterioro para el chicharro fileteado y envasado en atmósfera modificada a 10°C (Alfaro et al., 2013a). En este caso la temperatura de almacenaje ha sido de 4°C, bastante inferior a 10°C, pero hay que tener en cuenta que el presente experimento se ha llevado a cabo con caldos de pescado y no con filetes, por lo que las reacciones químicas han estado favorecidas por una mayor disponibilidad de los sustratos de las reacciones.

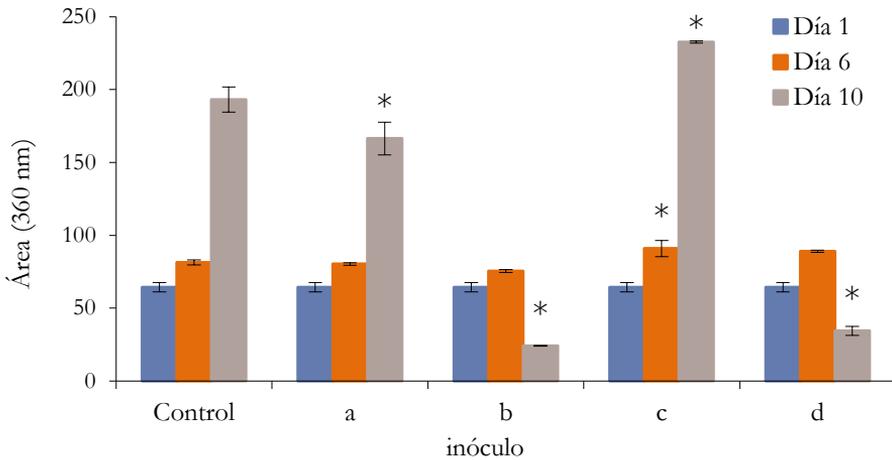


Figura 91: Evolución de la concentración de propanal en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: *Carnobacterium maltaromaticum*; b: *Serratia proteamaculans*; c: *Shewanella baltica* y d: *Yersinia intermedia*. \*= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

En el caso del propanal (Figura 91) y hexanal (Figura 92), ambos son marcadores típicos de la oxidación secundaria lipídica en alimentos. El propanal se asocia con los ácidos alfa-linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, mientras que el hexanal se asocia con los ácidos linoleico, gamma-linolénico y araquidónico (Shahidi, 2001), todos ellos presentes en los pescados azules como ya se comentó en la introducción. Es por este motivo que en ambos casos se aprecia un aumento en su concentración a lo largo del tiempo en las muestras control.

Respecto al propanal, es el inóculo de *Shewanella baltica* el que mayor concentración de este compuesto presenta. Así mismo, en los inóculos de *Serratia proteamaculans* y *Yersinia intermedia* se aprecia un descenso en el día final de experimento, algo que podría ser explicado por la interacción o condensación de este compuesto con otro presente en el caldo de pescado.

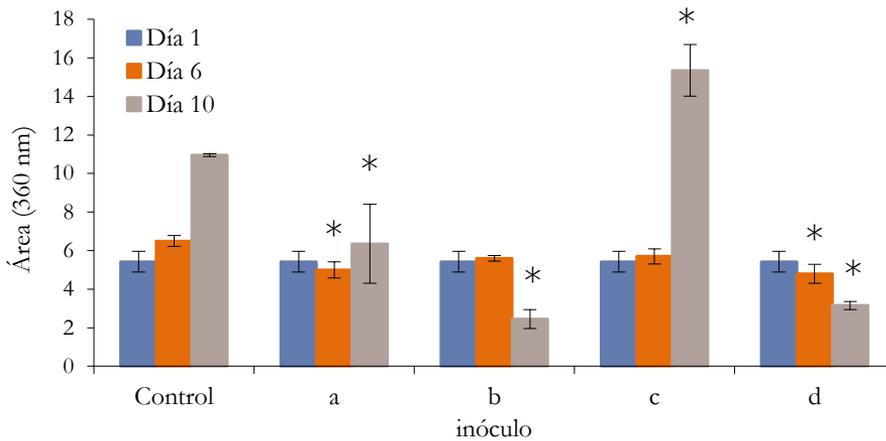


Figura 92: Evolución de la concentración de hexanal en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: *Carnobacterium maltaromaticum*; b: *Serratia proteomaculans*; c: *Shewanella baltica* y d: *Yersinia intermedia*. \*= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

En el caso del hexanal al igual que con el propanal, es *S. baltica* el inóculo que supera a la muestra control. Y de nuevo, en los inóculos de *S. proteomaculans* y *Y. intermedia* la concentración disminuye en el último día de muestreo.

Este microorganismo, *S. baltica*, ha sido identificado como productor de otros aldehídos como acetona y acetaldehído en gambas (Zhu et al., 2015) pero no se han encontrado referencias de producción de propanal o hexanal en otros productos pesqueros.

#### 4.3.6.3 -Análisis de componentes principales

Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de componentes principales para estudiar la relación entre todas las variables y los microorganismos bajo estudio. Con dos componentes principales se explicaba el 83,5% de la variabilidad existente.

La representación gráfica del análisis de componentes principales nos aporta 2 gráficas distintas, por un lado la gráfica de pesos de componentes, donde se puede apreciar la importancia de cada compuesto determinado en el estudio (Figura 93) y por otro lado el diagrama de dispersión (Figura 94) en el que se pueden apreciar las distintas cepas bacterianas posicionadas en función de las mayores concentraciones detectadas de los distintos compuestos que se han estudiado.

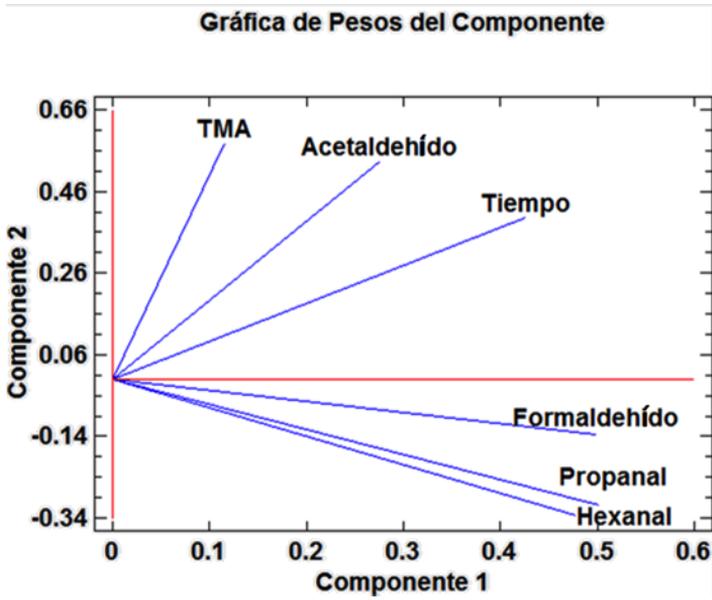


Figura 93: Gráfica de pesos de los componentes.

### Diagrama de Dispersión

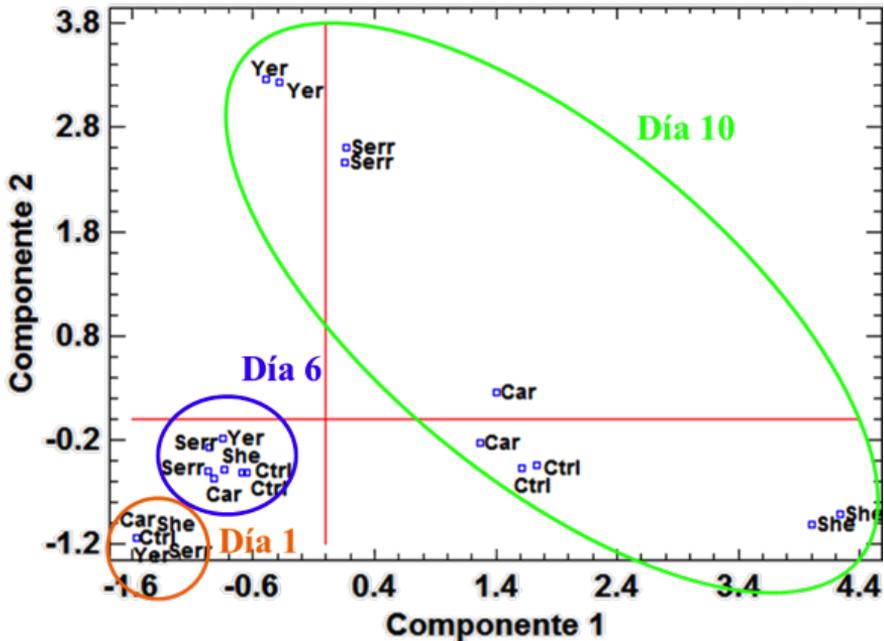


Figura 94: Diagrama de dispersión en función de las cepas bacterianas inoculadas. Ctrl: Control; Car: *Carnobacterium maltaromaticum*; Serr: *Serratia proteamaculans*; She: *Shewanella baltica* y Yer: *Yersinia intermedia*.

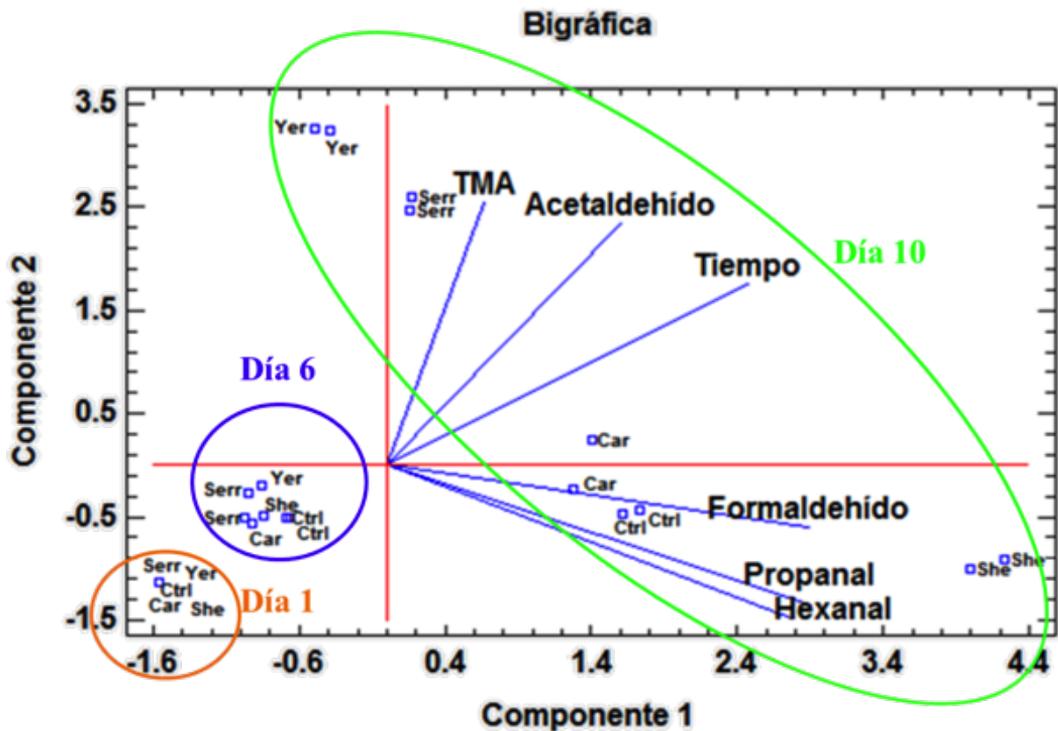


Figura 95: Bigráfica resultado de superponer la gráfica de pesos de componentes y el diagrama de dispersión. Ctrl: Control; Car: *Carnobacterium maltaromaticum*; Serr: *Serratia proteamaculans*; She: *Shewanella baltica* y Yer: *Yersinia intermedia*.

Si superponemos una figura sobre otra, obtenemos la bigráfica (Figura 95), de donde se pueden extraer distintas conclusiones. Por un lado, se aprecia cómo se pueden separar las muestras de los distintos días, algo esperable ya que los compuestos que se generan aumentan con el tiempo. De estos compuestos, la TMA y el acetaldehído son las variables que más ayudan a distinguir entre los distintos días ya que son las más cercanas a la variable tiempo.

Por otra parte se puede distinguir entre bacterias. A día 6 del experimento se distinguen ligeramente 2 grupos. Por un lado Yer y She junto con las muestras control y por otro lado Serr y Car, que se encuentran más hacia la izquierda debido a su menor contenido en formaldehído, propanal y hexanal.

A día 10, las diferencias ya son más evidentes y se aprecia como Serr y Yer por un lado se diferencian del resto por su mayor producción de TMA y acetaldehído mientras que el resto de bacterias se encuentran muy alejadas. She se caracteriza por su alto contenido en formaldehído.

Las muestras control se caracterizan por un alto contenido en formaldehído, propanal y hexanal, seguidos muy de cerca por Car.

Se podría concluir por tanto que en las condiciones que se ha llevado a cabo el estudio, el acetaldehído y la TMA serían los dos compuestos más interesantes, por su relación directa con el tiempo y nos permite así mismo concluir, que en estas condiciones las bacterias Yer y Serr son las que más peso tienen dentro de los microorganismos de deterioro específico.

Este compuesto, el acetaldehído, ya había sido identificado por su potencial como marcador en filetes de chicharro envasados en atmósfera modificada (Alfaro et al., 2013a). En este caso, solo se apreció el aumento de este compuesto a 10°C, apareciendo junto al butanal. Es evidente que una temperatura tan elevada hizo acelerar el metabolismo de la flora presente en los filetes, algo que no ocurrió a 2°C y 4°C.

En nuestro caso, a pesar de trabajar a 4°C el hecho de que la muestra se encontrase en estado de caldo hizo que los sustratos para las reacciones metabólicas de las bacterias estuviesen mucho más accesibles, acelerando también la aparición del compuesto.

#### **4.3.7 -EXPERIMENTO 7: DETERMINACIÓN DE AMINAS VOLÁTILES EN CARNE DE POLLO VACUNO Y CERDO**

Según el Reglamento 56/2013 de la Unión Europea (Comisión Europea, 2013) y el Real Decreto 578/2014 (Ministerio de la Presidencia de España, 2014) que regula su uso en España no está permitida la utilización de harinas de pescado en piensos para rumiantes (vacuno y ovino) salvo excepciones puntuales, como es en los lactoreemplazantes. No ocurre lo mismo con la alimentación del ganado porcino y avícola, donde si está permitida la utilización de este tipo de subproductos pesqueros.

En base a este hecho se tomó la decisión de analizar la carne de cerdo y pollo en busca de alguna amina volátil de las que típicamente se encuentran en el pescado.

También se utilizó carne de vacuno, que a pesar de la prohibición de la utilización de harinas de pescado, presenta otros compuestos que pueden ser utilizados por el metabolismo bacteriano dando como resultado TMA (Craciun & Balskus, 2012) como por ejemplo la colina, también presente en las carnes de pollo y cerdo (Howe et al., 2004).

En ninguno de los casos se ha encontrado presencia de estos compuestos (TMA, DMA o MA) por lo que ninguno de estos compuestos serían útiles para determinar el estado de calidad en este tipo de matrices alimentarias.

A pesar de esto si se ha encontrado un compuesto desconocido en la carne de vacuno (Figura 96) con el ion molecular ( $m/z$ : 274), el mismo que el compuesto formado al reaccionar la DMA con el BATB. Al fraccionar este compuesto se observa el  $m/z$ : 218 el mismo que el ion utilizado para monitorizar la DMA, pero en este caso no aparece el ion cualificador ( $m/z$ : 162). Este compuesto eluye más tarde que la dimetilamina y las áreas observadas son considerablemente mayores que las de la DMA. En cualquier caso, es un compuesto que no ha aumentado ni disminuido con el tiempo de conservación de la carne, por lo que tampoco se consideró interesante profundizar en su identificación.

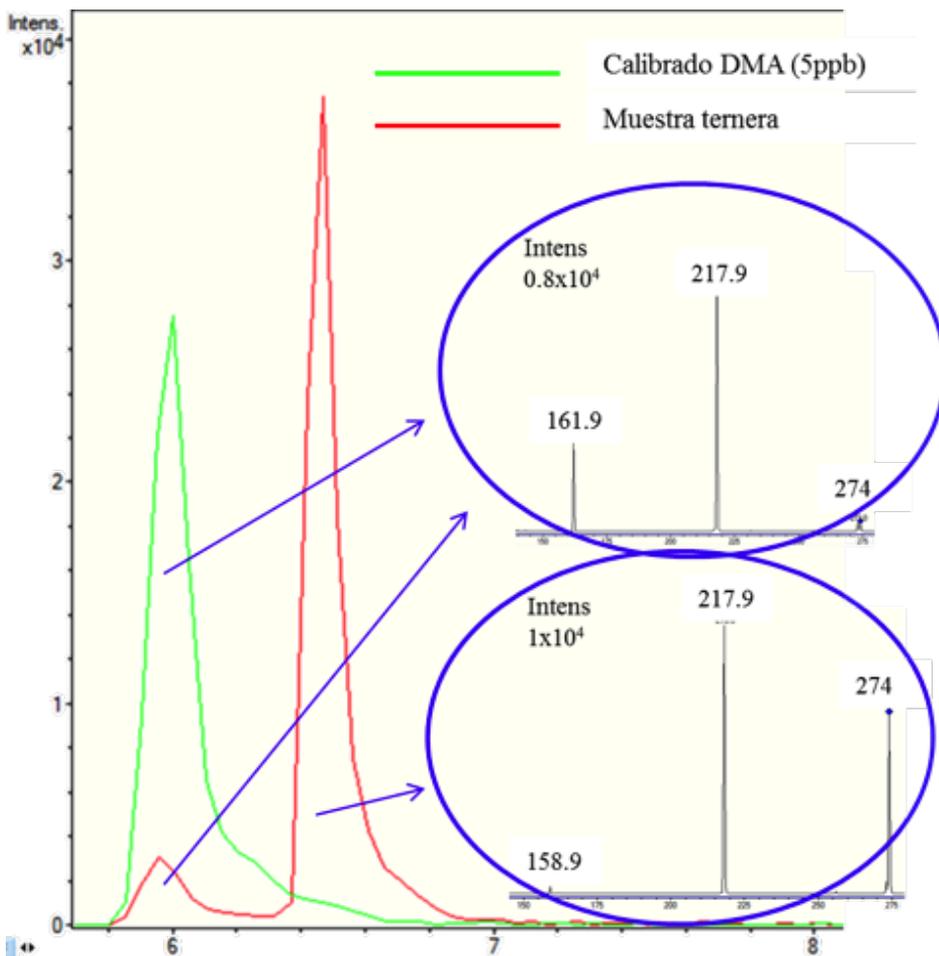


Figura 96: Cromatograma de una muestra de carne de ternera y un calibrado de DMA con sus espectros correspondientes.

## 4.4 -Conclusiones

Con la utilización del bromoacetato de tertbutilo se ha conseguido determinar la concentración de las aminas volátiles objeto de estudio en pescados marinos así como en pescado de agua dulce, pescados con concentraciones mucho más bajas de TMAO. Esta metodología ha sido utilizada en distintas condiciones de almacenamiento (refrigeración y congelación) pudiendo determinar los distintos perfiles de aminas volátiles.

Con este método se ha conseguido utilizar la TMA como indicador de calidad en pescados de agua dulce como es la trucha, algo que con otras metodologías menos sensibles no había sido posible.

Asimismo, se ha confirmado el efecto que los procesos de congelación- descongelación tienen en las concentraciones de compuestos como la TMA, datos que se correlacionarán con las concentraciones en las atmósferas que se presentan en el siguiente capítulo. Asociado a estos procesos también se han detectado otros compuestos que deberían ser analizados con más profundidad como el octanol para poder determinar su origen y explicar su disminución a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Por último, con el experimento de los caldos de chicharro se ha conseguido determinar qué compuestos son los más interesantes a la hora de estudiar la vida útil del chicharro en condiciones de refrigeración y sin la utilización de atmósfera modificada, en base a su tiempo de almacenamiento. Asimismo, gracias a la utilización de cultivos bacterianos aislados se ha conseguido identificar cuáles son los máximos responsables de la producción de compuestos como la TMA o el acetaldehído, *Serratia proteamaculans* y *Yersinia intermedia* respectivamente.

## 4.5 -Bibliografía

- Alfaro, B., Hernández, I., Baliño-Zuazo, L., Barranco, A., 2013a. Quality changes of Atlantic horse mackerel fillets (*Trachurus trachurus*) packed in a modified atmosphere at different storage temperatures. *J. Sci. Food Agric.* 93, 2179–87.
- Alfaro, B., Hernández, I., Le Marc, Y., Pin, C., 2013b. Modelling the effect of the temperature and carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria in packed fish products. *Food Control* 29, 429–437.
- Álvarez, V., Medina, I., Prego, R., Aubourg, S.P., 2009. Lipid and mineral distribution in different zones of farmed and wild blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 957–966.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2007. Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 287–293.
- Borderías, A.J., Sánchez-Alonso, I., 2011. First processing steps and the quality of wild and farmed fish. *J. Food Sci.* 76, R1–5.
- Comisión Europea, 2013. Reglamento UE N°56/2013 que modifica los anexos I y IV del Reglamento CE N°99/2001 por el que se establecen las disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiiformes transmisibles. *Diario Oficial de la Unión Europea.* L 21, 3–16.
- Craciun, S., Balskus, E.P., 2012. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glyceryl radical enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 21307–12.
- Dalgaard, P., 1995. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 319–333.
- Duflos, G., Leduc, F., N'Guessan, A., Krzewinski, F., Kol, O., Malle, P., 2010. Freshness characterisation of whiting (*Merlangius merlangus*) using an SPME/GC/MS method and a statistical multivariate approach. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2568–75.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 262–266.
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 121–137.
- Howe, J.C., Williams, J.R., Holden, J.M., 2004. USDA Database for the Choline and Betaine content of common foods. *US Dep. Agric.*
- Huss, H.H., 1995. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. *FAO Documento Técnico de Pesca* 348.
- Iglesias, J., Medina, I., 2008. Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *J. Chromatogr. A* 1192, 9–16.
- Iglesias, J., Medina, I., Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., 2009. Study of the volatile compounds useful for the characterisation of fresh and frozen-thawed cultured gilthead sea

- breem fish by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 115, 1473–1478.
- Jónsdóttir, R., Bragadóttir, M., Arnarson, G., 2005. Oxidatively Derived Volatile Compounds in Microencapsulated Fish Oil Monitored by Solid-phase Microextraction (SPME). *J. Food Sci.* 70, c433–c440.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2015. KEGG. Microbial metabolism in diverse environments [WWW Document]. KEGG Pathways.
- Lyons, P.P., Turnbull, J.F., Dawson, K.A., Crumlish, M., 2015. Exploring the microbial diversity of the distal intestinal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). *Aquac. Res.* 1–15.
- Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Dousset, X., Joffraud, J.-J., 2012. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE. *Food Microbiol.* 30, 164–172.
- Magnusson, H., Martinsdóttir, E., 1995. Storage quality of fresh and frozen-thawed fish in ice. *J. Food Sci.* 60, 273–278.
- Marrakchi, A. El, Bennour, M., Bouchriti, N., Hamama, A., Tagafait, A., 1990. Sensory, chemical, and microbiological assessments of moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J. Food Prot.* 53, 600–605.
- Martinsdóttir, E., Magnusson, H., 2001. Keeping Quality of Sea-Frozen Thawed Cod Fillets on Ice. *J. Food Sci.* 66, 1402–1408.
- Ministerio de la Presidencia de España, 2014. Real Decreto 578/2014 por el que se dictan disposiciones para la aplicación en España de la normativa de la Unión Europea relativa a la alimentación de animales de producción con determinados piensos de origen animal. *Boletín Of. del Estado* 165, 53130–53138.
- Prego, R., Pazos, M., Medina, I., Aubourg, S.P., 2012. Comparative chemical composition of different muscle zones in angler (*Lophius piscatorius*). *J. Food Compos. Anal.* 28, 81–87.
- Rey-Mansilla, M. del M., Sotelo, C.G., Aubourg, S.P., Rehbein, H., Havemeister, W., Jorgensen, B., Nielsen, M.K., 2001. Localization of formaldehyde production during frozen storage of european hake (*Merluccius merluccius*). *Eur. food Res. Technol.* 213, 43–47.
- Rey-Mansilla, M. del M., Sotelo, C.G., Perez-Martin, R.I., 2002. TMAOase Activity of European Hake (*Merluccius merluccius*) Organs: Influence of Biological Condition and Season. *J. Food Sci.* 67, 3242–3251.
- Rodríguez, C.J., Besteiro, I., Pascual, C., 1999. Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled. *J. Sci. Food Agric.* 79, 1473–1480.
- Rodríguez, Ó., Barrios-Velázquez, J., Ojea, A., Piñeiro, C., Aubourg, S.P., 2003. Evaluation of Sensory and Microbiological Changes and Identification of Proteolytic Bacteria during the Iced Storage of Farmed Turbot (*Psetta maxima*). *J. Food Sci.* 68, 2764–2771.

- Selli, S., Rannou, C., Prost, C., Robin, J., Serot, T., 2006. Characterization of Aroma-Active Compounds in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Eliciting an Off-Odor. J. Agric. Food Chem. 54, 9496–9502.
- Shahidi, F., 2001. Headspace Volatile Aldehydes as Indicators of Lipid Oxidation in Foods, in: Rouseff, R., Cadwallader, K. (Eds.), Headspace Analysis of Foods and Flavors SE - 9, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, pp. 113–123.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., Rosnes, J.T., 2002. Review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. Int. J. Food Sci. Technol. 37, 107–127.
- Sotelo, C.G., Rehbein, H., 2000. TMAO degrading enzymes, in: Haard, N.F., Simpson, B.K. (Eds.), Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. pp. 167–190.
- Srinivasa, S., Ding, X., Kast, J., 2015. Formaldehyde cross-linking and structural proteomics: Bridging the gap. Methods 89, 91–98.
- Vaisey, E.B., 1956. The non-enzymic reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine, dimethylamine and formaldehyde. Can. J. Biochem. Physiol. 34, 1085–1090.
- Vogel, B.F., Venkateswaran, K., Satomi, M., Gram, L., 2005. Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H<sub>2</sub>S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6689–6697.
- Zamora, J., Enriquez, R., 1987. *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia frederiksenii* and *Yersinia intermedia* in *Cyprinus carpio* (Linneo 1758). J. Vet. Med. Ser. B 34, 155–159.
- Zhu, J., Jia, J., Li, X., Dong, L., Li, J., 2013. ESR studies on the thermal decomposition of trimethylamine oxide to formaldehyde and dimethylamine in jumbo squid (*Dosidicus gigas*) extract. Food Chem. 141, 3881–8.
- Zhu, J., Li, J., Jia, J., 2012. Effects of thermal processing and various chemical substances on formaldehyde and dimethylamine formation in squid *Dosidicus gigas*. J. Sci. Food Agric. 92, 2436–42.
- Zhu, S., Wu, H., Zeng, M., Zunying, L., Zhao, Y., Dong, S., 2015. Regulation of Spoilage-Related Activities of *S.ewanella putrefaciens* and *S.ewanella baltica* by an Autoinducer-2 Analogue, (Z)-5-(Bromomethylene)furan-2 (5H)-One. J. Food Process. Preserv. 39, 719–728.

Parte de los resultados obtenidos en este capítulo (apartado 4.3.3) y en el capítulo 5 (apartado 5.3.1), en concreto los referidos al contenido en TMA y aldehídos volátiles en dorada, dorada fileteada y chicharro envasados en atmósfera modificada quedaron recogidos en un artículo científico que se adjunta a continuación.

*Quality changes of Atlantic horse mackerel fillets (Trachurus trachurus) packed in a modified atmosphere at different storage temperatures.*

Begoña Alfaro, Igor Hernandez, Lander Baliño-Zuazo y Alejandro Barranco. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93 (2013): 2179-2187.

## Publicación 2: Quality changes of Atlantic horse mackerel fillets (*Trachurus trachurus*) packed in a modified atmosphere at different storage temperatures

### Quality changes of Atlantic horse mackerel fillets (*Trachurus trachurus*) packed in modified atmosphere at different storage temperatures

Begoña Alfaro\*, Igor Hernández, Lander Baliño-Zuazo, Alejandro Barranco

Food Research Division, AZTI-Tecnalia, Parque Tecnológico de Bizkaia. Astondo Bidea, Edif. 609, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

\*Corresponding to: Begoña Alfaro, Food Research Division, AZTI-Tecnalia, Parque Tecnológico de Bizkaia. Astondo Bidea, Edif. 609, 48160 Derio, Bizkaia, Spain. E- mail address: [balfaro@azti.es](mailto:balfaro@azti.es)

#### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) is an important commercial fish in Europe. Changes in the microbial growth, sensory quality and chemical evolution of modified atmosphere packed (MAP) horse mackerel fillets (48% CO<sub>2</sub>/50% N<sub>2</sub>/2% O<sub>2</sub>) were monitored at different storage temperatures (2, 4, 6 and 10°C).

**RESULTS:** The observed sensory shelf life of MAP fish fillets was found to be approximately 7 days at 2°C, 6 days at 4°C, 5 at 6°C and 3 days at 10°C. A significant correlation was observed between all sensory attributes and two groups of bacteria (total viable count and psychrotrophic bacteria), with sensorial rejection when the bacteria approached 10<sup>6</sup> cfu g<sup>-1</sup> at 4, 6 and 10°C. A level of 30-50 mg TVB-N/100 g of mackerel muscle was well correlated with sensory shelf life determination at all temperatures, except for 2°C. During the storage time, lipid oxidation did not increase at any temperature and could not be related to quality decay. The presence of acetaldehyde and butyraldehyde in the packing atmosphere was only found in fillets stored at the highest temperature studied (10°C).

**CONCLUSION:** In this study, key quality parameters were established to monitor the spoilage and shelf life of MAP *Trachurus trachurus* stored at different temperatures. In addition, these results confirm the use of MA packaging as a mild preservation method for fillets of Atlantic horse mackerel.

**KEYWORDS:** *Trachurus trachurus*, MAP, quality changes, storage temperatures, shelf life

#### INTRODUCTION

The global post-harvest loss of fish is estimated to account for at least 10% of captured and cultured fish, where microorganisms are important contributors to quality reduction.<sup>1</sup> *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) is an edible fish that belongs to the family *Carangidae*. This species, typically known as Atlantic horse mackerel, can be found in the north-eastern Atlantic, from Iceland to Senegal.<sup>2</sup> It is an important commercial fish that is consumed smoked, fried, salted and baked.

In the global marketplace increasing consumer demand has resulted in longer transport and logistic chains with handling, intermediate points, as well as air and road transportation having an adverse effect on fish quality. It has created a demand for technologies that can be implemented to extend the shelf life of products while maintaining high quality. To this end, numerous studies have been conducted on the effect of MAP in combination with chilled storage on fish and fish products,<sup>3-6</sup> which conclude that the shelf life of fish in a CO<sub>2</sub> atmosphere can be extended by a factor of 1.5 to 2.0.<sup>7</sup>

Fish product shelf life under a modified atmosphere (MA) depends on many factors, for example species, fat content, initial microbial population,

the ratio of gas volume to product volume, but the most relevant is storage temperature.<sup>7</sup> Without the proper control of storage temperature, the benefits of MAP may be lost. Seafood spoilage during storage has been considered a consequence of bacterial activity and biochemical reactions.<sup>8</sup> It is well known that a certain number of organisms show a higher potential for degrading fish products than others. These organisms are called Specific Spoilage Organisms (SSO), and their identification is important for shelf life determination studies. For example, *Pseudomonas* and *Shewanella* have been reported to be the SSO in fish stored under aerobic conditions,<sup>9,10</sup> and *Photobacterium phosphoreum* has been described as SSO in MAP cod fillets.<sup>11</sup>

Spoilage products such as ammonia, biogenic amines, organic acids and sulphur compounds are produced due to bacterial metabolism, particularly SSO of consequence metabolism, generating off flavours and off odours in different seafood.<sup>12</sup> These metabolites in conjunction with sensory and microbiological assessment can be used to monitor shelf-life of different seafood. For example, Alasavar *et al.*<sup>13</sup> reported that nucleotide catabolism is a freshness indicator in sea bream and Baixas *et al.*<sup>14</sup> found that the evolution of trimethylamine (TMA) and total volatile basic nitrogen (TVB-N) are good parameters for shelf life determination in Mediterranean hake.

Sensorial analysis plays a key role in fish shelf life determination based on quality and freshness evaluation. Changes in the sensory characteristics related to the appearance, odour, taste and texture of fresh fish are mainly due to the activity of SSO.<sup>15</sup> Studies on fish products have reported the relationship between sensory rejection and the levels of specific microorganisms, considering sensory rejection at levels close to  $10^6$ - $10^8$  cfu g<sup>-1</sup> for total bacterial count<sup>16</sup>,  $10^6$ - $10^8$  cfu g<sup>-1</sup> for *Pseudomonas*<sup>17</sup> and  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup> for *Shewanella putrefaciens*.<sup>18</sup>

Losada *et al.*<sup>19</sup> reported that the shelf life of horse mackerel during iced storage was 14 days for whole fish and 12 days for fillets. Although some information regarding the quality assessment of horse mackerel stored in ice is available,<sup>20</sup> there is no scientific reference on quality parameters during MA storage. The aim of this study was to evaluate the effect of storage temperature on the quality and shelf life of MAP Atlantic horse mackerel fillets using sensory, physicochemical and microbiological assessments.

## MATERIALS AND METHODS

### Storage experiments

Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) were captured in the Atlantic Ocean (June-July), placed in boxes ice and stored on board for 1 day before arrived to a local fish-processing plant. Fish samples were gutted, filleted and delivered to the laboratory within 48 h of harvesting, packed in boxes containing ice. Fish samples with a mean weight of  $400 \pm 20$  g were packaged on trays (LinPack™, RJ Sales, Dublin, Ireland); the gas ratio was 48% CO<sub>2</sub>, 50% N<sub>2</sub> and 2% O<sub>2</sub> (values obtained with PBI Dansensor Checkmate 9900, Ringsted-Denmark). The final gas/samples ratio in all of the trays was approximately 2:1 (v/w). The samples were stored at different temperatures (2, 4, 6 or 10°C) in temperature-controlled chambers (IBERCEX, Spain). The temperature was monitored at different locations inside the chambers by a temperature sensor connected to temperature programming and recording software (Multisystem, OMRON, Japan). The deviation from the target temperature was  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ .

Fish samples were submitted to microbiological, chemical analyses and sensory evaluation at regular intervals (7-8 sampling times). Two batches of fish samples were used, one for sensorial method development (fish captured in June) and one for sensorial, microbial control and chemical analysis (fish captured in July). Those two batches had a similar geographical origin (FAO 27, North Atlantic), MAP environment and manipulation process.

### Microbiological analyses

At each sampling time, 10 g of skinless fish flesh was aseptically transferred to stomacher bags with 90 mL of peptone water with NaCl (0.5% w/v) and homogenised for 1 min in a Stomacher (Seward Stomacher Lab-Blender 400, Seward Medical, London, UK). Appropriate decimal dilutions from the homogenised fish flesh were prepared and plated to enumerate the following microorganisms: (i) Total viable bacteria (TVC) were enumerated in plate count agar (PCA, Pronadisa, Spain). Plates were incubated for 3 days at 30°C. (ii) The psychrotrophic bacteria count was determined using Plate Count Agar (PCA, Pronadi-

sa, Spain). Plates were incubated at 7°C for 10 days. (iii) *Pseudomonas* spp. were enumerated using Pseudomonas agar base (Oxoid CM559, supplemented with SR 103, Oxoid, Basingstoke, UK). Plates were incubated anaerobically for 2 days at 20°C. (iv) *Enterobacteriaceae* were enumerated in violet red bile glucose agar (VRBGA, Pronadisa, Spain) incubated aerobically at 37°C for 1 day. Two samples were analysed every 24 hours during 11 days for microbial control analysis. At least two appropriate dilutions were enumerated in duplicate. All plates were visually examined for typical colony types and morphological characteristics associated with each growth media. Microbiological data were expressed as the logarithms of the number of colony-forming units per gram of fish (log cfu g<sup>-1</sup>).

### Sensory evaluation

Sensory analysis was performed by 6-8 previously trained panellists from the staff at the Food Research Division, AZTI-Tecnalia to evaluate the freshness of the fillets. The panellists undertook 5 training sessions lasting 1 h each using a pre-defined glossary of attributes and 3 review sessions before the start of the experiment. Raw fish samples stored at different temperatures were evaluated as described by ISO standard 4121:1987<sup>21</sup> using a 5-point descriptive scale, where 1 is absolutely fresh, 3 is the rejection limit and 5 is completely spoiled. The descriptors scheme is detailed in Table 1. The following attributes of MAP mackerel fillets were assessed: odour of the muscle, skin colour, appearance, and muscle firmness. Fish products were defined as unacceptable when the score of any sensory attribute was equal or over 3.

### pH

The pH of fresh fish (10 g of filleted muscle in deionised water) was determined in duplicate using a pH-meter (Crison micro pH 2002, Barcelona-Spain).

### Total volatile basic nitrogen (TVB-N)

Total volatile basic nitrogen (TVB-N) content was determined according to the EU reference procedure<sup>22</sup>. Briefly, a deproteinised extract was distilled with perchloric acid, and volatile bases were absorbed by a boric acid solution and titrated with 0.01 N hydrochloric acid solution. The TVB-N value was expressed as mg N/100 g sample.

### Trimethylamine nitrogen (N-TMA)

The TMA amount in the fish muscle samples was determined using the official AOAC method.<sup>23</sup> TMA from a deproteinised sample was extracted with toluene and after reacting with picric acid and colour development was measured at 410 nm in a spectrophotometer (Genesys 6, Thermo Electron Company, Waltham-MA). The N-TMA value was expressed as mg N/kg of fish.

### Thiobarbituric acid (TBA)

The TBA content was measured following the method described by Vyncke<sup>24</sup> with some slight changes. A deproteinised sample was mixed with a 2-TBA solution (0.02 M), and absorbance at 535 nm was measured after 25 min of reaction in a boiling-water bath. TBA values were expressed as mg of malondialdehyde/kg of fish.

**Table 1.** Sensorial characterisation scale developed for Atlantic horse mackerel sensorial analysis.

Points	Odour	Skin colour	Flesh colour	Texture
1	Fresh fish odour, marine seaweed	Very iridescent skin, clear and bright	Translucent, bright, muscular packs in full, red central line	Very firm
2	Slightly fresh fish odour	Iridescent and bright skin	Slightly translucent and bright, muscular packs in full	Firm
3	Neutral odour, little odour	Slightly iridescent, bright metallic, colours slightly diffuse	Steel-like colour, dull	Slightly firm
4	Spoiled fish odour	Bright metallic, diffuse, weak yellow mucus	Steel-like colour, dull, with yellow points along the muscle	Soft
5	Putrid, faecal, ammoniac odour	Dark colours, very diffuse, clear yellow mucus	Very dull, mate, brownish	Very soft

**Gas Composition**

The CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations in the headspace of the fish trays were determined in duplicate at each sampling time using a PBI Dansensor Checkmate 9900 gas analyser (Ringsted, Denmark).

**Determination of carbonyl compounds**

Aldehydes and ketones were quantified after pre-concentration onto 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)-coated C18 cartridges (Agilent, Santa Clara, CA, USA) following high performance liquid chromatography (HPLC). In this determination, 120 mL of the headspace of the fish tray were passed through a C18 DNPH-coated cartridge to retain carbonyls. One mL of acetonitrile was added to elute all compounds, and the final extract was subjected to chromatographic analysis on an Agilent 1100 Series liquid chromatograph equipped with a degasser, a binary pump, an autosampler, a column oven and a diode array detector. Carbonyls were separated on a Luna C18 from Phenomenex (Torrance, CA, USA) with a guard column filled with the same stationary phase following a gradient elution with MilliQ water (A) and acetonitrile (B); this involved first an isocratic step from 0 to 2 min with 40% B and then, from 2 to 30 min, a linear gradient from 40% B to 75% B. Finally, 100% of B was passed for 5 minutes before conditioning the system with initial conditions. Carbonyl compounds were monitored at 360 nm.

**Modelling bacterial kinetics**

The model of Baranyi *et al.*<sup>25</sup> was fitted to the growth curves obtained at 2, 4, 6 and 10°C. The dependence of the maximum specific growth rate, μ<sub>max</sub>, of the total bacteria on the temperature was modelled with the Arrhenius model described by Taoukis *et al.*<sup>17</sup>

$$\mu_{\max}(T) = \mu_{\text{ref}} \exp \left[ \frac{-E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{ref}}} \right) \right]$$

where *T* is the absolute temperature (Kelvin = °Centigrade + 273), μ<sub>ref</sub> is the maximum specific growth rate (h<sup>-1</sup>) at the reference temperature *T*<sub>ref</sub>, *E*<sub>a</sub> is the activation energy (kJ mol<sup>-1</sup>) and *R* is the universal gas constant (=8.314 J mol<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup>). The Arrhenius model assumes a linear relationship between the logarithm of the rates and the inverse of the absolute temperature.

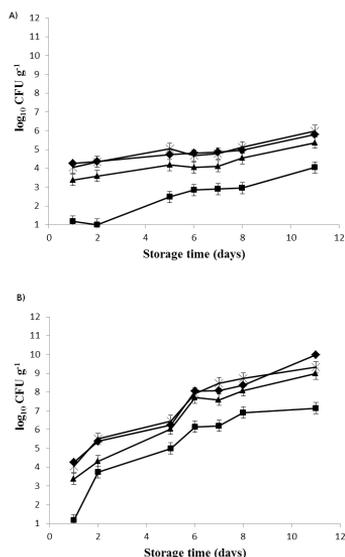
**Statistical analysis**

The significant effects of temperature and storage time on the quality of MAP mackerel, as measured by the chemical, microbiological and sensory evaluations, were determined by analysis of variance (ANOVA) using the SPSS V14.0 software program for statistical analysis (SPSS Inc., Chicago, Illinois). The least significant difference (LSD) procedure was used to test for differences between means, and Pearson correlation coefficients were used to compare the microbiological results and sensory attributes. A confidence interval at the 95% level (p≤0.05) was considered.

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Microbial quality**

Changes in the microbial flora of Atlantic horse mackerel during storage under MA conditions at 2 and 10°C are presented in Figure 1. The initial counts of the natural microflora of mackerel fillets packaged were about 4.2 log cfu g<sup>-1</sup> for TVC. It has been reported in previous studies<sup>11, 26, 27</sup> that the initial bacterial concentration is usually higher than 3.0 log cfu g<sup>-1</sup> and even greater than 5.0 log cfu g<sup>-1</sup> in fish obtained from retail establishments.<sup>17</sup> After 11 days, the TVC values were above 9.9 log cfu g<sup>-1</sup> in fish fillets stored at 10°C, above 7.9 at 6°C, above 7.0 at 4°C and close to 6.0 log cfu g<sup>-1</sup> at 2°C. Similar profiles were obtained for psychrotrophic bacteria. The growth rates of TVC and psychrotrophic bacteria are presented in Table 2. There are no statistically significant differences between total viable counts and psychrotrophic bacteria growth rate at any studied temperature (p>0.05). The total counts in MAP horse mackerel fillets at 2°C after 11 days were similar to those reported after 10 days for total aerobic bacteria and for *Pseudomonas spp.* in Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) stored on ice.<sup>20</sup> Delays in bacterial growth in fish fillets packaged under a MA have been reported in previous studies on raw whiting, mackerel, salmon<sup>6</sup> and Mediterranean fish.<sup>28</sup> The initial *Enterobacteriaceae* count was significantly lower in MAP samples than in other bacteria, around 1.1 log cfu g<sup>-1</sup> (Figure 1). At 2°C and 4°C, the *Enterobacteriaceae* count was below 3 log cfu g<sup>-1</sup> in fillets packaged under 50% CO<sub>2</sub> on day 8. Some other studies have also shown that concentrations of 40% CO<sub>2</sub> inhibited *Enterobacteriaceae* family species in rainbow trout<sup>29</sup>, in hake steaks<sup>30</sup> and in sole fillets<sup>31</sup> at



**Figure 1.** Concentration ( $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) of total viable bacteria ( $\blacklozenge$ ), *Pseudomonas* agar ( $\blacktriangle$ ), *Enterobacteriaceae* ( $\blacksquare$ ) and psychrotrophic bacteria ( $\times$ ) in modified atmosphere packaged horse mackerel fillets stored at (a) 2°C and (b) 10°C.

2°C. Over the temperature interval used in this study (2–10°C), we found a relationship close to linear for the empirical use of the Arrhenius model and the estimation of the apparent activation energy. The obtained apparent activation energies were between 19.6 and 25.5  $\text{kcal mol}^{-1}$  (Table 3), which agree with the results of Olley *et al.*<sup>32</sup>, who reported an apparent activation energy of 19.9  $\text{kcal mol}^{-1}$  as an indicator of bacterial spoilage in fish between 0 and 10°C. The apparent activation energy obtained for *Pseudomonas* was lower than the energies reported during air storage for turbot<sup>33</sup> and for gilt-head seabream,<sup>34</sup> indicating the high influence of the MA in these populations.

### Sensory results

The results from the sensory evaluation of Atlantic horse mackerel fillets under a MA are presented in Table 4. As expected, the sensory attributes were significantly reduced with storage time ( $p \leq 0.05$ ) at all studied temperatures.

The end of shelf life was assumed when any sensory attribute received a score equal or over 3. In this study, the most sensitive sensory attributes for the evaluation of mackerel freshness were odour (2, 6 and 10°C) and flesh colour (4°C). The sensory shelf life based on the sensorial parameters of mackerel fillets under MA was found to be approximately 7 days at 2°C, 6 days at 4°C, 5 days at 6°C, and 3 days at 10°C (Table 4). The shelf life of horse mackerel at 2–4°C (7–6 days) was similar or even longer than the sensory shelf life reported for this medium-fat fish species in flake ice (5 days)<sup>35</sup>. In addition, the shelf life at 2–4°C was close to the 6.5 days reported by Church *et al.*<sup>36</sup> for a similar species, *Scomber scombrus*, stored at

0°C in a MA (60%  $\text{CO}_2$ /40%  $\text{N}_2$ ) and longer than that reported by Fagan *et al.*<sup>6</sup> for *Scomber scombrus* stored in a MA (40%  $\text{CO}_2$ /60%  $\text{N}_2$ ) at 2–4°C (5 days). The MA conditions selected in this work offer an extension of the shelf life of horse mackerel and provide acceptable quality during distribution to consumers.

### pH

The pH values ranged from 6.2 to 6.9 throughout the entire storage period at different temperatures; no statistical correlation was observed between the pH values and bacterial growth (results not shown). Other authors have also reported that pH is not a good freshness indicator for stored fish samples.<sup>37</sup>

### Volatile amines

The initial TVB-N values were  $25.48 \pm 0.79$  mg of N/100 g, the evolution of these values was temperature-dependent, ranging from 33.90 at 2°C up to 93.38 mg of N/100 g at 10°C after 11 days of storage (Figure 2). The final sensory acceptance was correlated with 30–50 mg TVB-N/100 g of mackerel muscle at all temperatures except for 2°C, revealing TVB-N to be a good index of quality of MAP horse mackerel. At the time of sensory rejection at 4 and 6°C, the TVB-N content agreed with the limit of acceptability fixed for European countries for species such as salmon, hake and cod (35 mg TVB-N/100 g).<sup>38</sup> In sardine, Ababouch *et al.*<sup>39</sup> reported similar values of acceptability (25–35 mg of N/100 g).

The initial TMA values were  $4.28 \pm 0.48$  mg of N/kg, which varied throughout the spoilage time, depending on the storage temperature. After 11 days of storage at 2 and 4°C, TMA was not detected, but increasing values were observed at 6°C (over 62 mg N/kg at day 11) and at 10°C (over 75 mg N/kg after 11 days) (Figure 2). Similar results for other species of fresh fish, e.g., boque<sup>18</sup> and cod fillets<sup>40</sup> are reported in the literature.

The TMA-N concentration observed in this work was lower than that reported by Cann *et al.*<sup>41</sup> The absence of viscera and other parts of the fish and the inhibitory effect of MAP conditions on microbial growth may explain these differences.

### 2-thiobarbituric acid (TBA)

There was no correlation between TBA concentration and storage time or temperature under any studied condition (data not shown), indicating that TBA is not a good indicator of spoilage of MAP horse mackerel fillets. In contrast, other researchers working with horse mackerel freshness stored on ice<sup>42</sup> have concluded that TBA is a good chemical indicator of spoilage. Our results point to a different spoilage pattern for fish stored in a  $\text{CO}_2$  atmosphere without oxygen compare with ice-stored fish.

### Packing atmosphere

The percentage of  $\text{CO}_2$  in the fish packs was  $46.6 \pm 1.7\%$  at packing time and varied with storage time, depending on the storage temperature (data not shown). The concentration was constant at 2 and 4°C, increased slightly at 6°C (up to 52% of  $\text{CO}_2$ ) and showed a clear change at 10°C (59% at day 6 and 60% after 11 days of storage). This temperature-dependent effect could be due to  $\text{CO}_2$  production from microbial metabolism, which would be significantly lower at low temperatures.

**Table 2.** Maximum specific growth rate of TVC, *Pseudomonas* agar, *Enterobacteriaceae* and psychrotrophic bacteria in MAP Atlantic horse mackerel at different storage temperatures.

Temperature (°C)		Total viable count	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Psychrotrophic bacteria
2	$\mu(\text{h}^{-1})^a$	0.0133 ± 0.0018	0.0173 ± 0.0023	0.0280 ± 0.0034	0.0162 ± 0.0028
4	$\mu(\text{h}^{-1})$	0.0256 ± 0.0033	0.0329 ± 0.0038	0.0238 ± 0.0054	0.0305 ± 0.0035
6	$\mu(\text{h}^{-1})$	0.0369 ± 0.0017	0.0377 ± 0.0066	0.0665 ± 0.0146	0.0401 ± 0.0025
10	$\mu(\text{h}^{-1})$	0.0538 ± 0.0051	0.0559 ± 0.0066	0.0520 ± 0.0104	0.0514 ± 0.0070

Values are reported as averages ± standard deviation

<sup>a</sup> Maximum specific growth rate

**Table 3.** Results of fitting the Arrhenius model to describe the dependence of the maximum growth of spoilage bacteria on Atlantic horse mackerel stored under MAP at 2, 4, 6 and 10°C.

	Model terms	Estimate	Stand. Error	Adjusted R <sup>2</sup>
Total viable count	$\ln(\mu_{ref})$	-4.48	0.27	0.91
	$E_{app}$	25.5		
Psychrotrophic bacteria	$\ln(\mu_{ref})$	-4.20	0.19	0.85
	$E_{app}$	20.8		
<i>Enterobacteriaceae</i>	$\ln(\mu_{ref})$	-3.95	0.23	0.78
	$E_{app}$	19.6		
<i>Pseudomonas</i> spp.	$\ln(\mu_{ref})^a$	-4.16	0.21	0.89
	$E_{app}^b$	20.7		

<sup>a</sup> Maximum specific growth rate at the reference temperature

<sup>b</sup> Apparent activation energy is expressed in kcal mol<sup>-1</sup>.

The HPLC analysis of carbonyl compounds in the packing atmosphere indicates that only the concentration of acetaldehyde, 2-butanone and butyraldehyde varied with the storage time (Figure 3). Short-chain carbonyls in the atmosphere have also been observed in Atlantic horse mackerel after chilled storage<sup>43</sup> and in other fish species such as mackerel, cod, whiting, trout or salmon.<sup>15, 44, 45</sup> The concentration of identified aldehydes was highly dependent on the storage temperature and increased significantly at 10°C, though it did not vary at other temperatures. Acetaldehyde is formed during the early stages of spoilage, but the other two carbonyls compounds are only detected when fish is completely spoiled. It is difficult to establish the origin of these carbonyl compounds because they can arise from bacterial and enzymatic activities and from non-enzymatic autocatalytic oxidation reactions.<sup>46</sup>

**Correlation between sensory attributes and bacterial population**

Significant correlations (p<0.05) were observed between all of the sensory attributes considered and two of the bacteria groups (TVC and psychrotrophic bacteria) at 4, 6 and 10°C (Table 5). The sensorial rejection time was related to bacteria levels close to 10<sup>6</sup> cfu g<sup>-1</sup>, and hence, the product shelf life was related to microbial concentration. However, these correlations were lower at 2°C (Table 5). At low temperatures, fish spoilage may be mainly due to autolytic changes and unrelated to microbiological

activity. Gram *et al.*<sup>47</sup> underlined the importance of these primary changes in fresh fish. The results indicate that the selected bacteria count (TVC and psychrotrophic bacteria) may be an accurate microbiological indicator of the sensory shelf life of MAP horse mackerel during storage at chilled temperatures (in the range of 4-10°C).

**Correlation between sensory attributes and chemical indices**

Pearson correlations were used to analyse the relationships between sensory attributes and chemical indices (TVB-N and TMA) at different temperatures. Significant correlations (p<0.05) between sensory attributes and TVB-N values were identified at 4, 6 and 10°C (Table 6). The TMA values were significantly correlated with sensorial parameters at high temperatures (6 and 10°C) (Table 6). Volatile bases are generated by the deamination of amino acids by microbial enzymes,<sup>48</sup> which is favoured at high temperature. The results indicate that TVB-N levels may be an accurate chemical indicator related to the sensory shelf life of MAP horse mackerel during storage at temperature between 4 and 10°C.

It is remarkable that the packaging atmosphere of the fish trays did not produce markers of lipid oxidation (i.e., unsaturated aldehydes as hexanal). These results are in agreement with the sensorial characterisation, (Table 1); furthermore, the sensory panel did not detect an oxidised odour (as fishy oxidised flavour) after 11 days of storage.

**Table 4.** Effect of storage time and temperature on the sensory evaluation of Atlantic horse mackerel fillets subjected to modified atmosphere packaging stored at different temperatures.

Sensory parameter	Temp	Storage times (days)							
		1	2	4	5	6	7	8	11
Odour	2°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.6±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>b</sup>	2.5±0.5 <sup>bc</sup>	2.6±0.4 <sup>c</sup>	3.2±0.2 <sup>d</sup>	3.2±0.7 <sup>d</sup>	3.5±0.5 <sup>d</sup>
	4°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.8±0.5 <sup>a</sup>	2.6±0.6 <sup>b</sup>	2.7±0.5 <sup>b</sup>	2.9±0.6 <sup>bc</sup>	3.5±0.8 <sup>cd</sup>	3.9±0.5 <sup>d</sup>	3.9±0.4 <sup>d</sup>
	6°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.8±0.5 <sup>a</sup>	2.7±1.2 <sup>b</sup>	3.4±0.5 <sup>c</sup>	3.7±0.4 <sup>c</sup>	3.8±0.5 <sup>c</sup>	3.9±0.4 <sup>c</sup>	5.0±0.0 <sup>d</sup>
	10°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	2.5±0.7 <sup>b</sup>	3.8±0.9 <sup>c</sup>	4.0±0.3 <sup>cd</sup>	4.1±0.5 <sup>cd</sup>	4.4±0.4 <sup>de</sup>	4.6±0.2 <sup>ef</sup>	5.0±0.0 <sup>f</sup>
Skin Colour	2°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.7±0.2 <sup>a</sup>	1.7±0.9 <sup>a</sup>	3.0±0.5 <sup>b</sup>	2.8±0.7 <sup>bc</sup>	3.5±0.5 <sup>cd</sup>	4.0±0.8 <sup>d</sup>	3.8±0.4 <sup>d</sup>
	4°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.9±0.6 <sup>a</sup>	2.1±1.2 <sup>b</sup>	2.5±0.8 <sup>b</sup>	2.6±0.7 <sup>b</sup>	3.6±0.7 <sup>c</sup>	3.8±0.9 <sup>c</sup>	3.8±0.6 <sup>c</sup>
	6°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	2.0±0.4 <sup>b</sup>	2.2±1.1 <sup>bc</sup>	2.9±0.5 <sup>cd</sup>	3.1±0.6 <sup>d</sup>	3.6±0.6 <sup>de</sup>	4.1±0.6 <sup>df</sup>	4.8±0.4 <sup>f</sup>
	10°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.6±0.5 <sup>a</sup>	2.8±1.0 <sup>b</sup>	3.9±0.5 <sup>c</sup>	3.7±0.9 <sup>c</sup>	4.3±0.5 <sup>cd</sup>	4.9±0.2 <sup>de</sup>	5.0±0.0 <sup>e</sup>
Flesh Colour	2°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.3±0.2 <sup>a</sup>	1.5±0.6 <sup>a</sup>	2.5±0.8 <sup>b</sup>	2.9±0.6 <sup>bc</sup>	3.2±0.5 <sup>bc</sup>	3.5±0.5 <sup>c</sup>	3.8±0.8 <sup>c</sup>
	4°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.6±0.3 <sup>a</sup>	1.9±0.7 <sup>b</sup>	2.9±0.9 <sup>c</sup>	3.0±0.3 <sup>c</sup>	3.4±0.5 <sup>cd</sup>	3.7±0.4 <sup>c</sup>	4.2±0.6 <sup>c</sup>
	6°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.6±0.5 <sup>ab</sup>	2.0±0.9 <sup>b</sup>	3.2±0.5 <sup>c</sup>	3.4±0.8 <sup>c</sup>	3.4±0.5 <sup>c</sup>	4.1±0.2 <sup>d</sup>	4.5±0.7 <sup>d</sup>
	10°C	1.1±0.3 <sup>a</sup>	2.0±0.4 <sup>ab</sup>	2.8±1.2 <sup>bc</sup>	3.5±0.6 <sup>cd</sup>	3.6±0.8 <sup>d</sup>	3.7±0.7 <sup>de</sup>	4.4±0.5 <sup>e</sup>	4.5±0.7 <sup>e</sup>
Texture	2°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.2 <sup>a</sup>	1.4±0.5 <sup>a</sup>	2.0±0.6 <sup>b</sup>	2.0±0.3 <sup>b</sup>	2.5±0.5 <sup>bc</sup>	2.6±0.3 <sup>bc</sup>	2.5±0.5 <sup>c</sup>
	4°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.6±0.5 <sup>b</sup>	2.0±0.8 <sup>bc</sup>	2.1±0.7 <sup>b</sup>	2.3±0.4 <sup>bc</sup>	2.6±0.5 <sup>cd</sup>	2.9±0.7 <sup>cd</sup>	2.6±0.4 <sup>d</sup>
	6°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.5±0.4 <sup>ab</sup>	1.6±0.6 <sup>ab</sup>	2.1±0.7 <sup>bc</sup>	2.4±0.7 <sup>cd</sup>	2.9±0.7 <sup>d</sup>	2.8±0.6 <sup>d</sup>	3.0±0.0 <sup>d</sup>
	10°C	1.3±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.6 <sup>ab</sup>	2.0±1.0 <sup>b</sup>	2.3±0.4 <sup>bc</sup>	2.4±0.7 <sup>cd</sup>	2.8±0.7 <sup>cd</sup>	3.0±0.0 <sup>d</sup>	3.0±0.0 <sup>d</sup>

Values are reported as the means ± standard deviation.

<sup>a-d</sup> Values in the same line followed by a different letter are significantly different (p<0.05).

Scale from 1 to 5 (1 is absolutely fresh, 5 completely spoiled). Acceptability limit, 3.

**Table 5.** Pearson correlation coefficients between sensory attributes and microbial indices for fillet fish stored at different temperatures.

Temp.	Sensorial parameter	TVC <sup>a</sup>	Enterobacteria <sup>a</sup>	Pseudomonas spp. <sup>a</sup>	Psychrotrophic <sup>a</sup>
2°C	Odour	0.86	0.93	0.90	0.86
	Skin Colour	0.80	0.83	0.88	0.82
	Flesh Colour	0.86	0.89	0.81	0.75
	Texture	0.79	0.85	0.89	0.82
4°C	Odour	0.94	0.85	0.96	0.97
	Skin Colour	0.96	0.78	0.95	0.95
	Flesh Colour	0.93	0.77	0.94	0.93
	Texture	0.90	0.76	0.97	0.98
6°C	Odour	0.97	0.92	0.79	0.93
	Skin Colour	0.96	0.83	0.88	0.96
	Flesh Colour	0.94	0.86	0.81	0.97
	Texture	0.92	0.89	0.83	0.91
10°C	Odour	0.98	0.98	0.97	0.96
	Skin Colour	0.95	0.92	0.95	0.94
	Flesh Colour	0.96	0.96	0.97	0.96
	Texture	0.93	0.96	0.96	0.98

<sup>a</sup> All correlations were significant (p<0.05).

The shelf life of MAP Atlantic horse mackerel raw fillets is highly dependent on storage temperature, with shorter shelf life at high temperatures. MAP should ideally be used for very fresh products to extend the fresh like characteristics. Moreover, MAP can be combined with superchilling, lower temperature than 2°C, to further extend the shelf-life of fresh fish.<sup>49,50</sup> In this context, temperature control along the complete logistic fresh fish chain plays an important role in ensuring the shelf life of these minimally processed fish foods in the marketplace. Further stud-

ies with *T. trachurus* focused on identification of the bacteria population could enhance the understanding of the correlation between SSO and sensory spoilage. This knowledge is crucial for the selection of the best preservation techniques for this product.

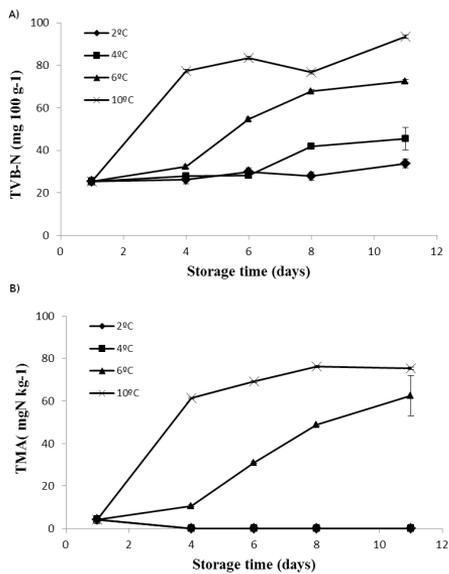
## CONCLUSIONS

According to sensory analysis, the limit of acceptability of Atlantic horse mackerel fillets packed under a MA was 7 days at 2°C, 6 days at 4°C,

**Table 6.** Pearson correlation coefficients between sensory attributes and chemical indices for fillet fish stored at different temperatures.

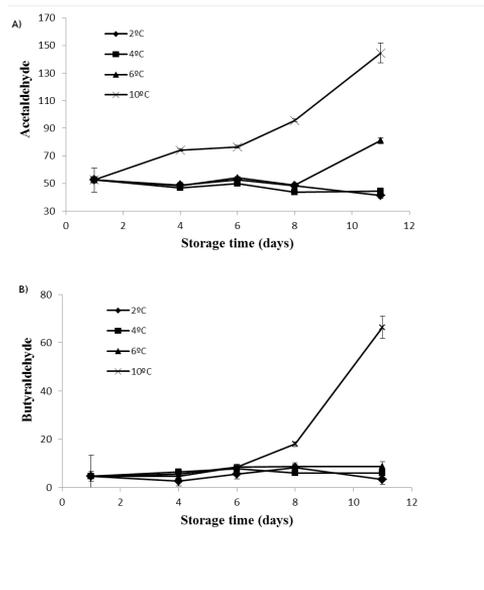
Temp.	Sensorial parameter	TVBN	TMA	TBA
2°C	Odour	0.80	-0.81	0.37
	Skin Colour	0.72	-0.67	0.41
	Flesh Colour	0.84	-0.68	0.17
	Texture	0.71	-0.66	0.41
4°C	Odour	0.87	-0.85	0.19
	Skin Colour	0.93 <sup>a</sup>	-0.74	0.07
	Flesh Colour	0.90 <sup>a</sup>	-0.72	-0.08
	Texture	0.81	-0.86	0.16
6°C	Odour	0.95 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.39
	Skin Colour	0.98 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	0.55
	Flesh Colour	1.00 <sup>a</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.43
	Texture	1.00 <sup>a</sup>	0.98 <sup>a</sup>	0.43
10°C	Odour	0.97 <sup>a</sup>	0.99 <sup>a</sup>	0.58
	Skin Colour	0.86	0.91 <sup>a</sup>	0.32
	Flesh Colour	0.89 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.38
	Texture	0.86	0.92 <sup>a</sup>	0.33

<sup>a</sup> Significant values (p<0.05)



**Figure 2.** Effect of storage time (days) and temperature on the (a) total volatile basic nitrogen (TVB-N) values and (b) trimethylamine (TMA) values of fish samples. Points represent means values±standard deviation. Data are expressed in chromatographic area units.

5 days at 6°C, and 3 days at 10°C. We found a good correlation between sensory rejection and bacterial concentration in fish samples over the temperature range of 4-10°C, with a bacterial concentration close to 10<sup>6</sup> cfu g<sup>-1</sup> at rejection time. TVB-N values provide useful spoilage indicator under all storage conditions, except at 2°C. In this study, analytical control parameters were related to sensorial characteristics along the shelf life of MAP *Trachurus trachurus* stored at different temperatures. In addition,



**Figure 3.** Effect of storage time (days) and temperature on the evolution of (a) acetaldehyde values and (b) butyraldehyde values in the packaging atmosphere. Points represent mean values±standard deviation. Data are expressed in chromatographic area units.

these results confirm the use of MA packaging as a mild preservation method for fillets of Atlantic horse mackerel.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The reported research has been funded by the Basque Government (Department of Agriculture and Fisheries, and Department of Presidency). The authors thank Iker Gandia for his excellent technical support.

## REFERENCES

- Svanevik CS and Lunestad BT, Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Microbiology* **151**:164-170 (2011).
- FAO, Fishery statistics. Capture production. Yearbook 2001.Rome, Italy. *Food Agriculture Organization of the United Nations*, **92/1** (2003).
- Mejlholm O and Dalgaard P, Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* **34**:27-31 (2002).
- Ruiz-Capillas C and Moral A, Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry* **89**:347-354 (2005).
- Goulas AE and Kontominas MG, Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* **100**:287-296 (2007).
- Fagan JD, Gormley TR and Uí Mhuircheartaigh MM, Effect of modified atmosphere packaging with freeze-chilling on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**:205-214 (2004).
- Sivertsvik M, Jeksrud WK and Rosnes JT, A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science & Technology* **37**:107-127 (2002).
- NF H, Technological aspects of extending prime quality of seafood: A review. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **1(3/4)**:9-27 (1992).
- Chai T, Chen C, Rosen A and Levin RE, Detection and Incidence of Specific Species of Spoilage Bacteria on Fish. *Applied Microbiology* **16**:1738-1741 (1968).
- Ravn Jørgensen B, Gibson DM and Huss HH, Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. *International Journal of Food Microbiology* **6**:295-307 (1988).
- Dalgaard P, Gram L and Huss HH, Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* **19**:283-294 (1993).
- Gram L and Dalgaard P, Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* **13**:262-266 (2002).
- Alasalvar C, Taylor KDA and Shahidi F, Comparative quality assessment of cultured and wild sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:2039-2045 (2002).
- Baixas-Noguera S, Bover-Cid S, Vidal-Carou MC, Veciana-Nogués MT and Mariné-Font A, Trimethylamine and total volatile basic nitrogen determination by flow injection/gas diffusion in mediterranean hake (*Merluccius merluccius*)†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:1681-1686 (2001).
- Olafsdottir G, Jonsdottir R, Lauzon HL, Luten J and Kristbergsson K, Characterization of volatile compounds in chilled cod (*Gadus morhua*) fillets by gas chromatography and detection of quality indicators by an electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**:10140-10147 (2005).
- Lyhs U, Lahtinen J, Fredriksson-Ahomaa M, Hyytiä-Trees E, Elfing K and Korkeala H, Microbiological quality and shelf life of vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout stored at 3 and 8 °C. *International Journal of Food Microbiology* **70**:221-230 (2001).
- Koutsoumanis K, Giannakourou MC, Taoukis PS and Nychas GJE, Application of shelf life decision system (SLDS) to marine cultured fish quality. *International Journal of Food Microbiology* **73**:375-382 (2002).
- Taoukis PS, Koutsoumanis K and Nychas GJE, Use of time-temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions. *International Journal of Food Microbiology* **53**:21-31 (1999).
- Losada V, Piñeiro C, Barros-Velázquez J and Aubourg SP, Inhibition of chemical changes related to freshness loss during storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in slurry ice. *Food Chemistry* **93**:619-625 (2005).
- Tzikas Z, Ambrosiadis I, Soutos N and Georgakis S, Quality assessment of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) and blue jack mackerel (*Trachurus picturatus*) during storage in ice. *Food Control* **18**:1172-1179 (2007).
- ISO 4121:1987.Sensory analysis - Methodology - Evaluation of food products by methods using scales. *The International Organization for Standardization Geneva, Switzerland*.
- Commission R, Ed, Official Journal of the European Union OJ, p 22 (2005).
- AOAC method 971.14 Trimethylamine Nitrogen in Seafood. *AOAC official methods of analysis* (1995).
- Vyncke W, Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette-Seifen-Anstrichmittel*.1084-1087 (1970).
- Baranyi J and Roberts TA, A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* **23**:277-294 (1994).
- Paleologos EK, Savvaidis IN and Kontominas MG, Biogenic amine formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology* **21**:549-557 (2004).
- Özogul Y, Özogul F, Kuley E, Özkutuk AS, Gökbulut C and Köse S, Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. *Food Chemistry* **99**:752-758 (2006).
- Koutsoumanis KP TP, Drosinos EH, Nychas GJ, Applicability of an Arrhenius model for the combined effect of temperature and CO<sub>2</sub> packaging on the spoilage microflora of fish. *Appl Environ Microbiol* **66**:3528-3534 (2000).
- Arashisar Ş, Hisar O, Kaya M and Yanik T, Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology* **97**:209-214 (2004).
- Ordóñez JA, López-Gálvez DE, Fernández M, Hierro E and De La Hoz L, Microbial and physicochemical modifications of hake (*Merluccius merluccius*) steaks stored under carbon dioxide enriched atmospheres. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**:1831-1840 (2000).
- López-Gálvez DE, de la Hoz L, Blanco M and Ordóñez JA, Refrigerated Storage (2 °C) of Sole (*Solea solea*) Fillets under CO<sub>2</sub>-Enriched Atmospheres. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**:1143-1149 (1998).

32. Olley J, Ratkowsky, D.A The role of temperature function integration in the monitoring of fish spoilage. *Food Technology NZ February*:13-17 (1973).
33. Nuin M, Alfaro B, Cruz Z, Argarate N, George S, Le Marc Y, Olley J and Pin C, Modelling spoilage of fresh turbot and evaluation of a time-temperature integrator (TTI) label under fluctuating temperature. *International Journal of Food Microbiology* **127**:193-199 (2008).
34. Koutsoumanis K and Nychas G-JE, Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *International Journal of Food Microbiology* **60**:171-184 (2000).
35. Rodríguez Ó, Losada V, Aubourg SP and Barros-Velázquez J, Sensory, microbial and chemical effects of a slurry ice system on horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**:235-242 (2005).
36. Church N, MAP fish and crustaceans - sensory enhancement. *Food Science and Technology Today* **12**:73-83 (1998).
37. Aubourg S, Damage detection in horse mackerel during chilled storage, in *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Ed. Springer Berlin / Heidelberg, pp 857-862 (2001).
38. DOCE. (1995). Determinación de la concentración de bases nitrogenadas volátiles (TVB-N) en pescados y productos de la pesca. Procedimientos de referencia. Directiva L. 97/84 (95/149),p.15. Brussels: European Commission.
39. Ababouch LH, Souibri L, Rhaliby K, Ouahdi O, Battal M and Busta FF, Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiology* **13**:123-132 (1996).
40. Dalgaard P, Mejlholm O and Huss HH, Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf life of packed fish. *International Journal of Food Microbiology* **38**:169-179 (1997).
41. Cann DCS, G. L. & Houston, N. C. , Further studies on marine fish stored under modified atmosphere packaging. *Technical Report, Aberdeen, UK, Torry Research Station*, 56 (1983).
42. Simeonidou S, Govaris A and Varelzsis K, Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Research International* **30**:479-484 (1997).
43. Iglesias J and Medina I, Solid-phase microextraction method for the determination of volatile compounds associated to oxidation of fish muscle. *Journal of Chromatography A* **1192**:9-16 (2008).
44. Duflos G, Coin VM, Cornu M, Antinelli J-F and Malle P, Determination of volatile compounds to characterize fish spoilage using headspace/mass spectrometry and solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **86**:600-611 (2006).
45. Iglesias J, Gallardo JM and Medina I, Determination of carbonyl compounds in fish species samples with solid-phase microextraction with on-fibre derivatization. *Food Chemistry* **123**:771-778 (2010).
46. Varlet V, Prost C and Serot T, Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation. *Food Chemistry* **105**:1536-1556 (2007).
47. Gram L and Huss HH, Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* **33**:121-137 (1996).
48. Muratore G and Licciardello F, Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Shelf life of Liquid-smoked Swordfish (*Xiphias gladius*) Slices. *Journal of Food Science* **70**:C359-C363 (2005).
49. Wang T, Sveinsdóttir K, Magnússon H, Martinsdóttir E. Combined Application of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage to Extend the Shelf Life of Fresh Cod (*Gadus morhua*) Loins. *Journal of Food Science*, **73**: S11-S19 (2008).
50. Fernández K, Aspe E, Roeckel M. Shelf-life extension on filets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. *Food Control* **20**(11):1036-42.(2009).

**CAPÍTULO**

**5**

CARACTERIZACIÓN  
DEL CONTENIDO  
DE AMINAS VOLÁTILES  
Y ALDEHÍDOS  
DE LA ATMÓSFERA  
DE PESCADO ENVASADO



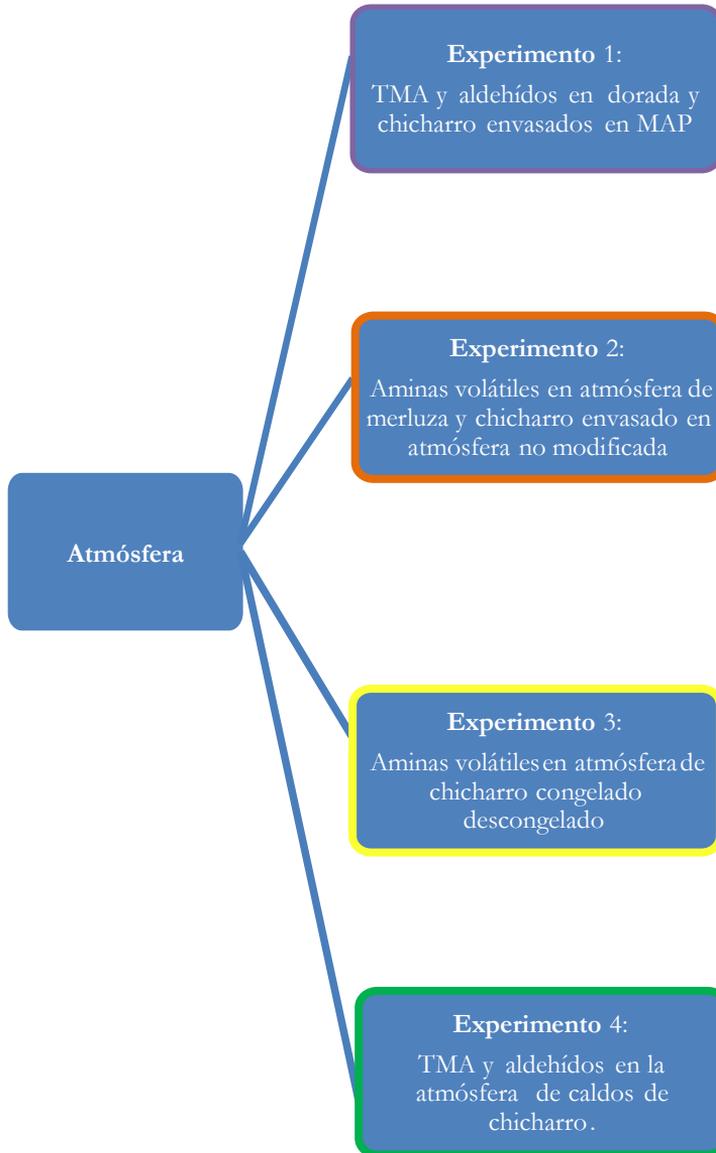


Figura 97: Relación de experimentos llevados a cabo con atmósferas de pescado en el capítulo 5. Las distintas coloraciones de los recuadros son para resaltar la correspondencia de los experimentos del presente capítulo con los del capítulo 4.

## 5.1 -Introducción

A la hora de analizar la calidad de un pescado, resulta determinante el análisis sensorial del mismo. Este análisis se basa en la percepción que tienen los catadores o consumidores de diferentes parámetros, entre los cuales el aroma juega un papel muy importante. Por este motivo resulta interesante y necesario poder caracterizar los compuestos volátiles responsables de estos olores. Estos compuestos tienen su origen en el músculo y la relación que existe entre la concentración en el músculo y la atmósfera que rodea el pescado es clara, por lo que tener información sobre la concentración que existe en la atmósfera puede evitar analizar el músculo, una matriz más compleja cuyo análisis implica la destrucción de la muestra.

Para la caracterización del contenido de aminas volátiles y aldehídos/cetonas de la atmósfera de pescado envasado se llevaron a cabo distintos experimentos utilizando la metodología desarrollada en el capítulo 3, la metodología del ácido pícrico y la metodología de derivatización con DNPH para determinación de aldehídos/cetonas.

Se escogieron las aminas y los aldehídos/cetonas porque, a pesar de que existen otros grupos químicos como alcoholes o compuestos azufrados, aminas y aldehídos/cetonas, son compuestos que han sido ampliamente estudiados como marcadores de calidad en numerosas especies pesqueras y además existen distintas metodologías que han sido utilizadas por muchos autores.

### ***Experimento 1: Estudio del contenido en TMA y aldehídos en dorada entera, dorada fileteada y chicharro envasado en MAP.***

Con el fin de determinar la concentración de TMA y de aldehídos/cetonas en la atmósfera de las barquetas de pescado envasado para utilizarlo como método de análisis no destructivo, se llevó a cabo un experimento en el que se extrajo la atmósfera del envase preconcentrándola para posteriormente analizarla y poder utilizar algún compuesto de los analizados como marcador de calidad.

### ***Experimento 2: Estudio del contenido en TMA y DMA y su correlación con la concentración en el músculo en merluza y chicharro envasados en atmósfera no modificada.***

Para poder correlacionar la concentración de estas aminas volátiles en el músculo con su concentración en la atmósfera de la barqueta, se llevó a cabo un estudio de 10 días en que se tomaron muestras de atmósfera y músculo. Las muestras fueron analizadas mediante el método del BATB y los resultados se compararon para determinar si existía correlación entre músculo y atmósfera.

***Experimento 3: Estudio de la evolución de TMA en chicharro envasado para discriminar entre pescado fresco y congelado-descongelado.***

Vista la tendencia en la formación de TMA que tiene lugar en el músculo de pescado congelado-descongelado (capítulo 4), se aprovechó esta circunstancia para forzar la acción de los microorganismos de deterioro específicos y acelerar así la formación de TMA, utilizándola como marcador diferenciador entre pescado fresco y congelado-descongelado.

***Experimento 4: Determinación de TMA y análisis de aldehídos/cetonas en las atmósferas de caldos de chicharro inoculados con distintas cepas bacterianas.***

Este experimento supone la continuación del experimento 6 del capítulo 4, donde se analizaron las concentraciones de TMA y aldehídos/cetonas en los caldos inoculados. En este apartado se analizarán los resultados obtenidos a partir de las atmósferas de los viales que contenían los caldos de chicharro.

## **5.2 -Material y métodos**

Para la captura de los compuestos volátiles, primero se optó por la preconcentración de estos compuestos mediante la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida acoplados a una jeringa que mediante una extracción manual haría pasar la atmósfera de las barquetas o viales a través de los cartuchos derivatizados, quedando retenidos para su posterior análisis.

Finalmente se decidió utilizar una bomba de muestreo personal con la que poder controlar el flujo de extracción de la atmósfera de manera que se controlase el volumen extraído, así como la velocidad de extracción.

A continuación se detallan los protocolos utilizados con los cartuchos de extracción en fase sólida y de la bomba de muestreo personal respectivamente.

### **5.2.1 -CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**

Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida con un relleno de base sílica (C18) (3 mL/0,5 gr) Bond Elut (Agilent technologies, EEUU).

#### **5.2.1.1 -Aminas.**

En el caso de las aminas, primeramente se activaron los cartuchos haciendo pasar 2 mL de MeCN a través de ellos utilizando un sistema de extracción mediante vacío para cartuchos

de extracción en fase sólida (Waters extraction manifold) (Waters, EEUU). Posteriormente se hicieron pasar 2 mL de NaOH 0,05 M para generar un medio básico que permitiera retener las aminas. A continuación con la ayuda de una jeringa se hicieron pasar 120 mL del gas del interior de la barqueta a través del cartucho. Tras esto, se llevó a cabo la elución del cartucho con la ayuda de 4 mL de ácido fosfórico 0,01 M (Figura 98).



Figura 98: Montaje experimental para la extracción de volátiles del interior de las barquetas de pescado.

En el caso de las extracciones de atmósfera de las barquetas se tomaron 120 mL y en el caso de los caldos de chicharro el volumen que se tomó de la atmósfera del vial fue de 10 mL.

El eluido de ácido fosfórico es el que posteriormente se utilizó para llevar a cabo la reacción con el ácido pícrico para determinar la TMA o con el FMOC para determinar la DMA.

Para la derivatización de la TMA se utilizó el método oficial de la AOAC basado en el método original de Dyer (1945) con ligeras modificaciones. A 1 mL de extracto ácido se le añadieron 0,25 mL de formaldehído al 10%, 2,5 mL de tolueno anhidro y 0,75 mL de KOH al 45%. Se agitaron los tubos durante 2 min y se colocaron en un baño termostático a 30°C durante 15 min. Se tomaron 1,5 mL de la fase superior y se pasaron a otro tubo con sulfato sódico

anhidro y se agitaron unos instantes para eliminar los restos de agua. Se tomó 1 mL de esta disolución de tolueno y se pasó a un tubo limpio, al que se añadió 1 mL de una disolución de ácido pícrico 0,2 mg/mL en tolueno. Se agitó de nuevo y se midió la absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro Genesys 10 (Thermo, EEUU). El calibrado se preparó siguiendo este mismo protocolo con disoluciones patrón.

Para las analíticas de la DMA se utilizó el agente derivatizante FMOC (cloroformiato de fluorenil metilo) utilizando el siguiente protocolo. Se tomaron 200 µL del extracto ácido de aminas y se basificaron hasta pH 12 con la adición de NaOH 0,5 M (12 µL). Posteriormente se añadieron 200 µL de tampón borato 100 mM y 200 µL de una disolución de 5 mg/mL de FMOC en MeCN. Se encapsuló la mezcla en un vial de cromatografía y se analizó mediante HPLC.

Se utilizó una columna Luna C18 (150 x 2 mm, I.D. 5 µm) con una precolumna de la misma fase estacionaria. El horno de la columna fue calentado a 30°C y la fase móvil estaba constituida por H<sub>2</sub>O (A) y MeCN (B) utilizando el gradiente de elución que aparece en la Tabla 23. Se trabajó a un flujo de 0,4 mL/min y el volumen de inyección fue de 50 µL. Se midieron las áreas cromatográficas a una longitud de onda de 262 nm.

Tabla 23: Gradiente utilizado para la determinación de DMA mediante HPLC-DAD a 262 nm.

Tiempo ( min)	%A	%B
<b>0,0</b>	50,0	50,0
<b>2,0</b>	50,0	50,0
<b>10,0</b>	0,0	100,0
<b>15,0</b>	0,0	100,0
<b>16,0</b>	50,0	50,0
<b>20,0</b>	50,0	50,0

### 5.2.1.2 –Aldehídos

Para el grupo de los aldehídos/cetonas, se hicieron pasar 2 mL de MeCN para activar los cartuchos tras lo cual se hicieron pasar 2 mL de una disolución de DNPH acidificada con ácido fosfórico. La DNPH se preparó disolviendo 1 mL de DNPH en 100 mL de MeCN y acidificándolo con 0,1 mL de ácido fosfórico; de esta disolución se preparó una dilución 1:10 que se utilizó para derivatizar los cartuchos.

En el caso de las barquetas de pescado se hicieron pasar 120 mL de atmósfera del interior y en el caso de los caldos de chicharro 10 mL del espacio de cabeza. Para la elución de los cartuchos se utilizó 1 mL de MeCN.

Los extractos de DNPH fueron diluidos a la mitad con agua y analizados mediante HPLC utilizando la metodología explicada en el apartado 4.2.5.2.

### 5.2.1.3 -Envasado del pescado

El pescado fue entregado por una cadena de distribución ya envasado en barquetas y con una composición gaseosa del 48% CO<sub>2</sub>, 50%N<sub>2</sub> y 2% O<sub>2</sub>.

## 5.2.2 -BOMBA DE MUESTREO PERSONAL

Visto que la utilización de los cartuchos basificados y la metodología del ácido pícrico no tuvieron la sensibilidad suficiente para la determinación de las aminas volátiles, se diseñó un nuevo método de extracción acompañado esta vez del método BATB, que cuando se llevaron a cabo los experimentos previos no estaba desarrollado completamente. Mediante una bomba de muestreo personal se llevó a cabo la extracción de los volátiles que quedaron atrapados en una solución de ácido acético 50 mM.

### 5.2.2.1 -Equipo y condiciones cromatográficas para la medida de las aminas volátiles

El equipo cromatográfico utilizado fue el mismo utilizado en los experimentos previos, un Agilent 1100 series acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Ion trap XCT-plus. Asimismo, la columna que se utilizó continuó siendo una Luna HILIC (150 x 2 mm, I.D. 3 µm, (Phenomenex Torrance, CA, USA)) con una precolumna con la misma fase estacionaria. El horno de la columna se mantuvo a la misma temperatura que en los experimentos previos, así como la composición de la fase móvil y el gradiente de elución. En este caso el flujo utilizado fue de 0,3 mL/min y el volumen de inyección se disminuyó hasta 3 µL.

En lo referente a las condiciones de espectrometría de masas, éstas variaron ligeramente respecto a las utilizadas en los capítulos 1 y 2. El capilar (3000 V), nebulizador (40 psi), gas de secado (9 L/hora) y temperatura de secado (350°C) se mantuvieron constantes a lo largo de todo el cromatograma pero en esta ocasión las condiciones fueron las mismas para DMA, TMA y patrón interno (que fue cuantificado en MS1), de modo que las condiciones para cada compuesto aparecen en la Tabla 24.

Tabla 24: Parámetros del espectrómetro de masas óptimos para cada amina (MS/MS).

Parámetros	MA: 260→204	DMA: 274→218 TMA: 174→118 TEAC: 130
Skimmer (V)	34	30
Capillary exit (V)	60	60
Octapole 1 (V)	14	14
Octapole 2 (V)	4	3,5
Trap Drive	31,6	35
Octapole RF (V)	70	70
Lens 1 (V)	5	-2,5
Lens 2 (V)	-100	-100
Fragmentation amplitude	0,6	0,43

### 5.2.2.2 -Extracción de volátiles con soluciones patrón

Para la extracción de los compuestos volátiles se utilizó una bomba de muestreo personal Twin Port Pocket Pump (SKC Inc, Dorset, UK) trabajando a un flujo constante y un medidor de flujo DryCal DC-Lite (DCLM, Butler, NJ, USA) para monitorizar el valor del flujo en cada momento de los experimentos.

En un tubo de ensayo sellado con un tapón de goma se realizaron 2 agujeros para poder introducir el tubo a través del cual entraba y salía el aire bombeado. En el interior de este tubo de ensayo se añadieron las disoluciones de aminas (1 mL en H<sub>2</sub>O), se basificó (1 mL, NaOH 2 M), calentó (80°C) y se hizo pasar aire (100 mL/min) a través de ellas para favorecer la salida de las aminas al espacio en cabeza del tubo, desde donde el flujo se dirigiría hacia la disolución captadora (10 mL, ácido acético 50 mM). El aire fue tomado en el interior de una cabina de flujo y antes de entrar en la bomba era filtrado a través de una solución de ácido acético 50 mM para evitar que las posibles aminas presentes en el aire interfiriesen con la medida (Figura 99).

En primer lugar se utilizaron mezclas de aminas a una concentración de 25 ppb. Se trabajó con distintos flujos (25, 50, 100 y 200 mL/min) y tiempos de extracción y se analizaron las áreas cromatográficas obtenidas.

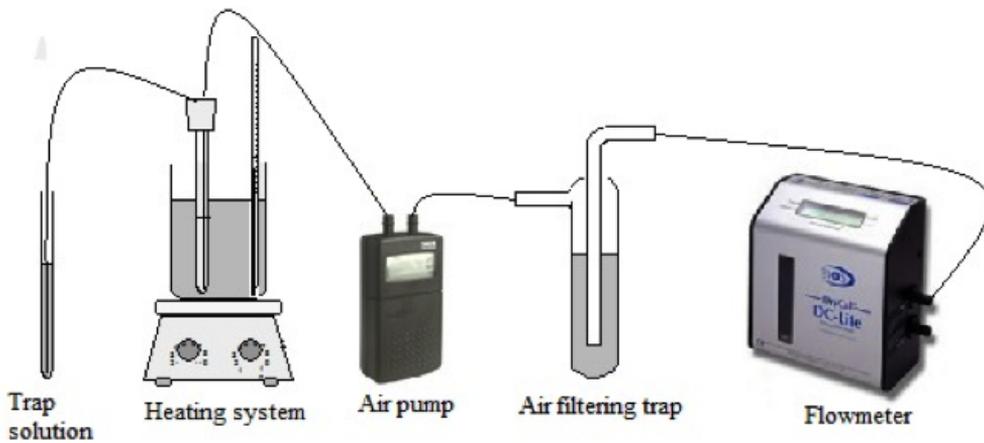


Figura 99: Esquema del montaje diseñado para la captura de aminas volátiles en una sustancia captadora mediante el uso de una bomba de muestreo personal y un sistema de burbujeo.

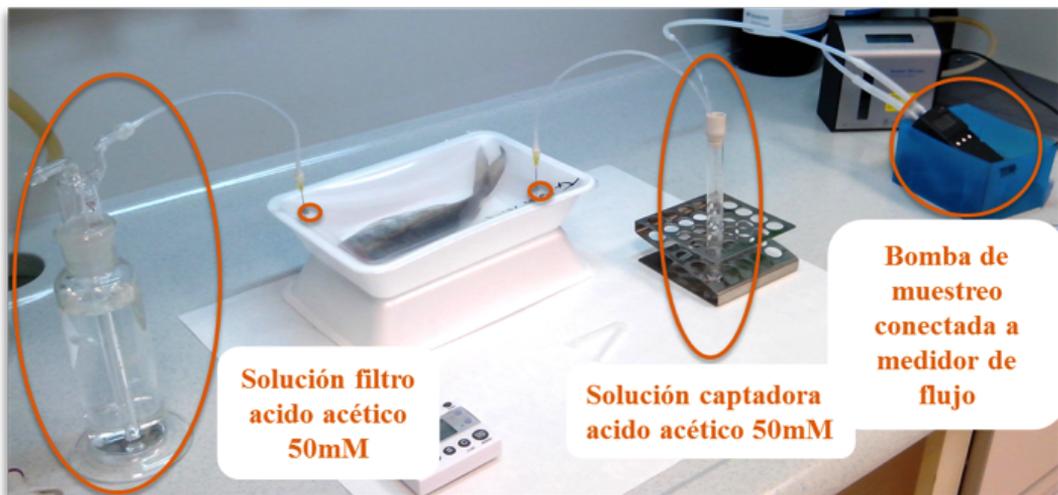


Figura 100: Montaje experimental para la captura de aminas volátiles mediante una bomba de muestreo personal.

### 5.2.2.3 -Extracción de volátiles en muestras reales

A la hora de analizar los espacios de cabeza de las barquetas de pescado era necesario atravesar el film de la barqueta para poder extraer su atmósfera y, por ese motivo se utilizaron septums

adhesivos para evitar pérdidas de gas al perforar el film con las agujas (Figura 100). Las barquetas tienen un volumen aproximado de 1200 mL, a los cuales habría que restar el volumen ocupado por el pescado. Se realizó la extracción durante 15 min a un flujo de 100 mL/min, lo cual suponía la extracción de 1,25 volúmenes de barqueta. Para intentar extraer al máximo los volátiles presentes, durante los dos primeros minutos se extrajo la atmósfera de la barqueta utilizando solo el orificio de salida realizado por la aguja a través del septum. Pasados los dos minutos, se realizó un segundo orificio en la barqueta que permitía la entrada de aire para que la barqueta no se deformase y se generara vacío en su interior. Este segundo orificio permitía la entrada de aire previamente filtrado a través de la solución de ácido acético 50 mM, que realizaba las veces de trampa, para retener las posibles aminas volátiles presentes en el aire del laboratorio.

#### 5.2.2.4 -Validación

Para la validación de la metodología de extracción, se llevó a cabo un experimento que se repitió en 4 días distintos. En cada día de experimento se analizaron disoluciones patrón en H<sub>2</sub>O, y mezclas de aminas volátiles (MA, DMA y TMA) a 10 ppb, 25 ppb, 50 ppb y 100 ppb por triplicado a un flujo de 100 mL/min y durante 15 minutos.

#### 5.2.2.5 -Envasado de pescado y análisis de vida útil

Para el envasado del pescado se utilizaron barquetas LINPAC 15-45 fabricadas en Poliespan-EVOH-PET y un film LINPAC Lintop 80 compuesto de PA-PE. Las especificaciones referentes a la permeabilidad de las distintas especies gaseosas están recogidas en la Tabla 20 del apartado 4.2.4. Para el envasado se utilizó la envasadora Smart 400 (Ulma, España), y las barquetas fueron termoselladas a una temperatura de 155°C sin realizar vacío ni utilizando atmósfera modificada alguna. Se utilizaron muestras de merluza y chicharro para determinar su vida útil mediante la metodología desarrollada. Las medidas se llevaron a cabo tanto en el músculo como en la atmósfera, para poder correlacionar ambas concentraciones. En cada día de experimento se analizaron merluzas y chicharro por triplicado y para cada día de experimento se envasó una barqueta vacía que fue considerada como medida blanco. Estas barquetas fueron almacenadas en una cámara frigorífica a 4°C hasta el momento de su análisis.

#### 5.2.2.6 -Experimento de pescado congelado-descongelado (Experimento 3)

El pescado utilizado en este experimento fue envasado de la misma manera que en el apartado anterior. Por un lado se envasaron chicharros frescos y por otro chicharros que habían permanecido congelados (-18°C) aproximadamente un año. Se les aplicó un tratamiento térmico, se envasaron y se introdujeron en una cámara climática programada a 15°C, y las muestras se

analizaron a tiempo cero, 2 horas, 6 horas y 24 horas por triplicado. Previo al envasado, el pescado, protegido por una bolsa de plástico fue introducido en un baño termostatzado a 30°C durante 5 minutos para que al introducirlo en la cámara a 15°C la temperatura del pescado fuese la misma.

### 5.2.2.7 -Reacción de derivatización

Para llevar a cabo la derivatización de los extractos ácidos se modificó el protocolo utilizado en el capítulo 3 con el BATB. Se tomaron 306 µL del extracto de acético 50 mM y se añadieron 194 µL de MeCN que contenían el patrón interno (TEAC). Debido a que el pH del extracto era muy bajo, fue necesario utilizar NaOH junto con tampón carbonato 1 M para poder alcanzar el pH 8 para el desarrollo óptimo de la reacción de derivatización. Después se añadió 1 mL del BATB disuelto de MeCN y en una concentración de 5 mg/mL. El calibrado fue realizado de la misma forma con los distintos stocks de aminas.

## 5.3 -Resultados

### 5.3.1 -EXPERIMENTO 1: ESTUDIO DEL CONTENIDO EN TMA Y ALDEHÍDOS/CETONAS EN DORADA ENTERA, DORADA FILETEADA Y CHICHARRO ENVASADO EN MAP

#### 5.3.1.1 -Contenido en TMA

Tanto en la dorada, entera y fileteada así como en el chicharro no se pudo determinar que la concentración de TMA aumentase en el espacio de cabeza de las barquetas ya que estos experimentos se llevaron a cabo utilizando la metodología del ácido pícrico, que como ya se ha comentado previamente no resulta suficientemente sensible. De hecho las tendencias que se observaron fueron extrañas, mostrando disminuciones y aumentos a lo largo de los 11 días de experimento.

Por otro lado los músculos de estos pescados fueron analizados (Experimento 3 del capítulo 4) y se observó la tendencia esperada, por lo que se concluyó que esta metodología de extracción de la atmósfera de la barqueta asociada a la utilización de una metodología poco sensible presentaba deficiencias y no era útil para ese fin.

Son varios los factores que pudieron afectar en los malos resultados. Por un lado, la metodología de extracción se llevó a cabo con una jeringa y de forma manual, de manera que el flujo no se podía controlar para que fuese repetible. Los cartuchos fueron basicados con NaOH con el

objetivo de crear un ambiente básico para que la amina quedase retenida en el cartucho, pero igual no lo suficiente debido a la alta volatilidad de la TMA en esas condiciones. Podría ser interesante acidificar los cartuchos para comprobar si esto ayudaba a la fijación de la TMA en el cartucho, un efecto similar al conseguido cuando se utilizó una disolución captadora de ácido acético para retener las aminas de la atmósfera de las barquetas de pescado. Sumado a esto, el hecho de llevar a cabo la extracción a través de un solo orificio de salida sin permitir ninguna entrada de aire al sistema provocó un aumento del vacío en el interior de la barqueta, que también pudo empeorar la extracción de los volátiles. Además la metodología utilizada para los análisis de estas muestras, el método del ácido pícrico, es una metodología poco sensible en la que concentraciones inferiores a 1 ppm resultan complicadas de cuantificar.

También hemos de tener en cuenta que el uso de una atmósfera modificada ralentizó el metabolismo de la flora bacteriana presente en el músculo por lo que todos los metabolitos resultantes aparecerían más tarde, alargándose así la vida útil del producto.

### 5.3.1.2 -Contenido en Aldehídos/Cetonas

En la Figura 101 se aprecia como el contenido de acetaldehído en la dorada entera, no aumenta a 2°C ni a 4°C durante los 11 días de experimento. A 6°C de temperatura, se aprecia como a día 11 la concentración aumenta, mientras que a 10°C, la temperatura más alta, se aprecia un crecimiento secuencial (prácticamente lineal) desde el comienzo hasta el final del experimento.

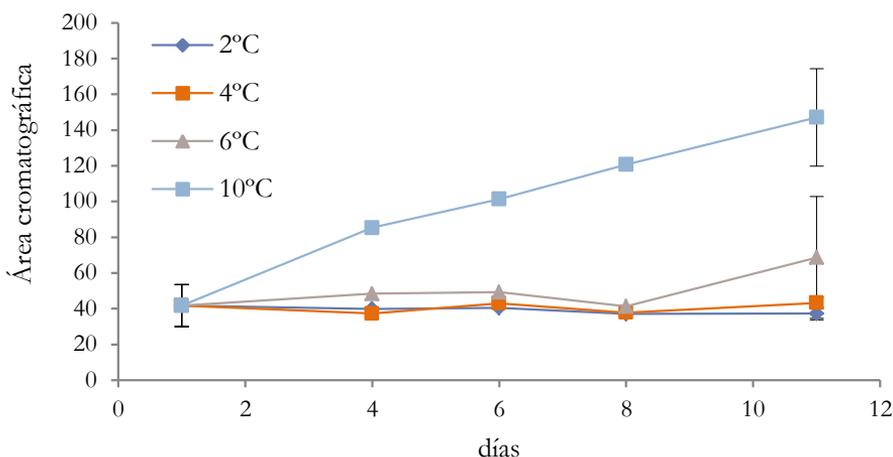


Figura 101: Evolución del acetaldehído en la atmósfera de barquetas de dorada entera envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.

En el caso del butanal en la dorada entera (Figura 102), únicamente existe crecimiento a 10°C de temperatura, donde se aprecia un pequeño crecimiento en el día 8 y finalmente el día 10, donde llega a alcanzar las 85 unidades de área cromatográfica.

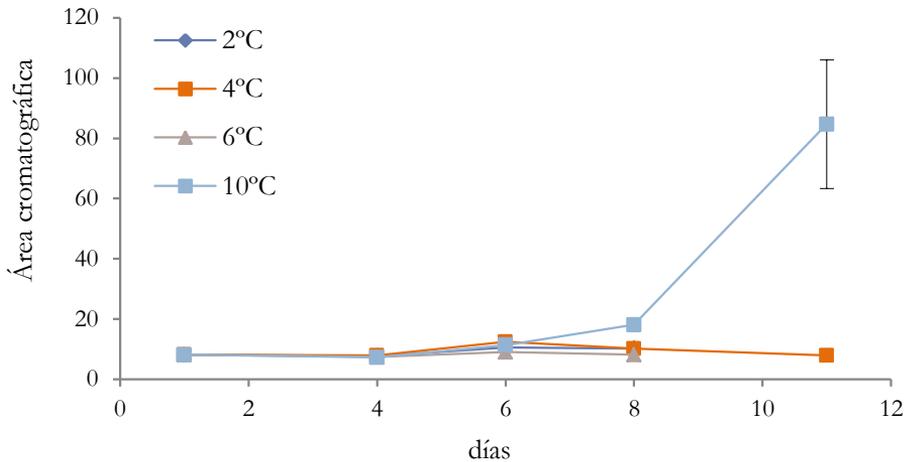


Figura 102: Evolución del butanal en la atmósfera de barquetas de dorada entera envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.

En el caso de la dorada fileteada (Figura 103 y Figura 104), se aprecian las mismas tendencias que en la dorada entera en ambos compuestos, llegando a alcanzar áreas cromatográficas ligeramente más altas.

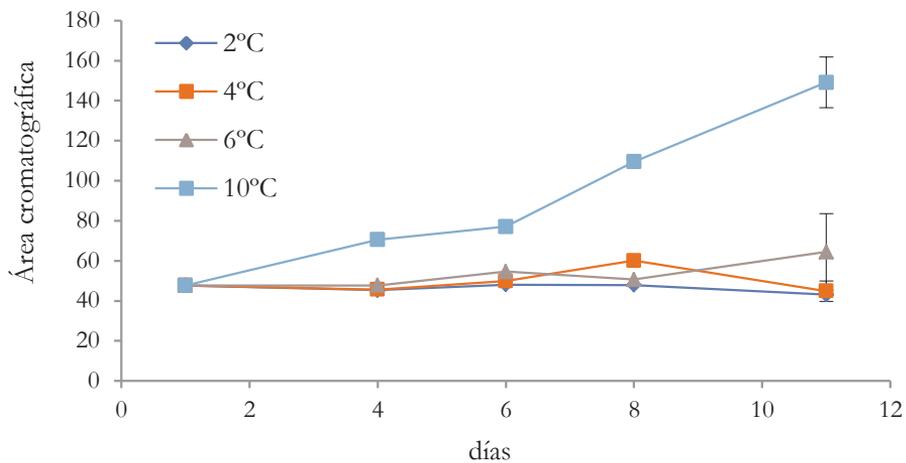


Figura 103: Evolución del acetaldehído en la atmósfera de barquetas de dorada fileteada envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.

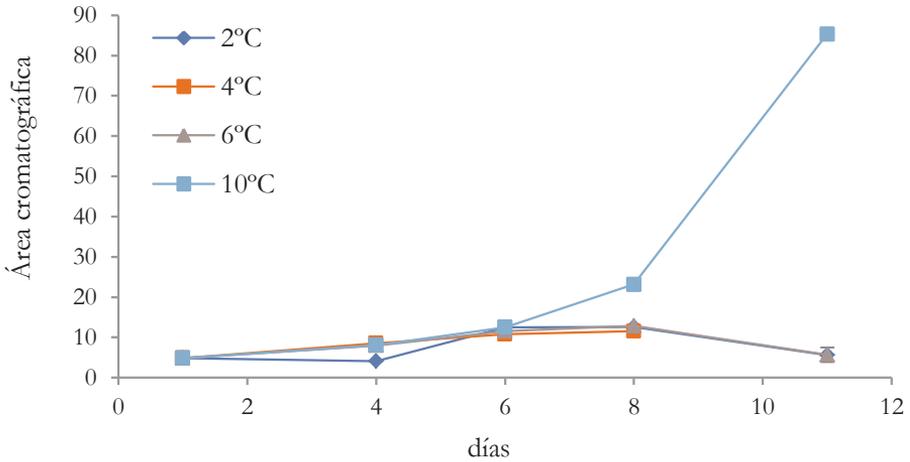


Figura 104: Evolución del butanal en la atmósfera de barquetas de dorada fileteada envasada en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.

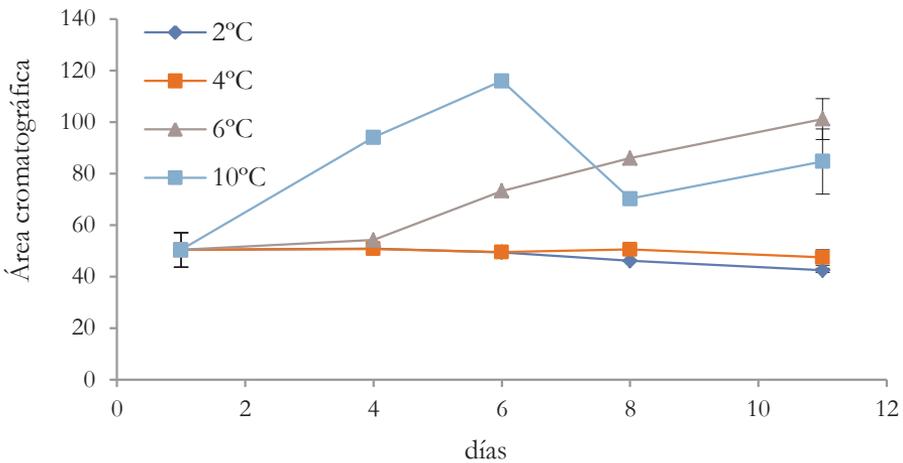


Figura 105: Evolución del acetaldehído en la atmósfera de barquetas de chicharro envasado en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.

En referencia al chicharro, a 2°C y 4°C no se aprecia aumento en la concentración del acetaldehído (Figura 105). A 6°C se aprecia una tendencia creciente a lo largo del experimento, alcanzando las 100 unidades de área cromatográfica. Por último, a 10°C, solo se aprecia aumento hasta el día 6, descendiendo el día 8 y 10. Este comportamiento puede ser debido a que el

acetaldehído haya formado un aducto con alguna proteína muscular del pescado. Aunque no se han encontrado referencias a este proceso en pescado, estos aductos proteína-acetaldehído existen y de hecho son utilizados como biomarcadores en casos de patologías relacionadas con la ingesta excesiva de alcohol (Niemelä et al., 2002; Tuma et al., 1991). Del mismo modo podría deberse a la entrada de esta molécula en cualquiera de los procesos químicos inherentes a la peroxidación lipídica (Ayala et al., 2014).

En caso del butanal (Figura 106) se observa un aumento a partir del día 6 a 10°C.

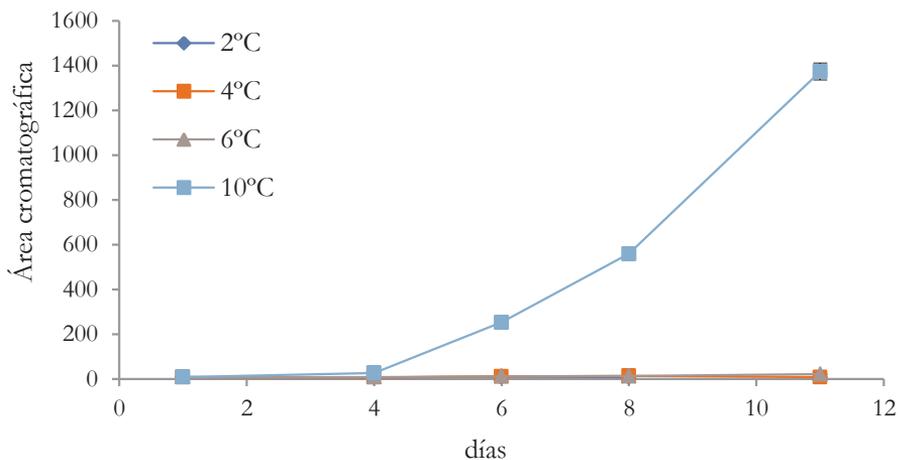


Figura 106: Evolución del butanal en la atmósfera de barquetas de chicharro envasado en MAP durante 11 días de almacenamiento en refrigeración a distintas temperaturas.

Las cantidades observadas de estos aldehídos han sido significativamente superiores a las encontradas en la dorada. Este hecho puede estar asociado al diferente contenido graso de ambas especies, ya que estos compuestos se generan como resultado de la oxidación lipídica.

### 5.3.2 -EXPERIMENTO 2: ESTUDIO DEL CONTENIDO EN TMA Y DMA Y SU CORRELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN EN EL MÚSCULO EN MERLUZA Y CHICHARRO ENVASADOS EN ATMÓSFERA NO MODIFICADA

#### 5.3.2.1 -Optimización de la metodología

A continuación se muestran los resultados de la optimización de la extracción con soluciones patrón. En este caso se utilizaron soluciones de 25 ppb de mezcla de MA, DMA y TMA. En

función de los distintos flujos, y tiempos de extracción se observaron distintos comportamientos para cada compuesto.

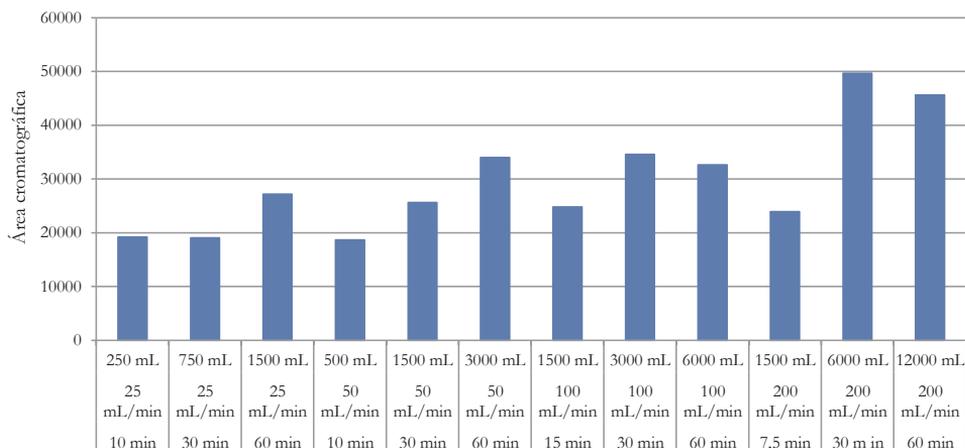


Figura 107: Áreas cromatográficas obtenidas en función de las condiciones de flujo y tiempo de trabajo de la bomba de extracción para la MA.

En el caso de la metilamina (Figura 107), a flujo 25 mL/min se aprecia que no hay diferencia entre extraer durante 10 minutos o 30 minutos, en cambio al pasar a 60 minutos de tiempo si se aprecia un aumento en el área cromatográfica.

Al pasar a un flujo de 50 mL/min si se aprecia que a mayor tiempo de extracción, se obtienen mayores áreas cromatográficas hasta llegar al máximo de extracción en el caso de 60 minutos.

En el caso del flujo de 100 mL/min, se observa que el tiempo de extracción de 30 minutos es el máximo y que al extraer durante 60 minutos, las áreas disminuyen ligeramente, esto puede ser debido a que se haya saturado la disolución captadora de ácido acético y el resto de la metilamina no esté siendo retenida o que el flujo resulte alto para que se solubilice todo el compuesto que está siendo burbujeadado.

Por último, si observamos los resultados a 200 mL/min se alcanza el máximo de extracción de todas las condiciones, durante 30 minutos y con un volumen de aire extraído de 6 L, al duplicar este volumen con este flujo, la recuperación disminuye de nuevo, pudiendo ser debido, como se ha comentado anteriormente, a la saturación de la solución captadora o a un flujo excesivo que no permitiese retener el compuesto.

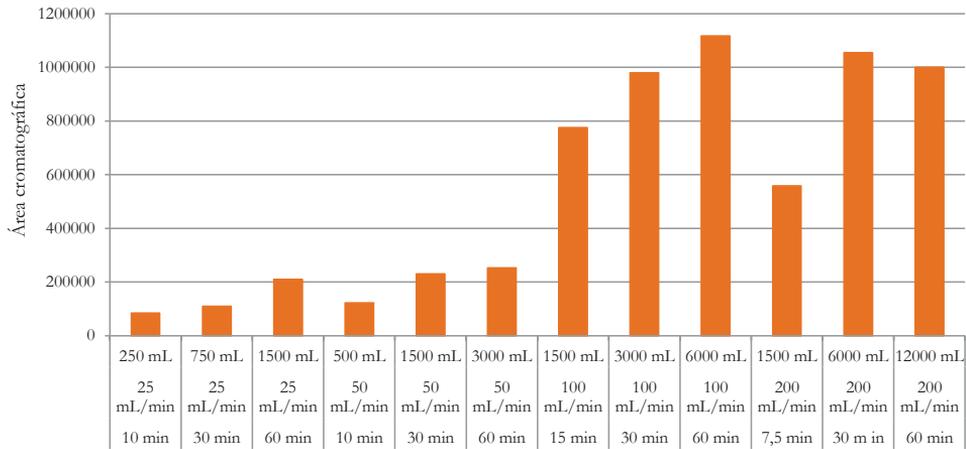


Figura 108: Áreas cromatográficas obtenidas en función de las condiciones de flujo y tiempo de trabajo de la bomba de extracción para la DMA.

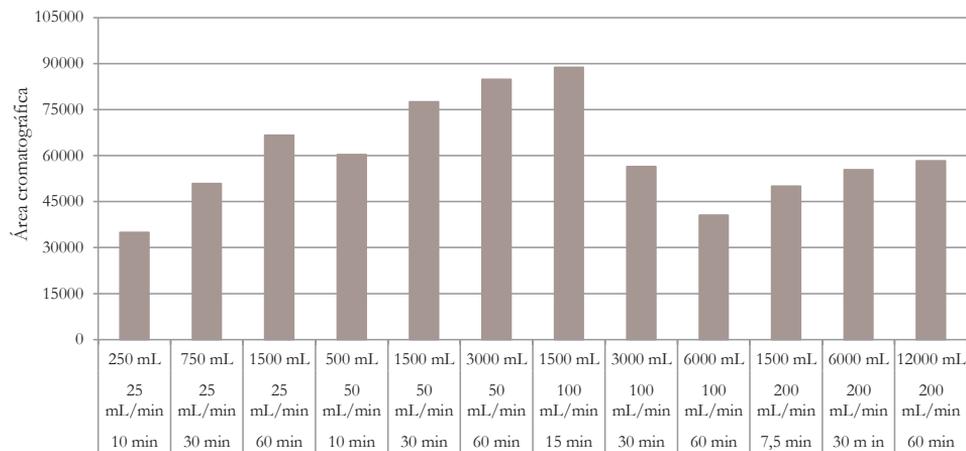


Figura 109: Áreas cromatográficas obtenidas en función de las condiciones de flujo y tiempo de trabajo de la bomba de extracción para la TMA.

Pasando ahora a la dimetilamina (Figura 108), la tendencia creciente se aprecia en los flujos de 25 mL/min, 50 mL/min y 100 mL/min, siendo este último donde se alcanza el máximo de extracción al extraer durante 60 minutos.

Al pasar al flujo de 200 mL/min, el máximo se alcanza con 30 minutos de extracción pero al pasar a 60 minutos de extracción, se aprecia una ligera disminución en las áreas debida a que la solución captadora este saturada de DMA o bien como se ha comentado para la MA, que el flujo resulte muy alto para solubilizar todo el compuesto que está siendo burbujeado. Se puede observar que tanto el flujo como el tiempo son parámetros que influyen en mayor medida en el caso de la DMA que el de la MA.

Por último, en el caso de la TMA (Figura 109), el efecto del flujo es aún más visible. En los dos primeros flujos (25 y 50 mL/min), las áreas cromatográficas aumentan a medida que aumenta el tiempo de extracción.

Al pasar al flujo de 100 mL/min, ocurre justo lo contrario, el máximo se alcanza con el menor tiempo de extracción. Esto es debido a que, como en los anteriores casos, un flujo alto provoca la salida de la amina de la disolución captadora por romper el equilibrio en la disolución. Este hecho se ve incrementado en el caso de la TMA porque esta amina es más volátil que las otras dos, de manera que el efecto es muy visible.

En el caso del flujo de 200 mL/min las áreas aumentan con el tiempo de extracción pero en ningún caso llegan a alcanzar los valores del flujo de 100 mL/min, lo que da más fuerza al argumento que a mayores flujos, el equilibrio se alcanza antes en la disolución captadora y las aminas comienzan a escapar al exterior.

A la vista de los resultados obtenidos con cada amina, se aprecia que los máximos no coinciden para las tres, de manera que se tuvo que tomar la decisión de elegir uno. Para ello se tuvo en cuenta que en este tipo de experimentos la amina que más información aporta es la trimetilamina. Por ello, se seleccionaron las condiciones óptimas para ella. Es importante mencionar que a pesar de que existen otras condiciones en las que se obtienen áreas cromatográficas muy parecidas para este compuesto (30 o 60 min a 50ml/min), se escogió trabajar a 100 mL/min por el menor tiempo necesario (15 min) para alcanzar esas áreas, algo interesante desde el punto de vista metodológico.

En estas condiciones, los resultados para la dimetilamina también eran bastante buenos y para la metilamina eran aceptables (Tabla 25).

Tabla 25: Áreas cromatográficas obtenidas con distintos flujos y tiempos de extracción. En todos los casos las áreas cromatográficas se encontraban por encima del LOQ. Las condiciones óptimas seleccionadas han sido las resaltadas.

Tiempo (min)	Flujo	Volumen total	Área cromatográfica		
			MA	DMA	TMA
10	25 ml/min	250 mL	19220	84878	34971
30	25 ml/min	750 mL	19035	109982	50921
60	25 ml/min	1500 mL	27191	210282	66652
10	50 ml/min	500 mL	18674	121959	60352
30	50 ml/min	1500 mL	25604	230447	77553
60	50 ml/min	3000 mL	34001	253094	84859
15	100 ml/min	1500 mL	24803	775434	88820
30	100 ml/min	3000 mL	34568	980078	56417
60	100 ml/min	6000 mL	32634	1116703	40629
7.5	200 ml/min	1500 mL	23925	557998	50043
30	200 ml/min	6000 mL	49682	1054973	55381
60	200 ml/min	12000 mL	45639	1000512	58301

<sup>1</sup> Condiciones óptimas para TMA

<sup>2</sup> Condiciones óptimas para DMA

<sup>3</sup> Condiciones óptimas para MA

Llegado el momento en que se necesitase mayor sensibilidad para MA o DMA, las condiciones de extracción se podrían modificar para adaptarlas a una mejor extracción.

### 5.3.2.2 -Validación

#### 5.3.2.2.1 -Linealidad y límites de detección

El rango lineal que se consiguió mediante la extracción de disoluciones patrón para las 3 aminas fue de 10-100 ppb. A mayores concentraciones se apreció como las pendientes de las rectas de calibración comenzaron a disminuir. En las figuras 110 -112 se pueden observar los resultados de MA, DMA y TMA, junto a su calibrado externo, donde solo se han representado las rectas de extracción hasta los 50 ppb de concentración para poderlas comparar entre sí, ya que los calibrados externos solo se realizaron hasta esa concentración. En general todas las muestras de atmósferas analizadas tuvieron cabida en este rango lineal y cuando no fue así, se aplicó una dilución en el mismo disolvente para que la muestra pudiese ser analizada.

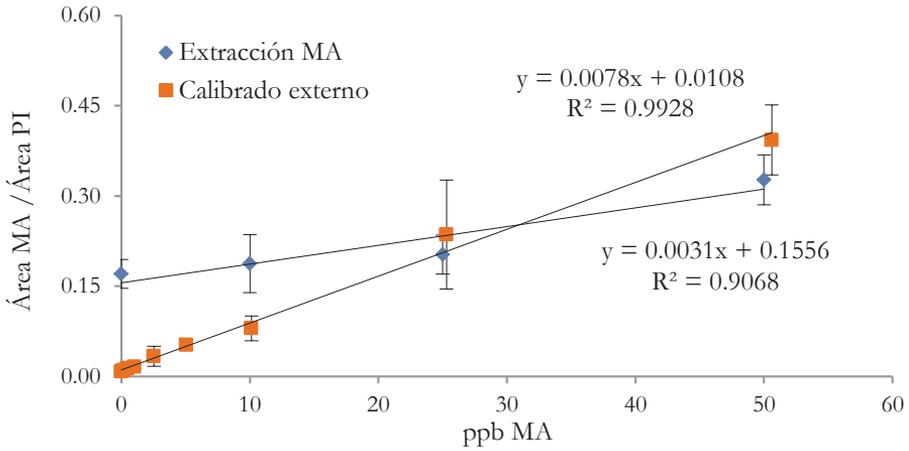


Figura 110: Intervalo de linealidad para la MA.

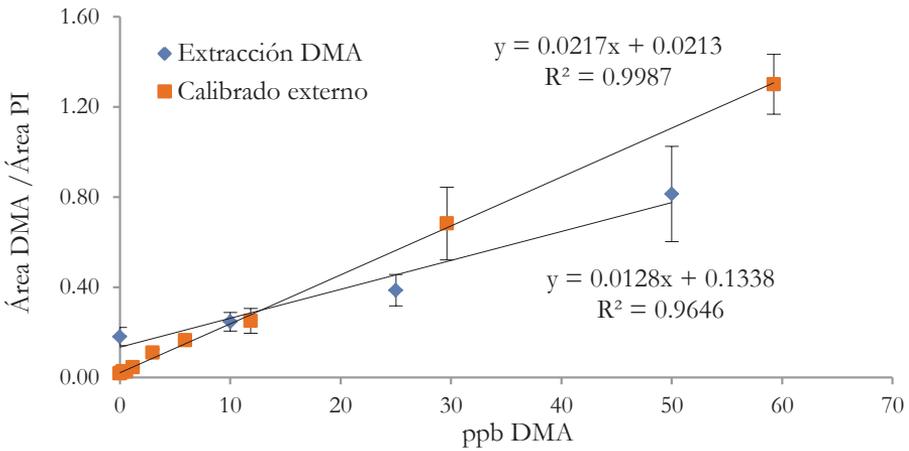


Figura 111: Intervalo de linealidad para la DMA.

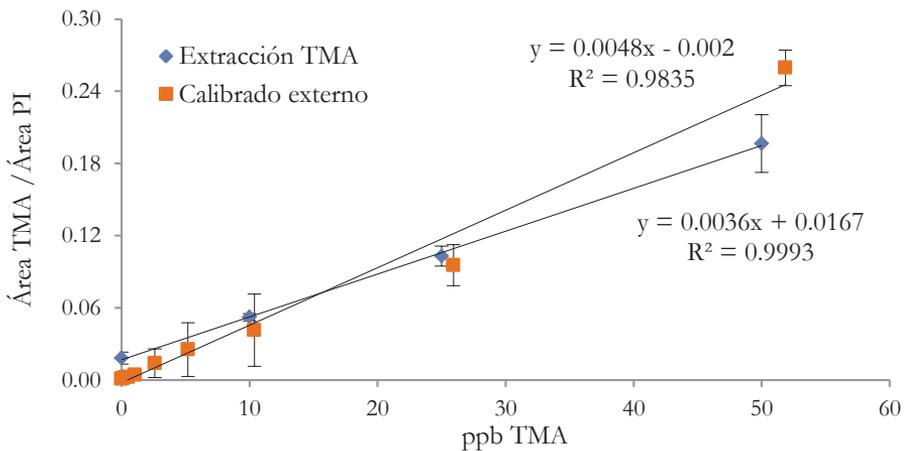


Figura 112: Intervalo de linealidad para la TMA.

En el caso de la MA (Figura 110), se aprecia que las muestras de las extracciones presentan unas concentraciones iniciales más altas que en el calibrado externo. Esto puede ser debido a la presencia de esta amina en el aire del laboratorio o en el agua utilizada. Además, cromatográficamente, el compuesto metilamina-BATB aparece cercano al pico de inyección, por lo que existen más interferencias que en el resto de los compuestos.

En el caso de la DMA (Figura 111) y TMA (Figura 112), se aprecian pendientes más parecidas (aunque ligeramente inferiores) a los calibrados externos.

Los límites de cuantificación alcanzados fueron de 10 ppb para las tres aminas ya que las concentraciones por debajo de este valor dieron resultados estadísticamente iguales a las muestras blanco.

#### 5.3.2.2.2 -Recuperación y repetibilidad

Los porcentajes de recuperación obtenidos para la metilamina variaron del 30% al 67% en los distintos días de experimento, con una media interdía alrededor del 50% (Tabla 26). En el caso de la dimetilamina, estos valores fueron de 45% a 73% con una media interdía del 61%. Por último, la TMA obtuvo los mejores datos de recuperación de los tres compuestos con valores que variaron del 74% al 87% y una media interdía del 78%.

Si prestamos atención a estos datos, observamos que el porcentaje de recuperación aumenta con el tamaño de la amina, es decir, la que menos se recupera es la metilamina y la que más la trimetilamina. Esto está directamente relacionado con sus valores de pKa, que igualmente son decrecientes en función del tamaño molecular. Al tener la TMA el valor de pKa más bajo, es la que menos necesidad tiene de basicificar el medio para escapar a la atmósfera, mientras que las otras dos al pH de trabajo necesitan mayores tiempos de extracción para volatilizarse. También hay que tener en cuenta el hecho de que las condiciones adoptadas definitivamente no son las más adecuadas para la MA y DMA y sí lo son para la TMA, algo que justifica más si cabe los mayores porcentajes de recuperación para este último compuesto.

En cuanto a la repetibilidad, los valores de desviación estándar relativa intradía variaron de 19 a 40% para la MA, de 27 a 38% para la DMA y de 8,5 a 28% para la TMA. Para la desviación estándar relativa interdía se obtuvieron valores de 32, 19 y 8% para la MA, DMA y TMA respectivamente (Tabla 26).

Al realizar el test F para comprobar las diferencias existentes entre los valores interdía e intradía, se puede apreciar que todos los valores F se encuentran por debajo del valor F crítico, algo que

nos indica que no existen diferencias significativas entre las variabilidades observadas dentro de un mismo día y entre varios días.

Tabla 26: Porcentajes de recuperación de la extracción de MA, DMA y TMA, sus desviaciones estándar y estándar relativas.

	%Recuperación <sup>1</sup>		
	MA	DMA	TMA
<b>Media día 1</b>	30,26	45,56	75,13
<b>SD día 1</b>	10,08	13,76	15,68
<b>%DER día 1</b>	33,33	30,21	w20,87
<b>VAR día 1</b>	101,70	189,45	245,72
<b>F día 1</b>	2,28	0,70	0,15
<b>Media día 2</b>	48,83	73,21	74,68
<b>SD día 2</b>	17,08	24,07	21,18
<b>%DER día 2</b>	34,97	32,87	28,37
<b>VAR día 2</b>	291,56	579,21	448,73
<b>F día 2</b>	0,79	0,23	0,08
<b>Media día 3</b>	44,78	64,38	74,58
<b>SD día 3</b>	8,56	17,78	11,25
<b>%DER día 3</b>	19,11	27,62	15,08
<b>VAR día 3</b>	73,19	316,25	126,49
<b>F día 3</b>	3,16	0,42	0,30
<b>Media día 4</b>	67,20	61,27	87,09
<b>SD día 4</b>	27,00	23,18	7,35
<b>%DER día 4</b>	40,17	37,83	8,43
<b>VAR día 4</b>	728,87	537,21	53,95
<b>F día 4</b>	0,32	0,25	0,70
<b>Media interdía</b>	47,77	61,11	77,87
<b>SD interdía</b>	15,21	11,53	6,15
<b>%DER interdía</b>	31,85	18,87	7,90
<b>VAR</b>	231,42	132,94	37,88
<b>F crítico</b>	3,34		

*SD= Desviación estándar; %DER= Desviación estándar relativa; VAR=Varianza; F= test F de Fisher*

<sup>1</sup> *Valores de % de recuperación promedio de todas las concentraciones utilizadas en el rango lineal*

5.3.2.2.3 -Correlación entre músculo y atmósfera

En primer lugar es importante mencionar que el pescado es una matriz alimentaria en la que existe una gran variabilidad tanto intermuestra como intramuestra, es decir, dentro de un mismo individuo, la concentración de aminas volátiles encontradas en filetes o rodajas tomadas de distintas zonas del cuerpo puede variar enormemente. Esto hace que las réplicas intramuestra puedan presentar una gran desviación estándar. Asimismo, individuos pescados el mismo día y en la misma zona, pueden presentar grandes diferencias en sus concentraciones de aminas volátiles, lo que también hará que las réplicas intermuestra puedan presentar desviaciones estándar altas. En el caso de esta tesis, cada chicharro fue utilizado como una muestra, mientras que la merluza fue troceada en 3 partes, cada una de las cuales fue utilizada como si fuese una muestra proveniente de individuos distintos. Esta variabilidad se aprecia en la Figura 113 (merluza) y Figura 114 (chicharro), donde se pueden observar los valores de TMA de las distintas réplicas con la desviación estándar intramuestra así como la media de las tres muestras con la desviación estándar intermuestra.

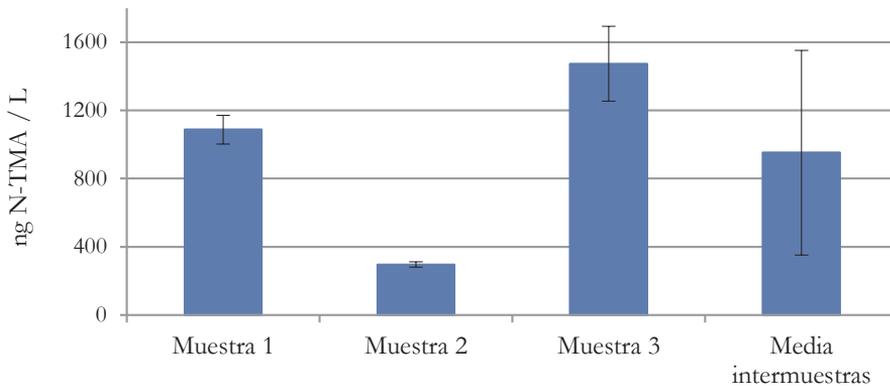


Figura 113: Comparación de la variabilidad intramuestra y la intermuestra en merluza.

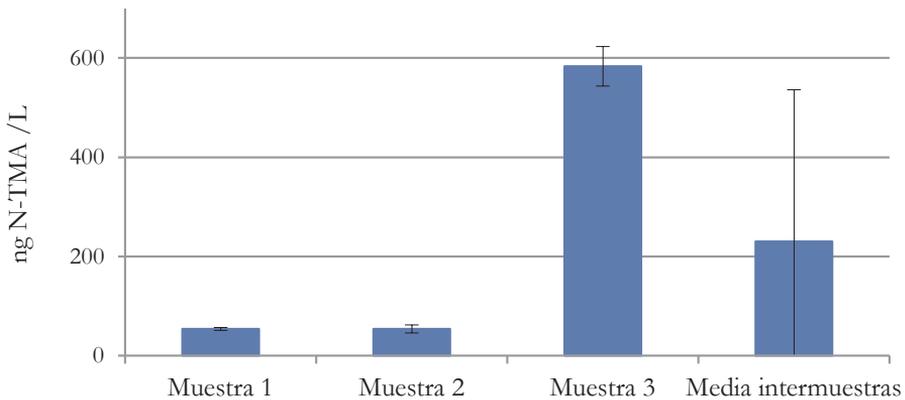


Figura 114: Comparación de la variabilidad intramuestra y la intermuestra en chicharro.

Esto provoca que la variabilidad intermuestra sea mayor que la intramuestra, con lo cual al representar las réplicas de las medidas en el gráfico de correlación (Figura 116), existe una gran dispersión de datos.

A falta de las concentraciones de amoníaco presentes en el pescado y teniendo en cuenta que el aumento en el TVBN durante el almacenamiento de pescado es predominantemente atribuido a la TMA (Howgate, 2010, 2009) (Figura 115) compararemos nuestros resultados con los límites legales establecidos para este índice (350 mg N/kg pescado). Es importante mencionar que el chicharro (*Trachurus trachurus*) pertenece a la familia *Carangidae*, la cual no pertenece a las categorías de especies para las que se fijan valores de TVBN en el reglamento 2074/2005. A pesar de esto hemos querido comparar los datos obtenidos con el chicharro con el mismo límite que se le impone a la merluza.

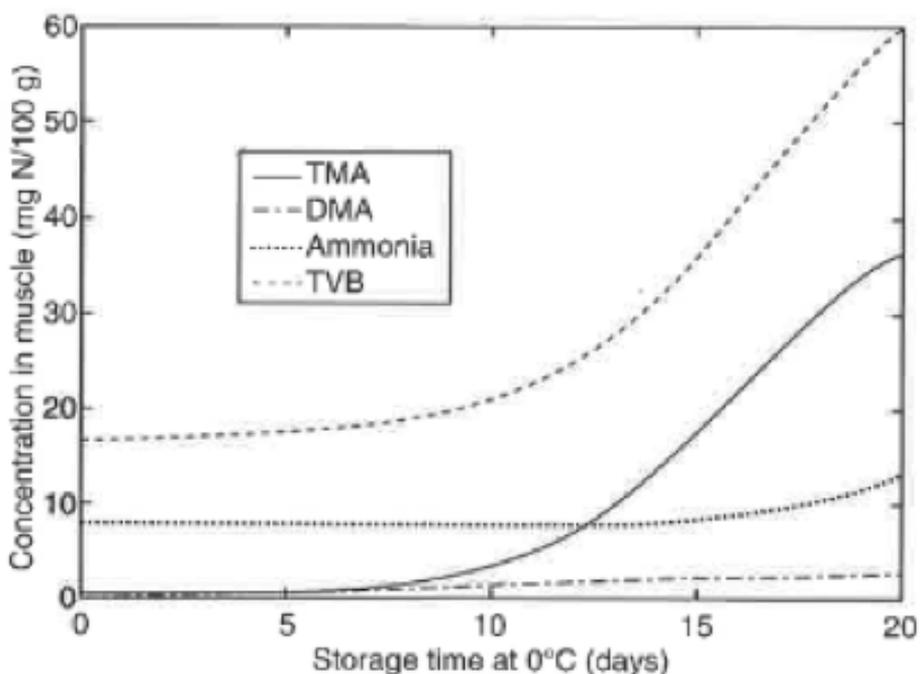


Figura 115: Evolución comparativa del amoníaco, DMA, TMA y TVBN a lo largo de 20 días de almacenamiento de pescados demersales a 0°C. (Tomado de *Traditional methods in Fishery products: Quality, safety and authenticity*, Peter Howgate 2009).

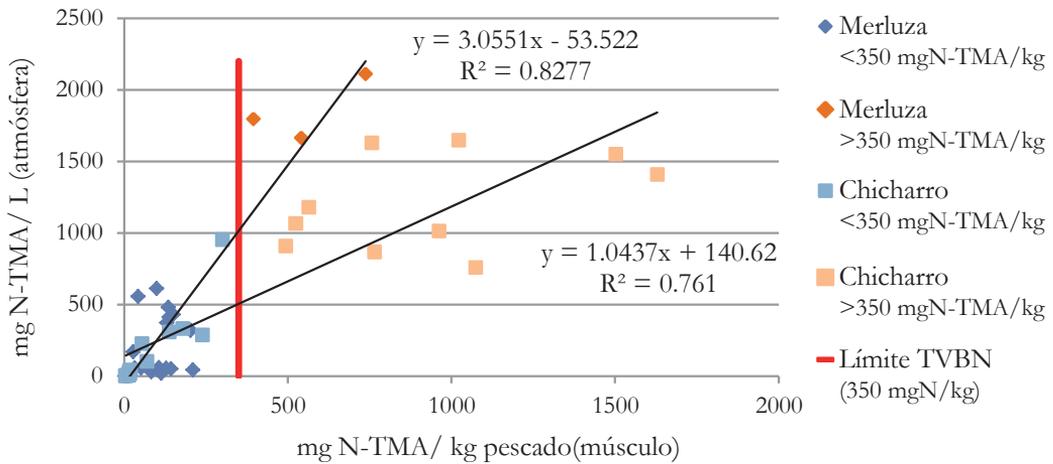


Figura 116: Correlación entre concentraciones de TMA en músculo y la atmósfera.

Atendiendo a la Figura 116, se aprecian tendencias distintas para las 2 especies. En el caso de la merluza se puede concluir que valores de TMA en el músculo superiores al límite del TVBN, es decir 350 mgN-TMA/kg pescado, se corresponden con concentraciones en la atmósfera superiores a los 1000 ng N-TMA/L.

En el caso del chicharro, los valores de músculo superiores al límite TVBN se corresponden con concentraciones en la atmósfera superiores a 500 ng N-TMA/L.

Los datos para llevar a cabo esta correlación se obtuvieron tomando los valores del apartado “vida útil” durante 10 días de almacenamiento a 4°C tanto para chicharro como para merluza.

A pesar de que en ambos casos el  $R^2$  de las rectas de regresión se encuentra por debajo de 0,9, se aprecia una correlación bastante buena, teniendo en cuenta que se trata de muestras reales y que el pescado es una matriz con una gran variabilidad.

### 5.3.2.3 -Vida útil

Una vez demostrada la buena correlación en TMA entre la atmósfera y el músculo, se aplicó esta metodología al análisis de la atmósfera de productos pesqueros envasados durante 10 días de almacenamiento en refrigeración.

En ambos casos (merluza y chicharro) se aprecia que la concentración prácticamente no varía durante los 3 primeros días de análisis, tanto en músculo como en la fase gaseosa

(Figura 117 y Figura 118). En el caso del chicharro (Figura 117) a partir del día 6 alguna de las réplicas ya sobrepasa el límite superior del TVBN a pesar de que el valor medio se encuentra por debajo de este valor. El día 8 ya se supera este valor en el músculo con un valor de 530 mg N-TMA/kg pescado que se corresponde con una concentración de 960 ng N-TMA/L en la atmósfera. Finalmente el día 10 las concentraciones de músculo siguen aumentando llegando a los 969 mg N-TMA/kg pescado pero se aprecia que la concentración en la atmósfera no ha aumentado de manera proporcional, esto podría ser debido a una saturación de la misma.

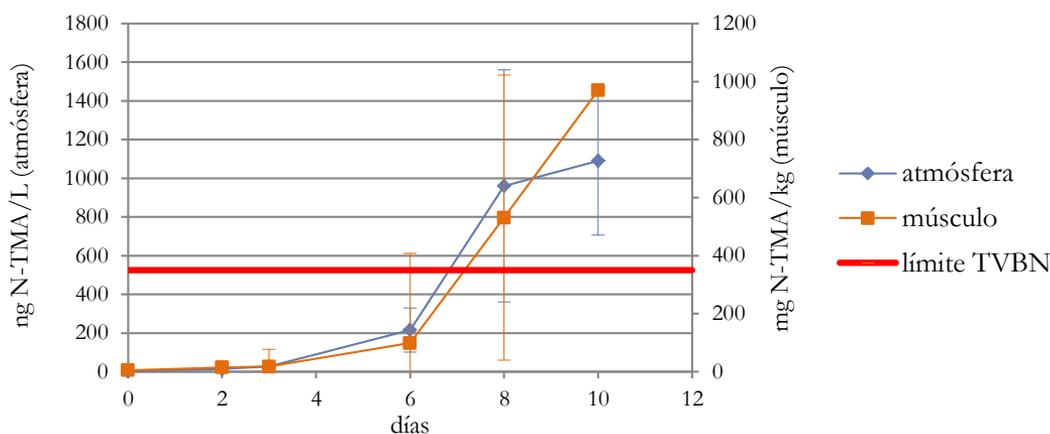


Figura 117: Evolución de la concentración de TMA en el espacio de cabeza de chicharro envasado sin atmósfera modificada a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) durante 10 días.

Las cantidades de TMA observada en estos experimentos son muy superiores a las obtenidas en otros experimentos encontrados en bibliografía. Hay que tener en cuenta que nuestros experimentos han sido llevados a cabo a 4°C, mientras que otros experimentos consultados en bibliografía para esta especie han sido llevados a cabo en hielo, es decir 0°C o bien en atmósfera modificada. Así, en los experimentos llevados a cabo por Aubourg (2001) en hielo, se determinó una concentración de 35 mg TMA-N/kg pescado a día 9 de experimento, y en los llevados a cabo por Mendes et al. (2005) no se superaron los límites de aceptabilidad en relación a la cantidad de TMA (100-150 mg N-TMA/kg pescado) hasta el día 10 de almacenamiento en hielo. Valores similares han sido descritos en otras especies como sardina (Marrakchi et al., 1990; Nunes et al., 1992).

El hecho de que existan pocas referencias sobre este producto es debido a que no presenta un gran interés comercial en general a pesar de que en la CAPV es bastante apreciado.

En el caso de la merluza (Figura 118) se aprecia como la concentración va aumentando con el tiempo de almacenamiento pero en este caso no se alcanza el límite superior del TVBN hasta el día 10, donde el valor medio se sitúa por debajo de este valor, aunque varias de las réplicas presentan valores superiores.

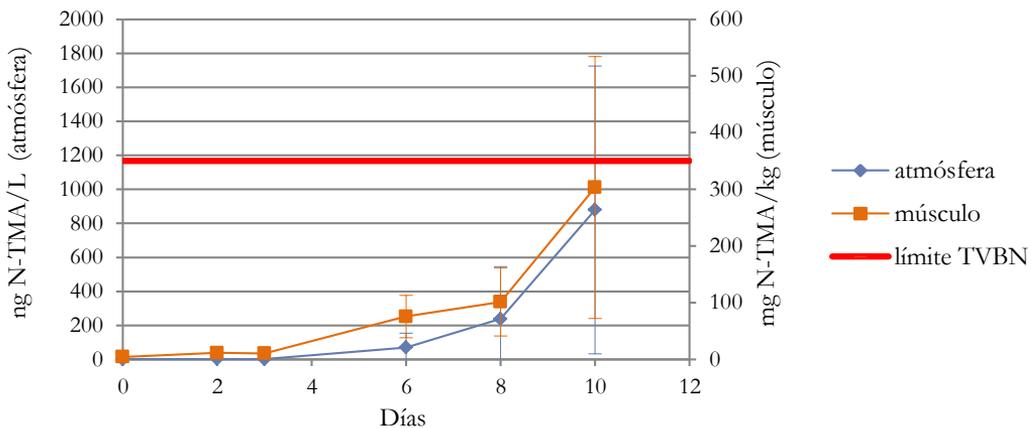


Figura 118: Evolución de la concentración de TMA en el espacio de cabeza de merluza envasada sin atmósfera modificada a lo largo del almacenamiento en refrigeración (4°C) durante 10 días.

Para esta especie, los límites de aceptabilidad que se han comentado previamente de manera general para el pescado (100-150 mg N-TMA/kg pescado) son ligeramente inferiores, siendo de 50 mg N-TMA/kg pescado (Baixas-Nogueras et al., 2003).

Baixas-Nogueras (Baixas-Nogueras et al., 2002) determinó 150 mg N-TMA/kg pescado tras 15 días de almacenamiento del pescado a una temperatura de 6-8°C y el doble, es decir, 300 mg N-TMA/kg pescado a día 29, mientras que almacenado en hielo, este pescado no alcanzó los 50 mg N-TMA/kg pescado hasta los 20 días. Estos valores contrastan ligeramente con los nuestros, donde a día 8 se determinaron 100 mg N-TMA/kg pescado. Asimismo, son inferiores a los determinados por Ruiz-Capillas & Moral, (2001), donde se determinaron 91 mg N-TMA/kg pescado a día 19 en hielo. Valores más similares a los nuestros fueron los que determinaron Orban et al., (2011), donde se alcanzaron los 200 mg N-TMA/kg pescado a día 10 en hielo en un estudio sobre la variabilidad estacional y en función de la talla de los niveles de TMA en la merluza. Asimismo, Pérez-Villarreal & Howgate (1987) determinaron 230 mg N-TMA/kg pescado en merluza tras 14 días de almacenamiento en hielo.

Es importante remarcar que en ambos casos, chicharro y merluza se ha obtenido una buena correlación entre la concentración determinada en el músculo y la presente en la atmósfera del envase del pescado.

Así mismo, a nuestro parecer podría resultar de interés que se regulase la concentración de TMA máxima admisible en el pescado del mismo modo que se reguló el contenido en bases volátiles totales, ya que además el valor de TVBN puede ser pronosticado de manera precisa a partir del valor de TMA mediante la expresión  $TVBN = TMA + c$ , donde  $c$  es la concentración de amoníaco, que varía en función de la especie y que típicamente suele variar entre 60-100 mgN/kg (Howgate, 2009).

### **5.3.3 -EXPERIMENTO 3: ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE TMA EN CHICHARRO ENVASADO PARA DISCRIMINAR ENTRE PESCADO FRESCO Y CONGELADO-DESCONGELADO**

#### **5.3.3.1 -Pescado congelado-descongelado**

Para llevar a cabo este experimento se eligió la temperatura de 15°C por ser el extremo superior del rango de tolerancia de los microorganismos causantes de la formación de TMA a partir de TMAO. Temperaturas superiores quizás permitieran acelerar este proceso, pero también es cierto que se potenciaría el crecimiento de otro tipo de microorganismos, cuyos metabolismos podrían producir sustancias inhibitoras de los organismos de deterioro específicos.

Resultó por tanto muy importante que la temperatura seleccionada (15°C) para las muestras de pescado fuese estable desde el comienzo del experimento y de manera uniforme en toda la muestra. Por ese motivo fue necesario un tratamiento térmico de las muestras que se encontraban a 4°C.

Se testaron varias opciones (Figura 119). Dejando las muestras a temperatura ambiente, el tiempo necesario para que alcanzasen los 15°C desde los 4°C fue prácticamente 3 horas.

Al introducir las muestras en una estufa a 30°C o 40°C este tiempo se redujo a 1 hora aproximadamente y por último introduciendo las muestras en un baño termostatzado a 30°C este tiempo se redujo drásticamente a 5 minutos, por lo que finalmente se eligió esta opción por ser la más rápida.

Para estas pruebas se utilizaron muestras de merluza, que presentan un grosor superior a las de chicharro, de manera que el tiempo necesario para alcanzar la temperatura de 15°C en el interior de la merluza sería más que suficiente para alcanzar dicha temperatura en el interior de una muestra de chicharro.

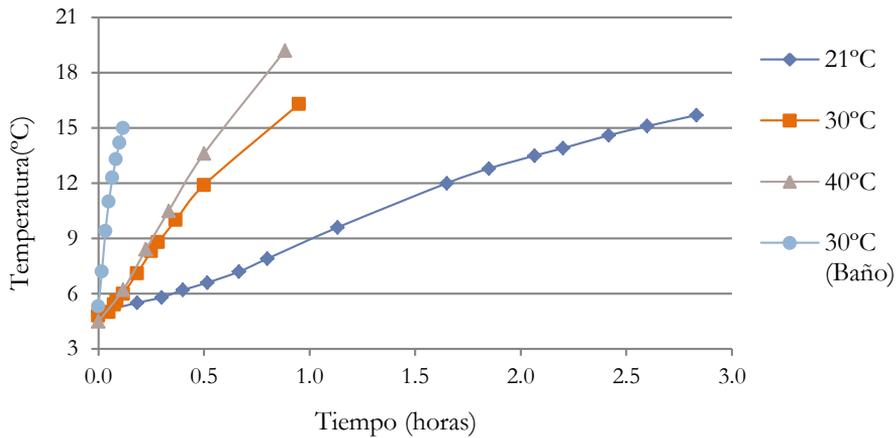


Figura 119: Evolución de la temperatura del músculo de pescado (merluza) expuesto a distintas condiciones térmicas tras ser extraído de una cámara de refrigeración a 4°C.

Como ya se vio en el capítulo anterior, la producción de TMA en el músculo de pescado congelado-descongelado se ve inhibida, por la necesidad de adaptación térmica del metabolismo de los organismos de deterioro específico, así como por la disminución del número de bacterias durante los periodos de congelación (apartado 4.3.4.1 y tabla 22 del capítulo 4).

En este caso se ha forzado ese metabolismo que como ya vimos tarda alrededor de 12 días en producir TMA a 4°C. A pesar de no haber analizado las concentraciones en el músculo, es lógico pensar que el metabolismo a 15°C será más activo que a 4°C, de manera que más cantidad de TMA se volatilizará y quedará atrapada en la atmósfera de la barqueta.

Esta idea es la que permite que, las bacterias presentes en el pescado fresco y que están adaptadas a temperaturas de refrigeración desde que son capturadas, se adapten rápidamente a la temperatura de 15°C y produzcan gran cantidad de TMA. Por otro lado, las bacterias presentes en el pescado congelado-descongelado, vienen de temperaturas de -18°C y tan solo han estado 24 horas a 4°C para su descongelación, con lo que su metabolismo necesitará más tiempo para adaptarse a la temperatura de 15°C.

En este caso (Figura 120) el pescado que se utilizó había permanecido congelado alrededor de 1 año y en tan solo 24 horas forzando su metabolismo a 15°C se apreciaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre fresco y congelado-descongelado. Teniendo en cuenta de nuevo los resultados del capítulo anterior, en los que el pescado que había permanecido congelado durante tan solo 7 días ya presentaba una tendencia de formación de TMA menor, podríamos decir que esas diferencias también serían visibles en la atmósfera de una barqueta, por lo que un pescado congelado tan solo 7 días también podría ser identificado como tal en el caso de presentarse descongelado.

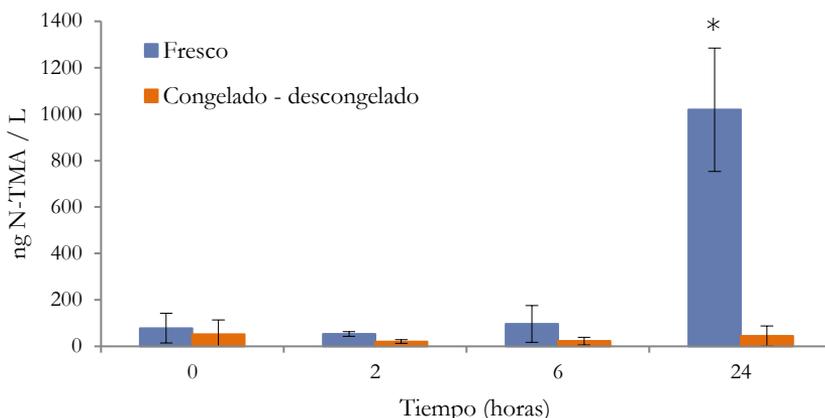


Figura 120: Evolución de la formación de TMA en pescado fresco y congelado-descongelado expuesto a 15°C durante 24 horas. \*Diferencias significativas entre muestra fresco y congelado- descongelado ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.4 -EXPERIMENTO 4: DETERMINACIÓN DE TMA Y ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS/CETONAS EN LAS ATMÓSFERAS DE CALDOS DE CHICHARRO INOCULADOS CON DISTINTAS CEPAS BACTERIANAS

#### 5.3.4.1 -TMA

En las atmósferas de los viales de los caldos de chicharro y con la metodología del ácido pícrico no se detectaron concentraciones de TMA por encima del LOD de la metodología. De nuevo en este caso se repiten las mismas circunstancias que en el apartado 5.3.1.1.

#### 5.3.4.2 -Aldehidos/cetonas

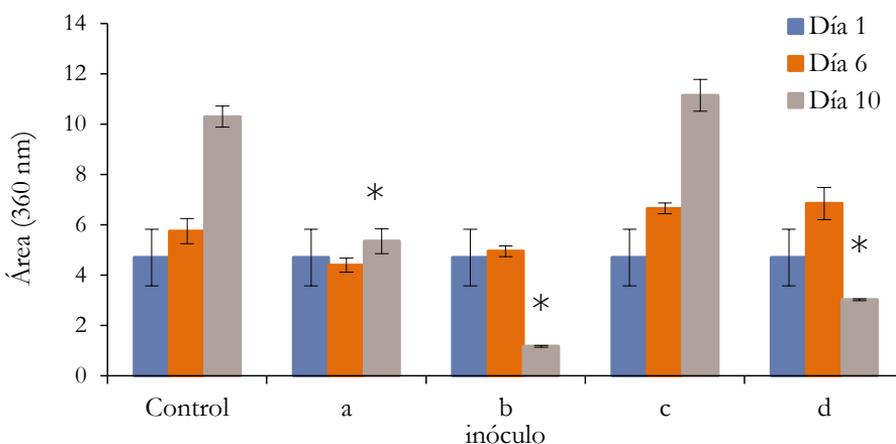


Figura 121: Evolución de la concentración de propanal en el espacio de cabeza de caldo de chicharro en función de los distintos inóculos durante 11 días de almacenamiento en refrigeración. a: *Carnobacterium maltaromaticum*; b: *Serratia proteomaculans*; c: *Shewanella baltica* y d: *Yersinia intermedia*. \*= Diferencias significativas respecto a la muestra control según el test de Dunnett ( $p < 0,05$ ).

En referencia a las atmósferas de los caldos, en cuanto al contenido de aldehídos, tan solo se han detectado concentraciones por encima del LOD para el propanal (Figura 121).

En el caso de acetaldehído, crotonaldehído y butanal, se ha apreciado su presencia pero las grandes diferencias entre réplicas hace imposible apreciar diferentes tendencias.

Y en relación ahora al propanal, y su correlación entre las áreas determinadas en músculo y en las atmósferas de los viales, se aprecia una buena correlación (Figura 122).

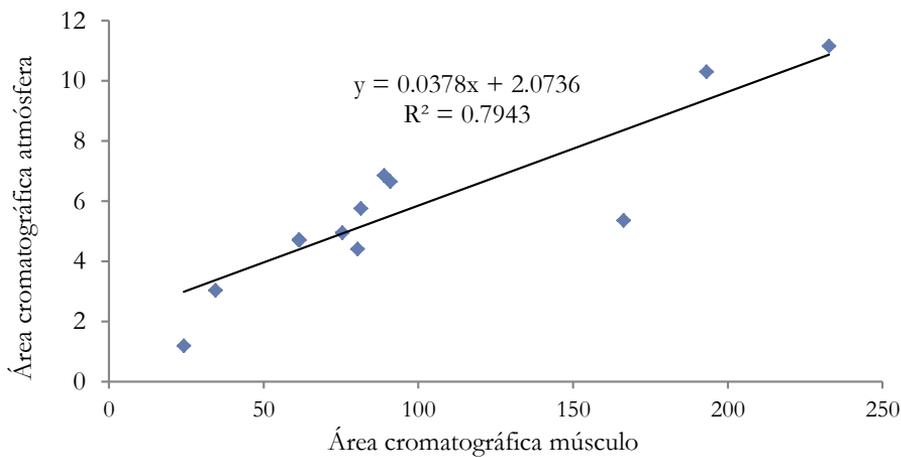


Figura 122: Correlación entre las concentraciones de propanal determinadas en los caldos de pescado y las determinadas en las atmósferas de los mismos.

Como ya se explicó en el capítulo anterior, este compuesto está asociado a la oxidación de los ácidos alfa linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, por lo que no es de extrañar que los valores de las muestras control sean tan elevados y solo sean superados por el inóculo de *S. baltica*. Del mismo modo que en las muestras de músculo se aprecia una disminución en el último día de muestreo en los inóculos de *S. proteamaculans* y *Y. intermedia*, que puede ser debido a la condensación de este compuesto o a su utilización en alguna otra ruta metabólica alternativa.

## 5.4 -Conclusiones

De los experimentos llevados a cabo con dorada entera, fileteada y chicharro, se puede extraer que tanto acetaldehído como butanal podrían resultar marcadores de deterioro interesantes a temperaturas de almacenamiento de entre 6-10°C. A temperaturas inferiores, las concentraciones

alcanzadas no permitirían su uso como biomarcador de deterioro, al menos en tiempos iguales o inferiores a 11 días.

La metodología desarrollada para la captura de aminas volátiles ha permitido alcanzar buenos porcentaje de recuperación ( $\pm 48\%$  para la MA,  $61\%$  para la DMA y  $\pm 78\%$  para la TMA) con disoluciones patrón y con esta metodología se han determinado también las concentraciones de TMA en las atmósferas de muestras reales (chicharro y merluza). Al comparar estos resultados con los obtenidos en el músculo se ha obtenido una buena correlación, por lo que es una metodología muy interesante ya que permite estimar la concentración de TMA en el músculo sin destruirlo.

Solo es necesaria la extracción de 1,5 L de aire del interior de la barqueta a un flujo de 100 mL/min durante 15 min para poder determinar las concentraciones de MA, DMA y TMA.

Otra de las aplicaciones implementadas con la metodología desarrollada es la de poder discriminar entre pescado fresco y pescado que ha sufrido un proceso de congelación y descongelación. Utilizando la temperatura para acelerar el metabolismo de los microorganismos de deterioro específicos, en tan solo 24 horas podemos observar diferencias significativas que permiten discriminar claramente el pescado fresco del congelado-descongelado.

## 5.5 –Bibliografía

- Aubourg, S.P., 2001. Damage detection in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) during chilled storage. J. Am. Oil Chem. Soc. 78, 857–862.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation : Production , Metabolism , and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxid. Med. Cell. Longev. 2014.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2003. Suitability of Volatile Amines as Freshness Indexes for Iced Mediterranean Hake. J. Food Sci. 68, 1607–1610.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, T., Vidal-Carou, M.C., 2002. Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6-8 degrees C) and stored in ice. J. Agric. Food Chem. 50, 6504–10.
- Howgate, P., 2009. Traditional methods, in: Rehbein, H., Oehlenschläger, J. (Eds.), Fishery products: Quality, safety and authenticity. Wiley-Blackwell, pp. 19–41.
- Howgate, P., 2010. A critical review of total volatile bases and trimethylamine as indices of freshness of fish. Part 1. Determination. Electron. J. Environ. Agric. Food Chem. 9, 29–57.
- Marrakchi, A. El, Bennour, M., Bouchriti, N., Hamama, A., Tagafait, A., 1990. Sensory, chemical, and microbiological assessments of moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. J. Food Prot. 53, 600–605.
- Mendes, R., Silva, H.A., Nunes, M.L., Empis, J.M.A., 2005. Effect of low-dose irradiation and refrigeration on the microflora, sensory characteristics and biogenic amines of Atlantic horse mackerel (*trachurus trachurus*). Eur. Food Res. Technol. 221, 329–335.
- Niemelä, O., Parkkila, S., Koll, M., Preedy, V.R., 2002. Generation of protein adducts with malondialdehyde and acetaldehyde in muscles with predominantly type I or type II fibers in rats exposed to ethanol and the acetaldehyde dehydrogenase inhibitor cyanamide. Am. J. Clin. Nutr. 76, 668–74.
- Nunes, M.L., Batista, I., De Campos, R.M., 1992. Physical, chemical and sensory analysis of sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice. J. Sci. Food Agric. 59, 37–43.
- Orban, E., Nevigato, T., Di Lena, G., Masci, M., Casini, I., Caproni, R., Rampacci, M., 2011. Total volatile basic nitrogen and trimethylamine nitrogen levels during ice storage of European hake (*Merluccius merluccius*): A seasonal and size differentiation. Food Chem. 128, 679–682.
- Pérez-Villarreal, B., Howgate, P., 1987. Spoilage of European hake (*Merluccius merluccius*) in ice. J. Sci. Food Agric. 41, 335–350.
- Ruiz-Capillas, C., Moral, A., 2001. Production of Biogenic Amines and Their Potential Use as Quality Control Indices for Hake (*Merluccius merluccius*, L.) Stored in Ice. J. Food Sci. 66, 1030–1032.
- Tuma, D., Hoffman, T., Sorrell, M., 1991. The chemistry of acetaldehyde-protein adducts. Alcohol Alcohol. Suppl. 1, 271–276.

Con los resultados obtenidos en la optimización y validación de la metodología del BATB con patrones y muestras reales de pescado envasado en barqueta se participó con una comunicación oral en el congreso internacional WEFTA 2014: Seafood Science for a changing demand (9-11 Junio 2014. Bilbao).

**TÍTULO:** A novel non-destructive method for the determination of volatile amines from packaged fish

**PONENTE:** Lander Baliño Zuazo

**COAUTOR:** Alejandro Barranco Ibarbia

**AFILIACIÓN:** AZTI-Tecnalia

**RESUMEN:**

Volatile amines coming from the metabolism of fish microflora and/or the activity of some enzymes during post mortem storage are commonly used as fish quality indicators. This work is aimed at the determination of these amines in a single short-time liquid chromatographic analysis improving the main features of existing methodologies.

A novel HPLC-MS-ESI method for the simultaneous analysis of trimethylamine (TMA), dimethylamine (DMA) and methylamine (MA) in the headspace gas from a fish packaged in heat-sealed trays has been optimized and validated in two fish species (hake and atlantic horse mackerel) stored at chilling or freezing temperatures.

A derivatising process with tert-butyl bromoacetate was included to improve the sensitivity. The influence of the pH, incubation temperature, and reaction time were optimized to obtain the maximum yield of the reaction. After derivatization, separation was conducted on an HILIC column with a gradient elution using tetraethyl ammonium chloride as internal standard. Chromatographic and mass detector conditions were optimized with the objective of developing a screening method to detect all amines reacting with the derivatising agent. Adequate sample treatments were optimized for both muscle (destructive method) and gas phase (non destructive method). Good correlations were observed between both type of matrices (muscle and gas).

This methodology was sensible enough to detect these compounds even in good quality fish. In the case of fish muscle extracts the limits of detection were below 0.5 mg-N/kg. When headspace was analyzed, this new methodology was able to measure 10 ng of TMA from the surrounding atmosphere of fish.

This novel multianalyte method provides a rapid and simultaneous determination of some volatile amines at very low concentrations and, as a result, relevant information about the spoilage level of fish along its storage can be extracted.

## Comunicación Oral 1: A novel non-destructive method for a determination of volatile amines from packaged fish

# A novel non-destructive method for the determination of volatile amines from packaged fish

Lander Baliño-Zuazo<sup>1</sup> and Alejandro Barranco<sup>2</sup>

<sup>1</sup>E-mail:landerbz@hotmail.com

<sup>2</sup>E-mail: abarranco@azti.es

44<sup>th</sup> WEFTA Meeting  
Bilbao. June 9-11. 2014



## Contents

1. Introduction
  - Fish spoilage
  - Volatile amines
2. Objectives
3. Methodology
4. Results
  - Extraction validation
  - Correlation with fish muscle
  - Applications
    - Shelf life
    - Frozen-thawed samples
5. Conclusions



## Fish spoilage

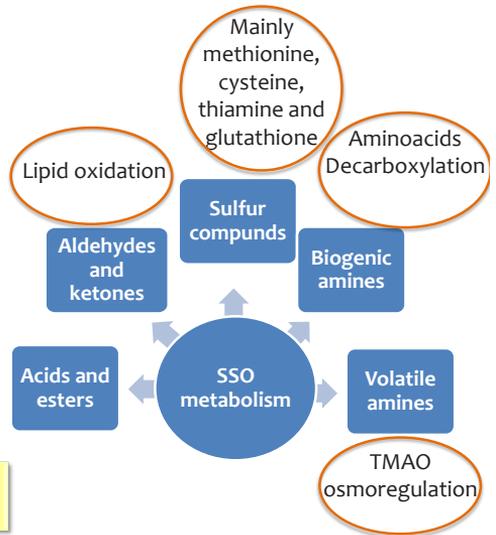
INTRODUCTION



- Very perishable
- Rapid spoilage
- Bacterial activity → **SSQ** → **OFF ODDOURS**  
**OFF FLAVOURS**



**Consumer rejection**



## Volatile amines

INTRODUCTION

**TVBN**  
Total Volatile Base Nitrogen\*

\*European EC (EC) No 2074/2005  
(20-35mg N / 100g fish)



**AMMONIA**

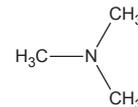
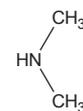


**VOLATILE AMINES**

Methylamine

Dimethylamine

**Trimethylamine**



**Increase of TVBN during chilling storage ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ) is predominantly due to TMA**

## Objectives

- Development of a **non destructive method** to determine the **TMA, DMA and MA** content in the **headspace of packaged fish**.
- **Correlate** the concentrations of the **headspace with the muscle** of the fish.
- Determination of the **shelf life of hake and atlantic horse mackerel** with this new methodology
- Use this method **to detect the fraud** of selling **frozen-thawed fish** instead of **fresh fish**.



## Derivatization process

METHODOLOGY

### Extracts

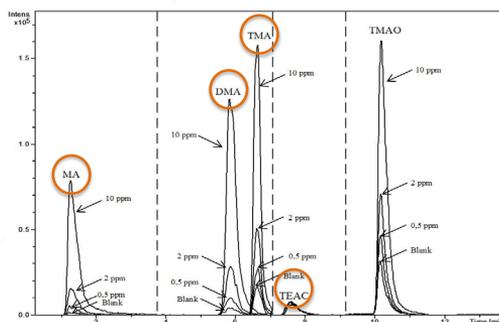
- Fish muscle
- Gas phase

### Derivatization

- Sample dilution
- TBBA (tertbutyl bromoacetate)
- TEAC (Tetraethylammonium chloride)
- Conditions:
  - pH: 8
  - Temperature: 60°C
  - Time: 60'
- Stop reaction: formic acid

### HPLC-MS

- HILIC column (30°C)
- Mobile phase
  - A: 100% H<sub>2</sub>O
  - B: 97%ACN:3%H<sub>2</sub>O
  - 5mM NH<sub>4</sub> acetate
- Inj volume: 3µL



## Extracts

METHODOLOGY



## Fish packaging and sampling

METHODOLOGY



### PACKAGING

- Trays: LINPAC 15-45 PS-EVOH-PET
- Film: LINPAC Lintop 80 (PA/PE)
- No vacuum
- Sealing temperature: 155°C

### FROZEN THAWED SAMPLES

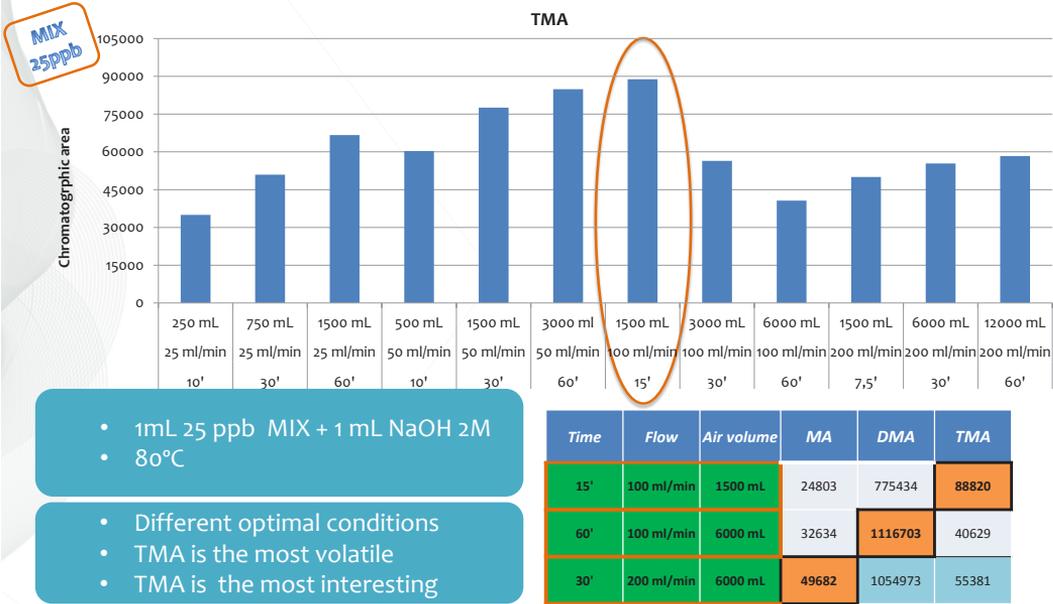
- Package fresh and frozen – thawed fish.
- 15°C during 24h
- Force SSO grow
- Sampling

### SAMPLING

- 2' extraction
- 2nd air entry (septum)
- 13' extraction
- pH adjustment and derivatization

## Volatile extraction optimization

RESULTS

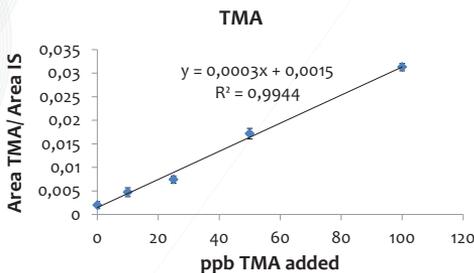


## Volatile extraction optimization

RESULTS

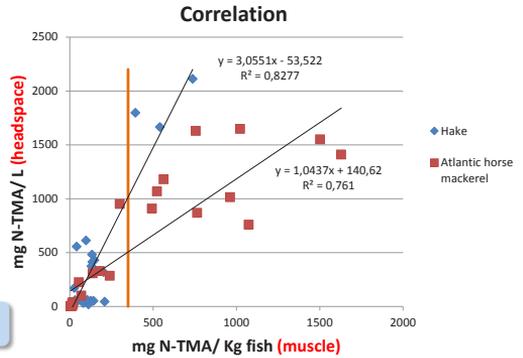
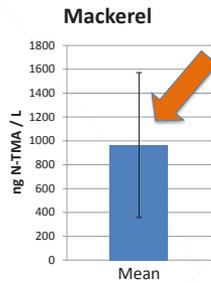
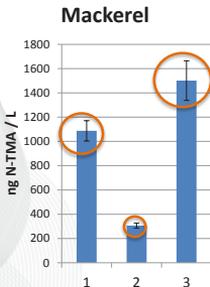
- Linear range: 10-100 ppb
- LOD: 10 ppb. <10ppb= blank
- %recovery
  - MA: ±50%
  - DMA: ±60%
  - TMA: ±75%
  - TMA>DMA>MA → Volatility
- Repeatability: interday **TMA %RSD: 7.90**

	%Recovery		
	MA	DMA	TMA
mean Day 1	30.3	45.6	75.1
SD Day 1	10.1	13.8	15.7
mean Day 2	48.8	73.2	74.7
SD Day 2	17.1	24.1	21.2
mean Day 3	44.8	64.4	74.6
SD Day 3	8.6	17.8	11.2
mean Day 4	67.2	61.3	87.1
SD Day 4	27.0	23.2	7.3
<b>Interday mean</b>	<b>47.8</b>	<b>61.1</b>	<b>77.9</b>
<b>interday SD</b>	<b>15.2</b>	<b>11.5</b>	<b>6.2</b>

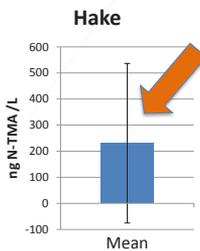
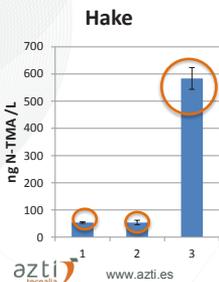


## Correlation with fish muscle

RESULTS



Intersample variability > intrasample variability



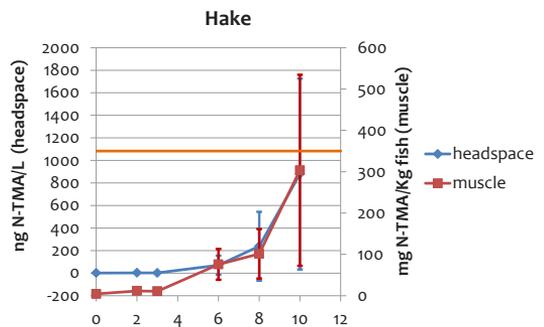
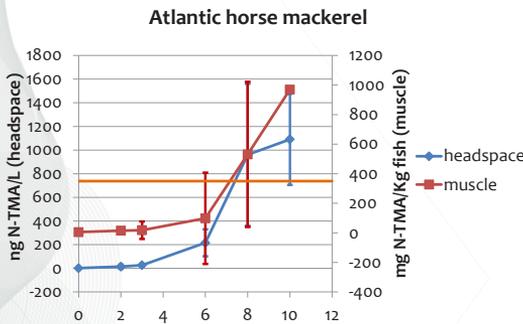
- **Mackerel**
  - Muscle > 350 mg N-TMA/Kg
  - Gas phase > 500 ng N-TMA/L
- **Hake**
  - Muscle > 350 mg N-TMA/Kg
  - Gas phase > 1000 ng N-TMA/L

azti  
tecnología  
www.azti.es

11

## Shelf life

RESULTS



- **Atlantic horse mackerel**
- 3 samples in triplicate
- Day 8: > TVBN limit (350mg N/ Kg fish)
- Muscle: mean 530mg N-TMA/Kg fish
- Gas phase: 960 ng N-TMA /L air
- Day 6: high content of TMA

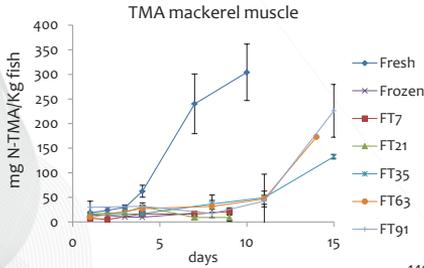
SAMPLE REJECTION

- **Hake**
- 3 samples in triplicate
- Day 10: ≈ TVBN limit (350mg N/Kg fish)
- Muscle: mean 303 mg N-TMA/Kg fish
- Gas phase: 879 ng N-TMA /L air

SAMPLE REJECTION

## Frozen-thawed samples

RESULTS

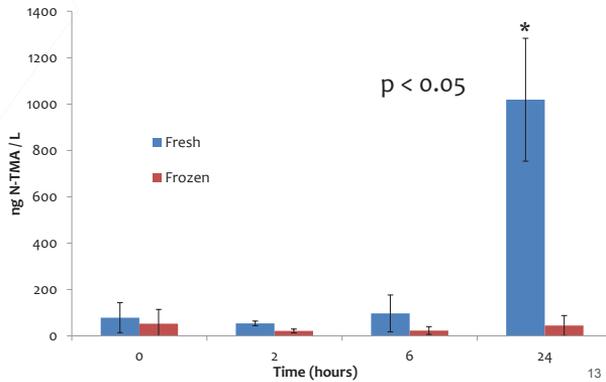


### TMA in Frozen-thawed fish

- Inhibited
- SSO metabolism
  - Thermal adaptation
- 7 days frozen storage → effect in muscle

### Forcing metabolism

- 15°C
- Spoilage acceleration
- 24h → significant differences



azti tecnalia www.azti.es

## Conclusions and future work

### Conclusions:

- Good correlation between muscle and headspace despite the high intersample variability.
- Development of a non destructive method.
- Detection of the fraud of selling frozen-thawed fish instead of fresh fish

### Future work:

- Test the influence of the MAP in the determination of the volatile amines in gas phase.
- Test the minimum days necessary in frozen storage to determine the fraud as well as the minimum time necessary to force the SSO metabolism at 15°C.
- Develop new sensors to make online detection systems and avoid the use of HPLC.

azti tecnalia www.azti.es

14

## Acknowledgements

Basque Country Government



AZTI -Tecnalia



azti  
tecnalia [www.azti.es](http://www.azti.es)

15

# Thanks for your attention



[www.azti.es](http://www.azti.es) | [www.alimentatec.com](http://www.alimentatec.com) | [www.itsasnet.com](http://www.itsasnet.com)  
T. +34 94 657 40 00

Txatxarramendi ugarteia z/g  
48395 Sukarrieta. Bizkaia

Herrera Kaia. Portualdea z/g  
20110 Pasaia. Gipuzkoa

Astondo Bidea. Edificio 609  
Parque Tecnológico de Bizkaia  
48160 Derio. Bizkaia



CAPÍTULO

6

DESARROLLO DE POLÍMEROS  
DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIPS)  
PARA LA DETERMINACIÓN  
DE AMINAS VOLÁTILES



## 6.1 -Introducción

El objetivo principal de este capítulo es el desarrollo de un sensor basado en polímeros de impresión molecular para la detección de aminas volátiles mediante una determinación colorimétrica o fluorimétrica. Para llevar a cabo ese objetivo, primeramente se eligieron los componentes para la síntesis de los MIPS, más en concreto los monómeros. Con este fin se estudió el efecto de las aminas volátiles sobre la señal de fluorescencia de distintos fluoróforos. Estos fueron seleccionados pensando en la disponibilidad comercial de derivados polimerizables estructuralmente muy similares que formasen parte del entramado polimérico y permitiesen apreciar diferencias colorimétricas o fluorimétricas en base a la interacción que tuviese el material sintetizado con la amina volátil en cuestión. A continuación se detalla el proceso de síntesis, tamizado y lavado de los materiales, así como un estudio de afinidad de los materiales sintetizados para la determinación de la TMA.

### ***Experimento 1: Efecto de las aminas volátiles sobre la señal fluorescencia de compuestos.***

Es conocido el hecho de que determinadas sustancias producen un efecto inhibitorio en la señal de fluorescencia de ciertos fluoróforos. Aprovechando este hecho se quiso buscar el efecto que podrían tener las aminas volátiles dimetilamina y trimetilamina sobre la señal de fluorescencia de ciertas sustancias para posteriormente utilizar un derivado polimerizable como base de la síntesis del polímero.

### ***Experimento 2: Síntesis, tamizado y lavado de los materiales poliméricos con los monómeros seleccionados, así como estado del acetonitrilo y metanol como medio de reacción para el método BATB.***

Una vez seleccionados los monómeros, disolventes y el resto de componentes de los polímeros, se continuó con el proceso de síntesis en condiciones de ausencia de  $O_2$  y a  $60^\circ C$  overnight. Después el material fue secado para evaporar los restos de disolvente y se procedió al triturado y tamizado para separar por tamaño de partícula. Del mismo modo, se comprobó que la reacción de derivatización con el BATB tuviese lugar en MeOH y MeOH:  $H_2O$  (medios a estudiar durante la evaluación del mecanismo de reconocimiento del MIP)

### ***Experimento 3: Estudio de la afinidad de los materiales sintetizados frente a la TMA.***

Por último, se estudió la afinidad de los materiales sintetizados una vez limpios para determinar las constantes de afinidad por la TMA de tanto el material imprimado (MIP) como del material blanco (NIP).

## 6.2 -Materiales y métodos

### 6.2.1 -ENSAYOS DE ALTERACIÓN DE LA SEÑAL DE FLUORESCENCIA DE DISTINTOS FLUORÓFOROS (EXPERIMENTO 1)

Previamente a la síntesis de los polímeros de impresión molecular se llevó a cabo un estudio para observar la influencia de la presencia de la trimetilamina, dimetilamina o trietilamina en la señal de fluorescencia de determinados cromóforos o sustancias que presentasen fluorescencia. Las sustancias utilizadas fueron naftaleno, azul de metileno, tionina, proflavina, naranja de acridina y diclorofluoresceína. La diclorofluoresceína fue seleccionada por ser un reactivo fluorescente ampliamente utilizado y se pensó que era un buen punto por el que comenzar a determinar si podía existir un efecto de las aminas sobre su señal. El resto de los fluoróforos a excepción del naftaleno se seleccionaron por la existencia de monómeros funcionales estructuralmente similares disponibles de forma comercial, ya que se descartó la posibilidad de sintetizar un monómero específico.

Para ello primero se estudiaron los espectros de excitación y emisión de dichas moléculas con la ayuda de un cromatógrafo de fluorescencia Agilent 1200series equipado con desgasificador, bomba cuaternaria, inyector automático, horno de columna y un detector DAD acoplado a un detector FLD. En este caso no se utilizó columna cromatográfica, se trabajó en inyección en flujo y en modo isocrático utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>O con un 0,00025% de MeOH en el caso del naftaleno y MeOH con un 0,5% de H<sub>2</sub>O en el caso de los otros fluoróforos testados. Se trabajó a un flujo de 0,5 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL.

Asimismo para la diclorofluoresceína se realizó un experimento en un lector de placas con medida de fluorescencia, para ello se utilizaron placas de 96 pocillos. En este caso el rango de concentraciones de fluoresceína utilizadas fue de 0,01-10 µM y el rango de concentraciones de TMA fue de 5 ppb-1 ppm.

Los stocks de naftaleno y diclorofluoresceína se prepararon en metanol y posteriormente se diluyeron en agua para alcanzar la concentración deseada. Por el contrario los stocks del resto de los fluoróforos se prepararon en metanol.

### 6.2.2 -SÍNTESIS DE LOS MATERIALES POLIMÉRICOS (EXPERIMENTO 2)

Para la síntesis de los materiales poliméricos se utilizaron los monómeros 2-vinilnaftaleno (2VN) y N-vinilcarbazol (NVC), a modo de agente reticulante se utilizó el etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) y como molécula iniciadora se utilizó el azobisisobutironitrilo (AIBN). A modo de disolvente se utilizaron el MeCN, MeOH y una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O 9:1. La molécula molde

que se utilizó fue la trimetilamina y los materiales no improntados fueron fabricados del mismo modo pero sin la presencia de la molécula molde.

Una vez pesados todos los compuestos se disolvieron en el disolvente que correspondiese, a lo que se añadió el agente reticulante, se comprobó que todos los compuestos estuviesen bien disueltos y se cerraron los tubos con tapones con septum y se realizaron varios ciclos de Ar/Vacío para eliminar el oxígeno presente en la premezcla, ya que inhibe la polimerización. Tras este paso, permanecieron en una estufa a 60°C durante toda la noche para que se formase el bloque de polímero.

### 6.2.3 -TAMIZADO Y LIMPIEZA MATERIALES (EXPERIMENTO 2)

Una vez los bloques fueron sacados de la estufa, se rompieron los viales en que se habían sintetizado y con la ayuda de un molino de bolas MM 400 (Retsch, Alemania) se trituran los bloques para conseguir las partículas que posteriormente fueron tamizadas y separadas según su tamaño de partícula. Se utilizaron tamices de 100  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$ .

Para eliminar la molécula molde utilizada y poder llevar a cabo ensayos de afinidad del material sintetizado se tomaron 350 mg del material y se realizaron lavados seriados con 10 mL de MeCN o MeOH en el baño de ultrasonidos (1 hora) para facilitar así la liberación de la trimetilamina. Entre los lavados se centrifugaban los tubos para sedimentar todo el polímero y tomar alícuotas para posteriormente analizarlas y determinar la concentración de trimetilamina presente. Se realizaron cinco lavados con el disolvente de síntesis y posteriormente se llevaron a cabo lavados con NaOH 1M para favorecer la volatilización de la TMA que todavía no se hubiese eliminado del material. Tras estos lavados se volvió a realizar un lavado con el disolvente de síntesis para comprobar si existía algún resto de TMA todavía en el material.

### 6.2.4 -REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA (EXPERIMENTO 2)

Para llevar a cabo la derivatización de los extractos de acetonitrilo se modificó el protocolo utilizado en el capítulo 3 con el bromoacetato de tertbutilo. Se tomaron 250  $\mu\text{L}$  del extracto en MeCN y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de una mezcla MeCN:H<sub>2</sub>O (77% H<sub>2</sub>O/8% ácido acético 7 mM/15% MeCN) a la que se añadió el patrón interno (TEAC). Se añadió el tampón carbonato (20  $\mu\text{L}$ ) 0.5 M para alcanzar el pH 8 y se añadió 1 mL del agente derivatizante disuelto en MeCN en una concentración de 5 mg/mL.

A continuación se introdujeron las muestras en un baño termostático a 60°C durante 1 hora y posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 5M para parar la reacción y encapsular el contenido de los viales para su posterior análisis mediante HPLC-MS.

En el caso de los polímeros sintetizados en MeOH, primeramente se verificó que la reacción pudiese llevarse a cabo utilizando MeOH en lugar de ACN con disoluciones patrón.

Las condiciones para la separación y el análisis de espectrometría de masas son las mismas que se explicaron en el apartado 5.2.2.1.

### **6.2.5 - ENSAYO DE AFINIDAD (EXPERIMENTO 3)**

Una vez se obtuvo un material libre de trimetilamina, se comenzó con el ensayo de afinidad para determinar las constantes de afinidad y la capacidad del polímero y comprobar si se había generado una unión específica o inespecífica.

Para ello se pusieron en contacto 10 mg de polímero con 1 mL de distintas concentraciones de trimetilamina (5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 500 ppb y 1000 ppb) más muestra blanco, todo ello por triplicado en el disolvente en que han sido fabricados los polímeros en un vial eppendorf, se agitaron en un vórtex y se mantuvieron en un agitador orbital durante toda la noche para facilitar la interacción de la TMA con los sitios activos del polímero. Con las disoluciones stock utilizadas se siguió el mismo proceso en ausencia del polímero, para comprobar si existía alguna pérdida por evaporación o por migración al plástico.

Al día siguiente se centrifugaron los viales para decantar el polímero y se analizaron los sobrenadantes con la dilución pertinente utilizando la metodología previamente explicada.

## **6.3 - Resultados**

### **6.3.1 - EXPERIMENTO 1: INFLUENCIA DE LAS AMINAS EN LA SEÑAL DE FLUORESCENCIA**

#### **6.3.1.1 - Diclorofluoresceína**

Primero se comprobó que la linealidad de la fluorescencia de la diclorofluoresceína permitía trabajar en el rango de 0,001  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$  manteniendo la linealidad, como puede apreciarse en la Figura 123.

Tras la lectura de las placas, se apreció que la TMA no tenía ningún efecto en la señal de emisión a las distintas concentraciones testadas de TMA y diclorofluoresceína. En ningún caso se apreció que la intensidad de la fluorescencia aumentase o disminuyese y tampoco se apreció que hubiese cambios en los máximos de emisión de la molécula (Figura 124). Estos experimentos se llevaron a cabo partiendo de un stock de diclorofluoresceína en metanol llevando a cabo las diluciones necesarias en

agua. La TMA se encontraba disuelta en agua y la medida se llevó a cabo tras la adición de la TMA a los pocillos añadiendo un paso de agitación de la placa previo a la medida de la señal. De este modo las concentraciones de metanol en los pocillos variaron de 0,00005% a 0,005%.

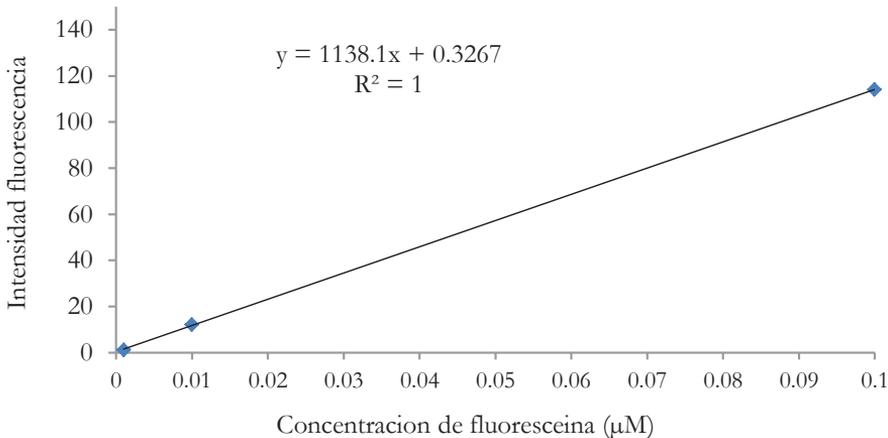
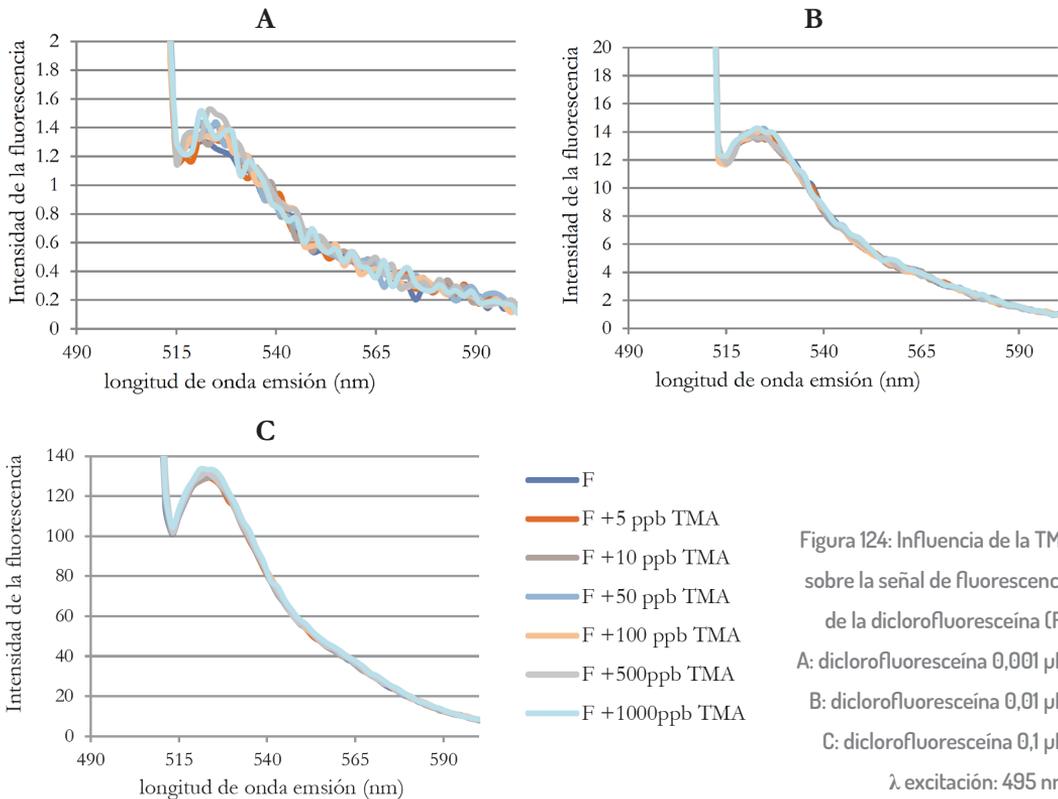


Figura 123: Calibrado de diclorofluoresceína de 0,001 µM a 0,1 µM. λ excitación: 495 nm. λ emisión: 527 nm.



A pesar de no entrar en el rango de linealidad, también se hicieron pruebas con concentraciones mayores, llegando a trabajar con disoluciones a 1 mM de diclorofluoresceína. Aun así, en ninguno de los casos se observó que la presencia de la TMA tuviese efecto alguno en la señal de fluorescencia.

### 6.3.1.2 -Naftaleno

En el caso del naftaleno (1 μM), se observó que la señal no era estable en el tiempo. Es decir, la primera medida que se tomaba transcurridos 10 minutos desde que se ponía en contacto el naftaleno con la amina, disminuía considerablemente pasadas aproximadamente unas dos horas. Este hecho también tenía lugar en ausencia de la amina. A pesar de esta inestabilidad, se apreció que la presencia de la amina tenía un efecto contrario al esperado, estas aminas potenciaron la señal de fluorescencia (Figura 125).

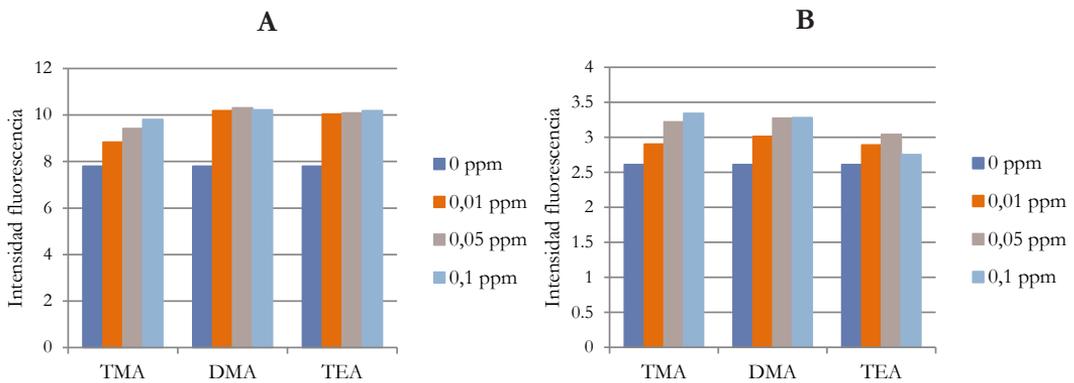


Figura 125: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del naftaleno (1 μM) pH neutro. λ excitación: 273 nm y λ emisión: 333 nm. A: tiempo de contacto 10 min. B: tiempo de contacto 2 horas.

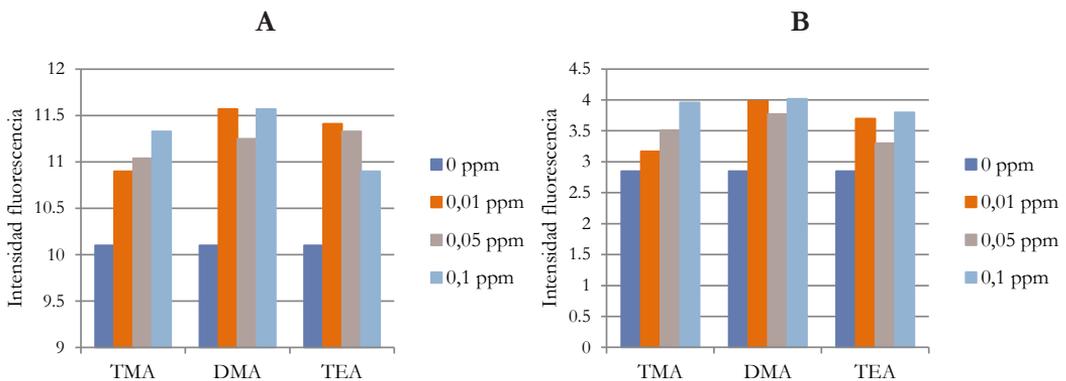


Figura 126: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del naftaleno (1 μM) pH ácido. λ excitación: 273 nm y λ emisión: 333 nm. A: tiempo de contacto 10 min. B: tiempo de contacto 2 horas.

Así mismo se llevó a cabo el mismo experimento acidificando el medio con ácido acético (Figura 126). El resultado mostró que los valores iniciales de fluorescencia fueron mayores que en el caso de no acidificar el medio, pero de nuevo, transcurridas las dos horas la señal disminuyó a niveles muy parecidos a los que se alcanzaron sin acidificar el medio. En ambos casos, a pH neutro y pH ácido, los valores fueron similares pero en el caso del pH ácido las diferencias fueron ligeramente mayores.

Estos resultados contrastan con otros estudios en los que la señal de fluorescencia del naftaleno se encuentra inhibida por la presencia de aminas alifáticas en general (Goodpaster & McGuffin, 2000) o la trietilamina (Oh & Shirota, 1995). En ambos casos, las pruebas están hechas en disolventes orgánicos y no en agua como en el caso de los experimentos de esta tesis ya que los extractos de pescado se obtienen con disoluciones acuosas ácidas.

### 6.3.1.3 -Azul de metileno

En el caso del azul de metileno se trabajó con el cromatógrafo y se analizó por un lado la señal DAD y por otro la señal de fluorescencia. Las concentraciones utilizadas fueron distintas en cada caso. Para la señal DAD fue suficiente con una concentración de 0,5  $\mu\text{M}$  mientras que en el caso de la fluorescencia, la señal resultó tan débil que fue necesario aumentar la concentración hasta 10  $\mu\text{M}$  (Figura 127).

En el caso de la señal DAD no se apreció ningún cambio entre la muestra de blanco de fluoróforo (al igual que en el apartado 3.5.3 del capítulo 3) y las que se les habían añadido distintas concentraciones de alguna amina. Fue en el caso de la fluorescencia donde se apreció un descenso en la señal únicamente en el caso de añadir TEA.

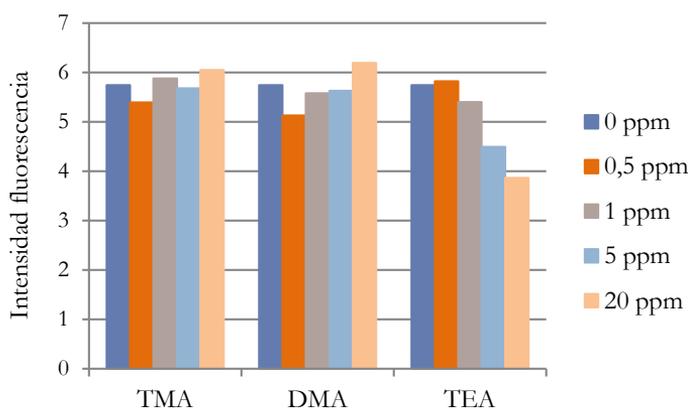


Figura 127: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del azul de metileno (10  $\mu\text{M}$ ) en MeOH.  $\lambda$  excitación: 655 nm y  $\lambda$  emisión: 662 nm.

### 6.3.14 -Tionina

En el caso de la tionina, no se apreció un comportamiento asociado a la concentración de la amina y en el único caso que se observó un descenso de la intensidad fue en el caso de la trietilamina en la concentración más alta (10 ppm) (Figura 128).

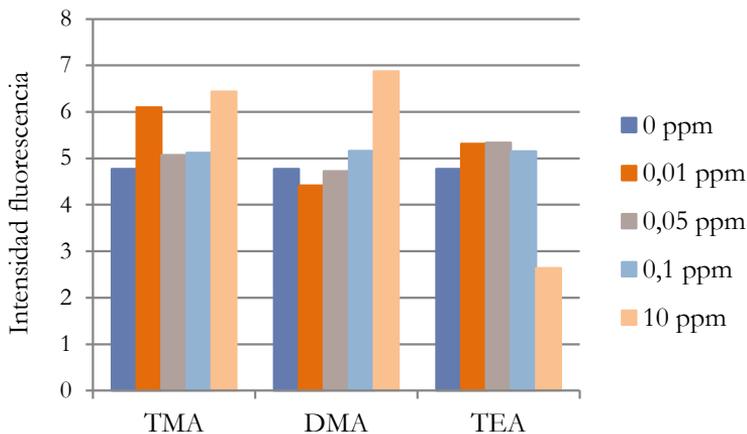


Figura 128: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del azul de la tionina (1 µM) en MeOH. λ excitación: 600 nm y λ emisión: 615 nm.

### 6.3.15 -Proflavina

La proflavina presentó un comportamiento muy irregular y no se pudo extraer ninguna conclusión de los datos gráficos obtenidos (Figura 129).

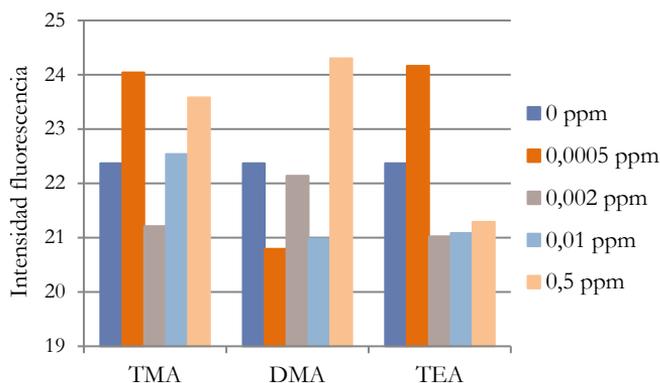


Figura 129: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia de la proflavina (0,05 µM) en MeOH. λ excitación: 465 nm y λ emisión: 500 nm.

### 6.3.1.6 -Naranja de acridina

En cuanto al naranja de acridina, se apreció que las concentraciones más altas de trimetilamina provocaron un aumento en la señal de fluorescencia, mientras que en el caso de la dimetilamina y trietilamina, se alcanza un máximo a una concentración intermedia y la concentración más alta produce un descenso en la señal (Figura 130).

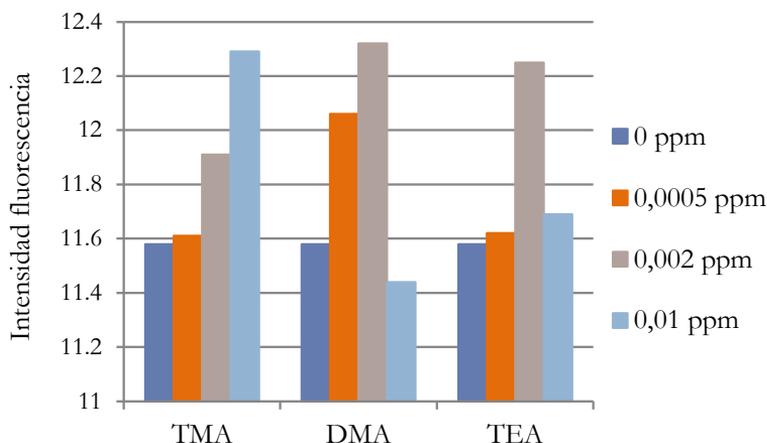


Figura 130: Efecto de la TMA, DMA y TEA sobre la señal de fluorescencia del naranja de acridina (0,05 µM) en MeOH.  $\lambda$  excitación: 500 nm y  $\lambda$  emisión: 522 nm.

De nuevo en este caso se aprecia que la señal de la fluorescencia se ve acentuada por la presencia de las aminas estudiadas, sobre todo en el caso de la TMA en la que en ninguna de las concentraciones se aprecia descenso de la señal.

A falta de resultados sobre el naranja de acridina comparables en la bibliografía se investigó el posible efecto de las aminas alifáticas sobre el carbazol, base del monómero seleccionado por su parecido con el naranja de acridina. En estos trabajos se aprecia que la señal de fluorescencia disminuye en presencia de distintas aminas (Bisht & Tripathi, 1993; Bortolus et al., 1997).

Una vez analizados los resultados de todas las sustancias estudiadas, se concluyó que las más interesantes por las modificaciones que habían tenido lugar como consecuencia de la adición de las aminas, fueron el naftaleno y el naranja de acridina.

Por este motivo se buscaron monómeros funcionales que tuviesen una estructura química muy similar al naftaleno y al naranja de acridina.

En el caso del naftaleno (Figura 131A), la molécula seleccionada fue el vinil-naftaleno (Figura 131B), que consiste en una molécula del hidrocarburo modificada con un enlace vinílico, zona por la que se enlazarán para formar el entramado polimérico.

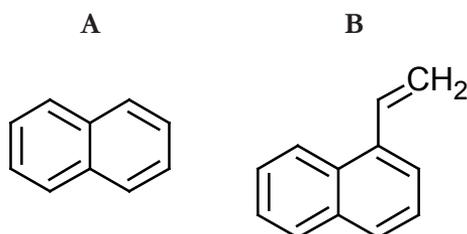


Figura 131: Estructura química del naftaleno (A) y del 2-vinil naftaleno (B).

En el caso del naranja de acridina (Figura 132A), no se pudo encontrar una molécula estructuralmente igual que estuviese comercialmente disponible y lo más parecido estructuralmente resultó ser una molécula de carbazol unida a un enlace vinílico (Figura 132B). Esa molécula presentaba diferencias en las bandas de absorción y emisión y a falta de los valores reales del N-vinil carbazol indicaremos los valores del carbazol a modo de referencia ( $\lambda$  excitación: 347 nm y  $\lambda$  emisión: 360 nm en ciclohexano (www.fluorophores.org)). Estos valores contrastan con los del naranja de acridina ( $\lambda$  excitación: 500 nm y  $\lambda$  emisión: 522 nm).

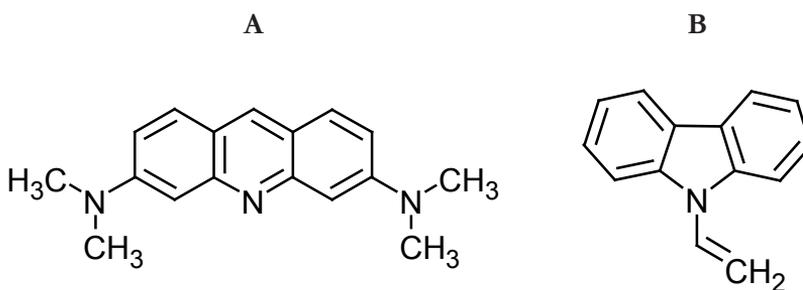


Figura 132: Estructura química del naranja de acridina (A) y del N-vinil carbazol (B).

### 6.3.2 -EXPERIMENTO 2: SÍNTESIS, TAMIZADO Y LAVADO DE LOS MATERIALES POLIMÉRICOS CON LOS MONÓMEROS SELECCIONADOS, ASÍ COMO TESTADO DEL METANOL COMO MEDIO DE REACCIÓN PARA EL MÉTODO BATB

Una vez elegidos los monómeros que se iban a utilizar, se eligieron los disolventes en los que iban a ser sintetizados. Ya que los materiales estaban pensados para trabajar con matrices acuosas (extractos de pescado o atmósferas con volátiles en los que habría presencia de humedad) se

decidió utilizar disolventes con polaridades relativamente altas como el metanol (0,762) y el MeCN (0,460) (Reichardt & Welton, 2010).

Para el 2-vinilnaftaleno se seleccionaron acetonitrilo, metanol y metanol:agua (9:1) para observar las posibles diferentes interacciones creadas en el material sintetizado por la presencia de puentes de hidrógeno y otras fuerzas de interacción, así como la intensidad de las mismas. Para el N-vinilcarbazol se seleccionaron únicamente el acetonitrilo y el metanol, teniendo en cuenta que su insolubilidad en agua podría traer problemas a la hora de formar la mezcla de prepolimerización. En ninguno de los dos casos se utilizaron modificadores del pH para las mezclas de reacción. La relación molar utilizada en la síntesis fue 1:4:20:0,22 para molécula molde, monómero, agente reticulante e iniciador respectivamente. La cantidad utilizada de cada reactivo se muestra en la Tabla 27.

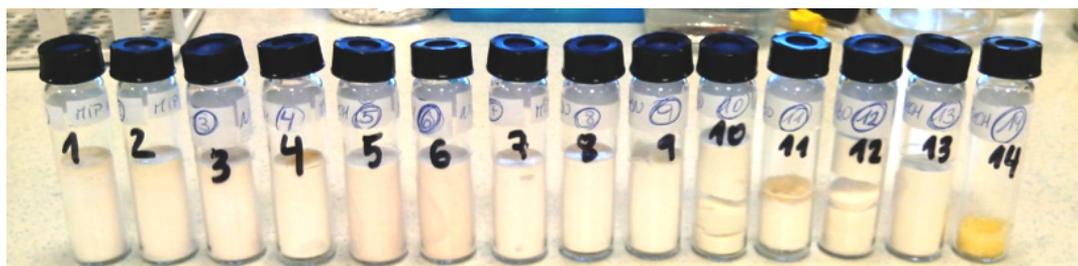


Figura 133: Viales de síntesis con los materiales poliméricos sintetizados en su interior.

Como se puede apreciar en la Figura 133 en el caso de los materiales 4, 11 y 14 la síntesis no llegó a buen término por algún problema con el sellado del vial mientras permanecía en la estufa a 60°C. Como se habían realizado duplicados de los MIPS, en el caso del 4 y el 11 hubo material suficiente para testarlo pero en el caso del material 14, un NIP, no se pudo testar, de modo que solo se tiene información de material improntado.

En el caso de los materiales 4 y 11, se formó una capa amarillenta en la parte superior del polímero. Por debajo de esta capa se encontraba el material blanco, del mismo color que el resto de los materiales y es el que se utilizó para el tamizado y la limpieza.

Tras el proceso de síntesis y tamizado del bloque sintetizado se separaron las partículas de un tamaño de partícula entre 22 y 45  $\mu\text{m}$  para su posterior lavado.

Tabla 27: Composición de cada material sintetizado (pesos y volúmenes de los distintos componentes). Las filas resaltadas se corresponden a los polímeros con problemas en la síntesis.

Número	Monómero	Disolvente	MIP/NIP	TMA-HCl [mg]	Monómero [mg]	EGDMA [mL]	AIBN [mg]	Disolvente [mL]	Peso teórico [mg]
1	N-VC	MeCN	MIP	94,61	788,90	3,73	35,76	9	4844,03
2	N-VC	MeCN	MIP	94,61	788,90	3,73	35,76	9	4844,03
3	N-VC	MeCN	NIP	-	788,90	3,73	35,76	9	4749,42
4	N-VC	MeOH	MIP	94,61	788,90	3,73	35,76	9	4844,03
5	N-VC	MeOH	MIP	94,61	788,90	3,73	35,76	9	4844,03
6	N-VC	MeOH	NIP	-	788,90	3,73	35,76	9	4749,42
7	2-VN	MeCN	MIP	97,48	648,64	3,85	36,85	9	4826,65
8	2-VN	MeCN	MIP	97,48	648,64	3,85	36,85	9	4826,65
9	2-VN	MeCN	NIP	-	648,64	3,85	36,85	9	4729,17
10	2-VN	MeOH:H <sub>2</sub> O	MIP	97,48	648,64	3,85	36,85	9	4826,65
11	2-VN	MeOH:H <sub>2</sub> O	MIP	97,48	648,64	3,85	36,85	9	4826,65
12	2-VN	MeOH:H <sub>2</sub> O	NIP	-	648,64	3,85	36,85	9	4729,17
13	2-VN	MeOH	MIP	64,99	432,42	2,56	24,57	9	3217,77
14	2-VN	MeOH	NIP	-	432,42	2,56	24,57	9	3152,78

## 6.3.2.1 - Limpieza de los materiales sintetizados

Tabla 28: Porcentajes de recuperación obtenidos en los distintos lavados hechos en el disolvente de síntesis de cada material sintetizado. La cantidad de material que se utilizó fueron 350 mg de un tamaño de partícula de entre 20 y 45  $\mu\text{m}$ . Las filas resaltadas se corresponden a los polímeros con problemas en la síntesis.

Número	Polímero	TMA-HCl recuperado (mg)					TMA-HCl inicial (mg)	Recuperación (%)	
		Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3	Lavado 4	Lavado 5			
1	MIP NCV MeCN 1	20,394	1,928	0,322	0,049	0,010	7,946	6,836	116,2
2	MIP NCV MeCN 2	23,757	2,690	0,435	0,080	0,012	9,441	6,836	138,1
3	NIP NVC MeCN	0,215	0,105	0,010	0,005	0,000	0,117		
4	MIP NVC MeOH 1	26,319	1,152	0,117	0,011	0,002	9,660	6,836	141,3
5	MIP NVC MeOH 2	14,768	0,804	0,364	0,065	0,077	5,627	6,836	82,3
6	NIP NVC MeOH	0,227	0,102	0,007	0,006	0,000	0,120		
7	MIP 2VN MeCN 1	22,538	2,395	0,431	0,069	0,013	8,906	7,069	126,0
8	MIP 2VN MeCN 2	23,387	2,543	0,399	0,070	0,012	9,244	7,069	130,8
9	NIP 2VN MeCN	0,224	0,115	0,007	0,002	0,000	0,122		
10	MIP 2VN MeOH:H <sub>2</sub> O 1	20,878	1,138	0,890	0,135	0,223	8,143	7,069	115,2
11	MIP 2VN MeOH:H <sub>2</sub> O 2	26,318	1,059	0,276	0,025	0,046	9,703	7,069	137,3
12	NIP 2VN MeOH:H <sub>2</sub> O	0,209	0,113	0,013	0,006	0,000	0,119		
13	MIP 2VN MeOH	21,432	1,146	0,311	0,244	0,168	8,155	7,069	115,4

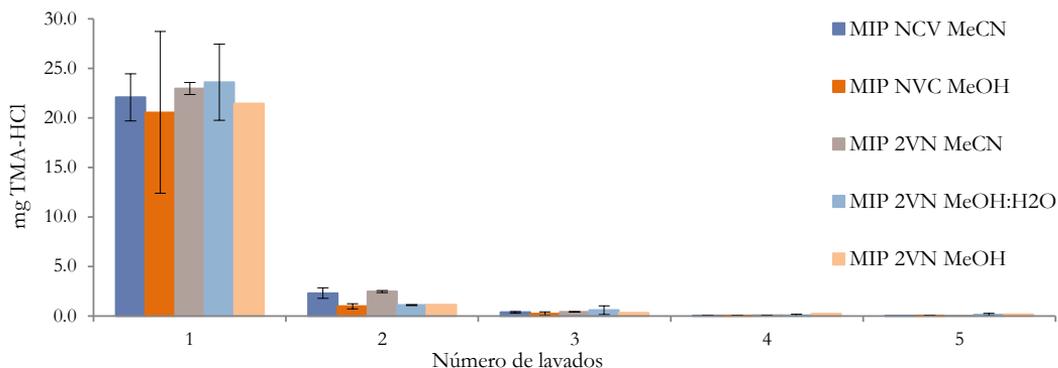


Figura 134: Concentración de TMA encontrada en los distintos lavados realizados a los polímeros. Valores promedio de las dos réplicas de cada polímero fabricado con su desviación estándar correspondiente.

En cada lavado se realizó una dilución apropiada para evitar así saturar el reactivo de la reacción de derivatización. En el primer y segundo lavado se utilizó una dilución 1:2000, para los lavados 3 y 4 se diluyó la muestra 500 veces y en el quinto lavado se diluyó tan solo 50 veces ya que la concentración de TMA ya era baja (Figura 134). En todos los casos se analizaron las dos réplicas de los polímeros sintetizados y no se apreció que hubiese diferencias significativas en el proceso de lavado de los distintos materiales.

Tras 5 lavados con el disolvente de síntesis se consiguieron recuperaciones superiores al 100% (Tabla 28). A pesar de esto, para asegurarnos de que los materiales sintetizados se encontraban libres de TMA se llevaron a cabo 2 lavados adicionales con NaOH 1M en un baño de ultrasonidos para favorecer la extracción y volatilización de la TMA que pudiera quedar en el interior del polímero.

Como ya se ha explicado en la optimización de la metodología de análisis (apartado 3.7.3.2.1), el pH óptimo para llevar a cabo la reacción con el BATB es 8. En los lavados realizados con NaOH 10 mM se consiguió modificar el pH añadiendo ácido, pero en este caso, neutralizar una concentración tan alta como 1M de NaOH requeriría una gran concentración de ácido, lo que conllevaría una alta fuerza iónica en el medio de reacción, algo que no permitió llevar a cabo la reacción. Por otro lado, la concentración de TMA que todavía permanecía en el polímero era tan baja, que diluir la muestra para reducir el pH y que resultase más fácil neutralizarlo tendría también un efecto negativo, esta vez en la sensibilidad de la reacción. De manera que los lavados con NaOH no se cuantificaron de manera alguna. Para suplir esas analíticas, se realizó un nuevo lavado con el disolvente de síntesis tras haber llevado a cabo un lavado adicional con agua para que todo el NaOH fuese arrastrado.

En estos nuevos lavados finales posteriores a los lavados con NaOH, se pudo apreciar que ya no había TMA en el material sintetizado por lo que se pasó a realizar el estudio de afinidad.

### 6.3.2.2 -Reacción de derivatización en metanol y metanol: H<sub>2</sub>O

Una vez modificadas las proporciones de acetonitrilo y agua en la reacción y comprobado que el rendimiento era comparable al de la reacción original, se comprobó que la sustitución del acetonitrilo por el metanol o metanol: agua (9:1) no tenía un efecto negativo en el rendimiento (Figura 135). Además en cualquiera de las modalidades que fuese siempre se acompañaba la secuencia de análisis con un calibrado externo realizado con las mismas proporciones de disolventes.

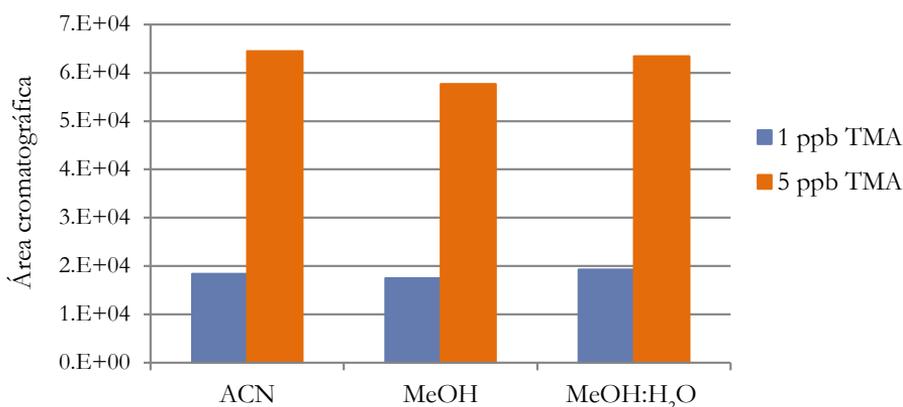


Figura 135: Comparativa del rendimiento de la reacción de la TMA con el BATB en distintos medios de reacción y a dos concentraciones.

### 6.3.3 -EXPERIMENTO 3: ESTUDIO DE LA AFINIDAD DE LOS MATERIALES SINTETIZADOS FRENTE A LA TMA

Para el estudio de la afinidad de los materiales poliméricos se analizaron los sobrenadantes resultantes de poner en contacto el polímero con las disoluciones de TMA durante toda la noche. Se aplicaron distintas diluciones en función de la concentración para trabajar siempre en el intervalo lineal del método.

En todos los casos la isoterma que mejor se ajustó a nuestros datos resultó ser la de Freundlich y los parámetros del polímero se calcularon siguiendo su ecuación ( $B = a F^n$ ). Donde  $B$  es la cantidad de TMA adsorbida en el polímero y  $F$  es la cantidad de TMA libre que no ha sido retenida en el polímero. El parámetro  $a$  es una medida de la capacidad del polímero ( $N$ , número de sitios activos) y la afinidad media ( $K$ ). La contribución exacta de cada uno de los parámetros no puede ser extraída directamente sin datos experimentales más específicos. Por otro lado el índice de heterogeneidad  $n$ , varía entre 0 y 1 siendo  $n=1$  para un sistema totalmente homogéneo y tendiendo hacia 0 según aumenta la heterogeneidad de los sitios activos (García-Calzón &

Díaz-García, 2007). Valores de  $n$  superiores a 1, indican sistemas completamente homogéneos sin interacciones específicas (Yañez et al., 2010).

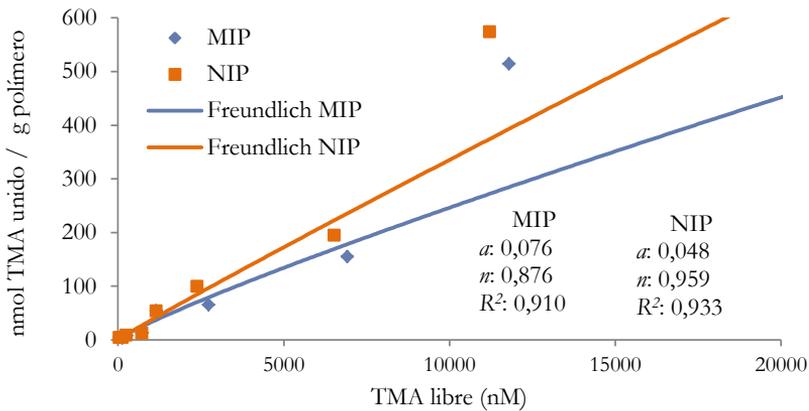


Figura 136: Isotherma de afinidad del polímero sintetizado con N-vinil carbazol en MeCN y su polímero blanco.

En el caso del polímero sintetizado con N-vinil carbazol en MeCN y su polímero blanco (Figura 136) se alcanzan valores de  $a$  y  $n$  muy similares tanto en el MIP con en el NIP, siendo ligeramente superiores los del material improntado como se extrae de sus constantes (Tabla 29). En este material se aprecian valores de  $n$  relativamente próximos a 1, lo que nos indica que se trata de un material bastante homogéneo, es decir, con poca variabilidad de sitios activos. El MIP ha proporcionado un valor de  $n$  menor que el NIP lo que significa que la introducción de la TMA en la mezcla de polimerización ha contribuido a la heterogeneidad del material.

Los resultados obtenidos con el polímero sintetizado con N-vinil carbazol en MeOH no permitieron extraer ninguna de las constantes ya que no se observó afinidad ninguna.

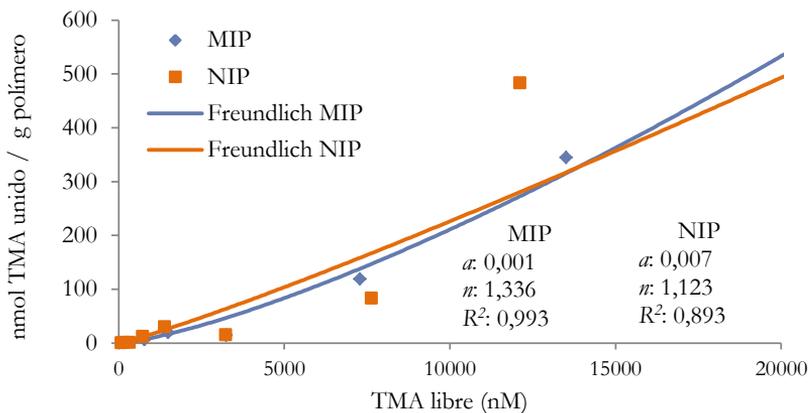


Figura 137: Isotherma de afinidad del polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeCN y su polímero blanco.

Para el polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeCN (Figura 137) se obtuvieron unos valores del parámetro  $a$  significativamente menores a los del polímero hecho con N-vinil carbazol en MeCN, que significaría que presenta una menor capacidad y afinidad por la TMA. Del valor obtenido del parámetro  $n$ , se puede prever que las interacciones entre la TMA y el polímero sean inespecíficas.

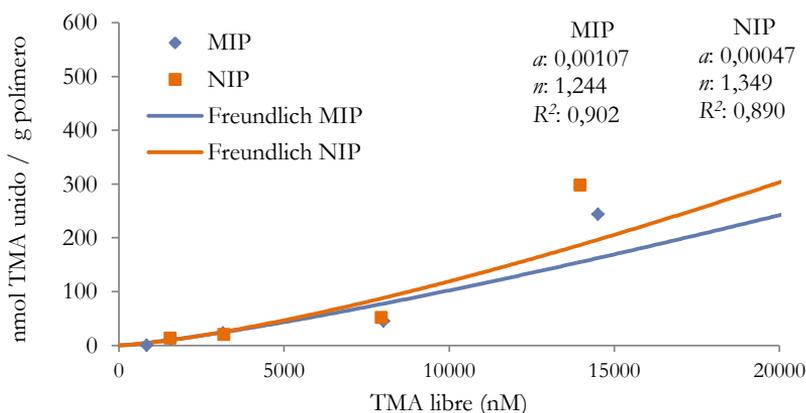


Figura 138: Isoterma de afinidad del polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeOH: H<sub>2</sub>O y su polímero blanco.

En el caso del polímero sintetizado con 2-VN en MeOH: H<sub>2</sub>O tampoco se apreciaron diferencias significativas entre la cantidad adsorbida en el material improntado y el no improntado (Figura 138). Este material presenta un alto índice de homogeneidad (Tabla 29) y una afinidad (parámetro  $a$ ) ligeramente inferior en el NIP que en el MIP.

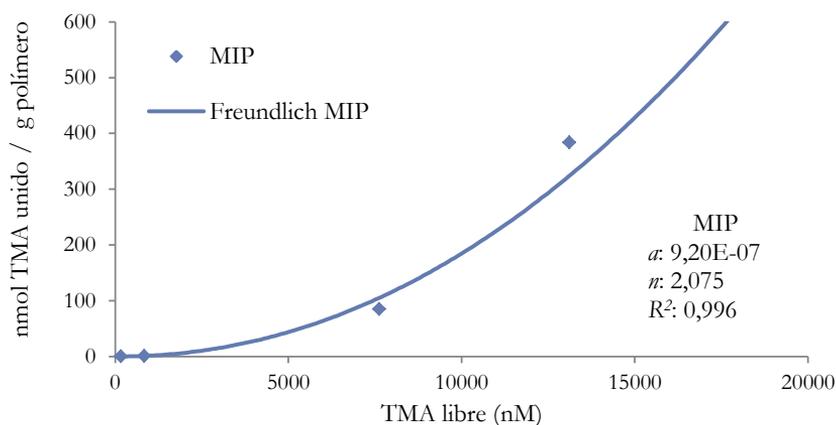


Figura 139: Isoterma de afinidad del polímero sintetizado con 2-vinil naftaleno en MeOH y su polímero blanco.

Por último, en el polímero sintetizado con 2-vinilnaftaleno como monómero y MeOH como disolvente (Figura 139), solo se pudieron calcular las constantes de afinidad para el material improntado ya que en el caso del NIP el vial de sellado se rompió durante la polimerización y no se llegó a sintetizar. En este caso se alcanzó el mayor valor para el índice de homogeneidad y el menor para la constante  $a$  (Tabla 29).

En las Figura 140 y Figura 141 se pueden observar las rectas con las que han sido obtenidos los valores de las constantes  $a$  y  $n$  para los distintos polímeros. En ellas se representa el logaritmo de la concentración de TMA que se ha unido por unidad de masa del polímero frente al logaritmo de la concentración de TMA libre. A partir de la ecuación que se obtiene, la pendiente corresponde al parámetro  $n$  y para obtener el parámetro  $a$ , se debe realizar la siguiente operación ( $10^{\text{ordenada en origen}}$ ).

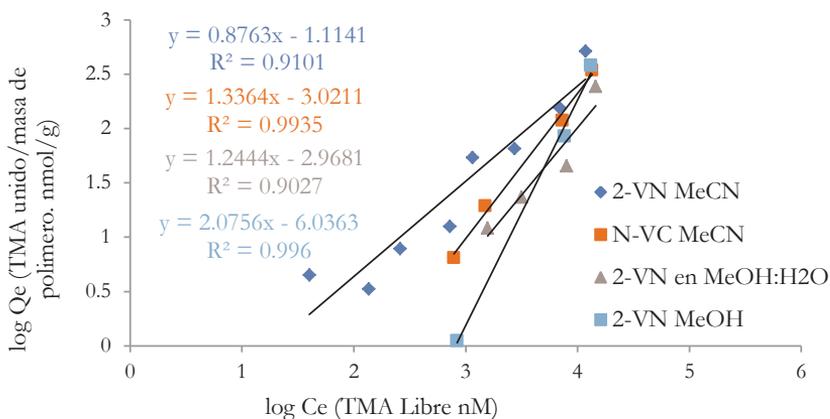


Figura 140: Rectas de regresión lineal utilizadas para la obtención de los parámetros  $a$  y  $n$  para los distintos polímeros sintetizados (MIP).

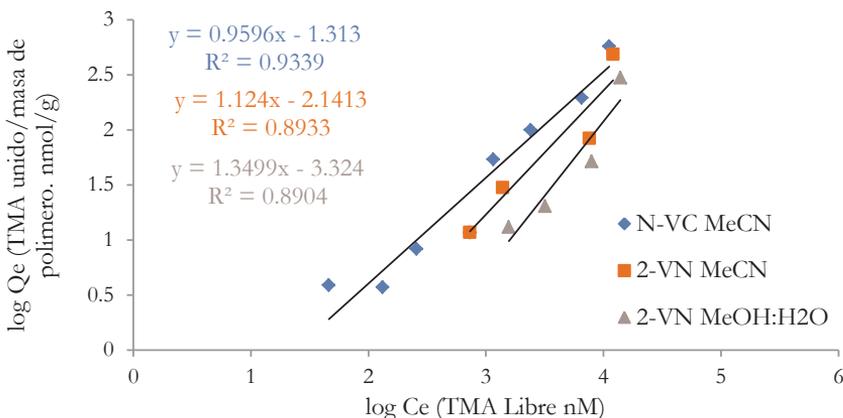


Figura 141: Rectas de regresión lineal utilizadas para la obtención de los parámetros  $a$  y  $n$  para los distintos polímeros no improntados sintetizados (NIP).

Tabla 29: Factor de capacidad / afinidad ( $a$ ) e índice de heterogeneidad ( $n$ ) de los distintos polímeros sintetizados.

Polímero	$a$	$n$	$R^2$
<b>N-vinil carbazol en MeCN (MIP-1)</b>	0,076	0,876	0,910
<b>N-vinil carbazol en MeCN (NIP-3)</b>	0,048	0,959	0,933
<b>N-vinil carbazol en MeOH (MIP-4)</b>	-	-	-
<b>N-vinil carbazol en MeOH (NIP-6)</b>	-	-	-
<b>2-vinil naftaleno en MeCN (MIP-7)</b>	0,001	1,336	0,993
<b>2-vinil naftaleno en MeCN (NIP-9)</b>	0,007	1,123	0,893
<b>2-vinil naftaleno en MeOH: H<sub>2</sub>O (MIP-10)</b>	0,00107	1,244	0,902
<b>2-vinil naftaleno en MeOH: H<sub>2</sub>O (NIP-12)</b>	0,00047	1,349	0,890
<b>2-vinil naftaleno en MeOH (MIP-13)</b>	9,20E-07	2,075	0,996
<b>2-vinil naftaleno en MeOH (NIP-14)</b>	-	-	-

Analizando de forma global las constantes de los distintos polímeros evaluados, se podrían dividir en tres grupos:

- i) El polímero fabricado en acetonitrilo con N-vinil carbazol. Este polímero presenta un cierto grado de heterogeneidad de sitios activos y un valor del parámetro  $a$  más alto indicando una mayor afinidad.
- ii) El polímero fabricado en metanol y con N-vinilcarbazol que no ha mostrado ningún tipo de afinidad por la TMA.
- iii) Aquellos polímeros que han proporcionado un alto índice de homogeneidad en sus sitios activos y además interacciones inespecíficas.

De los dos monómeros empleados en este estudio, ha sido el N-vinilcarbazol el que ha proporcionado un mejor resultado generando sitios activos con mayor afinidad. Esto puede ser debido a que la interacción entre la amina y el carbazol es más fuerte que con el naftaleno. Esto se observa en un medio aprótico como el acetonitrilo, ya que la presencia de metanol o agua en el medio interfiere en este tipo de interacciones. En el caso del monómero 2-vinil naftaleno las interacciones observadas han sido menores y son de otra naturaleza ya que la presencia de agua parece favorecerlas (mayores valores del parámetro  $a$ ). Sin embargo los valores del parámetro  $n$  han resultado ser mayores a 1, lo que indica que las interacciones son inespecíficas.

Con el polímero que ha presentado un cierto grado de heterogeneidad ( $0 < n < 1$ ) se ha llevado a cabo una estimación de la distribución de la afinidad mediante la Ecuación 2 (Rampey et al., 2004):

$$N(K) = 2,303 \cdot a \cdot n \cdot (1 - n^2) \cdot e^{-2,303 \cdot n \cdot \log K}$$

Ecuación 2: Ecuación para la estimación de la distribución de la afinidad.

Esta ecuación solo es válida en un intervalo de valores, que vienen definidos por los límites inferior y superior de las concentraciones de las isoterma experimentales y se calculan mediante las Ecuaciones 3 y 4:

$$K_{min} = 1/F_{max}$$

$$K_{max} = 1/F_{min}$$

Ecuación 3 y Ecuación 4: Cálculo de los límites superior e inferior de las concentraciones de las isoterma experimentales.

En la Figura 142 se puede observar la distribución de los sitios activos de los polímeros 1-3. Como se aprecia, existe una disminución exponencial de las energías de adsorción y en la Tabla 30 se recogen los distintos valores de las constantes de afinidad y el número de sitios activos.

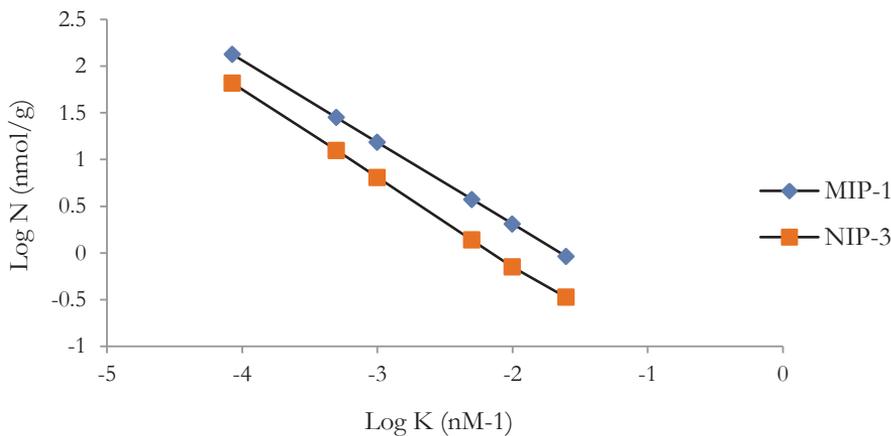


Figura 142: Distribución de las constantes de afinidad de los polímeros 1-3.

Tabla 30: Relación de constantes de afinidad y número de sitios activos de los polímeros 1-3.

	K min (nM <sup>-1</sup> )	K max (nM <sup>-1</sup> )	N total (nmol/g)	K medio (nM <sup>-1</sup> )
<b>MIP1</b>	8,47E-05	0,0249	65,6	0,000616
<b>NIP 3</b>	8,92E-05	0,0217	29,4	0,000529

A partir de estos datos también se puede estimar un valor promedio de la constante de afinidad y el número de sitios activos de acuerdo con las Ecuación 5 y 6 :

$$N_{K_{min}-K_{max}} = a(1 - n^2)(K_{min}^{-n} - K_{max}^{-n})$$

$$\bar{K}_{K_{min}-K_{max}} = K_m = \left(\frac{n}{n-1}\right)\left(\frac{K_{min}^{1-n} - K_{max}^{1-n}}{K_{min}^{-n} - K_{max}^{-n}}\right)$$

Ecuación 5 y Ecuación 6: Ecuaciones para la estimación del valor promedio de la constante de afinidad y el número de sitios activos.

Las constantes de afinidad obtenidas han sido  $6,17 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  y  $5,29 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  para el MIP y NIP respectivamente. En el caso del número de sitios activos esta estimación ha proporcionado unos valores de 65,6 y 29,4 nmol/g para el MIP y NIP respectivamente. Los resultados observados para el MIP y el NIP han sido muy parecidos y no se puede decir que sean significativamente diferentes. Por lo tanto, todo parece indicar que no ha habido un efecto de impronta muy notable. Este hecho puede ser debido a que la molécula de trimetilamina es demasiado pequeña como para generar este efecto (Gräfe et al, 2006) y que el disolvente utilizado (porógeno) no haya sido el adecuado. Probablemente, utilizando un medio más apolar las interacciones hubieran sido más fuertes.

## 6.4 -Conclusiones

A lo largo de este capítulo se ha mostrado el desarrollo de un polímero de impresión molecular para la determinación de aminas volátiles.

En primer lugar se realizó una selección del mejor fluoróforo para incluir en la matriz polimérica y así poder revelar la unión entre el MIP y las aminas. Al estudiar el efecto de las aminas volátiles sobre

la señal de fluorescencia de la diclorofluoresceína se observó que no tuvieron ningún efecto sobre ella en las condiciones estudiadas. Este mismo comportamiento se obtuvo con Tionina y Proflavina.

En el caso del azul de metileno, únicamente en presencia de la TEA se apreció una disminución en la señal de fluorescencia que estaba relacionada con la concentración de la amina.

En cambio, en el caso del naftaleno, se apreció un efecto potenciador de la señal de la fluorescencia en presencia de DMA, TMA y TEA y este efecto incrementaba con la concentración de las aminas. Este efecto se apreció tanto a pH neutro como a pH ácido. Con el fluoróforo naranja de acridina también se apreció un efecto de la presencia de TMA y DMA. En el caso de la TEA el efecto no quedó muy claro, ya que no estaba claramente relacionado con el aumento de la concentración de la amina.

Con todos los resultados se concluyó que los fluoróforos más interesantes por los cambios que se habían apreciado fueron el naftaleno y el naranja de acridina.

Una vez seleccionados los fluoróforos más interesantes, se seleccionaron unos monómeros que incluían unas estructuras similares: N-vinil carbazol y el 2-vinil naftaleno.

Con ellos se sintetizaron distintos materiales poliméricos que fueron triturados, tamizados y lavados en el disolvente en que habían sido sintetizados para posteriormente llevar a cabo el estudio de afinidad.

Con solo 5 lavados con el disolvente de síntesis se consiguió recuperar el 100% de la TMA que se añadió en la síntesis. A pesar de haber recuperado el 100% se realizaron 2 lavados adicionales con NaOH 1M en un baño de ultrasonidos para terminar de extraer y volatilizar la TMA que pudiera quedar en el interior del material. Estos resultados ya daban a entender que la interacción entre el polímero y la TMA no era muy fuerte.

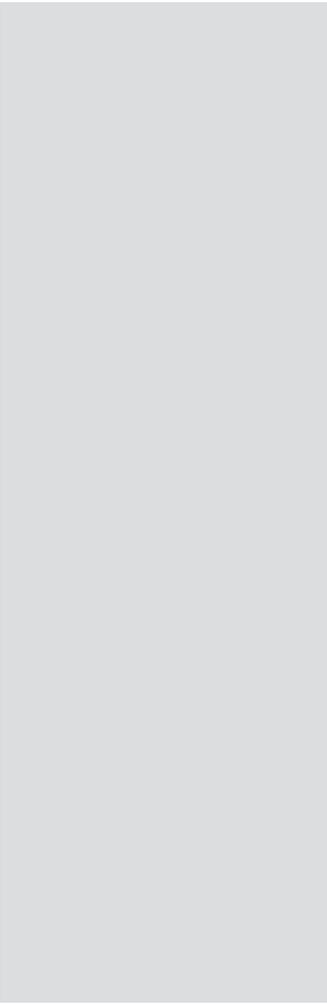
La metodología del BATB fue adaptada a distintos medios de reacción, MeCN, MeOH y MeOH: H<sub>2</sub>O obteniendo rendimientos similares a los de la reacción original.

Finalmente, en ninguno de los materiales sintetizados se ha generado aparentemente sitios activos de unión específica entre TMA y el material. No obstante si se han apreciado materiales que presentan cierta afinidad por la TMA. El polímero que mejores resultados ha proporcionado ha sido el sintetizado con N-vinil carbazol en MeCN, aunque no se han observado diferencias significativas entre el MIP y el NIP. La presencia de disolventes próticos ha evitado la generación de sitios activos con suficiente afinidad frente al TMA.

## 6.5 –Bibliografía

- Bisht, P.B., Tripathi, H.B., 1993. Fluorescence quenching of carbazole by triethylamine: exciplex formation in polar and nonpolar solvents. *J. Lumin.* 55, 153–158.
- Bortolus, P., Monti, S., Galiazzi, G., 1997. Complexation of aliphatic amines with carbazole in the S<sub>0</sub> and S<sub>1</sub> states : Solvent effect on the deactivation of the excited complex. *Chem. Phys.* 223, 99–108.
- García-Calzón, J. a., Díaz-García, M.E., 2007. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors Actuators B Chem.* 123, 1180–1194.
- Gräfe, A., Haupt, K., Mohr, G.J., (2006). Optical sensor materials for the detection of amines in organic solvents. *Anal. Chim. Acta.* 565 (1), 42-47.
- Goodpaster, J. V, McGuffin, V.L., 2000. Selective Fluorescence Quenching of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Aliphatic Amines. *Society* 72, 1072–1077.
- Oh, S.-C., Shirota, Y., 1995. The effect of intermolecular hydrogen bonding on the photoinduced electron transfer reaction of a naphthalene-triethylamine-alcohol system: estimation of the equilibrium constant for hydrogen bond formation from fluorescence quenching and reaction pathway. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 92, 79–83.
- Rampey, A.M., Umpleby, R.J., Rushton, G.T., Iseman, J.C., Shah, R.N., Shimizu, K.D., 2004. Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis. *Anal. Chem.* 76, 1123–1133.
- Reichardt, C., Welton, T., 2010. Properties, Purification, and Use of Organic Solvents, Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry.
- Yañez, F., Chianella, I., Piletsky, S.A., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2010. Computational modeling and molecular imprinting for the development of acrylic polymers with high affinity for bile salts. *Anal. Chim. Acta* 659, 178–185.





CONCLUSIONES



De los trabajos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral se desprenden las siguientes conclusiones:

1. De toda la batería de metodologías estudiadas para la determinación de las aminas volátiles (MA, DMA y TMA), la derivatización con bromoacetato de tert-butilo (BATB) ha permitido desarrollar y validar una metodología multianalito con un buen rango lineal (0,25-10  $\mu\text{g/g}$  en pescado de agua dulce) y porcentajes de recuperación (70-107% para el pescado de agua dulce) constantes a lo largo del mismo para la MA, DMA y TMA. El pH, la temperatura y el tiempo de reacción han sido los parámetros más importantes a controlar para que la reacción de derivatización tenga un buen rendimiento. Además la reacción con BATB se ha adaptado a diferentes medios de reacción (MeOH y MeOH: H<sub>2</sub>O) para que pueda ser aplicado a otras matrices y/o extractos.
2. La alta sensibilidad de la metodología optimizada ha permitido establecer la TMA como un buen marcador de calidad a temperaturas de refrigeración, incluso para especies de agua dulce. A partir del día 4 de almacenamiento a 4°C se comenzó a apreciar aumento en la concentración de TMA en todas las especies estudiadas (merluza, chicharro y trucha). Por otra parte, la MA no resultó útil para la determinación de la calidad en pescado de agua dulce ni de agua salada y la DMA resulto un buen marcador de calidad por su aumento en el caso de la merluza hasta los 9 meses de almacenamiento en congelación.
3. La congelación de muestras de merluza y chicharro durante al menos 7 días y su posterior refrigeración tiene un efecto claro sobre la producción de TMA de los microorganismos de deterioro específicos. En comparación con las muestras frescas, la aparición de TMA se retrasa del día 4 a más allá del día 15 en el caso de la merluza y del día 4 al día 15 en el caso del chicharro. En el caso de las otras aminas estudiadas no se apreció ningún efecto relacionado con el tiempo de congelación en las concentraciones determinadas.
4. El octanol ha sido identificado como un marcador de frescura en muestras que habían permanecido congeladas y que posteriormente fueron almacenadas durante 15 días en refrigeración. Se observó una disminución en la concentración de este compuesto a lo largo del periodo de refrigeración y esa disminución estaba inversamente relacionada con el tiempo de almacenamiento a -18°C, es decir, a menor tiempo de congelación se determinaron mayores concentraciones de octanol.

5. En base a los resultados obtenidos y los análisis estadísticos realizados con los caldos de chicharro y los inóculos bacterianos, se puede concluir que la cepa bacteriana que mayor concentración de TMA produjo a día 10 de almacenamiento en refrigeración fue *Yersinia intermedia*. En relación a los aldehídos/cetonas determinados, *Shewanella baltica* fue la mayor responsable de la generación de formaldehído y *Serratia proteamaculans* de la producción de acetaldehído. En cuanto a la producción de propanal, fue *Shewanella baltica* de nuevo la que mayor cantidad generó mientras que en *Serratia proteamaculans* y *Yersinia intermedia* hubo una gran disminución. En el caso del hexanal fue nuevamente *Shewanella báltica* la cepa que mayor aumento generó. TMA y acetaldehído son las variables que más ayudan a diferenciar los distintos tiempos de almacenamiento en refrigeración. De este análisis también se puede extraer que *Serratia proteamaculans* y *Yersinia intermedia* son las cepas que mayor cantidad de TMA y acetaldehído producen por lo que en estas condiciones son las que más peso tienen dentro de los microorganismos de deterioro específico. Asimismo las concentraciones determinadas de aldehídos en los caldos de chicharro inoculados con distintas cepas bacterianas presentaron una buena correlación con las determinaciones llevadas a cabo en la atmósfera de los mismos caldos.
6. Las aminas volátiles bajo estudio no han mostrado ser buenos marcadores de deterioro en productos cárnicos. No se ha detectado la presencia MA, DMA y TMA en carne de pollo, cerdo y vacuno ni su aumento o disminución a lo largo del almacenamiento en refrigeración.
7. El acetaldehído y el butanal tomados de la atmósfera de las barquetas resultaron buenos marcadores químicos del deterioro en dorada entera, dorada fileteada y chicharro almacenados a 6°C y 10°C, mientras que a 2°C y 4°C no se pudieron detectar.
8. La cuantificación de MA, DMA y TMA se ha podido realizar en muestras gaseosas adaptando y validando la metodología del BATB. Con esta metodología se alcanzaron unos porcentajes de recuperación de 47, 61 y 77% para MA, DMA y TMA respectivamente. Esta metodología ha permitido su monitorización en muestras de merluza y chicharro.
9. Las concentraciones determinadas en la atmósfera y el músculo de merluza y chicharro presentan una buena correlación a pesar de la gran variabilidad inter e intramuestra existente en el pescado.

10. Se ha conseguido discriminar entre muestras de pescado congelado-descongelado y muestras de pescado fresco exponiendo ambos tipos de pescado a temperaturas de 15°C durante al menos 24 horas y analizando únicamente la atmósfera del pescado.
11. La inclusión de un fluoróforo en la matriz polimérica del MIP puede ayudar a la detección de la unión entre el analito y el MIP. Con este fin se seleccionaron el naftaleno y el naranja de acridina por el incremento en la señal de fluorescencia que experimentaron en presencia de DMA y TMA entre 0-0,1 ppm para el naftaleno (1  $\mu\text{M}$ ) y entre 0-0,01 ppm para el naranja de acridina (0,05  $\mu\text{M}$ ).
12. La trimetilamina utilizada como molécula molde en la preparación de los MIPs no ha permitido la generación de un número suficiente de sitios activos con alta especificidad, debido fundamentalmente al pequeño tamaño de la molécula. El medio donde se realiza la polimerización (porógeno) juega un papel muy importante en las características del MIP, obteniéndose, en este caso, mejores resultados con disolventes apróticos (acetonitrilo). El N-vinil carbazol ha mostrado ser el monómero que mayor interacción con la TMA ha generado. Así, se ha estimado un valor medio de la constante de afinidad relativamente alto (del orden de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ), pero el número de sitios activos ha sido muy pequeño (del orden de nmol/g). Por todo esto, para poder utilizar un MIP como elemento de reconocimiento en un sensor para la determinación de TMA se requeriría un mayor estudio de las condiciones de polimerización.



