

T 11-51 (v. 1)

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS  
BIÓGENAS PREVIA DERIVATIZACIÓN "OFF-LINE"  
CON CLORURO DE DABSILO EN MUESTRAS DE  
VINO, CERVEZA Y MALTA**

Biblioteca Universitaria de Granada  
  
01295934

**TESIS DOCTORAL**

*Roberto Romero González*  
*05/02*  
*2 tomos*

**Roberto Romero González**

**Granada, 2002**

T. Prov. 24/90

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ... 16/05/2002  
ENTRADA NUM. ... 1797

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
02 MAYO 2002  
COMISION DE DOCTORADO

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS**  
**PREVIA DERIVATIZACIÓN "OFF-LINE" CON CLORURO DE**  
**DABSILO EN MUESTRAS DE VINO, CERVEZA Y MALTA**

**TESIS DOCTORAL**

**Roberto Romero González**

**Granada, 2002**

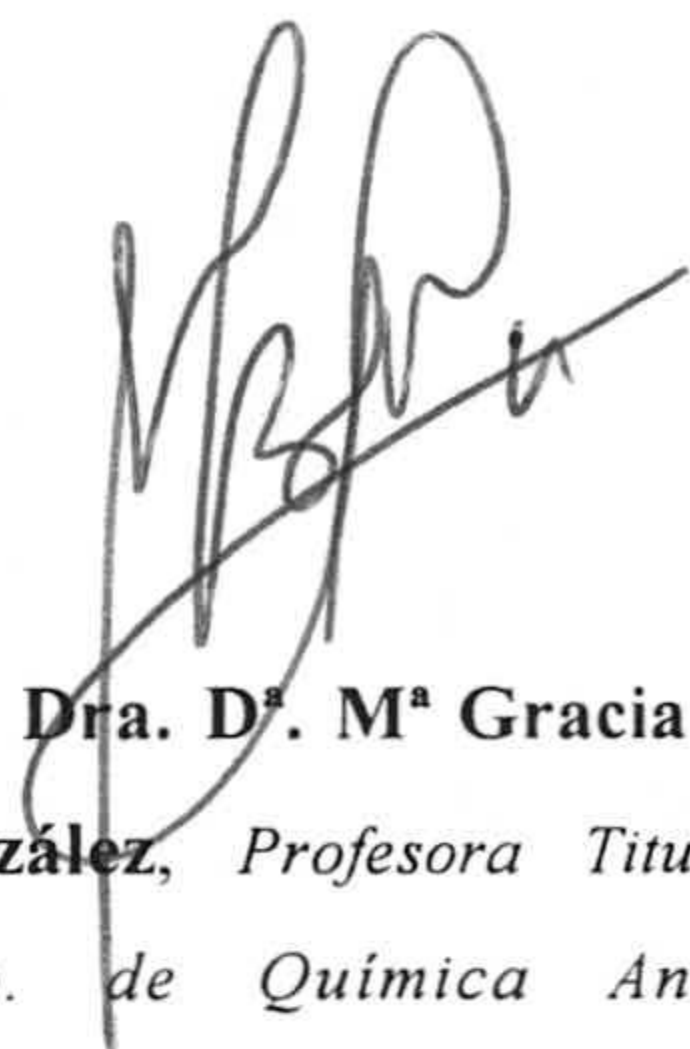
<b>BIBLIOTECA UNIVERSITARIA</b>
<b>GRANADA</b>
N.º Documento <u>613384752</u>
N.º Copia <u>i17869419</u>

**DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS  
PREVIA DERIVATIZACIÓN "OFF-LINE" CON CLORURO DE  
DABSILO EN MUESTRAS DE VINO, CERVEZA Y MALTA**

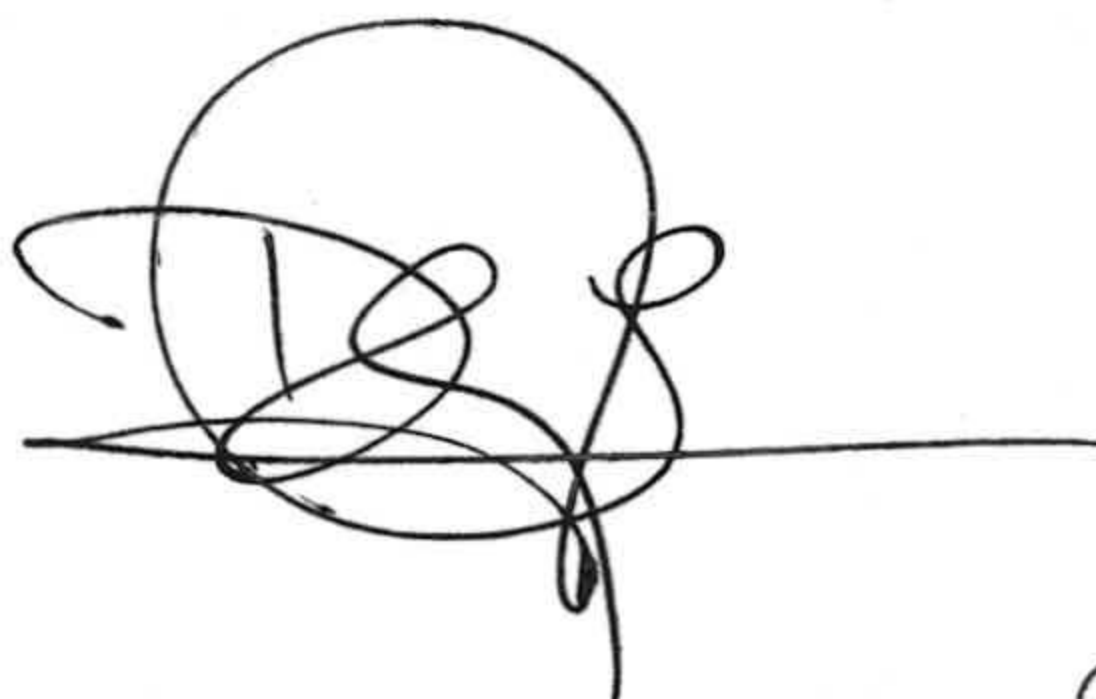
por

**Roberto Romero González**

VISADA en Granada, a 30 de Abril de 2002.



Fdo: **Dra. D.ª. M.ª Gracia Bagur  
González**, Profesora Titular del  
Dpto. de Química Analítica.  
Universidad de Granada.



Fdo: **Dr. D. Domingo Gázquez  
Evangelista**, Profesor Titular del  
Dpto. de Química Analítica.  
Universidad de Granada.



Fdo: **Dra. D.ª. Mercedes Sánchez-  
Viñas**, Profesora Titular del Dpto. de  
Química Analítica. Universidad de  
Granada.

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección Químicas.



Fdo: **Roberto Romero González**,  
Licenciado en Ciencias,  
Sección de Químicas.

*A MARISA*

Cuando el trabajo experimental implicado en esta Memoria se ha realizado en algo más de tres laboratorios pertenecientes a otros tantos Departamentos, es lógico pensar que muchas personas, forman parte de ella, colaborando voluntaria o involuntariamente a su realización. Algunas son:

Mis Directores de Tesis y algo más, Domingo, Mercedes y Brigui, por generar un ambiente de trabajo que ha facilitado la realización de este trabajo, y que ha permitido formarme como científico y madurar como persona.

A Jan Åke, por permitirme trabajar con su grupo de investigación, y pasar tres meses de mi vida, que NUNCA olvidaré.

A mis padres, Paco y Leo, y por extensión a toda mi familia, por apoyarme en los malos y buenos momentos.

A Alberto, por no hacerme sentir tan solo en el laboratorio.

A Mónica, por ayudarme a "andar" por un laboratorio.

A Bea, por subir de vez en cuando, y hablar conmigo.

A Luis, que me hizo adentrarme aún más en la Quimiometría.

A Monsa, por "permitirme ser su compañero de despacho", a veces.

A Robert, por ayudarme a pensar en algo más que "Chemistry".

A César, Pilar y Don Antonio Cerezo, por permitirme acabar la parte experimental de esta Memoria en el Departamento de Galénica y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

A Pablo, por trabajar y acompañarme en la Planta Industrial.

A Claes, Luke, Lotta, Axel, Eddie, Tobias y Lennart por hacerme sentir como en casa.

A Adrian, que me ayudó a pasar el mal trago de vivir lejos de casa.

A Ramón, por poner un toque de humor maño en mi vida.

A mi amigo Juanjo.

Por permitirme ser vuestro amigo, **GRACIAS.**

**¡Experimenta!**

**Haz de ello tu consigna día y noche.**

**Experimenta,**

**y ello te llevará a la luz.**

**La manzana en la copa del árbol**

**nunca está demasiado alta para alcanzarla.**

**Así que sigue el ejemplo de Eva....**

**¡Experimenta!**

**Sé curioso,**

**aunque los amigos con quien te cruces se puedan molestar.**

**Enójate,**

**cada vez que quieran retenerte.**

**Si sólo sigues este consejo,**

**el futuro puede ofrecerte infinita felicidad**

**y alegría.....**

**Experimenta**

**¡Y ya verás!**

*Cole Porter*

## ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>OBJETIVOS</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>CAPÍTULO I:</b>	
<b>VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y RECONOCIMIENTO DE PAUTAS</b> .....	57
I.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS .....	58
I.1.1. VALIDACIÓN CARACTERÍSTICA .....	62
I.1.1.1. Diseño experimental:optimización de un método analítico .....	62
I.1.1.1.a. Metodología de la superficie de respuesta .....	75
I.1.1.1.b. Establecimiento de una función de conveniencia .....	83
I.1.1.2. Estudio de robustez. Delimitación de la inercia .....	88
I.1.1.2.a. Procedimiento para el estudio de robustez .....	96
I.1.1.3. Establecimiento de la función de calibración .....	101
I.1.1.4. Selección de la señal instrumental para el análisis cuantitativo .....	110
I.1.1.5. Establecimiento de los parámetros de calidad del método analítico ....	112
I.1.2. VALIDACIÓN APLICADA .....	119
I.1.2.1. Evaluación de la veracidad .....	119
I.1.2.1.a. Influencia de la matriz en la veracidad de un resultado analítico .....	121
I.1.2.2. Evaluación de la precisión .....	132
I.2. RECONOCIMIENTO DE PAUTAS CON DATOS QUÍMICOS .....	134
I.2.1. MÉTODOS NO SUPERVISADOS .....	135
I.2.1.1. Análisis en Componentes Principales (ACP) .....	136
I.2.1.2 Análisis de agrupaciones o clusters .....	138
I.2.2. MÉTODOS SUPERVISADOS .....	141
I.2.2.1. Análisis Discriminante Lineal (ADL) .....	142

## **CAPÍTULO II:**

<b><i>DISOLUCIONES, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN</i></b> .....	149
II.1. DISOLUCIONES Y REACTIVOS .....	150
II.1.1. DISOLUCIONES .....	150
II.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES .....	152
II.1.3. GASES EMPLEADOS .....	154
II.2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL .....	154
II.2.1. INSTRUMENTACIÓN .....	154
II.2.2. MATERIAL .....	156
II.3. SOPORTE INFORMÁTICO .....	158
II.3.1. ORDENADORES .....	158
II.3.2. IMPRESORAS .....	158
II.3.3. PAQUETES INFORMÁTICOS .....	158
II.4. MUESTRAS ANALIZADAS .....	159
II.5. METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA .....	160

## **CAPÍTULO III:**

<b><i>OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS</i></b> .....	163
III.1. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DABSILACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS .....	164
III.1.1. ESTUDIOS PRELIMINARES .....	165
III.1.1.1. Asignación de los picos .....	169
III.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DABSILACIÓN .....	172
III.1.2.1. Diseño I: Optimización de las variables implicadas en la derivatización	174
III.1.2.2. Diseño II: Optimización del pH y tiempo de calentamiento .....	181
III.1.2.2.a. Variación del pH a tiempo de calentamiento constante .....	185
III.1.2.2.b. Variación del tiempo de calentamiento a pH constante .....	185
III.1.2.3. Diseño III: Optimización del tiempo y temperatura de calentamiento .	186

III.1.2.3.a. Variación del tiempo de calentamiento a una temperatura constante . . . . .	190
III.1.2.3.b. Variación de la temperatura a tiempo de calentamiento constante . . . . .	190
III.1.3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN . . . . .	192
III.1.3.1. Estudio de la influencia de la concentración de reactivo sobre la altura total de pico . . . . .	192
III.1.3.2. Diseño IV: Estudio de los valores óptimos de pH y tiempo de calentamiento a una concentración de reactivo de $1.25 \times 10^{-3}$ M y temperatura de 70 °C . . . . .	194
III.1.4. CONCLUSIONES FINALES: PROCEDIMIENTO PARA LA REACCIÓN DE DABSILACIÓN . . . . .	197
III.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA . . . . .	202
III.2.1. TEMPERATURA DE LA COLUMNA . . . . .	202
III.2.2. COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL . . . . .	206
III.2.2.1. Influencia del pH de la disolución reguladora en el eluyente A . . . . .	206
III.2.2.2. Influencia de la concentración de la disolución reguladora utilizada en la fase móvil . . . . .	210
III.2.2.3. Estudio de la influencia de los porcentajes de trietilamina y dimetilformamida . . . . .	213
III.2.2.3.a. Diseño I . . . . .	213
III.2.2.3.b. Diseño II . . . . .	217
III.2.2.4. Influencia de la modificación del gradiente de elución sobre la separación cromatográfica . . . . .	222
III.2.2.5. Efecto del porcentaje de agua en el eluyente B y del gradiente, sobre la resolución, el tiempo de retención, el área y altura de pico . . . . .	225
III.2.3. LONGITUD DE ONDA DE DETECCIÓN . . . . .	228
III.2.4. CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS . . . . .	232
III.3. PROCEDIMIENTO PROPUESTO PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS . . . . .	234

## CAPÍTULO IV:

<i>ESTUDIO DE LA ROBUSTEZ Y ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO: VALIDACIÓN CARACTERÍSTICA</i> .....	237
IV.1. ESTUDIO DE LA ROBUSTEZ DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS .....	238
IV.1.1. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES Y DE SUS NIVELES .....	238
IV.1.2. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES RESPUESTA .....	240
IV.1.3. ELECCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EMPLEADO .....	240
IV.1.4. REALIZACIÓN DEL DISEÑO .....	242
IV.1.5. CÁLCULO DE LOS EFECTOS .....	243
IV.1.6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	243
IV.1.6.1. Altura y área de pico .....	243
IV.1.6.2. Tiempo de retención .....	250
IV.1.6.3. Resolución .....	252
IV.1.6.4. Estimación del intervalo máximo de tolerancia .....	253
IV.1.7. CONCLUSIONES .....	255
IV.2. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD .....	256
IV.2.1. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD ENTRE LA SEÑAL INSTRUMENTAL Y LA CONCENTRACIÓN. ELECCIÓN DE LA SEÑAL INSTRUMENTAL .....	256
IV.2.1.1. Linealidad: Elección de la mejor señal instrumental .....	262
IV.2.2. PARÁMETROS DE CALIDAD .....	264
IV.2.3. ESTUDIO DE LA ZONA DE LINEALIDAD ENTRE 0 Y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	265
IV.2.3.1. Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas .....	267
IV.2.3.2. Linealidad: Elección de la mejor señal instrumental .....	270
IV.2.3.3. Obtención de los parámetros de calidad del método .....	271

## CAPÍTULO V:

<b>DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS</b> .....	279
<b>V.1. VALIDACIÓN APLICADA PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO</b> .....	280
V.1.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	280
V.1.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO TINTO .....	280
V.1.2.1. Validación del método en un vino tinto: Verificación de la veracidad .	280
V.1.2.2. Análisis de muestras de vino tinto .....	287
V.1.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO CLARETE .....	290
V.1.3.1. Verificación de la veracidad .....	290
V.1.3.2. Análisis de diversas muestras de vino clarete .....	295
V.1.4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO BLANCO .....	297
V.1.4.1. Verificación de la veracidad .....	297
V.1.4.2. Análisis de muestras de vino blanco .....	302
<b>V.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS Y EL TIPO DE VINO</b> .....	305
V.2.1. ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	306
V.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE .....	308
V.2.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE .....	313
V.2.3.1. Análisis en componentes principales .....	313
V.2.3.2. Análisis de agrupaciones o clusters .....	317
V.2.3.3. Análisis discriminante lineal .....	320
V.2.3.3.a. Análisis discriminante lineal utilizando todas las variables .....	321
V.2.3.3.b. Análisis discriminante lineal por paso a paso hacia atrás .....	324

## CAPÍTULO VI:

<i>DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MALTA, MAÍZ Y CERVEZAS</i> .....	331
VI.1. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS SÓLIDAS: MALTA Y MAÍZ .....	332
VI.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO LÍQUIDO .....	332
VI.1.1.1. Selección del agente extractante .....	332
VI.1.1.2. Optimización de la concentración de agente extractante y del tiempo de extracción .....	334
VI.1.1.3. Estudio de la estabilidad del extracto .....	342
VI.1.2. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MALTA Y MUESTRAS SIMILARES .....	344
VI.1.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO AL ANÁLISIS DE AMINAS BIÓGENAS EN MALTA Y MAÍZ .....	345
VI.1.3.1. Análisis de una muestra de malta .....	345
VI.1.3.2. Análisis de una muestra de maíz .....	347
VI.1.3.3. Verificación de la validez de las matrices estudiadas para la determinación de aminos biógenos .....	350
VI.1.3.3.a. Ensayo del porcentaje de recuperación en malta .....	350
VI.1.3.3.b. Ensayo del porcentaje de recuperación en maíz .....	352
VI.2. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN CERVEZAS .....	354
VI.2.1. RESULTADOS .....	355
VI.3. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA .....	362

## CAPÍTULO VII:

<i>APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS</i> .....	379
VII.1. EXTRACCIÓN EN MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA .....	380
VII.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA ....	384
VII.2.1. ESTUDIOS PRELIMINARES: EXTRACCIÓN DIRECTA .....	385
VII.2.2. EXTRACCIÓN DE LAS AMINAS BIÓGENAS MEDIANTE LA FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS .....	388
VII.2.2.1. Diseño de escrutinio .....	390
VII.2.2.2. Diseño Doehlert .....	393
VII.3. MÉTODO PROPUESTO PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA .....	402
VII.4. APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN A MUESTRAS DE VINOS .....	404
VII.4.1. ESTUDIO DE LA LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN .	404
VII.4.2. APLICACIÓN A LA EXTRACCIÓN DE AMINAS EN VINOS .....	407
<i>CONCLUSIONES</i> .....	413
<i>BIBLIOGRAFÍA</i> .....	419





## OBJETIVOS

## **OBJETIVOS**

Al iniciar este trabajo, nos propusimos como objetivo fundamental, validar la determinación cromatográfica de triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina y espermina en muestras de vino, cerveza y malta, previa derivatización con cloruro de dabsilo.

Con este enfoque, dentro de lo que hemos denominado validación característica, se desarrollan experimentos dirigidos a la reoptimización de las variables implicadas en la reacción de derivatización y separación cromatográfica de los analitos, haciendo uso de las Técnicas Formales de Optimización Multidimensional. Se procede a la obtención de los parámetros de calidad de los mismos, haciendo especial hincapié en el estudio de robustez del método, donde se propone realizarlo desde un punto de vista químico-analítico.

Dentro de la validación aplicada se llevan a cabo estudios centrados en la influencia de la matriz para la obtención de resultados veraces, cuando se aplica el método a las muestras citadas previamente.

Los resultados analíticos, aplicando el análisis multivariante, se utilizan con objeto de proporcionar información química relevante asociada a los procesos de elaboración y características de los vinos y cervezas.

Finalmente, se propone el empleo de la extracción en membrana líquida soportada dentro de la etapa de tratamiento de la muestra, previa a la derivatización e inyección cromatográfica, optimizando dicho proceso de extracción con la función de conveniencia.



## INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

Una de las técnicas que ha experimentado un crecimiento más rápido dentro de la Química Analítica es la **cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**. La rapidez, versatilidad, eficacia y ventajas de esta técnica han dado lugar a una explosión de aplicaciones, métodos, nuevas columnas y sistemas de detección. No obstante, en numerosas ocasiones los analitos no reúnen las condiciones cromatográficas adecuadas para una separación selectiva y una detección sensible. En estos casos, es necesario recurrir a una reacción de **derivatización** que los transforme en otras especies más adecuadas para la etapa cromatográfica.

Un gran número de componentes de los **alimentos** pueden ser separados y determinados mediante HPLC: aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas, ácidos y bases orgánicas, toxinas, aditivos, residuos de pesticidas, nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, cationes, aniones, etc.... Las aplicaciones de la HPLC dentro de la tecnología alimentaria implican, por una parte, el análisis de los componentes de los alimentos naturales o procesados, y el control de los cambios producidos durante el procesado y almacenamiento, y por otra, la identificación y determinación de posibles contaminantes y aditivos. En tal sentido, el contenido de determinadas **aminas biógenas** en numerosos alimentos ha sido ampliamente estudiado

debido a la toxicidad potencial de estos compuestos, siendo el ejemplo más característico el de la histamina, poderoso agente químico cuya presencia en el organismo provoca una gran variedad de efectos tóxicos.

En la actualidad el diseño y desarrollo de nuevos métodos de análisis con la suficiente calidad para ser considerados de utilidad en la práctica diaria, requiere el empleo de algunas **herramientas de la Quimiometría** tales como, las *técnicas de optimización* para el establecimiento de los valores de las variables experimentales que definen un método, tanto más cuanto mayor sea el número de éstas, como es el caso de los métodos cromatográficos en los que además, suele ser necesario un complejo tratamiento de la muestra. A su vez, la calidad demandada por la sociedad establece como necesario argumentar la validez de los resultados generados por el método, verificando convenientemente su *validación* en la que además de comprobar la veracidad y establecer la incertidumbre asociada al mismo se recomienda establecer los intervalos de dichas variables que aseguren la *robustez* del método empleado.

Finalmente, aprovechando la cantidad de datos que suministra una separación cromatográfica multicomponente se puede hacer uso de algunas *técnicas de reconocimiento de pautas* con objeto de extraer la *máxima información de la muestra analizada*. En este sentido, partiendo de algunas características particulares de los datos químicos como son el elevado número de factores que influyen sobre los resultados, (pH, concentración de reactivo, temperatura, tiempo de equilibración, etc...) la posibilidad de controlar la mayoría de ellos por parte del químico analítico y el bajo valor de la incertidumbre asociada a una medida analítica (comprendida normalmente entre un 0.3 y un 3 %) permiten generar, interpretar y comunicar información relevante para la toma de decisiones.

## AMINAS BIÓGENAS

Las **aminas biógenas**, llamadas así porque se generan por la acción de organismos vivos, son bases nitrogenadas de bajo peso molecular sintetizadas biológicamente a partir de [1,2]:

- Descarboxilación de aminoácidos.
- Aminación/Transaminación de aldehídos y/o cetonas.

Se incluyen dentro de aquellas sustancias fisiológicamente activas en el metabolismo humano, presentes o incorporadas al mismo a través de la ingestión de alimentos. Algunas de ellas son muy importantes para el buen funcionamiento fisiológico, mientras que otras, sobre todo ingeridas en grandes cantidades, pueden ejercer un efecto perjudicial sobre los sistemas nervioso, cardiovascular, etc..., [3].

Desde el punto de vista químico se dividen en varias familias, en función del grupo orgánico que posean en común (Figura 1), pudiéndose distinguir [4]:

1. *Aminas alifáticas*. Son las más simples y están constituidas por cadenas hidrocarbonadas, que poseen uno, o varios grupos amino, por lo que en general se las conoce como *poliaminas*. Entre ellas destacan por su efecto toxicológico la putrescina, la cadaverina, la espermidina y la espermina.
2. *Catecolaminas*. El grupo funcional que las caracteriza es el grupo “catecol”, unido a una cadena de etilamina o alguno de sus derivados. Son metabolitos de la tirosina, y entre ellos destacan la dopamina, adrenalina (epinefrina) y noradrenalina (norepinefrina).



3. *Fenilalquilaminas*. En este caso, los grupos funcionales distintivos son los “fenilo” o “fenol”, unidos a una cadena de etilamina o de sus derivados. Entre ellas destacan la feniletilamina, los isómeros orto, meta y para de la tiramina, la feniletanolamina, m-octopamina, p-octopamina, etc....
4. *Indolalquilaminas*. Su grupo característico es el grupo “indol”, unido a la etilamina sola o substituida. Destacan por su importancia la triptamina, serotonina (5-hidroxitriptamina) y 5-metoxitriptamina.
5. *Imidazolaminas*. Son compuestos formados por un grupo “imidazol”, y una cadena de etilamina. Entre las aminas más importantes destacan la histamina, telemetilhistamina y pros-histamina.

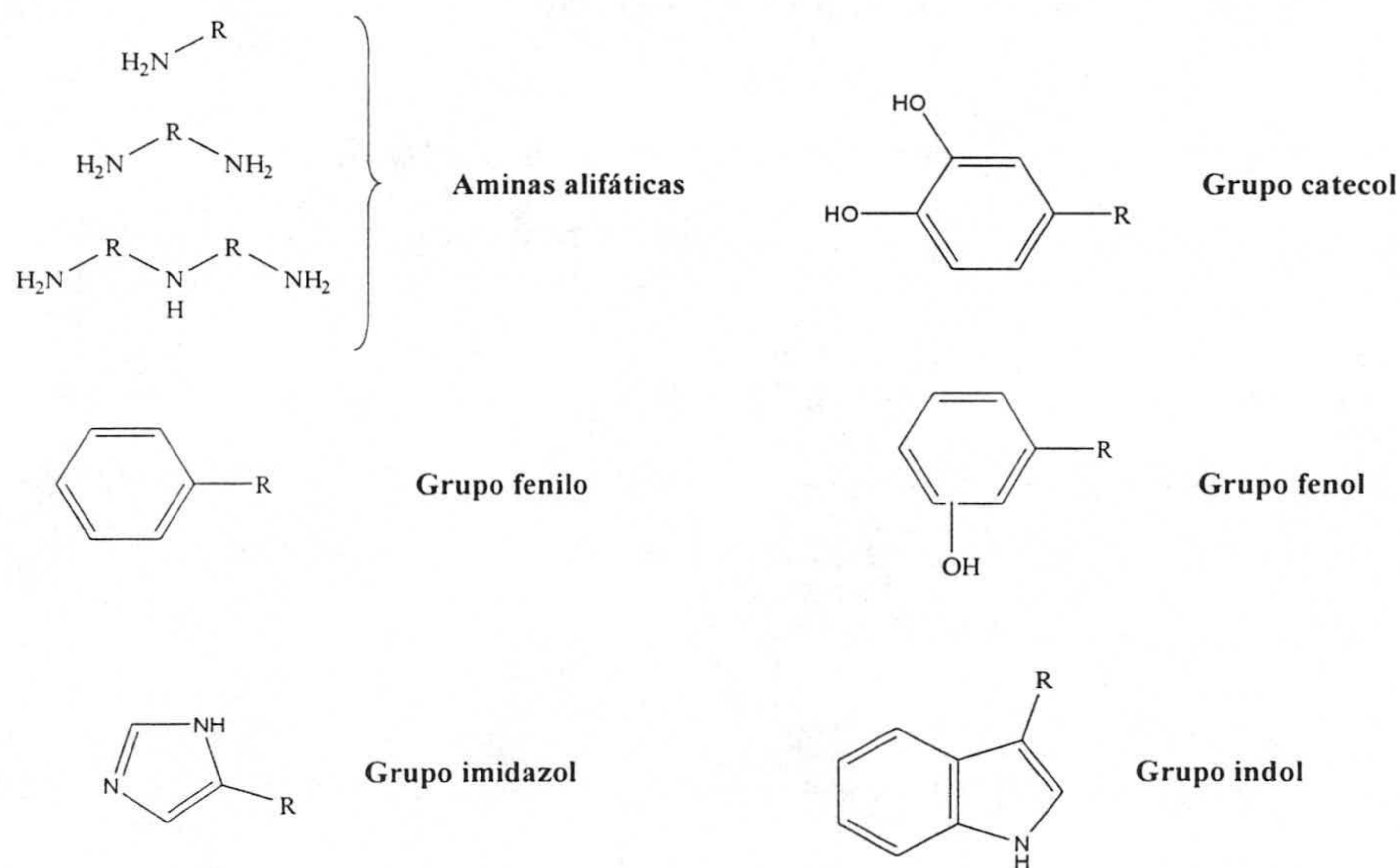
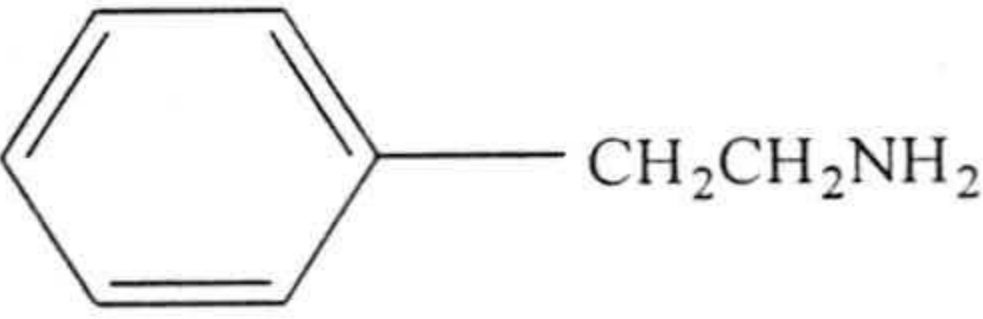
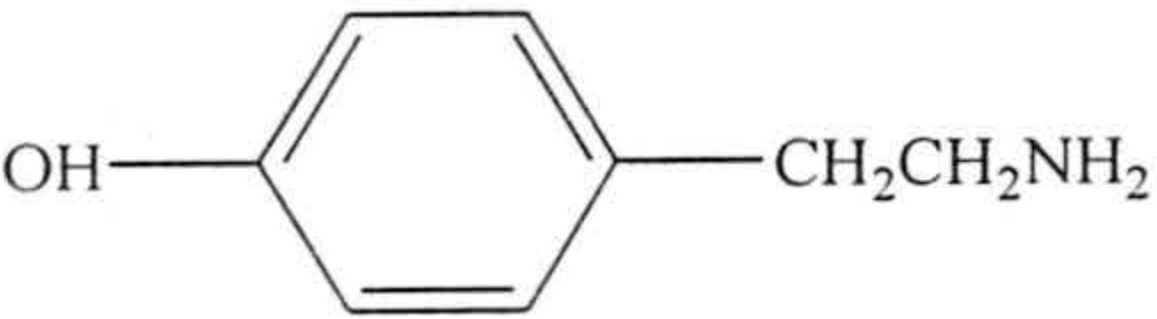
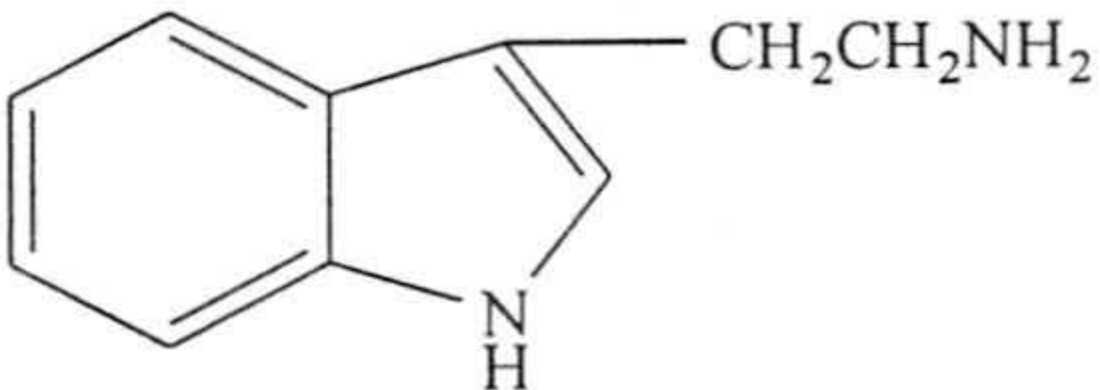
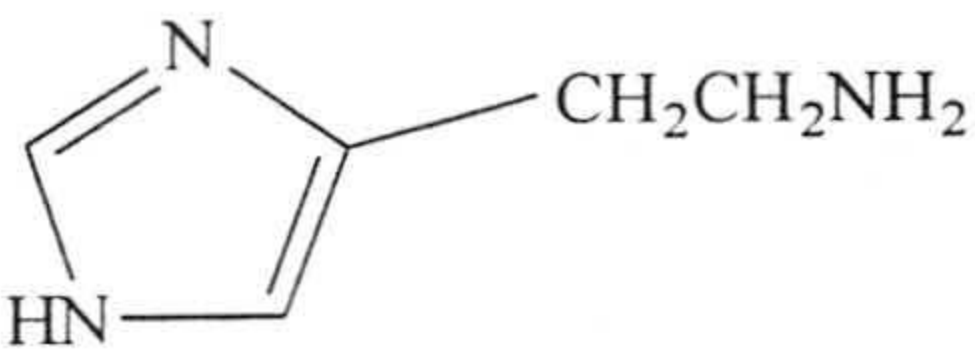


Figura 1. Grupos funcionales característicos de las aminas biógenas

Esta Memoria se centra en el estudio de algunas fenilalquilaminas, indolalquilaminas, imidazolaminas y poliaminas, y en concreto de las aminos indicadas en la Tabla 1, donde se recogen las estructuras de estos compuestos, sus pesos moleculares y su fórmula empírica.

**Tabla 1. Estructura química de las aminos estudiadas**

<u>Estructura</u>	<u>Fórmula empírica</u>	<u>Peso molecular (g/mol)</u>	<u>Nombre</u>
	$C_8H_{11}N$	121.18	<i>Feniletilamina</i>
	$C_8H_{11}NO$	137.18	<i>Tiramina</i>
	$C_{10}H_{12}N_2$	160.22	<i>Triptamina</i>
	$C_5H_9N_3$	111.15	<i>Histamina</i>
$NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$	$C_4H_{12}N_2$	88.15	<i>Putrescina</i>
$NH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$	$C_5H_{14}N_2$	102.18	<i>Cadaverina</i>
$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$	$C_7H_{19}N_3$	145.25	<i>Espermidina</i>
$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH$	$C_{10}H_{26}N_4$	202.34	<i>Espermina</i>

## ► FORMACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS

Las aminas biógenas pueden ser sintetizadas mediante vía endógena, por las rutas metabólicas normales que implican básicamente la descarboxilación de aminoácidos, o bien, pueden generarse de forma exógena, por ejemplo en el tracto intestinal, por acción de bacterias que inducen la descarboxilación de aminoácidos liberados por la hidrólisis enzimática de las proteínas [5].

Algunos ejemplos de las rutas biológicas en las que se generan algunas de las aminas biógenas se muestran en la Figura 2 [6,7]:

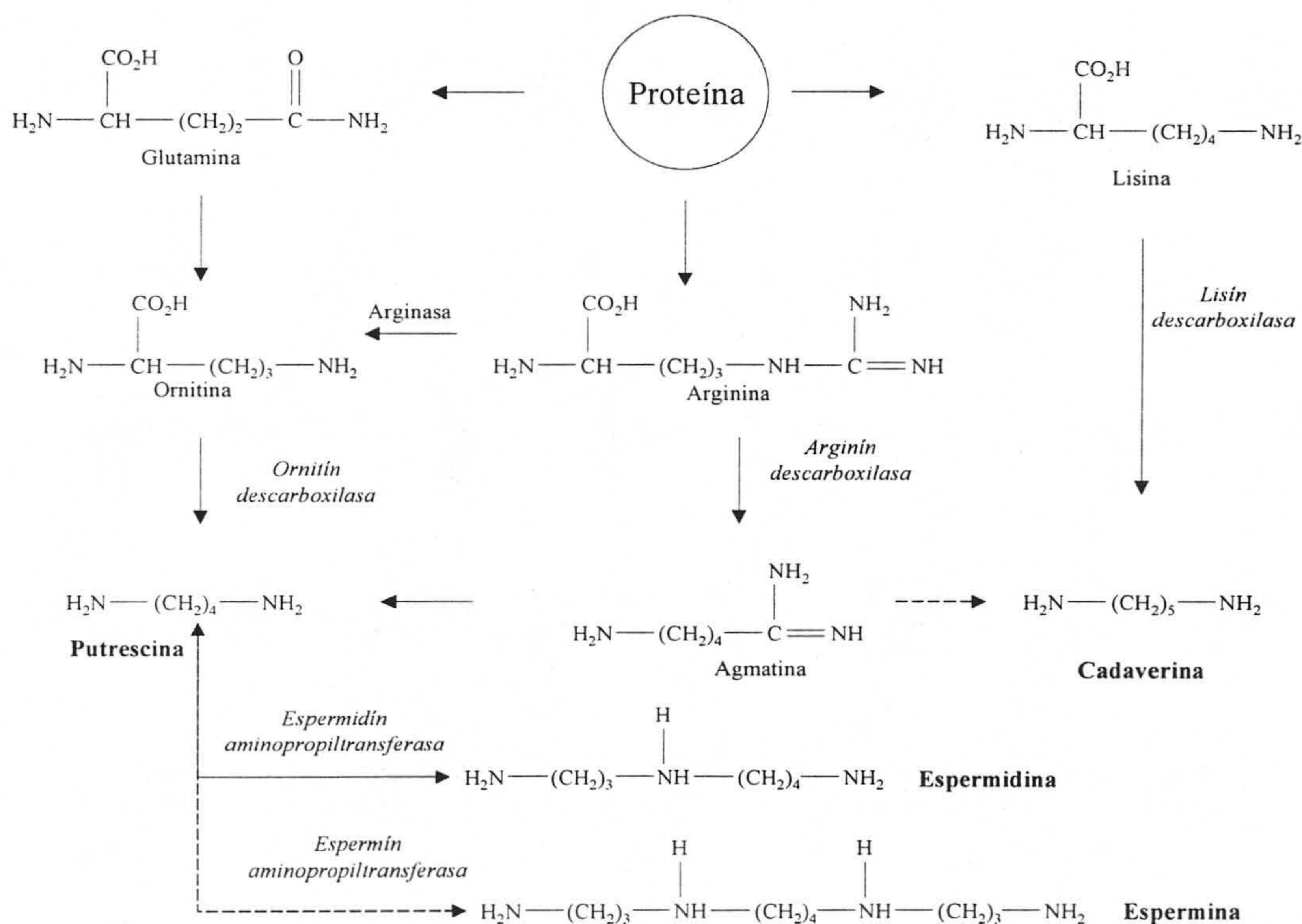


Figura 2. Diagrama para la generación de algunas aminas biógenas

En ella se puede observar, que debido a las proteolisis, se libera arginina, que mediante la acción de la arginasa, produce ornitina. Ésta es descarboxilada por la acción de la ornitín descarboxilasa produciendo *putrescina*, que mediante la adición de grupos aminopropil, genera *espermidina* y *espermina*.

Alternativamente, mediante la proteolisis se libera lisina, que genera la *cadaverina*.

De la misma forma, y tal como se muestra en la Figura 3, mediante la descarboxilación de los correspondientes aminoácidos se obtienen el resto de las aminas biógenas estudiadas en esta Memoria [1].

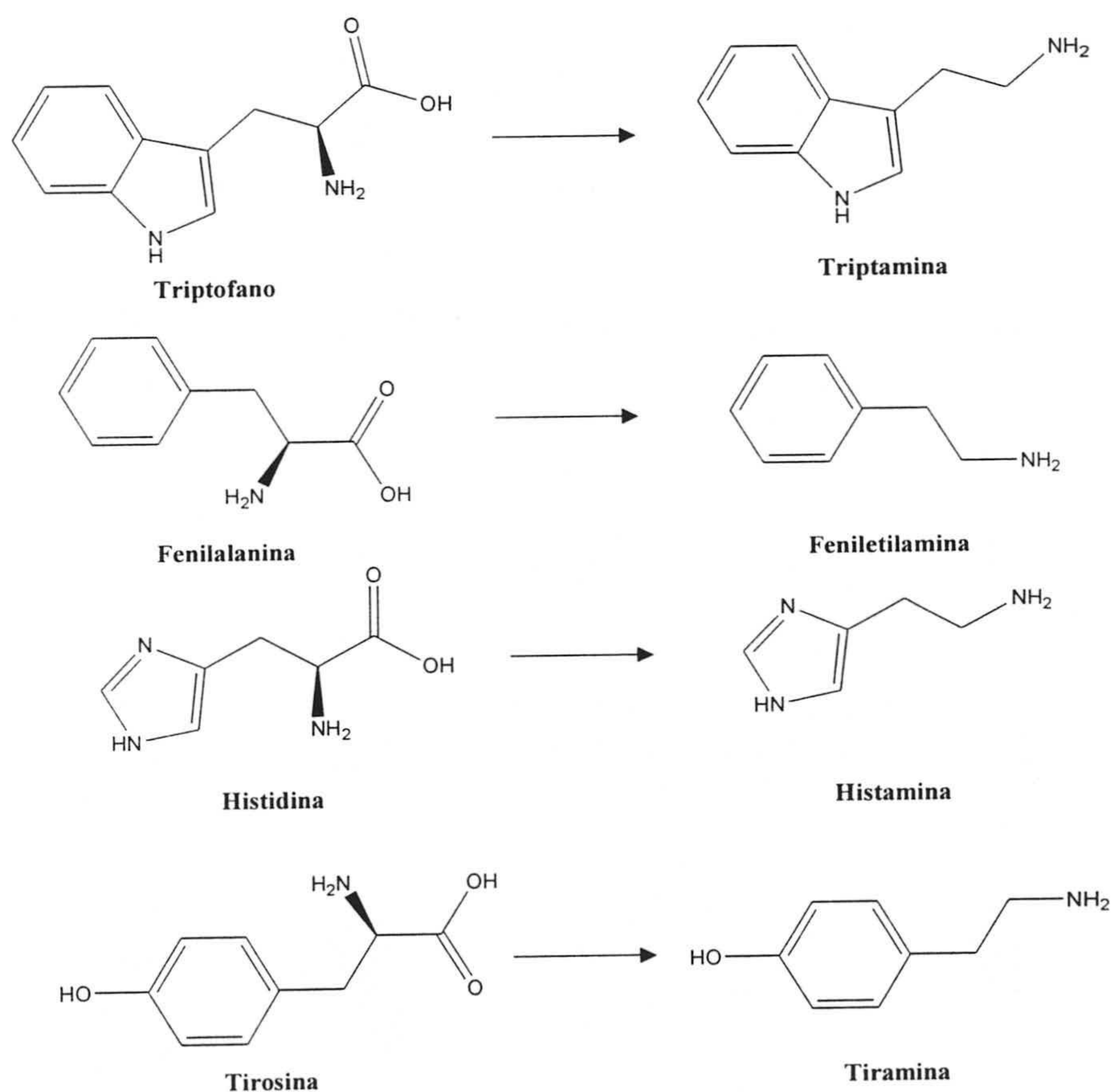


Figura 3. Descarboxilación de los aminoácidos para la generación de aminas biógenas

Desde un punto de vista general, la **formación de aminas biógenas en alimentos** depende de tres factores [1]:

- Presencia de aminoácidos libres en el alimento.
- Presencia de microorganismos con enzimas capaces de descarboxilar a dichos aminoácidos.
- Condiciones que permitan el crecimiento bacteriano y favorezcan la descarboxilación.

Puesto que prácticamente la mayoría de los alimentos contienen proteínas o aminoácidos libres susceptibles de ser transformados en aminas biógenas, los dos últimos factores son los que influirán en mayor medida en la formación de estos compuestos en alimentos.

En bibliografía aparecen un gran número de microorganismos capaces de descarboxilar aminoácidos [1,3,8], entre los que destacan *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium*. Además, en productos que sufren algún tipo de proceso de fermentación el origen de las aminas se debe a la presencia de bacterias lácticas como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y *Streptococcus*.

En la Tabla 2 se recogen algunas de las bacterias más frecuentemente encontradas en diversos alimentos y que originan aminas biógenas.

Tabla 2. Bacterias aisladas en diversos tipos de alimentos

<u>Alimento</u>	<u>Bacteria</u>	<u>Referencia</u>
Pescado	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnei alvei</i> , <i>Proteus morganii</i> , <i>Morganella Vulgaris</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Serratia Marcescens</i>	[3], [9], [10], [11]
Queso	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacilus macerans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Clostridium perfringes</i>	[12], [13], [14]
Carne	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus carnis</i> , <i>Lactobacillus divergens</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Streptococcus carnosus</i> , <i>Micrococcus Varians</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>	[1], [13], [15]
Embutidos	<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Citrobacter freudii</i>	[1], [13]
Vino	<i>Pediococcus cerevisiae</i> , <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i>	[1], [13], [16], [17]
Cerveza	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Pediococcus spp.</i> , <i>Klebsiella Terrigena</i>	[19], [19]
Vegetales	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	[3]
Soja, Miso.	<i>Pediococcus halophilus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Pediococcus cereveisiae</i>	[20]

Los principales factores que influyen en la **actividad y crecimiento bacteriano en alimentos** son:

① Temperatura y tiempo de almacenamiento

Las condiciones de manufacturado influyen en la producción de aminas a partir de los aminoácidos libres. En este sentido los factores más importantes son el tiempo y la temperatura de almacenamiento [12].

En general, se ha observado que periodos de almacenamiento prolongado y temperaturas elevadas favorecen la producción de aminas. Se conocen estudios [21] en los que se correlaciona el contenido de *putrescina*, *espermina*, *espermidina*, *cadaverina* y *tiramina*, con el tiempo y temperatura de almacenamiento.

② pH

Influye sobre la acción de las aminodescarboxilasas y los microorganismos, de tal forma que se ha demostrado que su actividad es máxima cuando el pH es ligeramente ácido (pH óptimo = 4-5.5) [1].

③ Contenido en sal

Este factor es especialmente importante en pescado almacenado o sazonado y ha sido estudiado extensamente para la *histamina*. La información recogida en bibliografía es contradictoria ya que algunos autores como Taylor y col. [22] indican que concentraciones comprendidas entre 3.5-5.5 % inhiben la producción de esta amina en el pescado. Sin embargo, otros autores estudian casos de bacterias que son capaces de producir histamina en medios que poseen un 12 % de NaCl [3].

---

④ Adición de acidulantes

En algunos casos se ha demostrado que la adición de ciertos conservantes a los alimentos, como sorbitol, o ácidos cítrico, sórbico y succínico pueden inhibir la formación de algunas aminos biógenas como la *histamina* [3].

⑤ Presencia de oxígeno

Condiciona la síntesis de aminos biógenas al modificar el comportamiento de las bacterias. En este sentido, se ha demostrado que bacterias como la *Enterobacter cloacae* producen, en ambientes anaeróbicos, la mitad de la *putrescina* generada en condiciones aeróbicas, mientras que otras como la *Klebsiella pneumoniae* en condiciones aneróbicas disminuye la producción de *cadaverina*, pero genera *putrescina* en condiciones anaeróbicas [23].

En general, y como ***criterios básicos para poder controlar la presencia de aminos biógenas en alimentos***, es necesario:

- Utilizar unas condiciones térmicas y de almacenamiento aceptables.
- Realizar un control estricto de la higiene, tanto en las materias primas como en los ambientes de procesado, con objeto de inhibir la generación de microorganismos [12].
- Controlar las materias primas, puesto que la flora microbiana original es importante para el posterior desarrollo de bacterias que puedan producir aminos biógenas [15].
- Utilizar cortos periodos de fermentación para la elaboración de *productos fermentados*, así como llevar a cabo una adecuada selección de las levaduras [17, 24].



- En el proceso de elaboración de *vinos*, incluir el uso de dióxido de azufre, bentonita o lisozima, siendo esta última, una enzima que ataca a las bacterias hidrolizando los enlaces glicosídicos de los mucopolisacáridos de la pared bacteriana [29].

## ► PRESENCIA DE AMINAS BIÓGENAS EN ALIMENTOS

La cantidad de aminos presentes en los alimentos depende tanto de la naturaleza de los mismos, como de la presencia de microorganismos [26]. En general, a la hora de hablar de contenidos cabe distinguir entre aquellos alimentos que no han “experimentado” un proceso de fermentación, de los que sí lo han “experimentado”.

### 1. Alimentos no fermentados

Los altos valores de aminos biógenos presentes, suelen indicar una actividad microbiana acusada [1], debida en gran parte a una manipulación y almacenamiento incorrectos. Destacan los pescados, aunque también se han detectado estos compuestos en carnes, frutas y vegetales.

#### *a) Pescado*

La mayor cantidad de aminos se encuentra en los pescados de la familia de los escómbridos (*Scombridae*), entre los que destacan el atún, arenque, caballa y bonito, o en otros peces como sardina, arenque o anchoa. La presencia y formación de aminos se debe básicamente al gran contenido de histidina que presentan, oscilando entre  $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para el arenque y  $15 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para el atún [3].

En 1978, Mietz y Karmas [6] observaron que durante el almacenamiento del

pescado, aumentaba el contenido de *putrescina*, *cadaverina* y *histamina*, mientras que descendía el de *espermidina* y *espermina* (debido probablemente a reacciones de deaminación o por ser consumidas por las propias bacterias o microbios presentes en el alimento [27]), por lo que introdujeron un índice para señalar la calidad de los pescados, basándose en la cantidad de las distintas aminas detectadas en los mismos, denominado BAI (*Biogenic Amines Index*):

$$BAI: \frac{ppm_{histamina} + ppm_{cadaverina} + ppm_{putrescina}}{1 + ppm_{espermidina} + ppm_{espermina}} \quad (1)$$

De esta forma, los pescados en mal estado tendrán altos contenidos de histamina, cadaverina y putrescina, mientras que la espermidina y espermina tendrán valores próximos a cero, por lo que el índice será alto, indicando que la descomposición del pescado está muy avanzada (Tabla 3).

**Tabla 3. Valores del índice de aminas biógenas para distintos tipos de pescado**

<b>Pescado</b>	<b>BAI</b>	<b>Clase</b>
<i>Escorpina</i>	0 -2	Pasable
	2-10	Indicios de descomposición
	10-∞	Descomposición avanzada
<i>Filete de Salmón</i>	0-0.8	Pasable
	0.8-8	Indicios de descomposición
	8-∞	Descomposición avanzada
<i>Cola de Langosta</i>	0-5	Pasable
	5-50	Indicios de descomposición
	50-∞	Descomposición avanzada

La Tabla 4 recoge los datos referentes al contenido de aminas biógenas en distintos tipos de pescado:

**Tabla 4. Contenido de aminas biógenas (mg·kg<sup>-1</sup>) en diversos tipos de pescado**

	TRIP	FEN	PUT	CAD	HIST	TIR	SPD	SP	Ref.
<i>Anchoa</i>	0.10	1.50	0.15	0.11	0.50	0.55	2.95	6.35	[28]
	62.22	62.30	265.23	226.89	31.57	8.40	2.06	9.79	[29]
<i>Merluza</i>	nd <sup>a</sup>	nd	0.75	3.10	nd	nd	2.40	7.45	[28]
<i>Atún</i>	0.85	nd	0.78	1.59	0.70	2.19	2.36	8.10	[29]
	12.0	nd	nd	nd	nd		nd	nd	[30]
<i>Bonito</i>	nd	3.85	3.92	12.02	1.62		0.86	6.36	[29]
<i>Caballa</i>	0.92	nd	2.79	5.91	0.52	nd	3.69	2.09	[29]
			9.5	28.0	20.7	25.8			[31]
<i>Anguila</i>	nd	3.50	5.98	16.56	0.50	1.71	nd	3.80	[29]
<i>Calamar</i>	nd	nd	6.99	4.75	0.65	2.80	nd	5.84	[29]
<i>Aguja</i>	nd	nd	nd	nd	nd		nd	20.6	[30]
<i>Sardina</i>			3.3	27.4	16.2	5.4			[31]

**TRIP:** Triptamina; **FEN:** Feniletilamina; **PUT:** Putrescina; **CAD:** Cadaverina; **HIST:** Histamina; **TIR:** Tiramina; **SPD:** Espermidina; **SP:** Espermina. <sup>a</sup> No detectada.

### **b) Carne**

La carne fresca de cerdo contiene valores altos de *espermidina* y *espermina*, mientras que presenta bajos valores de *putrescina*, *cadaverina*, *histamina* y *tiramina* [23]. Sin embargo, si dicha carne es almacenada a temperaturas altas,

aproximadamente a 30 °C, el contenido de aminos aumenta considerablemente.

### c) Otros productos

Las aminos biógenas suelen considerarse como constituyentes naturales de los tejidos vegetales, encontrándose en naranjas, limones, albaricoques, uvas y cereales entre otros. Su contenido varía en función de la parte de la planta que se analiza, siendo menor en la flor y mayor en las semillas [32]. Las aminos más frecuentes en este tipo de alimentos son la *putrescina* y la *espermidina* [3,33].

En la Tabla 5 se muestran los contenidos de aminos en muestras vegetales.

**Tabla 5. Contenido de aminos biógenas (mg·kg<sup>-1</sup>) en muestras vegetales**

	<b>TRIP</b>	<b>FEN</b>	<b>PUT</b>	<b>CAD</b>	<b>HIST</b>	<b>TIR</b>	<b>SPD</b>	<b>SP</b>	<b>Ref.</b>
<i>Uva</i>		0.24	3.72	1.24	0.26	0.49	30.67		[34]
<i>Malta</i>	3.75	1.15	41.25	1.07	2.42	13.65	45.3	20.27	[35]
<i>Malta</i>	nd <sup>a</sup>		72.0	12.92	11.75	24.17			[36]
<i>Lúpulo</i>	nd	12.80	5.07	nd	nd	11.82	20.92	13.90	[35]
<i>Lúpulo</i>	nd		18.80	5.08	6.20	13.95			[36]
<i>Banana</i>			294.2				24.2	29.6	[37]
<i>Cebollino</i>	nd		254.42	5.30	nd	8.07	236.27	64.93	[38]

**TRIP:** Triptamina; **FEN:** Feniletilamina; **PUT:** Putrescina; **CAD:** Cadaverina; **HIST:** Histamina; **TIR:** Tiramina; **SPD:** Espermidina; **SP:** Espermina. <sup>a</sup> No detectada.

Se ha detectado *feniletilamina* en el cacao [1], y por extensión en los productos derivados de él como el chocolate, donde junto a ella se detectan la *tiramina* y la *triptamina* [39].

Por último, se han detectado *espermina*, *espermidina* y *putrescina* en leche

humana, siendo sus cantidades muy variables en función del individuo analizado [1]. La leche de vaca (entera y semidesnatada) presenta bajas cantidades de poliaminas [40].

## **2. Alimentos fermentados**

El contenido de aminos biógenas en este tipo de alimentos suele ser considerablemente alto. Este hecho se ha atribuido a la acción de las bacterias lácticas.

### ***a) Queso***

Después del pescado, el queso es el alimento que suele presentar los contenidos de aminos biógenas más elevado ya que durante su elaboración se reúnen las condiciones más favorables para la formación de estos compuestos [14].

En general, durante el proceso de curación del queso, la caseína se degrada lentamente, originando un aumento de los aminoácidos libres susceptibles de ser descarboxilados [41]. El contenido aumenta apreciablemente si además la temperatura de curado y/o almacenamiento es alta.

En la Tabla 6 se indican los contenidos de aminos en varios tipos de queso analizados, aunque hay que indicar que se conocen datos adicionales de presencia de aminos biógenas en otros tipos de quesos, como son el suizo, cheddar, roquefort, emmental y romadur [11,42].

Tabla 6. Contenido de aminas biógenas ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) en muestras de queso

	TRIP	FEN	PUT	CAD	HIST	TIR	SPD	SP	Ref.
<i>Parmesano</i>	nd <sup>a</sup>	0.1	2.4	0.7	2.1	1.7	0.3	0.3	[14]
	nd	0.8	0.3	4.5	42.0	0.1	0.4	Nd	[43]
<i>Gorgonzola</i>	9.6	4.3	4.1	2.5	13.5	3.9	2.5	13.1	[14]
	56.5	128.7			327.0	270.6			[44]
<i>Gouda</i>	6.3	2.5	23.3	7.3	28.4	7.0	2.7	3.0	[14]
<i>Provolone</i>	0.8	3.8	5.7	74.4	10.4	0.6	1.6	3.1	[14]
<i>Mozzarella</i>	0.5	0.8	3.5	2.3	15.7	2.0	2.8	1.9	[14]

TRIP: Triptamina; FEN: Feniletilamina; PUT: Putrescina; CAD: Cadaverina; HIST: Histamina; TIR: Tiramina; SPD: Espermidina; SP: Espermina.<sup>a</sup> No detectada.

### b) Vegetales fermentados

El estudio de la presencia de aminas biógenas en este tipo de alimentos se localiza básicamente en el *chucrut*, o, col picada que se hace fermentar en salmuera, y en *productos asiáticos que proceden de la fermentación de la soja y otros cereales*.

Los estudios centrados en la elaboración del *chucrut* [3] indican que durante la etapa inicial de la fermentación se generan cantidades apreciables de *putrescina*, mientras que al final del período de fermentación aparecen *histamina* y *tiramina*.

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos al analizar 121 muestras de este producto [45]. El hecho más significativo está en que el consumo de este alimento puede representar la ingestión de cantidades considerables de aminas.

Tabla 7. Valores de aminas biógenas ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) en chucrut

	<u>Valor medio</u>	<u>Intervalo</u>
<i>Putrescina</i>	146	2.8-529
<i>Cadaverina</i>	50.0	nd-293
<i>Histamina</i>	7.8	nd-229
<i>Tiramina</i>	174	nd-951
<i>Tiramina</i>	5.1	nd-37.5
<i>Espermidina</i>	8.2	nd-47.0

La variabilidad de los niveles de aminas biógenas en los productos derivados de la fermentación de la soja y otros cereales depende de las diferentes proporciones utilizadas entre las semillas y la soja, de la composición microbiana y de las condiciones de fermentación [46]. Se han detectado *putrescina*, *cadaverina*, *histamina* y *tiramina*, en concentraciones muy variadas y elevadas, en varios productos [12,20].

### c) Embutidos

La causa principal de la presencia de aminas biógenas en estos productos es la fermentación, de tal forma que, la concentración final de aminas puede verse influenciada por las condiciones de madurado del embutido, sobre todo por la temperatura a la que se lleva a cabo la maduración [47].

En la Tabla 8 se recogen algunos de los contenidos recogidos en bibliografía.

Tabla 8. Contenido de aminos biógenas ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) en embutidos

TRIP	FEN	PUT	CAD	HIST	TIR	SPD	SP	Ref.
359.84		29.49	453.26	637.73	121.95	20.40	94.72	[38]
15.1	9.5	8.5	4.2	69.6	130.9	2.8	19.2	[48]
12.70	9.70	38.62	19.20	5.25	14.25	2.30	1.75	[49]
6.10	3.00	13.31	33.44	2.10	6.75	1.50	0.97	[50]

**TRIP:** Triptamina; **FEN:** Feniletilamina; **PUT:** Putrescina; **CAD:** Cadaverina; **HIST:** Histamina; **TIR:** Tiramina; **SPD:** Espermidina; **SP:** Espermina.

#### d) *Pescado fermentado*

Aunque se ha investigado poco acerca del contenido de aminos en estos productos, ya que como tales no se ingieren de forma deliberada, el nivel de aminos biógenas varía considerablemente, oscilando entre 10 y 760 mg de amina por kilogramo de producto [20].

#### e) *Vino*

La presencia de aminos biógenas en este tipo de producto alimentario fue puesta de manifiesto por primera vez en 1954 por Tarantola [51], y desde entonces, han proliferado los estudios [25].

En general, la presencia de estos compuestos en los vinos se debe a dos causas fundamentales:

- A la presencia de las aminos en la uva.
- Realización de la fermentación maloláctica.

En relación a la presencia de aminos en la uva o bien en el mosto, suelen aparecer en una mayor concentración la *espermidina* y *espermina* [52] aunque suelen



degradarse durante el proceso de vinificación [17].

En general, y aunque algunos autores indiquen la posibilidad de la formación de aminas biógenas durante la fermentación alcohólica [53], hay un consenso general, a la hora de afirmar que la principal causa de la generación de aminas biógenas en los vinos es la **fermentación maloláctica** [25], descartándose su aparición durante la fermentación alcohólica aunque el mosto presente altos valores de histidina.

Esta fermentación, durante la cual se produce ácido láctico a partir de ácido maloláctico, la “sufren” los vinos jóvenes cuando han finalizado la fermentación alcohólica o están a punto de acabarla, proporcionando al vino estabilidad, afinamiento y pérdida de acidez [24].

La abundancia de aminas dependerá tanto de la cantidad de bacterias lácticas, como de la cantidad de aminoácidos presentes después de la fermentación alcohólica. En este sentido, conviene indicar que puesto que las levaduras causantes de la fermentación alcohólica son compuestos ricos en nitrógeno, si no son eliminados del vino después de esta fermentación, pueden sufrir procesos de autólisis, originando una gran cantidad de péptidos y aminoácidos libres que serán susceptibles de ser descarboxilados durante la fermentación maloláctica.

Por otro lado, **el pH del vino** es de vital importancia, ya que en función de éste, se activarán unas bacterias lácticas u otras [17]. Se ha detectado que valores de pH comprendidos entre 4 y 5, óptimos para una actividad bacteriana intensa, favorecen la proliferación de aminas biógenas [16].

Las condiciones óptimas para la fermentación maloláctica son:

- pH de 4.2 a 4.5.
- Temperatura de 20 a 25 °C.
- Elevada presencia de nutrientes.

En muchas ocasiones, la presencia de aminos en vino se puede atribuir también a unas **malas condiciones de higiene del instrumental empleado en el proceso de elaboración del vino** [17].

En la Tabla 9, se muestran algunos valores de aminos encontrados en vinos tintos, claretes y blancos, donde puede apreciarse, que las aminos presentes en una mayor concentración son *histamina, tiramina y putrescina*. También cabe destacar que, ***los vinos blancos presentan una menor concentración en aminos que los tintos***. Este hecho puede atribuirse a varios factores, entre los que destacan [25]:

- La extensión de la fermentación maloláctica, ya que en los vinos blancos es nula o menos importante que en los vinos tintos.
- El empleo de bentonita en la elaboración de vinos blancos, ya que como se ha comentado anteriormente parece ser que además de servir para “clarificar” el vino, reduce su contenido en aminos.

Tabla 9. Contenido de aminas biógenas (mg·l<sup>-1</sup>) en muestras de vino

	TRIP	FEN	PUT	CAD	HIST	TIR	SPD	SP	Ref.
<b>Vino Tinto</b>									
<i>España</i>		0.31	2.75	0.22	6.04	0.52			[53]
		nd <sup>a</sup>	9.0	0.3	1.1				[54]
		0.59	7.80	0.54	4.67	3.39			[55]
			3.76	nd	5.13	nd			[56]
<i>Portugal</i>		0.853	6.905	0.190	3.202	1.443	0.341	0.031	[52,57]
<i>Francia</i>		0.20	4.83	0.26	1.15	0.69			[59]
		1.9	10.8	0.2	3.7	3.7	0.6	0.1	[59]
<i>Italia</i>	nd	2.4			7.9	3.6			[60]
<i>Suiza</i>		6	9	0	26	8			[61]
<b>Vino Clarete</b>									
<i>España</i>		nd	2.65	0.36	1.2	0.5			[53]
		0.55	4.30	< 0.2	0.58	< 0.40			[55]
		3.65	nd	2.48	nd				[56]
<i>Francia</i>		1.5	2.5	0.4	0.4	2.3	0.4	0.2	[59]
<b>Vino Blanco</b>									
<i>España</i>		0.10	1.55	1.50	3.70	0.20			[53]
		nd	0.6	nd	0.5				[54]
		0.79	1.96	< 0.2	0.30	< 0.4			[55]
		3.04	nd	1.15	nd				[56]
<i>Portugal</i>		0.384	2.081	0.068	0.072	0.057	0.075	nd	[52,57]
<i>Francia</i>		0.9	1.9	0.1	0.1	2.2	0.3	0.1	[59]

TRIP: Triptamina; FEN: Feniletilamina; PUT: Putrescina; CAD: Cadaverina; HIST: Histamina; TIR: Tiramina; SPD: Espermidina; SP: Espermina. <sup>a</sup> No detectada.

*c) Cerveza*

Durante el proceso de elaboración de este producto, se cumplen los tres requisitos básicos para la generación de aminas, que como ya hemos comentado son la presencia de aminoácidos libres, la existencia de microorganismos con enzimas capaces de descarboxilar los aminoácidos y las condiciones favorables para el crecimiento microbiano.

En general, y puesto que las levaduras empleadas durante el proceso de fermentación de la cerveza no son capaces de generar las aminas, la presencia de bacterias lácticas causantes de su presencia en cervezas se debe a unas malas condiciones higiénicas durante el proceso de elaboración. Así la existencia de aminas biógenas en cerveza es el resultado de **contaminación bacteriana** durante el proceso de elaboración, habiéndose descrito una correlación entre la cantidad de bacterias y el contenido de *tiramina* [18].

En la Tabla 10 se recogen los contenidos de aminas biógenas encontrados en cervezas de distinta procedencia.

Tabla 10. Contenido de aminas biógenas (mg·l<sup>-1</sup>) en cerveza

	TRIP	FEN	PUT	CAD	HIST	TIR	SPD	SP	Ref.
<i>Con alcohol</i>									
<i>España</i>	1.4	0.4	5.0	1.0	0.8	5.0	0.8	0.2	[62]
			5.08	0.61			1.40	0.77	[63]
<i>Italia</i>	0.6	1.2	3.2	0.5	nd	5.0	0.6	nd	[64]
<i>Israel</i>					4.51	7.58			[65]
<i>Chequia</i>	1.06		7.24	13.02	0.73	5.61			[36]
<i>Canada</i>			4.2		5.1	14.6			[66]
<i>Sin alcohol</i>									
<i>España</i>	0.1	0.3	3.2	0.3	0.4	5.4	1.7	nd	[62]
<i>Italia</i>	0.5	0.6	2.1	0.1	nd	1.9	0.9	nd	[64]
<i>Chequia</i>	1.62		8.34	12.05	1.02	5.54			[36]

**TRIP:** Triptamina; **FEN:** Feniletilamina; **PUT:** Putrescina; **CAD:** Cadaverina; **HIST:** Histamina; **TIR:** Tiramina; **SPD:** Espermidina; **SP:** Espermina. <sup>a</sup> No detectada.

## ► TOXICIDAD DE LAS AMINAS BIÓGENAS

Aunque algunas aminas biógenas como *triptamina*, *feniletilamina*, *histamina*, *tiramina* y *putrescina* son necesarias para ciertas funciones fisiológicas críticas relacionadas tanto con el sistema nervioso, como con el cardiovascular, el consumo de alimentos conteniendo estos compuestos puede llevar asociada una toxicosis, ya sea exógena

(alimentaria), o endógena (toxicosis del metabolismo). La Tabla 11 reúne los efectos más relevantes asociados a estos compuestos [3].

**Tabla 11. Efectos asociados a la toxicosis por aminas biógenas**

<u>Amina</u>	<u>Efecto</u>
Histamina	<p>Libera adrenalina y noradrenalina.</p> <p>Excita la musculatura lisa de útero, intestino y tracto respiratorio.</p> <p>Estimula las neuronas gástricas y motoras.</p> <p>Controla la secreción gástrica.</p>
Tiramina	<p>Constricción de los vasos sanguíneos.</p> <p>Aumenta el rendimiento cardíaco.</p> <p>Provoca salivación y lacrimación.</p> <p>Aumento de la respiración.</p> <p>Aumento el contenido de glucosa en sangre.</p> <p>Libera noradrenalina desde el sistema nervioso.</p> <p>Migrañas.</p>
Poliaminas	<p>Hipotensión.</p> <p>Potencian la toxicidad de las otras aminas.</p> <p>Parálisis de las extremidades.</p> <p>Interaccionan con las cadenas de ADN y ARN.</p> <p>Inhiben la oxidación de ácidos grasos.</p>
Feniletilamina	<p>Libera noradrenalina desde el sistema nervioso.</p> <p>Aumenta la presión sanguínea.</p> <p>Migrañas.</p>
Triptamina	<p>Aumenta la presión sanguínea.</p>

Uno de los problemas toxicológicos más discutidos en relación con este tipo de compuestos es el de su **posible actuación como precursores de agentes mutágenos o carcinogénicos, especialmente de las nitrosaminas**, ya que al contener un grupo amino pueden ser nitradas, o formar compuestos capaces de generar nitrosaminas.

Las aminas biógenas más relacionadas con este hecho son la *putrescina*, la *cadaverina*, la *espermidina* y la *espermina*. Se conocen estudios en los que algunas de ellas, i.e. *putrescina* y *cadaverina*, encuentran en el estómago las condiciones adecuadas de temperatura y medio ácido para reaccionar con nitritos ingeridos y generar N-nitrosaminas [67].

Sin embargo y debido a la falta de datos concluyentes, es difícil evaluar la formación endógena de nitrosocompuestos a partir de la ingestión de alimentos que contienen aminas y agentes nitrantes [68].

En general, el nivel toxicológico de las aminas biógenas es difícil de establecer debido a que depende tanto de las características del individuo como a la presencia de otras aminas (potenciadores) en los alimentos que éste ingiere.

Por otro lado, no todas las aminas consideradas en esta Memoria son igualmente tóxicas, de tal forma que **para unas buenas prácticas de manipulación de alimentos sólidos** se consideran como aceptables niveles de 50-100 ppm para la histamina, 100-800 para la tiramina y 30 ppm para la feniletilamina, o un contenido total de aminas de 100-200 ppm [69].

En relación al **vino**, se ha observado, que el consumo de medio litro de vino con una concentración de 5 mg de histamina por litro suele provocar cefaleas [70], este hecho ha dado lugar a que algunas bodegas españolas dediquen sus esfuerzos presentes y futuros al desarrollo de vinos en los que se elimina gran parte de la histamina.

Pese a la diversidad de productos y circunstancias que hacen de la ingestión de

aminas biógenas un problema casi individualizado, tanto entidades nacionales como internacionales, han establecido unos límites máximos de aminas en diversos tipos de productos. En este sentido, se puede decir que la única amina sometida a legislación es la *histamina*, quizás porque sea la más tóxica o porque sea la más estudiada.

La Unión Europea [71] y por extensión España [72], han regulado el contenido permitido en algunos tipos de pescados pertenecientes a los escómbridos y clúpedos, fijando valores de *histamina de 100 mg·kg<sup>-1</sup> en pescado fresco y de 200 mg·kg<sup>-1</sup> en pescado madurado*. A su vez, han establecido una normativa, según la cual es de obligado cumplimiento el análisis de 9 muestras de cada lote comercializado, permitiéndose que sólo dos de dichas muestras superen el valor límite, siempre y cuando sea inferior a 200 mg·kg<sup>-1</sup> y 400 mg·kg<sup>-1</sup> en pescados frescos y madurados respectivamente.

Por otro lado, la Food Drug Administration, FDA, [9] de Estados Unidos ha establecido un doble límite de histamina: 50 mg·kg<sup>-1</sup> como indicador de manipulación deficiente de pescado, y 500 mg·kg<sup>-1</sup> como nivel de intervención por riesgo.

Otros países, como Canada, Australia y Nueva Zelanda han propuesto valores de 100 mg·kg<sup>-1</sup> en pescado [73,74], aunque en el caso de Australia y Nueva Zelanda, se ha aumentado hasta 200 mg·kg<sup>-1</sup> [74].

El otro tipo de alimento que está legislado en algunos países es el vino, oscilando los límites máximos de histamina de un país a otro de manera sustancial [75]:

País	Contenido (mg·l <sup>-1</sup> )
<i>Holanda</i>	5
<i>Suiza</i>	4
<i>Alemania</i>	2
<i>Francia</i>	8



lo que puede originar en cierta manera dificultades a la hora de la exportación e importación de productos.

## **DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE AMINAS BIÓGENAS**

Debido a la importancia de la presencia de aminas biógenas en alimentos, se ha hecho necesario el uso y desarrollo de métodos analíticos que permitan su identificación y determinación de una manera fiable. Se conocen numerosos métodos que permiten tanto la determinación de una sola amina, normalmente histamina o tiramina, como la de varios de estos compuestos a la vez, siendo estos últimos mucho más atractivos, ya que entre otras cosas permiten la obtención de mayor información, por lo que el número de métodos que pueden determinar simultáneamente varias aminas ha ido incrementándose gradualmente. Así, entre las técnicas más empleadas para la identificación y determinación de aminas biógenas podemos distinguir dos grandes grupos:

- Aquellos que utilizan técnicas no cromatográficas.

En general, implican la utilización de espectrofluorimetría [76], biosensores [77-79], o inmunoensayos [42], en los cuales el objetivo es la determinación de una sola amina, o últimamente, el empleo de la electroforesis capilar, donde se puede analizar más de una amina [80].

- Aquellos que hacen uso de la cromatografía en todas sus variantes, gases [81,82] y líquidos, ya sea en la modalidad de cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía iónica [83,84] o de capa fina [3,31]. Sin embargo, es la cromatografía líquida de alta resolución, debido a su gran versatilidad, la técnica más empleada, siendo utilizada en los métodos de referencia de

los laboratorios oficiales de análisis [25], pudiendo utilizarse también su modalidad de pares iónicos [44,85]. Los detectores más empleados en la determinación cromatográfica de estos compuestos son los fluorescentes o espectrofotométricos. Sin embargo, debido a que las aminas no presentan fluorescencia *per sé* o absorben a longitudes de onda poco selectivas, es necesario recurrir a un proceso de derivatización, ya sea pre o post-columna, con objeto de aumentar tanto la sensibilidad como la selectividad de la determinación analítica.

Otro problema que aparece es que debido a la baja concentración de aminas en diversas muestras, es necesario preconcentrarlas o utilizar un proceso de limpieza o “clean-up” con el objeto tanto de eliminar las interferencias antes de su determinación cromatográfica, aunque no siempre sea necesario esta etapa [5,55,86].

## ► **TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

En general, va enfocado hacia el aislamiento y/o la preconcentración de los analitos a partir de la muestra. Constituye el paso crítico de la determinación analítica puesto que si los procedimientos y las condiciones operatorias no se eligen y controlan bien, pueden producirse pérdidas de los analitos.

Los procedimientos selectivos más empleados en muestras líquidas son la extracción líquido-líquido y la extracción en cartuchos, mientras que para muestras sólidas, se suele emplear algún procedimiento de lixiviación.

En la **extracción líquido-líquido** se han empleado disolventes como butanol, cloroformo, diclorometano y dietiléter [43,64].

Uno de los grandes inconvenientes de estos procesos extractivos, es que debido a la gran diferencia de polaridad existente entre las aminas biógenas, se obtienen porcentajes de recuperación muy bajos, por lo que a veces es necesario recurrir a la extracción de algún derivado apolar de los analitos, empleando como disolventes extractantes dietiléter [10,36], acetato de etilo [87] o cloroformo [88], siendo la similitud de la estructura de los derivados, la causante de la mejora de la extracción.

En algunos tipos particulares de productos alimentarios líquidos tales como el **vino**, la determinación de aminas como *histamina, tiramina, putrescina y cadaverina*, se puede llevar a cabo a través de una filtración preliminar de la muestra antes de su determinación [56,59]. Sin embargo, cuando el contenido de los analitos es bajo, se realiza una extracción con disolventes como butanol, acetato de etilo, eter etílico y diclorometano [25], pudiéndose extraer las aminas como pares iónicos con bis-2-etilhexilfosfato, y posterior reextracción en HCl 0.1 M [52].

El principal inconveniente de estos procedimientos es el consumo excesivo de tiempo y disolvente, obteniendo, por regla general, porcentajes de recuperación muy variables.

En los últimos años, se ha observado un creciente desarrollo de métodos de **extracción en fase sólida**, debido en parte al aumento de la especificidad de las fases estacionarias que se usan en los cartuchos de extracción. La utilidad de esta técnica consiste en que los analitos son separados y preconcentrados, reduciendo el tratamiento de muestra que normalmente es necesario cuando se emplean otras técnicas, como la extracción líquido-líquido. Para esta finalidad se han empleado muchos adsorbentes, entre los que destacan cambiadores catiónicos débiles y fuertes y el octadecilsilano (C<sub>18</sub>). Así, si se pretenden extraer las aminas sin modificación previa, se emplean los cambiadores catiónicos débiles,

formados por grupos carboxílicos, o fuertes, formados por grupos sulfónicos, originando distintos porcentajes de recuperación [89]. De esta forma, Busto y col. [90] han descrito un método para la determinación de las aminas biógenas más importantes en vinos basado en el aislamiento de estos compuestos de la matriz con un cambiador catiónico fuerte, y posterior elución con una disolución de borato en Metanol/H<sub>2</sub>O (50%, v/v), consiguiendo porcentajes de recuperación entre el 70 y el 100%.

Por otro lado, la fase C<sub>18</sub> constituye el adsorbente más popular para extraer compuestos orgánicos de matrices acuosas, aunque cuando se tienen que aislar aminas, sus polaridades deben ser modificadas, bien derivatizándolas o bien haciéndolas reaccionar con agentes formadores de pares iónicos [90].

Un factor que se debe tener en cuenta cuando se trabaja con vinos es la interferencia específica de las sustancias polifenólicas. Para eliminar estas sustancias se emplean normalmente la polivinilpirrolidona (PVP) y la polivinilpolipirrolidona (PVPP), aunque también se han intentado otros procedimientos como la extracción con cartuchos con cambiadores iónicos o con C<sub>18</sub>. En este caso, los cartuchos C<sub>18</sub> sirven para eliminar los polifenoles y otros compuestos no polares, mientras que se utiliza un cambiador iónico (SAX) para eliminar los compuestos iónicos como aminoácidos y polifenolatos [91].

La extracción de las aminas de una matriz sólida, mediante **procesos de lixiviación** puede llevarse a cabo con agua a temperatura ambiente [84] o a alta temperatura [92], de forma que sólo se extraigan las aminas libres. Sin embargo, para poder extraer las aminas unidas a otros componentes de la matriz, es necesaria la utilización de un ácido, generalmente, clorhídrico [93], perclórico [34,48,94] o tricloroacético [49,50].

La elección del ácido depende de las características de la matriz. El ácido clorhídrico es apropiado para la extracción de aminas en quesos, pero no proporciona buenos resultados al emplearlo en pescados o productos cárnicos, donde suele ser recomendable el uso del ácido tricloroacético, debido a su capacidad de poder precipitar las proteínas [92].

Además de los ácidos, se puede recurrir a la utilización de disolventes orgánicos como metanol [95], acetona [92], acetonitrilo-perclórico [92], o diclorometano-perclórico [96].

En algunos casos, después del proceso de extracción, es precisa una etapa de purificación, siendo el grado de pureza necesaria función de la técnica analítica final. El tratamiento de purificación del extracto puede hacerse mediante:

- ◆ Cromatografía en columna con alúmina o resinas de cambio iónico, o
- ◆ Extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos.

Cuando se aplica el primer método es necesario un ajuste inicial del pH, seguido de las etapas de activación, lavado y elución, con el consiguiente consumo de tiempo [84,97,98].

Cuando se aplica a una extracción L-L, el extracto bruto se satura con una sal, a continuación se ajusta el pH a un valor alcalino y se lleva a cabo una extracción con un disolvente orgánico (butanol, butanol-cloroformo, etc...) para obtener una disolución de aminas libre de aminoácidos [43,99].

En el caso de determinaciones en productos alimenticios de origen vegetal o animal, los mejores resultados se suelen obtener al tener en cuenta la naturaleza química de los analitos, la matriz biológica y la posible presencia de interferencias [100]. Algunas veces se emplea un proceso de limpieza o “clean-up” en una sola etapa, pero con frecuencia se requieren dos o más etapas. Estos procesos de limpieza implican el empleo de resinas de cambio iónico, [101,102], disolventes orgánicos [103], o extracción con alúmina [104].

En la última década se han conseguido obtener muestras limpias mediante procesos de microdiálisis in vivo [105], y ultrafiltración, trabajando con pequeños volúmenes de muestras y con bajas concentraciones de analitos [106].

Tanto en tejidos animales como vegetales las aminas libres protonadas, presentes dentro y fuera de las células, e implicadas por ello en interacciones iónicas, son extraídas después de triturar dichos tejidos, con disoluciones de los ácidos citados anteriormente. Los procedimientos de rutina implican extracciones frías con disoluciones de ácido al 5% o 1 M y periodos de incubación que van desde unos pocos minutos hasta varias horas [107-109]. El triturado físico de los tejidos se lleva a cabo generalmente después de enfriarlos con nitrógeno y pulverizarlos en un mortero. También se puede homogeneizar la muestra mediante una extracción con disolventes empleando un homogenizador Potter-Elvehjem [110], un omnimixer [111,112], la ruptura mediante sonicación o ciclos de congelación y descongelación [113]. A continuación, las fases son centrifugadas a baja temperatura y el sólido resultante reextraído. Los líquidos sobrenadantes son sometidos a análisis inmediato, después de neutralización, con o sin proceso de derivatización, o sometidos a etapas de fraccionamiento para evitar interferencias de compuestos contaminantes coextraídos, como azúcares o aminoácidos [107].

Las *poliaminas* y las *aminas aromáticas* pueden también liberarse en el líquido sobrenadante de la hidrólisis con HCl 6M y se supone que están unidas a compuestos de bajo peso molecular [114,115]. El sólido que queda después de la extracción con ácido perclórico o tricloroacético puede también liberar poliaminas después de la hidrólisis; éstas pueden presentar uniones con compuestos de elevado peso molecular, y especialmente poliaminas unidas covalentemente con proteínas a través de transglutaminasas [116].

Torrigiani y col. [117] proponen un método novedoso de análisis de poliaminas para el virus del mosaico del tabaco, basado en un tratamiento de la muestra con ultrasonidos y ácido perclórico. Sugiere que la sonicación actúa sobre los agregados de proteínas tratados con perclórico causando la liberación de las moléculas de poliaminas atrapadas.

Independientemente de cual sea el método de extracción, se tiene que tener especial cuidado con los posibles enlaces de las poliaminas a las paredes de los aparatos de vidrio usados en la extracción y en los posteriores procesos, siendo recomendable la silaonización

del material de vidrio [118].

## ► **DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS**

Como se ha comentado anteriormente, en la actualidad los principales métodos de determinación de aminas biógenas están basados en las técnicas cromatográficas, aunque últimamente, está empezando a desarrollarse la aplicación de métodos electroforéticos.

Así, en la mayoría de los casos, las aminas biógenas se analizan mediante **cromatografía líquida de alta resolución**, empleando como fase estacionaria una fase inversa del tipo octadecilsilano. Las fases móviles constan fundamentalmente de sistemas binarios tamponados que combinan agua con modificadores orgánicos como tetrahidrofurano [119], trietilamina [93], y como disolventes orgánicos metanol [55] y acetonitrilo [120,121], empleándose de forma general un gradiente de elución [28,34], aunque a veces, se consiguen buenas separaciones en régimen isocrático [120,122].

La detección más empleada es la fluorescente o la ultravioleta-visible, previa derivatación de las aminas, aunque también puede usarse la electroquímica [123,124], que presenta el inconveniente de originar un línea base con un elevado ruido de fondo debido al alto potencial de oxidación de las aminas biógenas. Para solucionar dicho problema, se han propuestos diversos métodos para la medición de la señal electroquímica como la detección amperométrica de pulso integrado [125].

Debido a su simplicidad, se han desarrollado un número considerable de métodos de análisis de aminas biógenas por **cromatografía en capa fina** [31,50,126], empleando un densitómetro para la determinación cuantitativa de estos analitos [127], posterior a un proceso de derivatización. Como fase estacionaria se suele emplear gel de sílice y como

fases móviles cloroformo, trietilamina, benceno, etc... A veces, y con objeto de mejorar la resolución entre los diferentes analitos, se recurre a la separación bidimensional [50].

En análisis bioquímico o ambiental es frecuente el uso de la **cromatografía de gases** para la separación y determinación de aminas biógenas [128,129]. El empleo de la espectrometría de masas, acoplada al cromatógrafo de gases ha permitido obtener métodos de elevada sensibilidad y selectividad [52]. La utilización de la cromatografía de gases origina separaciones con una elevada resolución en un corto período de análisis. Sin embargo, presenta una serie de inconvenientes en relación al resto de las técnicas cromatográficas, como puede ser la termolabilidad de las aminas, o la presencia de picos que puedan interferir en la determinación de los analitos debido a la matriz, disolventes o reactivos, mejorándose con el empleo de columnas capilares.

Por otro lado, la **electroforesis capilar**, se está convirtiendo en una seria alternativa a la determinación cromatográfica de aminas biógenas, debido a la mejora en la separación, posible automatización de las diversas etapas en la determinación, así como el bajo precio de los reactivos usados en esta técnica. Además, el empleo de la detección fluorescente inducida por láser, ha contribuido a una mejora sustancial en los límites de detección de las aminas [130]. Las modalidades más empleadas para la separación de aminas son la electroforesis capilar zonal y la cromatografía electrocinética capilar micelar [118]. En general, la separación se realiza en capilares de sílice, usando como electrolito el borato, modificado con dodecil sulfato sódico y empleando como modificadores orgánicos, metanol, acetona, acetonitrilo [38,131-133], pudiendo mejorarse la separación por incorporación de ciclodextrinas en el tampón [134].



## **Procesos de derivatización**

La determinación multianalito de aminos biógenos presentes a bajas concentraciones, independientemente de la técnica empleada, es difícil de conseguir por dos razones: el carácter polar de estos compuestos que dificulta su aislamiento de matrices acuosas y la ausencia de propiedades fisico-químicas intrínsecas que hacen que sea muy difícil su detección espectrofotométrica o espectrofluorimétrica sin tener que acudir a la derivatización. Por lo tanto, en la mayoría de los métodos de análisis de aminos primarias y secundarias, los grupos amino de éstas se utilizan para la formación de derivados adecuados para una determinación sensible a la vez que para mejorar la separación.

La reacción de derivatización, se puede hacer pre o post columna, dependiendo de varios factores. De esta forma, la **derivatización post-columna** se suele emplear con agentes derivatizantes que originan compuestos inestables, mientras que si los derivados son estables, se prefiere la **derivatización pre-columna** al resultar más simple y económica.

En general, los principales objetivos de los procedimientos de derivatización son:

- Mejora de la detectabilidad.
- Mejora del comportamiento cromatográfico.
- Evitar descomposiciones durante el proceso de separación.
- Preparación más adecuada de la muestra.

### a) Derivatización en cromatografía de gases

La determinación de aminas por cromatografía de gases presenta una serie de problemas debido a la alta solubilidad en agua y la polaridad de estos compuestos. De ahí, que la derivatización se emplee para reducir esta polaridad y mejorar las características cromatográficas, como son la volatilidad, selectividad y sensibilidad. Por ello, la utilización de la derivatización de aminas biógenas previa a su determinación por cromatografía de gases se emplea para:

- Aumentar su volatilidad.
- Reducir la polaridad de los compuestos.
- Reducir la degradación térmica de los analitos aumentando su estabilidad.
- Aumentar la detección mediante la introducción de grupos funcionales (p. ej.  $CF_3$ ), que son especialmente sensibles a los detectores de captura electrónica y de ionización de llama.
- Mejorar la eficacia de la extracción desde medios acuosos.

Los métodos de derivatización se suelen clasificar en cuatro grupos, en función de los agentes de reacción empleados, distinguiendo la *alquilación*, *condensación*, *acilación*, y *silanización*. Entre los agentes derivatizantes más usados están: etilcloroformiato, bromuro de pentafluorobenzoilo y diazometano. En la mayoría de los casos, las reacciones de derivatización son rápidas.

En la actualidad, en lugar de emplear los detectores tradicionales, como el de captura electrónica o el de ionización de llama [135], se está empleando con gran profusión la espectrometría de masas, empleando como agentes derivatizantes el cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo [52,57].

**b) Derivatización en cromatografía líquida**

Tradicionalmente la determinación cromatográfica de aminas ha implicado el uso de derivados que implican la detección espectrofotométrica o fluorimétrica, empleando agentes derivatizantes como:

- Cloruro de dansilo (**Cl-Dans**) [43,48,54,126,136-138].
- o-Ftaldialdehído (**OPA**) [28,73,89,91,139,140].
- Cloruro de dabsilo (**Cl-Dabs**) [93,141-145].
- Cloroformiato de fluorenmetilo (**FMOC**) [42,59,146].
- Fenilisotiocianato (**PITC**) [147,148].
- 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (**AQC**)[56,90].
- Otros:
  - Cloruro de benzoilo [10,36,133],
  - Fluorescamina [149],
  - Cloruro de carbazol-9-yl-acetyl (**CRA-Cl**) [150],
  - 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazol (**NBD-F**) [151],
  - Cloruro de 2-Naftiloxicarbonil (**NOC**) [152],
  - Cloruro de para-nitrobenzoiloxicarbonil (**PNZ-Cl**) [153],
  - 2-cloronitrosourea [122].

La mayoría de estos compuestos también se utilizan como agentes derivatizantes cuando se emplea la electroforesis capilar [73,118,133].

En, la Tabla 12 se indican algunas características de los principales agentes derivatizantes, mientras que en la Figura 4 se muestran la estructura de los mismos.

Tabla 12. Características de los principales agentes derivatizantes

	<b>Dns-Cl</b>	<b>OPA</b>	<b>Dabs-Cl</b>	<b>FMOC</b>	<b>PITC</b>	<b>AQC</b>
<b>Detección<sup>a</sup></b>	UV/FL	UV/FL	UV	FL	UV	FL
<b>Sensibilidad</b>	pmol	fmol	pmol	fmol	pmol	fmol
<b>Estabilidad</b>	Buena	Mala	Buena	Regular	Buena	Buena
<b>Aminas secundarias</b>	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Pico de exceso de reactivo</b>	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Derivatización</b>	Pre-columna	Pre y post columna	Pre-columna	Precolumna	Pre-columna	Pre-columna
<b>Temperatura reacción</b>	Variable	Ambiente	Variable	Ambiente	Ambiente	Ambiente

a: Detección ultravioleta (UV) o fluorescente (FL).

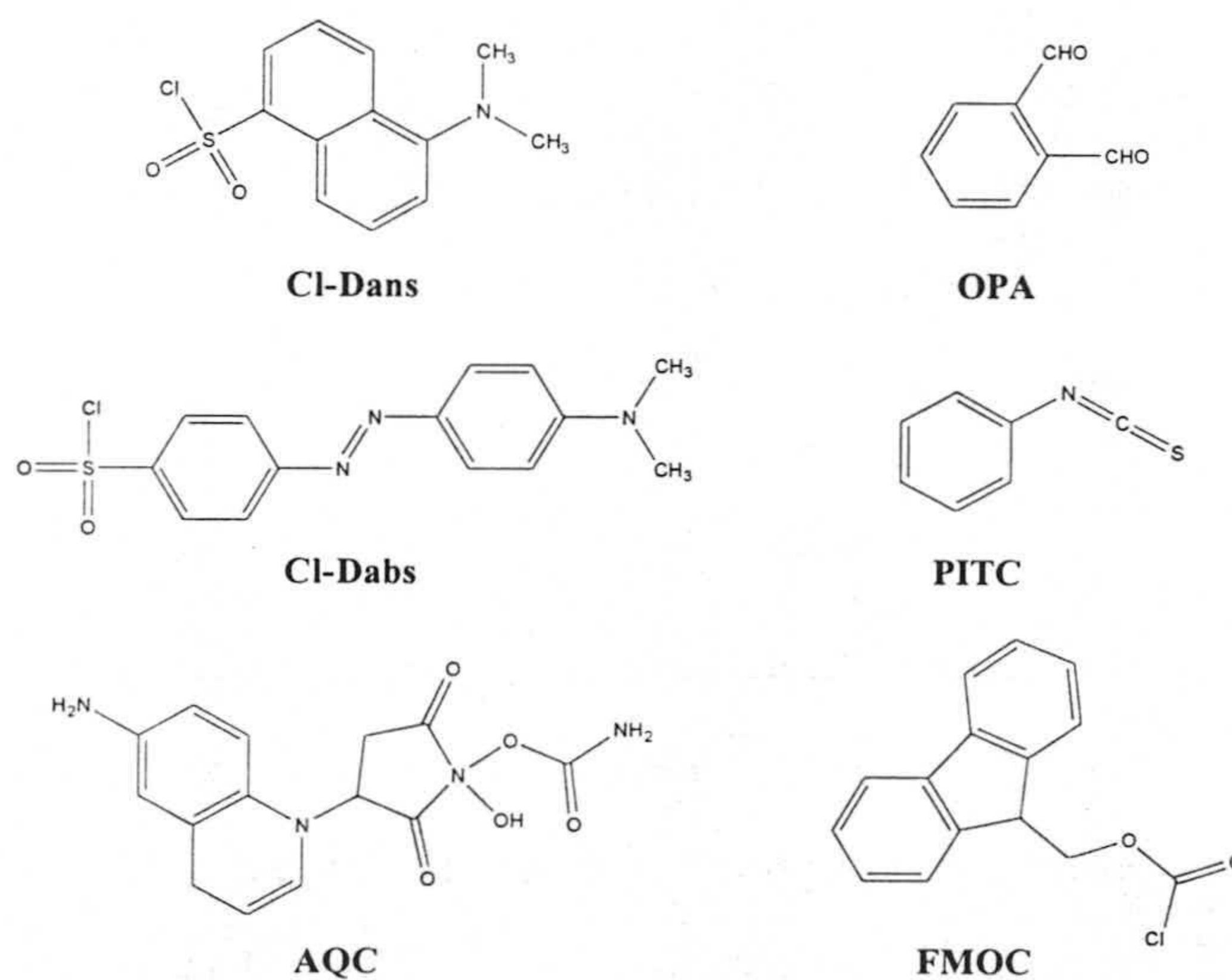


Figura 4. Estructuras de los principales agentes derivatizantes

Las **reacciones de dansilación** son las más utilizadas, aunque consumen mucho tiempo, si bien el proceso puede acelerarse empleando ultrasonidos [118] o calefacción [154]. Recientemente se han propuesto mejoras empleando microondas [33,138], donde aminas alifáticas como *putrescina*, *cadaverina*, *espermidina* y *espermina* son dansiladas en un horno microondas en 5 minutos, y separadas mediante cromatografía en capa fina de alta resolución, empleando gel de sílice como fase estacionaria y una fase móvil compuesta de cloroformo-trietilamina (2:1).

Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de éter polioxi-etileno-10-lauril (POLE) en la fase móvil aumenta tanto la intensidad de fluorescencia como la relación señal ruido de los derivados. Basado en este fenómeno se ha propuesto un método de determinación de aminas biógenas en tejidos de plantas y muestras de cerveza [37].

En general, la utilización del cloruro de dansilo como agente derivatizante presenta la ventaja de poder reaccionar con aminas primarias y secundarias, pudiendo determinarse mediante detección espectrofotométrica o fluorimétrica, aunque no es muy sensible. Su mayor inconveniente, aparte de que el tiempo de derivatización es largo, es que los cromatogramas presentan varios picos debido al exceso de reactivo, que pueden interferir con los picos correspondientes a los de las aminas, por lo que se ha llegado a proponer la realización de un blanco paralelamente a las muestras y patrones [118]. Finalmente, puede reaccionar con fenoles, alcoholes alifáticos y azúcares, con la posible pérdida de selectividad en el análisis.

La **derivatización con o-ftaldialdehído** permite detectar cantidades de aminas del orden de femtomoles y resolver mezclas complejas de aminas en un corto período de tiempo. La derivatización precolumna con OPA seguida de la separación de los derivados mediante RP-HPLC y detección fluorimétrica es descrita por diversos autores que ensalzan las ventajas de este reactivo debido a su selectividad pues sólo reacciona con aminas primarias [155]. Sin embargo, este hecho se considera como un serio inconveniente por otros autores,

pues no permite derivatizar aminas secundarias [54], aparte de originar derivados que no son estables.

La estabilidad de los derivados depende de la propia amina, del exceso de agente derivatizante, y sobre todo, de la naturaleza del nucleófilo (tiol) usado en la reacción. Una manera de solucionar este problema es estudiando diferentes nucleófilos o variando el medio una vez que la reacción ha tenido lugar. En concreto, se ha visto, que con la adición de mercaptoetanol (nucleófilo) se consigue aumentar la estabilidad de los derivados.

Otra vía de mejorar la irreproducibilidad de los resultados debida a la inestabilidad de los derivados de las aminas con el OPA es la posibilidad de realizar la reacción de derivatización de forma automática [119] o bien, como se ha comentado con anterioridad, mediante la derivatización post-columna [35].

Recientemente se ha propuesto, la realización de la reacción de derivatización en la propia columna, estando presente el agente derivatizante en la fase móvil [156].

El **cloroformiato de fluorenmetilo** (FMOC) se ha introducido como agente derivatizante debido a que forma derivados espectrofotométricos y/o fluorescentes con aminas primarias y secundarias, pudiendo considerarse como una alternativa a los agentes derivatizantes comentados anteriormente. La reacción es fácil de automatizar y produce derivados estables. Su principal inconveniente se debe a que origina una gran cantidad de productos secundarios, que deben ser eliminados para obtener un cromatograma con la menor cantidad de interferencias posibles [146].

Al igual que el anterior, tanto el **fenilisocianato** (PITC) como el **6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato** (AQC), son agentes derivatizantes que se han utilizado para obtener derivados de aminas biógenas, con mejores características para su detección.

El primero permite la detección UV de los derivados de las aminas primarias y secundarias, originando derivados estables. Sin embargo, el procedimiento de derivatización es laborioso, difícil de automatizar y requiere una gran especialización por parte del operador.

Por otro lado, el AQC se ha usado como alternativa al OPA, ya que proporciona derivados fluorescentes de las aminas primarias y secundarias con una sensibilidad similar a los derivados procedentes del OPA. Además, los productos son estables, aunque se debe de evitar tener un gran exceso de reactivo.

### **Cloruro de Dabsilo (Cl-DABS)**

El cloruro de 4-dimetilaminoazobencen-4'-sulfonilo (DABS-Cl) fue sintetizado por primera vez en el año 1975, por J.K. Lin y J.Y. Chang, mediante reacción de 4-dimetilaminoazobencen-4'-sulfonato sódico con pentacloruro de fósforo [141]. Este compuesto forma cristales de color rojo intenso, en forma de láminas, estables a temperatura ambiente, con un punto de fusión de 186-188 °C.

Como agente derivatizante origina derivados con aminas primarias y secundarias de gran estabilidad, permitiendo la detección de los mismos a una longitud de onda que oscila entre 436 y 456 nm, con el consiguiente aumento de la selectividad. El mayor inconveniente es la limitación de la vida de la columna [157], que se observa a través de una pérdida en la resolución de los picos cromatográficos. Reacciona fácilmente con todos los aminoácidos para formar derivados dabsilados.

Puesto que tiene los mismos grupos funcionales que el cloruro de dansilo, Li y Chang emplearon condiciones de dabsilación similares a las de la dansilación, i.e., cada aminoácido fue disuelto en un tampón de carbonato/bicarbonato sódico (pH=8.9), y a esta disolución se le añadió otra de DABS-Cl en acetona. Se tapó la mezcla y se le permitió reaccionar a 70 °C en un baño de agua con agitación constante durante 6 min. De esta forma se prepararon 17 derivados y se midieron sus propiedades fisico-químicas. Los espectros IR

revelaron la existencia de grupos sulfonamida (-SO<sub>2</sub>-NH-)-.

Los derivados dabsilados se separaron mediante  cromatografía en capa fina bidimensional, encontrándose que eran estables a la luz. El grupo dabsil, intensamente cromóforo, permite la detección de estos compuestos como puntos coloreados sobre las placas cromatográficas sin necesidad de emplear luz UV.

En el mismo trabajo se propone un procedimiento para la determinación de aminoácidos puesto que la mayoría de ellos reaccionan completamente cuando la relación molar de DABS-Cl a aminoácido es mayor de 2:1.

En 1980 J.K. Lin y C.C. Lai desarrollaron un método de HPLC para la determinación de amoniaco, y aminas en muestras de pescado y camarones [142], mediante la derivatización pre-columna de las aminas con DABS-Cl.

Los autores sugieren que los amino-compuestos con un grupo funcional ácido como aminoácidos o aminas fenólicas podrían reaccionar con el DABS-Cl para formar las correspondientes dabsilamidas las cuales podrían permanecer en medio alcalino después de la extracción con hexano/butanol. En este trabajo también se estudian las propiedades fisicoquímicas de 14 dabsilamidas.

También se ha aplicado al análisis de aminoácidos en polipéptidos, con resultados que indican que el método es tan fiable como el analizador de aminoácidos convencional [158]. La Figura 6 muestra el cromatograma correspondiente a la separación de una mezcla de aminoácidos dabsilados. Puede verse un gran pico asignado a DABS-ONa, i.e., exceso de reactivo hidrolizado (naranja de metilo).



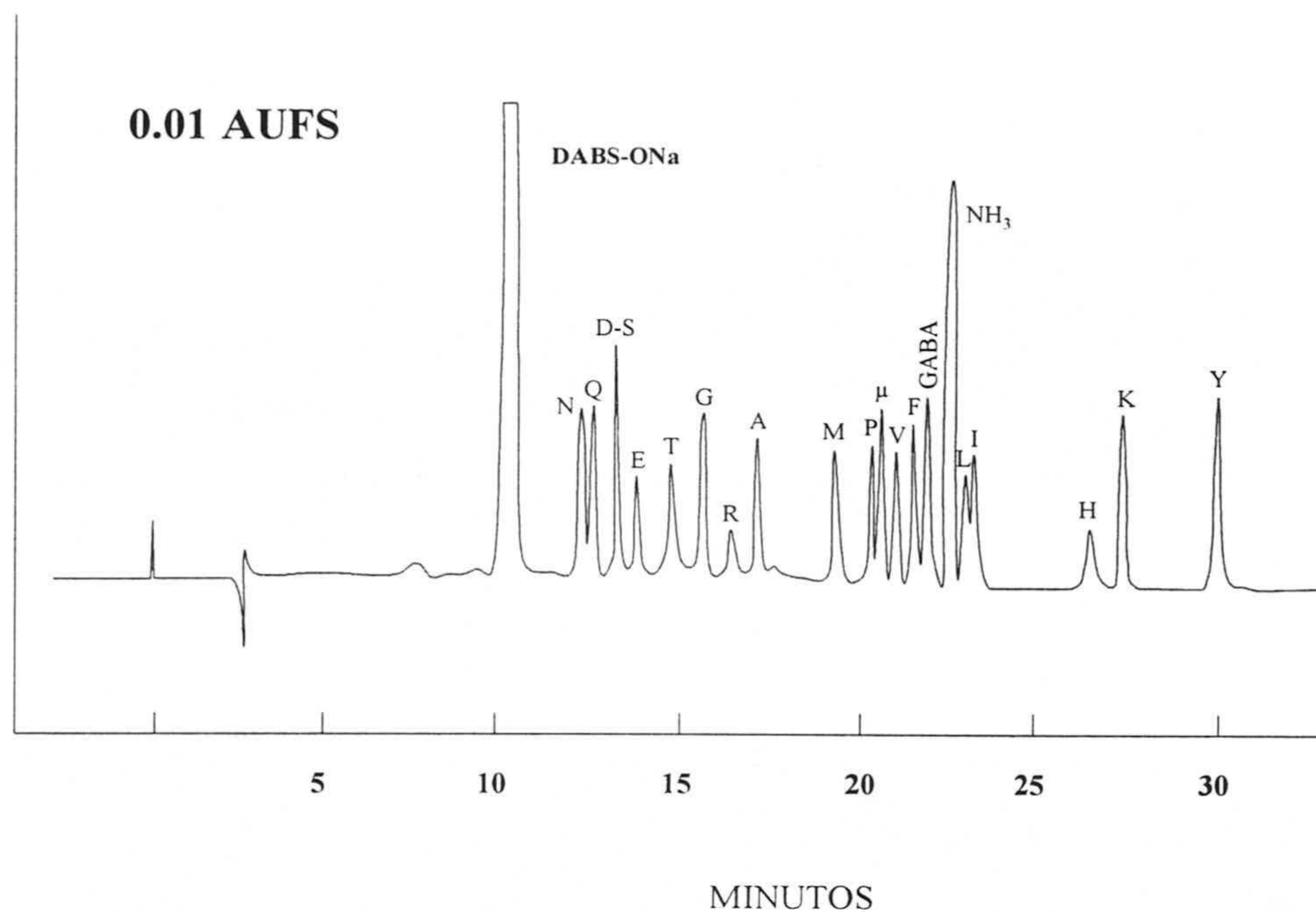


Figura 6. Separación cromatográfica de derivados dabsilados

Es interesante destacar que sólo se necesitan para cada análisis de 7 a 30 ng de hidrolizados dabsilados. En este sentido, el análisis mediante este reactivo es potencialmente más sensible que el analizador de aminoácidos convencional. No obstante, la mayor limitación del método proviene de la contaminación por aminoácidos.

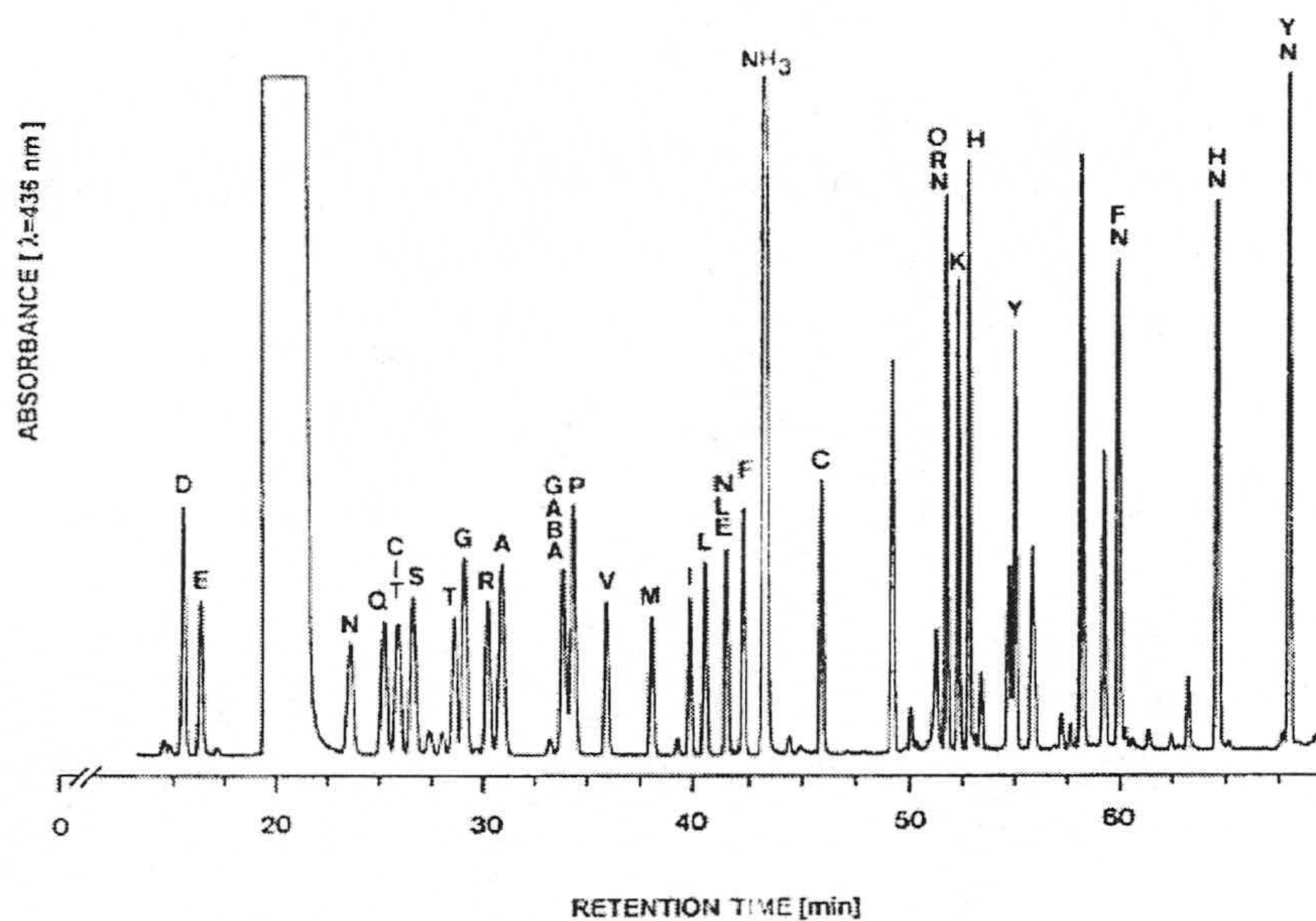
Knecht y Chang investigaron las **fuentes potenciales de contaminantes durante la hidrólisis de proteínas y derivatización de aminoácidos** [159]. Los datos indican que la principal fuente de contaminación por aminoácidos es la disolución acuosa de HCl 6 M, aunque su origen no está claro. Los autores creen que se debe a micropartículas presentes en el aire que son absorbidas por la disolución de ácido o que se depositan en las paredes de los tubos de hidrólisis. La hidrólisis en fase gaseosa puede reducir en un 25% el fondo

generado por la hidrólisis normal en fase líquida. Se pueden colocar varias muestras simultáneamente en el recipiente de hidrólisis en fase gaseosa, depositar HCl 6 M, purgar el recipiente con argón y sellarlo a vacío. La hidrólisis se lleva a cabo a 110 °C durante 24 h.

De esta forma se propuso un procedimiento de dabsilación mejorado: primero, se empleó un tampón de bicarbonato sódico de pH 8.1 para disolver las muestras hidrolizadas y la acetona fue reemplazada por acetonitrilo en la disolución del DABS-Cl. En segundo lugar, el tampón fosfato fue reemplazado por tampón acetato para la separación cromatográfica, debido a que se formaba un fino precipitado cuando el tampón fosfato se mezclaba con un gran volumen de acetonitrilo.

En 1995 Krause y colaboradores desarrollaron un método para la determinación simultánea de aminoácidos y de aminas biógenas, centrándose especialmente en el rendimiento de la derivatización y en la estabilidad de los derivados [144]. Emplearon un agente antioxidante, el ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA)), y un tampón de dilución en el procedimiento de dabsilación, así como una mayor concentración de DABS-Cl (6.2 mM), con objeto de alcanzar una derivatización y estabilidad óptimas de los derivados bis-dabsilados de lisina, tirosina, histidina y carnosina y de las aminas biógenas *histamina*, *tiramina*, *putrescina* y *cadaverina*. La relación de volúmenes de muestra, agente derivatizante y tampón de dilución, así como la composición de dicho tampón, influyen significativamente sobre el rendimiento de los derivados y el rango de linealidad del método.

En la Figura 7 se muestra la separación de una mezcla patrón de aminas biógenas y aminoácidos, mientras que en la Figura 8 se muestra el cromatograma de los derivados dabsilados obtenidos tras la extracción de un queso.



**Figura 7. Separación cromatográfica de derivados dabsilados de aminas y aminoácidos.**  
**D:** Ácido aspártico; **E:** Ácido glutámico; **N:** Asparagina; **Q:** Glutamina; **CIT:** Citrulina; **S:** Serina; **T:** Treonina; **G:** Glicina; **R:** Arginina; **A:** Alanina; **GABA:** Ácido  $\gamma$ -Aminobutírico; **P:** Prolina; **V:** Valina; **M:** Metionina; **I:** Isoleucina; **L:** Leucina; **NLE:** Norleucina; **F:** Fenilalanina; **NH<sub>3</sub>:** Amoniac; **C:** Cisteina; **ORN:** Ornitina; **K:** Lisine; **H:** Histidina; **Y:** Tyrosina; **FN:** Feniletilamina; **HN:** Histamina; **YN:** Tiramina.

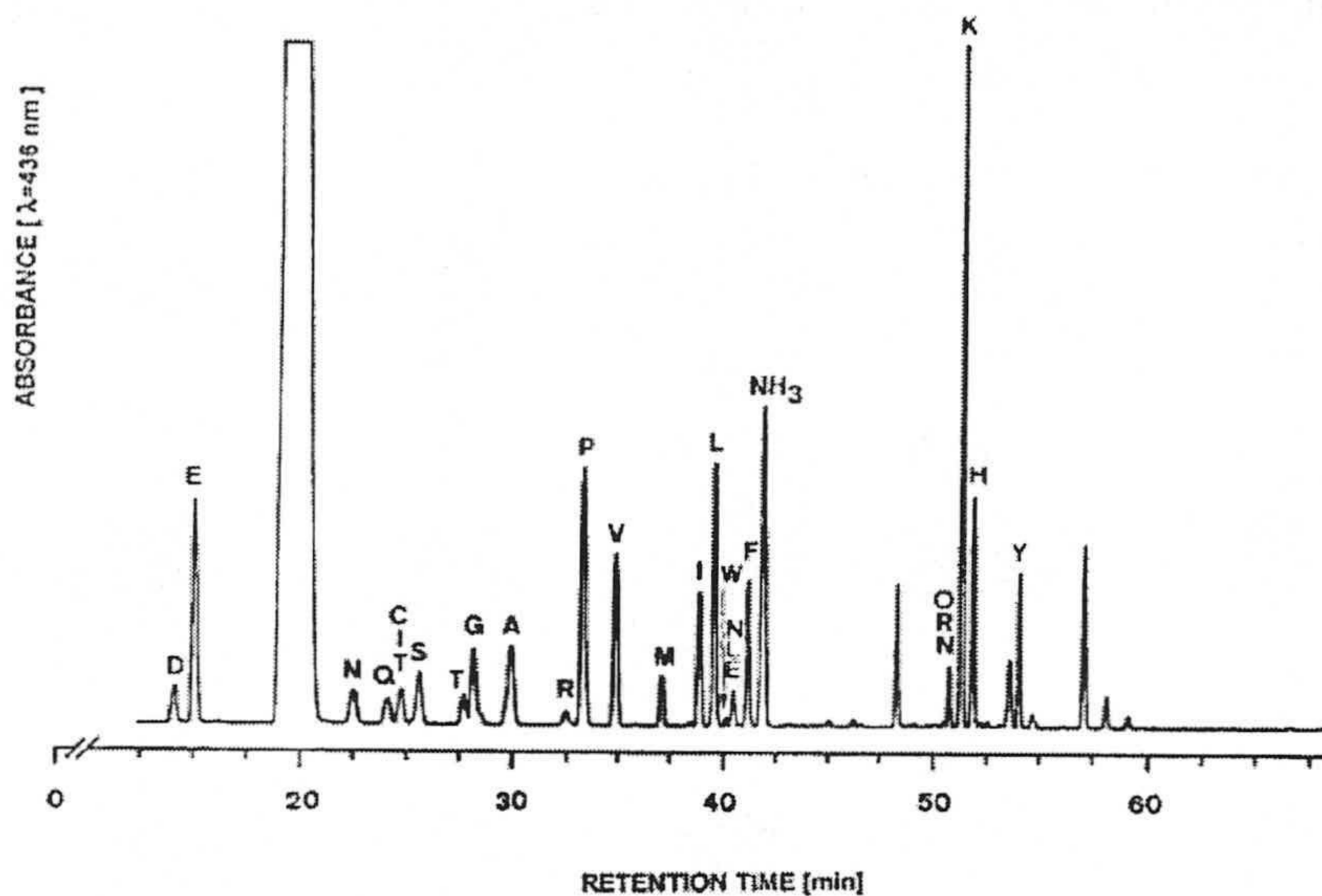
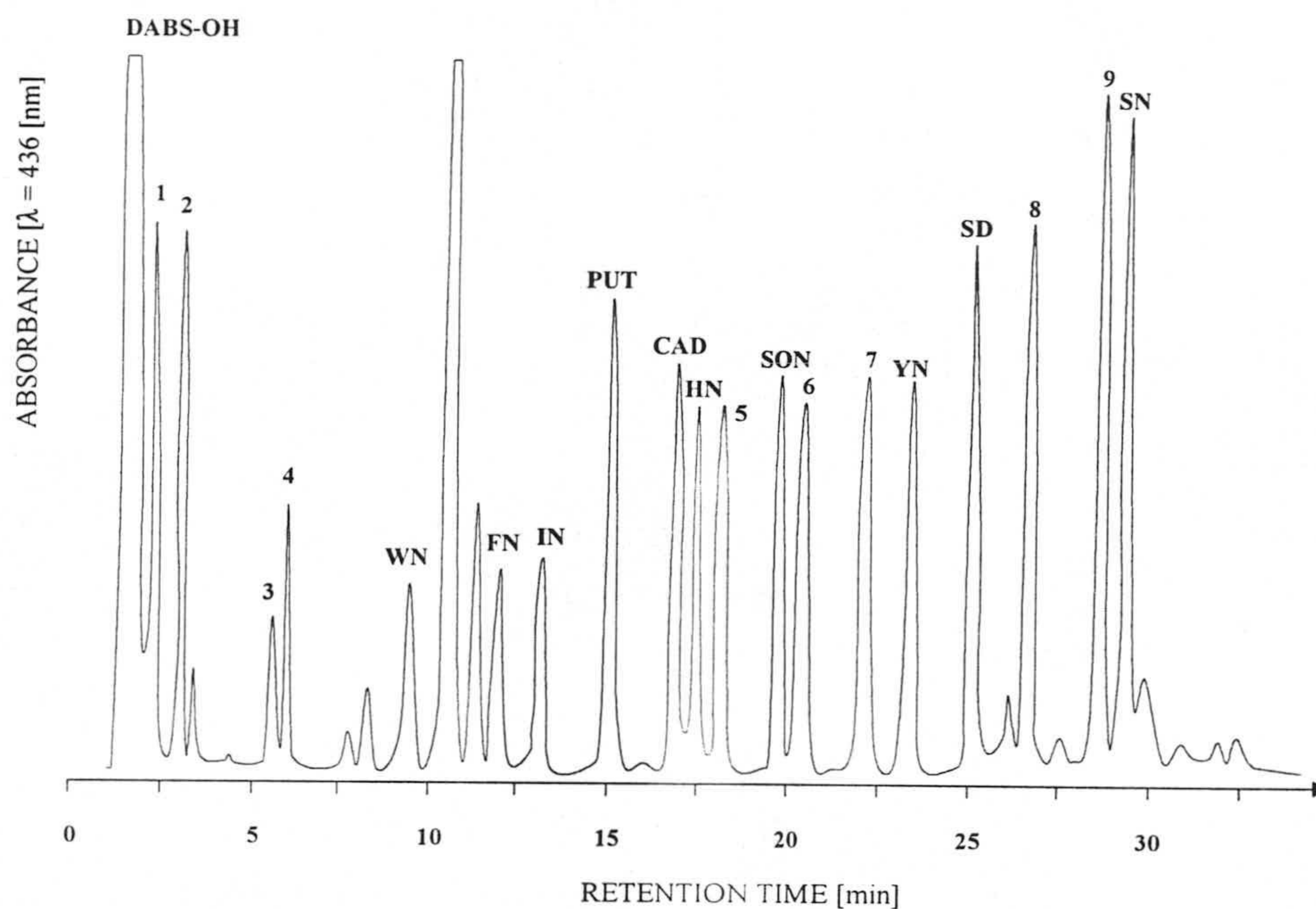


Figura 8. Separación cromatográfica de los derivados dabsilados de la Figura 7 en una muestra de queso. Para abreviaturas, ver Figura 7.

De acuerdo con los autores, este método representa una seria alternativa al método convencional de análisis de aminoácidos y aminas mediante cambio iónico/ninhidrina o respecto a otros métodos de HPLC, y considerando que se pueden obtener datos de más de treinta componentes en alimentos como el queso, también puede ser valioso en control de calidad (identidad).

Bockhardt, Krause y Klostermeyer desarrollaron un procedimiento automático de derivación con DABS-Cl, en combinación con un método de HPLC para la determinación simultánea de al menos 19 derivados de aminas biógenas en alimentos [93]. A diferencia del método descrito por Krause y col. [144] para la determinación simultánea de aminoácidos

y aminas biógenas, se incrementó el poder eluyente de la fase móvil mediante la adición de éter *tert*-butilmetílico. Este reactivo se mostró esencial para conseguir la separación de espermina y espermidina. La Figura 9 ilustra una separación de una mezcla de aminas biógenas conteniendo 20 componentes.



**Figura 9. Separación cromatográfica de derivados dabsilados de aminas biógenas. 1:** Carnosina; **2:** 2-aminoetanol; **3:** Etilamina; **4:** Agmatina; **5:** Cistamina; **6:** 1,7-diaminoheptano; **7:** 1,8 diaminooctano; **8:** Noradrenalina; **9:** Adrenalina; **WN:** Triptamina; **FN:** Feniletilamina; **IN:** Metilbutilamina; **PUT:** Putrescina; **CAD:** Cadaverina; **HN:** Histamina; **SON:** Serotonina; **YN:** Tiramina; **SD:** Espermidina; **SN:** Espermina.

## CAPÍTULO I

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y

RECONOCIMIENTO DE PAUTAS



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y RECONOCIMIENTO DE PAUTAS

Uno de los objetivos básicos de la Química Analítica es conseguir que la información obtenida como consecuencia del desarrollo de un proceso analítico sea un fiel reflejo de la información intrínseca del problema que lo ha planteado. Este hecho ha puesto de manifiesto la necesidad de una adaptación específica de los métodos analíticos, que ha necesitado para ello del desarrollo de la Quimiometría [1] con objeto de:

1. Obtener información química relevante de los datos obtenidos en el laboratorio, representando y visualizando de una manera comprensible dicha información y
2. Aumentar la calidad de las medidas químicas mejorando las condiciones de su recogida.

En este capítulo se exponen las ideas básicas de tipo quimiométrico que, han sido aplicadas para extraer la máxima información química de los datos analíticos, así como el conjunto de acciones que nos han permitido comprobar la calidad de los resultados en esta Memoria.



## **I.1. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

Validación es el proceso de confirmación, mediante examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen una serie de requerimientos particulares para un uso específico [2]. Cuando se refiere a un método analítico se interpreta como el establecimiento de los parámetros de calidad y las limitaciones de un método, identificando y cuantificando los factores que pueden inducir cambios en los mismos [3].

Experimentalmente, se realiza para cuantificar las propiedades analíticas del método en función de los requerimientos establecidos previamente, e implica la verificación de la representatividad y exactitud de los resultados generados por el procedimiento analítico. Desde el punto de vista de la investigación y dado que la representatividad implica actuaciones fuera del laboratorio, la validación se restringe a realizar un estudio de las propiedades derivadas de la exactitud [4], como son:

- *Inercia*: Capacidad de un método para generar resultados inexactos al modificar ligeramente las condiciones experimentales recomendadas en el procedimiento [5].
- *Veracidad*: Grado de concordancia entre el valor medio obtenido y un valor de referencia aceptado [6].
- *Precisión*: Grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar repetidas veces el procedimiento experimental bajo condiciones estipuladas [6].

Estas propiedades derivadas de la exactitud están representadas por varios parámetros de calidad. Así, la *inercia*, se caracteriza a través de la robustez; la *veracidad* a través del rango dinámico lineal, el intervalo de trabajo y la selectividad; y la *precisión* por la resolución analítica o desviación estándar del método, la repetibilidad, la reproducibilidad y los límites de detección y cuantificación.

En nuestra opinión se pueden distinguir dos fases dentro de la validación de un método:

- ① Establecimiento de los parámetros de calidad del mismo antes de la aplicación a una muestra real: robustez, sensibilidad, linealidad, límite de detección y cuantificación, así como la estimación de la repetibilidad y reproducibilidad, en lo que se podría definir como *validación característica*. Puesto que gran número de estos parámetros pueden determinarse a partir de una función de calibración, ésta debe establecerse también durante esta fase de la validación.
- ② Verificación de que estos parámetros conducen a resultados veraces y precisos cuando el método se aplica a muestras, surgiendo la *validación aplicada*.

Un método debe ser validado cuando sea necesario verificar que sus parámetros de calidad son adecuados para su uso en un problema analítico particular. Por ejemplo:

- El desarrollo de un método nuevo para un problema en particular.
- El establecimiento de un método al que se le han incorporado mejoras o se ha extendido su uso a un nuevo problema.
- Cuando un control de calidad indica que un método establecido cambia con el tiempo.
- Un método establecido y usado en otro laboratorio, o con diferentes analistas o diferente instrumentación.
- Demostrar la equivalencia entre dos métodos (nuevo y estándar).

Finalmente, la validación de un método analítico está íntimamente relacionada con la etapa de optimización del mismo, no existiendo una frontera clara entre optimización y validación. Así, si alguno-s de los parámetros de calidad obtenidos al poner a punto un método existente en bibliografía o desarrollado por el propio laboratorio no resultan

apropiados, es necesario recurrir a una reoptimización de las variables experimentales. De esta forma, las etapas de desarrollo de un método analítico nuevo o de implementación en un laboratorio de un método descrito en bibliografía, no son independientes del proceso de validación del mismo [7].

Teniendo en cuenta los aspectos comentados anteriormente, es conveniente establecer un protocolo que permita la ejecución de un procedimiento de validación. En esta memoria se utiliza la secuencia de experiencias recogidas en la Figura I.1, que está basada en los procedimientos descritos por García-Campaña y col. [5] y Hartmann y col. [8]. A su vez, y dado que algunos de los pasos de la validación implican o pueden implicar ensayos inter o intralaboratorios, desarrollaremos exclusivamente los aspectos teóricos relativos a estos últimos.

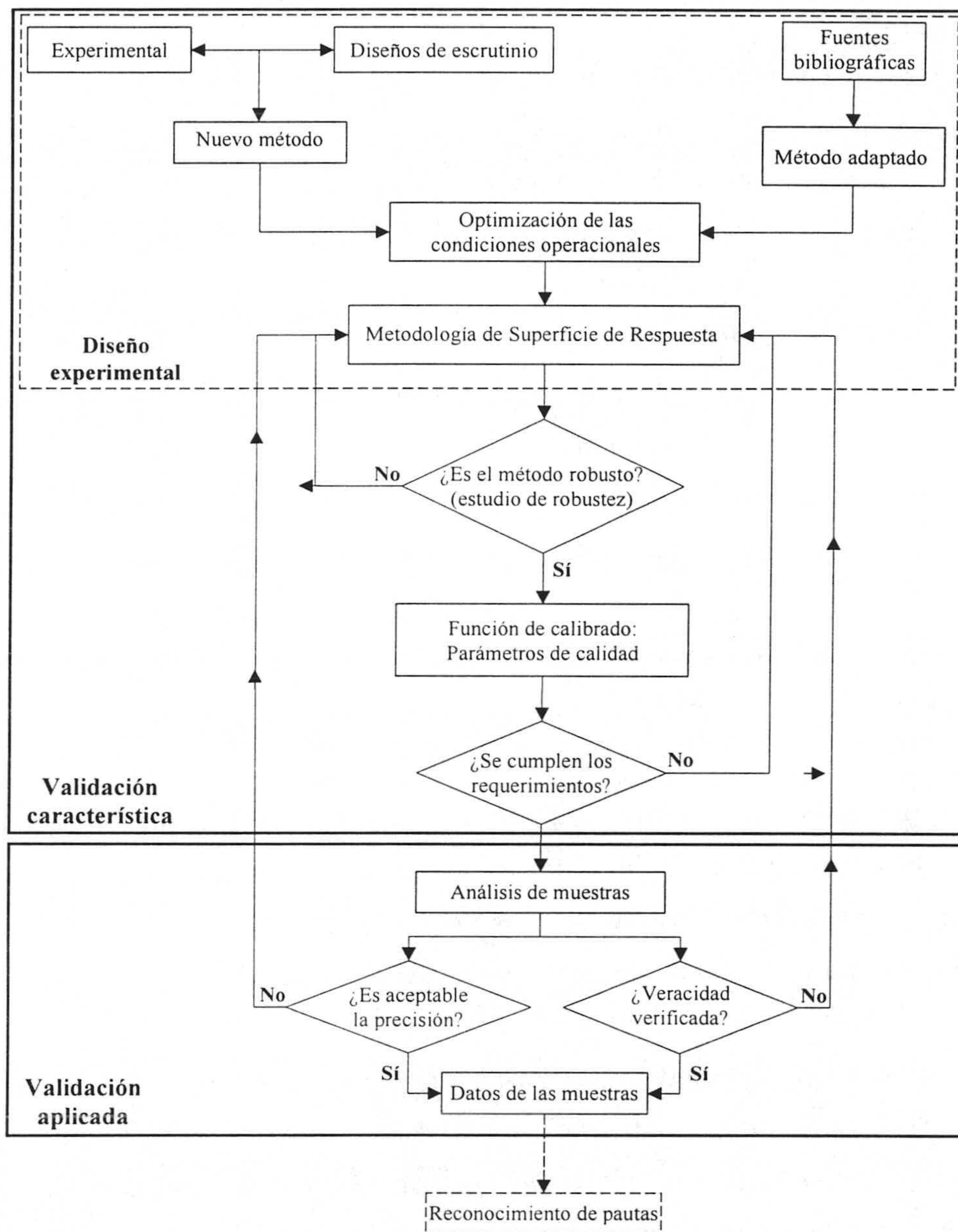


Figura I.1. Diagrama de flujo para la validación

## **I.1.1. VALIDACIÓN CARACTERÍSTICA**

### **I.1.1.1. Diseño experimental: optimización de un método analítico**

Para poner a punto un determinado método analítico se requiere siempre el conocimiento de los valores numéricos que han de tomar las diferentes variables que intervienen en el proceso y que permiten obtener un resultado analítico con la mejor calidad posible. Generalmente, esta calidad suele estar asociada a la obtención de un valor máximo de señal analítica, aunque en ciertos casos pueden utilizarse otros tipos de variables respuesta, llegándose a combinar varias de ellas [9].

El procedimiento para hallar estas condiciones óptimas se denomina “optimización” y se define como el proceso de búsqueda y localización del conjunto de valores de las variables independientes (factores), que producen el mejor resultado posible (respuesta), en nuestro proceso de síntesis, medición o determinación analítica [10].

La optimización se realiza básicamente en el desarrollo de métodos analíticos nuevos, sin embargo, en el caso de métodos ya existentes puede ocurrir que durante la etapa de validación sea necesario reconsiderar los valores establecidos, en cuyo caso lo que podríamos denominar “reoptimización” jugará un papel fundamental.

En cromatografía, la optimización de las variables experimentales implica el estudio de la etapa de tratamiento de la muestra, posible reacción de derivatización y de la propia separación cromatográfica, por lo que por una parte se requieren un gran número de experimentos, lo que supone un elevado consumo de tiempo, entre 10-60 minutos por punto experimental, mientras que por otra, la interacción mutua de las variables puede producir la existencia de más de un valor óptimo en dicha selección.

Tradicionalmente, los distintos valores se han encontrado aislando cada variable y optimizándola de manera independiente de las restantes, pero cuando el efecto de alguna de ellas no es independiente de las demás, (se producen interacciones entre dos o más variables) este proceso de “uno a la vez” o univariante, puede conducir a conclusiones erróneas [11]. Por ello, es conveniente utilizar técnicas formales de optimización multidimensionales o multivariantes que permiten la optimización simultánea de más de una variable. Esta nueva forma de planificar las experiencias puede superar al sistema tradicional, ya que por un lado, puede detectar y estimar interacciones entre las variables, y por otro, obtiene igual o más información pero con menos trabajo experimental. Por tanto, la utilización de la metodología de optimización basada en el uso de diseños experimentales multidimensionales se hace adecuada para los cromatografistas, pudiéndose aplicar a cada una de las etapas consideradas previamente.

Básicamente, los métodos multivariantes se dividen en dos grupos [12]:

- Métodos de tipo Caja Negra ( Diseños Secuenciales).
- Métodos de tipo Analítico (Diseños Simultáneos).

- **Métodos de tipo Caja Negra (Secuencial)**

Este es un concepto derivado de la teoría de sistemas en el que se asume un casi total desconocimiento del sistema, del que se sabe que tiene **entradas**, valores de las variables, y **salidas**, respuestas o resultados. En este caso, se diseñan estrategias que consisten en establecer cada experimento tras la evaluación de los resultados de los experimentos anteriores. Por ello, los métodos de este grupo se denominan de tipo secuencial. Los más conocidos son los métodos simplex, y dentro de éstos el simplex regular.

- **Métodos de tipo Analítico (Simultáneo)**

El término analítico se usa en el sentido matemático y se refiere a la posibilidad de disponer de una función suficientemente aproximada de la superficie de respuesta (una ecuación) como para evaluar la localización del óptimo por derivación de dicha función. Las técnicas basadas en diseños de tipo factorial son representantes genuinos de esta estrategia y su utilización en condiciones en las que el número de experimentos se reduzca al mínimo, constituyen el denominado método de Box-Wilson, de gradiente o de pendiente máxima (steepest ascend). Puesto que en estos casos, todos los experimentos se planifican con anterioridad a su realización, los métodos que pertenecen a este grupo se denominan de tipo simultáneo.

La optimización de las variables experimentales, tanto en los métodos de tipo secuencial como en los de tipo simultáneo, puede llevarse a cabo de una forma adecuada si se utiliza un diseño experimental en el que paralelamente se pueden obtener los valores óptimos de dichas variables a la vez. Los diseños a tres niveles permiten ajustar los datos experimentales a funciones polinómicas de grado dos y un estudio adecuado de tales funciones, posibilita encontrar la región del óptimo con relativamente pocas experiencias [13].

Un diseño experimental se define como una prueba o serie de pruebas en las cuales se introducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida [14]. Por lo tanto, el diseño experimental implica:

- Identificación de aquellos factores que pueden influir en el resultado de un experimento.
- Elección del conjunto de experimentos a realizar, de modo que minimice los efectos

de los factores incontrolados.

- Utilización del análisis estadístico para separar los efectos de los diferentes factores implicados.

Puesto que el principal objetivo de un diseño experimental es aumentar el conocimiento sobre el sistema en estudio, no existe un diseño que se pueda considerar “el mejor” ya que la elección de éste dependerá de las condiciones y fines para los que se establece el mismo.

La metodología estadística utilizada implica la planificación de un experimento para obtener datos apropiados, que puedan ser analizados mediante métodos estadísticos, con el fin de producir conclusiones válidas y objetivas. El análisis estadístico de los datos está estrechamente relacionado con el diseño experimental, ya que depende directamente del diseño empleado.

A la hora de planificar un diseño experimental, hay que tener en cuenta tres conceptos básicos:

- *Réplicación.* Replicar un experimento consiste en repetirlo completamente bajo las mismas condiciones experimentales, siendo ésta en determinados diseños, la única manera de poder estimar el error experimental.
- *Aleatoriedad.* Tanto la elección de los puntos experimentales del diseño, como el orden en que se realizan los ensayos, debe hacerse aleatoriamente para prevenir la existencia de sesgo y evitar dependencias entre observaciones. Es un requisito previo para la aplicación válida de la mayoría de los métodos estadísticos.
- *Homogeneidad estadística de las comparaciones.* La homogeneidad de las unidades



experimentales al realizar las comparaciones aumenta la posibilidad de detectar cambios e identificar factores. Cuando no se pueden realizar todos los ensayos en las mismas condiciones experimentales, se debe recurrir al análisis de bloques, entendiendo un bloque como una porción homogénea de puntos experimentales dentro del dominio total ensayado.

Cuando se plantea un diseño experimental, se requiere de antemano tener una idea clara de qué es exactamente lo que se va a estudiar. Por ello, al llevar a cabo el proceso de optimización, se deben seguir los siguientes pasos [14]:

- Comprender y evaluar el problema.
- Elegir los factores y niveles, entendiendo como factores las variables de las que depende la respuesta y como niveles, los posibles valores que puede tomar cada uno de los factores en el tipo de diseño elegido.
- Seleccionar la variable respuesta.
- Elegir el diseño experimental más adecuado.
- Realizar el experimento.
- Analizar estadísticamente los datos: comprobar el modelo y evaluar los factores que influyen en la variable respuesta.
- Obtener las conclusiones.

Si se realiza la optimización de las variables experimentales de un método nuevo, lo normal es comenzar con un diseño de primer orden (variación lineal de la respuesta), denominado generalmente de *escrutinio*, donde se pretende estudiar los efectos de las variables experimentales sobre las distintas variables respuesta.

La propiedad básica de selección de este tipo de modelos es la ortogonalidad que garantiza, tanto la sencillez en las estimaciones, como la máxima precisión en las regiones de confianza para uno o varios parámetros y en las predicciones de las respuestas.

A continuación, se suelen aplicar los diseños de segundo orden, en los que se estudian aquellos factores que resultaron significativos en los de primer orden a tres o más niveles, tratando de ajustar los datos experimentales a una superficie cuadrática.

Sin embargo, cuando se pretenden reoptimizar las condiciones experimentales de un método, para el cual ya se conocen las variables experimentales que ejercen una influencia significativa sobre las respuestas, se suelen emplear directamente los modelos de segundo orden (Diseños de optimización propiamente dichos).

Los diseños correspondientes a este tipo de modelo deben tener por lo menos tres niveles de cada factor. Se construyen atendiendo a las propiedades de *ortogonalidad* (elimina las covarianzas entre los coeficientes cuadráticos puros), *capacidad de rotación* (implica que la matriz de varianzas-covarianzas es invariante a la rotación ortogonal de las variables, por lo que la varianza de la respuesta predicha en un punto es función de la distancia de ese punto al central y no de la dirección) e *isovarianza*.

De una manera esquemática, se citan a continuación las principales clases de diseños disponibles para las etapas de ajuste lineal y cuadrático.

**a) Diseños empleados en modelos de primer orden.**

Ese grupo lo podrían formar:

- El diseño Simplex.
- Los diseños factoriales completos.
- Los diseños factoriales fraccionados con puntos centrales a dos niveles.

- *Diseño Simplex.*

Un simplex se define como la figura de  $n$  lados más simple en un espacio de  $n$  dimensiones. En esta técnica, la respuesta se optimiza respecto a  $k$  factores, de los  $k$  vértices posibles y  $k - 1$  están en el mismo plano o hiperplano (simplex). Así, para dos factores el simplex será un triángulo equilátero, para tres factores un tetraedro y así sucesivamente. Estas figuras geométricas tienen la interesante propiedad de poder formar un nuevo simplex regular sobre cualquier cara de un simplex dado, por la adición, tan sólo, de un nuevo punto equidistante de los de la cara fija.

Desde el punto de vista matemático, el Simplex es un algoritmo secuencial de búsqueda directa, que se caracteriza por la no utilización de derivadas de la respuesta y por basarse en un estudio secuencial de observaciones [12]. El algoritmo consiste en diseñar un simplex inicial, realizar los experimentos y calcular el nuevo vértice por reflexión del vértice con la peor respuesta.

Para mejorar la ejecución del método se han propuesto varias modificaciones. Así, el avance hacia el máximo se puede acelerar utilizando un simplex que puede variar en tamaño según como se compare la respuesta en el nuevo vértice. Inicialmente, el tamaño del simplex es grande, para avanzar con rapidez hacia el máximo, cerca del cual se contrae para permitir que éste se pueda establecer con exactitud [15].

Aunque el Simplex tiene la ventaja de moverse bien con un gran número de variables, en realidad es un método ciego, ya que no conoce, ni evalúa en ningún momento la superficie de la respuesta y no aporta información adicional sobre el sistema, por lo que habría que hacer nuevos puntos experimentales, por ejemplo un nuevo diseño [16], para evaluar numéricamente los efectos y el óptimo encontrado.

- *Diseño Factorial  $2^k$ .*

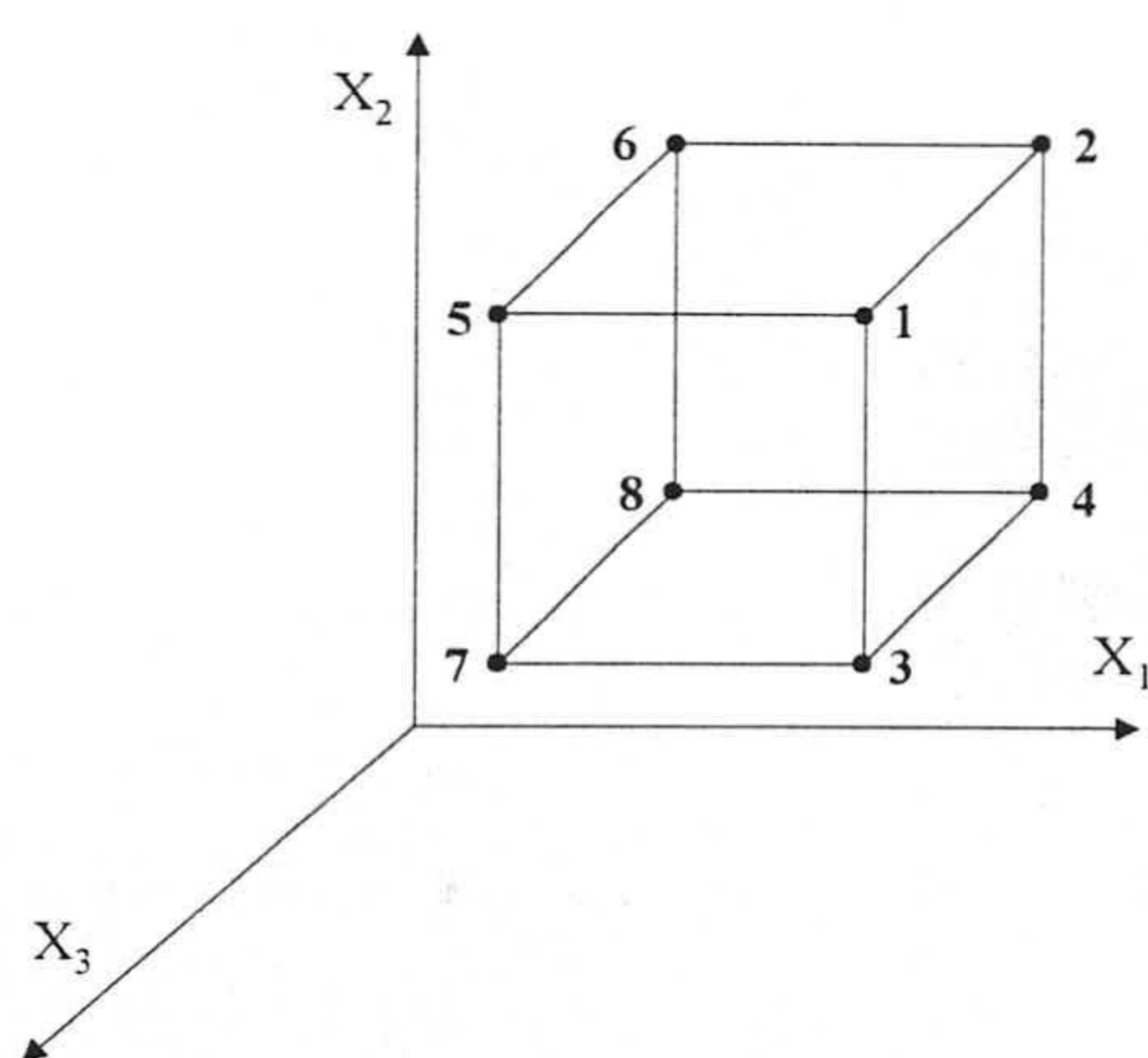
Es un tipo particular de diseño factorial en el que todos los  $k$  factores se estudian a dos niveles (+1 y -1). Se consideran de gran importancia ya que:

- Permite estudiar un alto número de factores con relativamente pocas unidades experimentales.
- Favorece la experimentación secuencial, lo que facilita la eliminación de factores “inertes”.
- Es fácil de fraccionar en bloques para conseguir mayor homogeneidad en los puntos experimentales del dominio ensayado.
- Facilita la construcción de diseños factoriales fraccionados a dos niveles, que reducen aun más el número de unidades experimentales requeridas.
- Cuando se necesita un análisis más completo se pueden aumentar de modo sencillo, para formar diseños compuestos.

Es adecuado para la estimación de los efectos tanto de primer orden como de interacción, sin embargo, falla cuando existen efectos adicionales que son significativos (p. ej. los de segundo orden) [12].

Al estar basados en los modelos de primer orden representan, generalmente, planos inclinados debido a los términos de interacción, en lugar de superficies de respuesta conteniendo un máximo [17].

En la Figura I.2 se muestra la representación gráfica de un diseño factorial  $2^3$ , así como la matriz de dicho diseño.



Experimento	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1

**Figura I.2. Diseño factorial  $2^3$ .** (-) y (+) indican el nivel más bajo (-1) y más alto (+1) respectivamente.

- *Diseños Factoriales Fraccionados a dos niveles.*

El número de experimentos que requiere un diseño factorial  $2^k$  completo aumenta geoméricamente al crecer  $k$ . Cuando  $k$  es grande la información deseada se puede obtener, casi siempre, realizando sólo una fracción del diseño factorial completo [18]. El hecho de que se puedan estimar todos los efectos, no implica que todos sean significativos. Existe cierta jerarquización ya que la importancia de los efectos principales tiende a ser mayor que la de las interacciones de dos factores, que a su vez tiende a ser mayor que la de las interacciones de tres factores, y así sucesivamente.

Un uso importante de los factoriales fraccionados se da en “los experimentos de escrutinio” [18], donde el objetivo del diseño es el estudio de aquellas variables que pueden producir cambios significativos en la respuesta seleccionada. El éxito de su utilización se basa en tres ideas clave [19]:

- *La dispersión.* Cuando existen varias variables, es probable que el sistema esté influido básicamente por algunos de los efectos principales e interacciones de orden inferior.
- *La proyección.* Los diseños factoriales fraccionados pueden proyectarse en diseños más poderosos (más grandes) en el subconjunto de factores significativos.
- *La experimentación secuencial.* Es posible combinar los experimentos de dos o más diseños factoriales fraccionados para conformar de manera secuencial un diseño más grande y estimar los efectos de los factores y las interacciones de interés.

Un ejemplo particular de éstos, son los diseños saturados y los de Plackett-Burmann, en los que solo se pueden evaluar los efectos principales, estando confundidas las interacciones de segundo orden y superiores con los efectos principales. En estos diseños, se requiere un número de ensayos igual al número de variables a estudiar más uno. Su mayor utilidad está en los estudios de robustez, donde al tomar pequeños intervalos de las variables experimentales, las interacciones se consideran despreciables, pudiendo estimar con una gran fiabilidad los efectos principales.

Tanto en los diseños factoriales completos como fraccionados se suelen emplear puntos centrales para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien a un plano o si existe curvatura, por lo que en esa región experimental deberían emplearse diseños de orden superior, para estimar el error experimental.

#### **b) Diseños empleados en los modelos de segundo orden.**

Se pueden distinguir cinco clases fundamentales,

- Diseño factorial  $3^k$ ,

- Diseño de Box-Behnken,
- Método de Box-Wilson,
- Diseño compuesto central,
- Diseño Doehlert,

de los cuales sólo se comentarán los dos últimos, por ser los que se han empleado en esta Memoria.

- *Diseño compuesto central.*

Se compone de tres partes:

a.- Un diseño factorial,  $2^k$ , donde  $k$  es el número de factores estudiados que suelen ser inferior a 5.

b.-  $2k$  puntos axiales complementarios (denominado de diseño estrella), localizados en los ejes del espacio factorial, a una distancia  $\alpha$  (distancia axial o brazo de la estrella) medida desde el punto central del diseño hasta el punto estrella, i.e.  $(\pm\alpha, 0, \dots, 0)$ ,  $(0, \pm\alpha, \dots, 0)$ , ...,  $(0, 0, \dots, \pm\alpha)$ .

c.-  $n_c$  puntos centrales.

Por lo tanto, el número de puntos experimentales será  $N = 2^k + 2k + n_c$ .

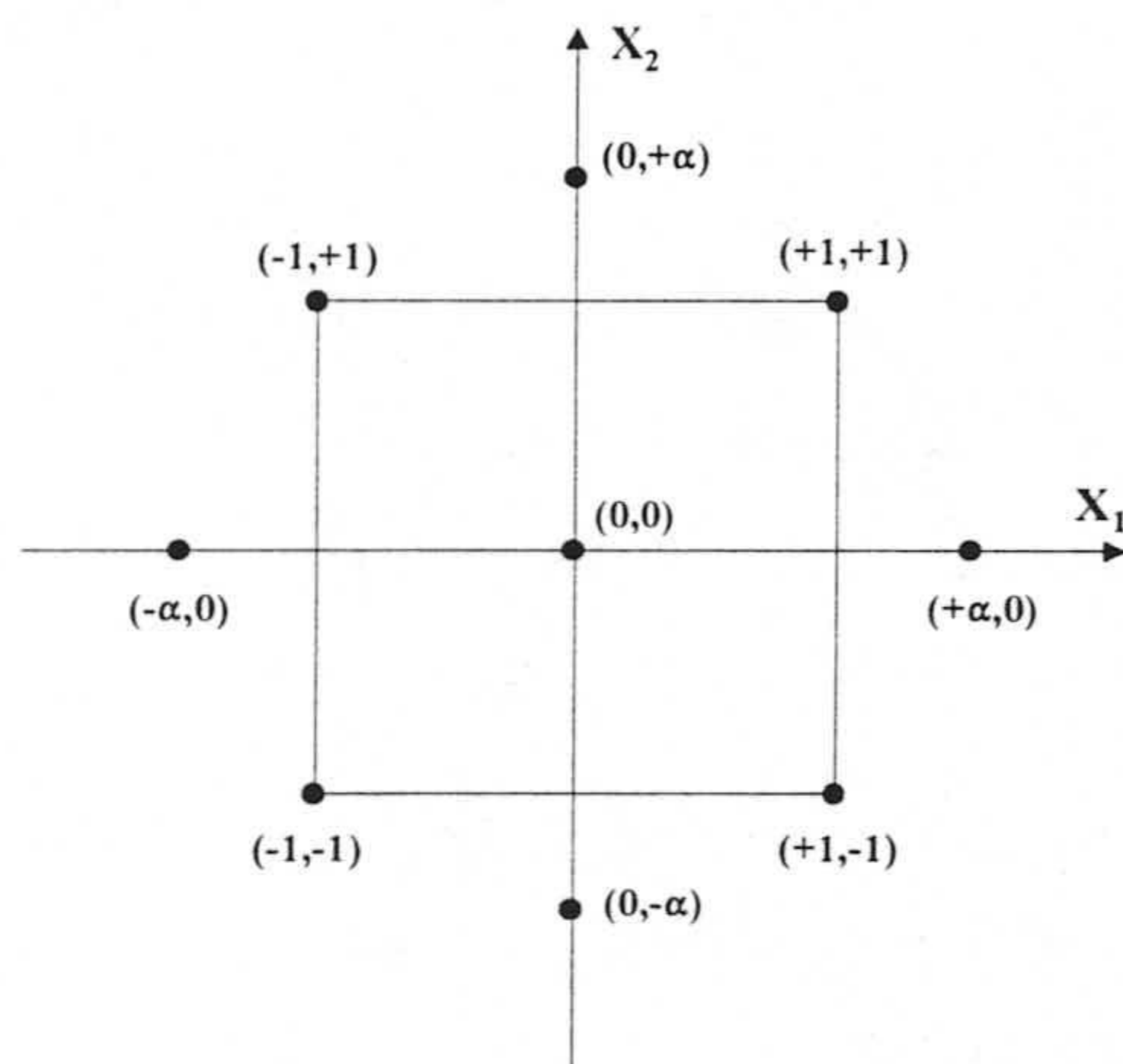
Este diseño es probablemente el más utilizado para justificar superficies de respuesta de segundo orden ya que:

- Se puede transformar en ortogonal seleccionando apropiadamente  $\alpha$  mediante la ecuación [20]:

$$\alpha = \sqrt{\frac{\sqrt{(2^k + 2k + n_c)2k} - 2k}{2}} \quad (1)$$

- La correcta selección de  $\alpha$ , puede convertirla en rotatoria. Así si  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ , proporciona un diseño compuesto central rotatorio, del diseño  $2k$
- Si  $\alpha = 1$ , se convierte en un diseño compuesto central, centrado en las caras. Al no ser rotatorio, su utilización conlleva una seria desventaja.

En la Figura I.3 se recoge la representación gráfica de un diseño compuesto central para dos factores, así como la correspondiente matriz del diseño.



Experimento	$X_1$	$X_2$
1	+1	+1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	-1	-1
5	$-\alpha$	0
6	0	$-\alpha$
7	$+\alpha$	0
8	0	$+\alpha$
9	0	0

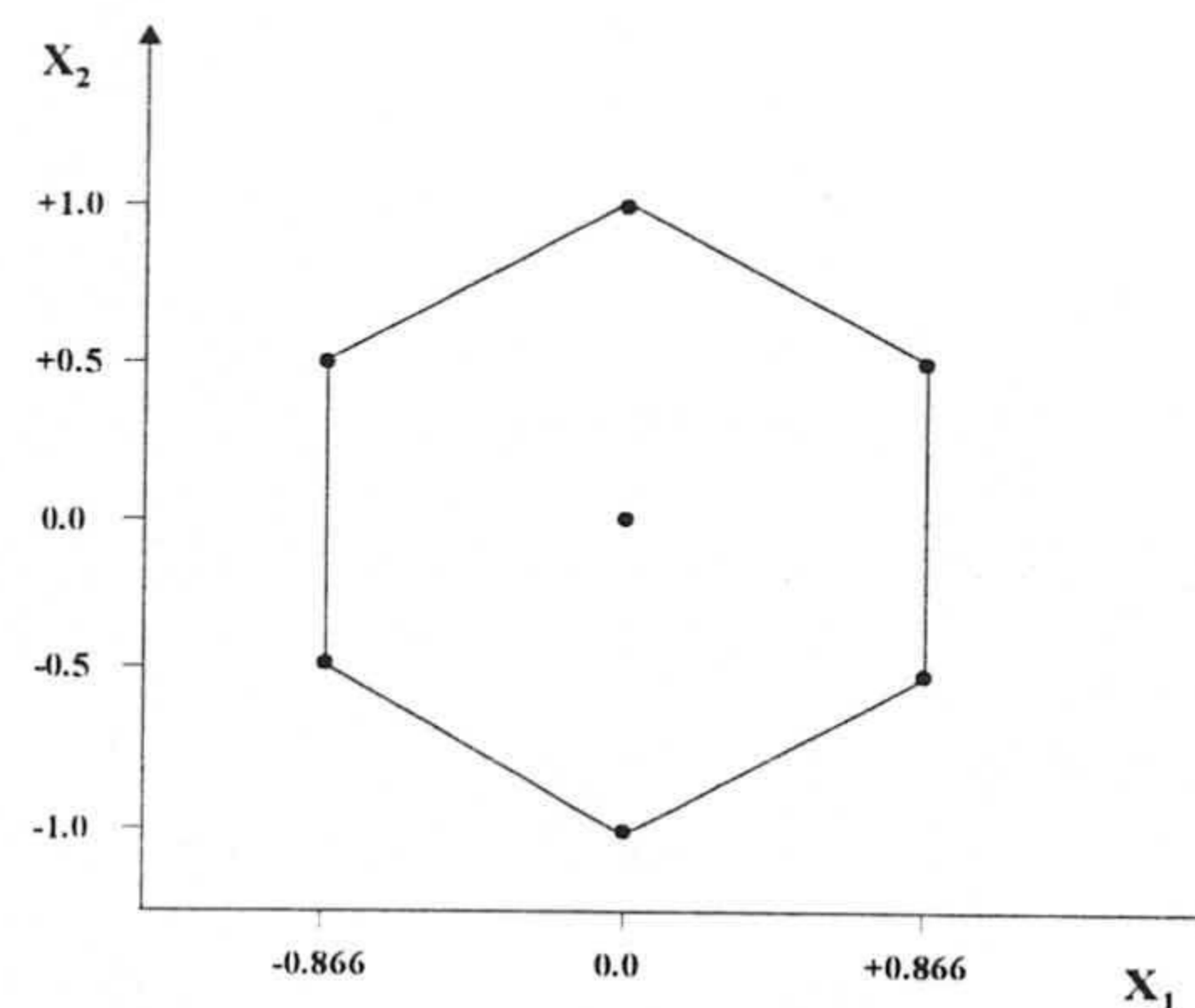
Figura I.3. Diseño compuesto central para dos variables



- *Diseño Doehlert.*

Este diseño presenta una distribución uniforme de puntos sobre todo el espacio experimental, dispuesta según una red romboidal, que en el caso de dos variables produce un hexágono [21], Figura I.4.

Experimento	$X_1$	$X_2$
1	0.000	0.000
2	0.000	+1.000
3	+0.866	+0.500
4	+0.866	-0.500
5	0.000	-1.000
6	-0.866	-0.500
7	-0.866	+0.500



**Figura I.4. Estructura del diseño Doehlert para dos variables**

Los diseños Doehlert han sido utilizados en la optimización de sistemas cromatográficos [22,23], electroquímicos [24], de extracción líquido-líquido [25] y en la interpretación de los factores que influyen en la determinación de analitos por absorción atómica electrotérmica [26,27].

Requieren un número de experimentos menor,  $N = k^2 + k + 1$ , que los diseños compuestos centrales [22,28] y aunque no son ortogonales no se desvían significativamente de la calidad necesaria para su aplicación eficaz y segura [29].

Si definimos la eficiencia como el cociente entre el número de coeficientes de la ecuación y el número de puntos experimentales estudiados [28], los diseños Doehlert junto con los de Box-Behnken presentan mayor valor de este parámetro en comparación con el

diseño factorial  $3^k$ ; este hecho permite obtener la misma información, pero con menor número de experimentos.

Otra propiedad particular de este diseño es que posibilita el estudio de algunos factores a distintos niveles, lo que permite analizar las posibles variables más críticas a más niveles.

#### **I.1.1.1.a. Metodología de la superficie de respuesta**

La Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemático- estadísticas y que son útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés está influida por varias variables y que tienen como objetivo la optimización de la respuesta [30].

Supongamos por ejemplo, la existencia de dos variables  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  que influyen en la respuesta  $\mathbf{R}$  de un proceso de optimización. Dicha respuesta es función de los niveles  $x$  e  $y$  correspondientes de los factores  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$  respectivamente, tal y como se indica en la ecuación (2):

$$R = f(X,Y) + \varepsilon \quad (2)$$

donde  $\varepsilon$  representa el error o ruido observado en la respuesta  $\mathbf{R}$ .

Si la respuesta esperada se denota por  $E(\mathbf{R}) = f(\mathbf{X},\mathbf{Y}) = \eta$ , entonces la superficie representada por  $\eta = f(\mathbf{X},\mathbf{Y})$  se denomina *superficie de respuesta*.

En la mayoría de los problemas, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por ello, el primer paso en la MSR consiste en

establecer una aproximación adecuada a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Por lo general, se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes, sin embargo, la existencia de curvatura en el sistema obligaría a usar polinomios de mayor grado. Así, y para un modelo de segundo orden, la ecuación general sería:

$$R = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (3)$$

donde:

$\beta_0$ : Término independiente.

$\beta_i$ : Coeficiente del término lineal.

$\beta_{ii}$ : Coeficiente del término cuadrático puro.

$\beta_{ij}$ : Coeficiente del término de interacción.

$x_i$ : Nivel correspondiente al factor  $X_i$ .

$x_k$ : Nivel correspondiente al factor  $X_j$ .

Los coeficientes del polinomio de aproximación se estiman mediante el método de mínimos cuadrados, realizándose el análisis de la superficie de respuesta en términos de la superficie ajustada. Tal análisis será equivalente al análisis del sistema real, si la superficie ajustada es una aproximación adecuada a la función de respuesta real.

Esta Metodología es una técnica secuencial. A menudo, cuando se considera un punto sobre la superficie de respuesta alejado del óptimo, el polinomio de primer grado es apropiado si existe poca curvatura en el sistema. En este caso, el objetivo consiste en guiar al experimentador rápida y eficazmente a la cercanía general del punto óptimo. Determinada la región del punto óptimo, puede emplearse una superficie de respuesta de segundo grado para localizarlo.

Para llevar a cabo la elección del diseño apropiado, hay que tener en cuenta una serie de características, ya que éste debe [30]:

- Proporcionar una distribución razonable de puntos de datos en toda la región de interés.
- Permitir investigar la idoneidad del modelo, incluyendo el fallo de ajuste.
- Permitir la realización de experimentos en bloques.
- Permitir la construcción secuencial de diseños de orden superior.
- Proporcionar una estimación del error intrínsecamente.
- No requerir un número elevado de ensayos ni demasiados niveles de los factores.
- Asegurar simplicidad en los cálculos de los coeficientes del modelo.

En este sentido, los diseños Doehlert tienen una estructura adecuada para su utilización en Metodología de Superficies de Respuesta al poseer prácticamente, todas las características señaladas.

El análisis estadístico de los resultados experimentales obtenidos tras la aplicación de un diseño se realiza mediante el siguiente esquema de trabajo:

Comprobación de las hipótesis matemáticas.  
Comprobación del modelo de segundo orden.  
Análisis de varianza.  
Estimación de los coeficientes del modelo.  
Estudio de la superficie de respuesta estimada.  
Obtención de los valores óptimos.

– Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Se puede llevar a cabo de forma gráfica mediante el análisis de los residuales y para obtener conclusiones fiables, se requieren una serie de principios básicos de tipo estadístico,

como son:

*Aleatoriedad.* El orden del conjunto de ensayos y del sistema experimental debe elegirse aleatoriamente.

*Normalidad.* Una forma de comprobarla consiste en construir una gráfica de probabilidad normal tanto de los valores de respuesta como de sus residuales. En el caso de que exista cumplimiento de dicha hipótesis, esta gráfica debe ser una línea recta.

*Homogeneidad de varianzas.* Se consigue representando los residuales en función de los valores de cada una de las variables. Dicha gráfica no debe mostrar una forma de embudo o campana.

*Independencia.* Se deduce a partir de una gráfica de los residuales frente a los valores predichos de la variable respuesta.

– Comprobación del modelo de segundo orden.

Se lleva a cabo mediante la representación gráfica de los valores experimentales de la variable respuesta frente a los predichos por el modelo. La adecuación de los puntos experimentales al modelo, se cuantifica a través del coeficiente de determinación  $r^2$ .

– Análisis de la Varianza.

Este análisis, ofrece la posibilidad de conocer los niveles de significación, P, para cada uno de los coeficientes de regresión del modelo de segundo orden. Para ello, se calcula el estadístico F de Snedecor, definido como el cociente entre cada media cuadrática y el error total.

La comparación del estadístico calculado con su valor tabulado para los grados de libertad correspondientes y a un nivel de significación del 5%, permite establecer que si:

$F_{cal} < F_{tab}$  La variabilidad del coeficiente de regresión es menor que la generada por el error aleatorio y por tanto, no es significativo.

$F_{cal} > F_{tab}$  La variabilidad del coeficiente de regresión es mayor que la generada por el error aleatorio y por tanto, es significativo.

En algunos casos se puede llegar a la misma conclusión observando los niveles de significación, P en este caso. Si P es inferior al 5% se dirá que el coeficiente de regresión es significativo; si por el contrario es superior al 5%, no será significativo, representando P la probabilidad de que el efecto del coeficiente de regresión sea debido únicamente al error aleatorio.

– Estimación de los coeficientes del modelo.

A partir de los valores obtenidos de la variable respuesta, es posible estimar los coeficientes de regresión de una función respuesta del tipo:

$$R(X,Y) = \beta_0 + \beta_X X + \beta_Y Y + \beta_{XX} X^2 + \beta_{YY} Y^2 + \beta_{XY} XY \quad (4)$$

donde:

R (X,Y): Respuesta analítica del sistema.

X e Y: Variables a optimizar.

$\beta_0$  : Término independiente.

$\beta_X$ : Coeficiente lineal para la variable X.

$\beta_Y$ : Coeficiente lineal para la variable Y.

$\beta_{XX}$ : Coeficiente cuadrático para la variable X.

$\beta_{YY}$ : Coeficiente cuadrático para la variable Y.

$\beta_{XY}$ : Coeficiente de interacción de las dos variables.

– Estudio de la superficie de respuesta estimada.

La representación de la ecuación anterior muestra la superficie de respuesta estimada de la variable respuesta en función de las dos variables a optimizar, lo que permite visualizar la existencia o ausencia de puntos críticos en el dominio experimental ensayado.

– Obtención de los valores óptimos.

La aplicación de los diseños estudiados con anterioridad para dos variables sobre la zona elegida del espacio experimental, proporciona la estimación de la relación funcional que representa a la superficie de respuesta de nuestro sistema. Para el análisis de esta función,  $R(X,Y)$ , que corresponde a un modelo cuadrático, Bosque y col. [29], proponen la aplicación del criterio de Lagrange :

Un punto crítico  $(x_0, y_0)$  de una función  $R(X,Y)$  derivable dos veces es:

- Mínimo relativo si  $H(x_0, y_0) > 0$  y  $\partial^2 R / \partial x^2 > 0$
- Máximo relativo si  $H(x_0, y_0) > 0$  y  $\partial^2 R / \partial x^2 < 0$
- Punto de silla si  $H(x_0, y_0) < 0$ ,

donde  $H(x,y)$  es el hessiano de  $R$  dado por la expresión:

$$H(x,y) = (\partial^2 R / \partial x^2) \cdot (\partial^2 R / \partial y^2) - (\partial^2 R / \partial x \partial y)^2 \quad (5)$$

Con el criterio de Lagrange es posible establecer la existencia de alguna de las dos circunstancias siguientes en el dominio experimental:

a) Existencia de un óptimo en la función estimada:

Si el punto crítico resulta ser un óptimo (generalmente un máximo o un mínimo), la posición del mismo se localiza algebraicamente, mediante la resolución de las ecuaciones:

$$\frac{\partial R}{\partial x} = 0 \qquad \frac{\partial R}{\partial y} = 0 \qquad (6)$$

Los valores de las variables encontrados,  $X_{\max}$  e  $Y_{\max}$ , en el óptimo, podrán ser utilizados en el procedimiento operatorio del método analítico.

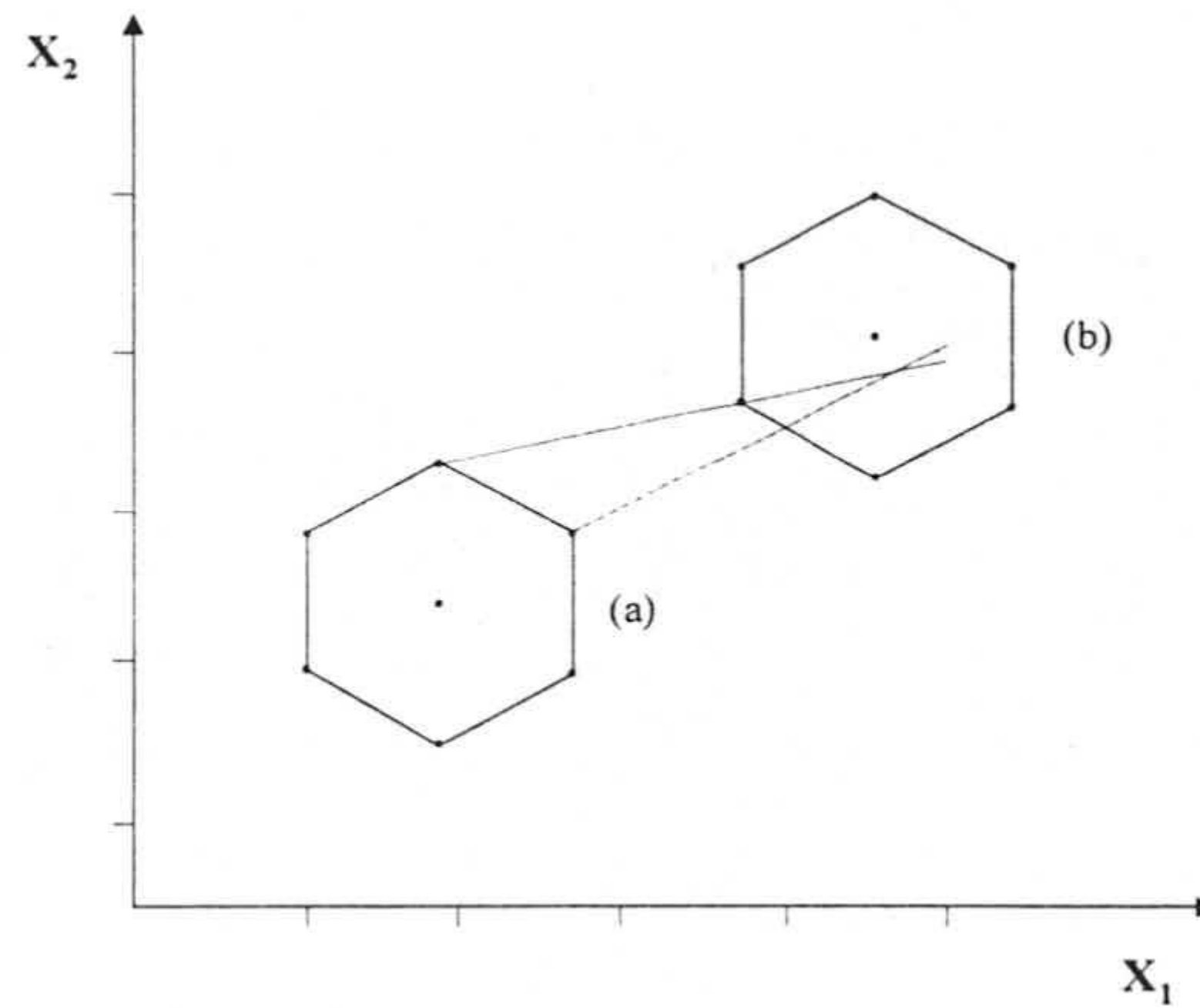
b) La no existencia de óptimo en la función estimada.

Esto implicaría la necesidad de realizar un nuevo diseño en la zona donde se estima la presencia del óptimo del sistema. Para localizar la zona se propone buscar la dirección de máxima variación de la respuesta. El cálculo del vector gradiente [29] sobre dos o más puntos del diseño inicial, permitirá encontrar dicha dirección:

$$\vec{\nabla}R(x_0, y_0) = \frac{\partial R}{\partial x}(x_0, y_0)\vec{i} + \frac{\partial R}{\partial y}(x_0, y_0)\vec{j} \qquad (7)$$

El punto de corte de las rectas trazadas sobre las direcciones de los vectores gradientes en dichos puntos, indicará la región donde presumiblemente se pueda encontrar el óptimo de la respuesta, en la que se realizará un nuevo diseño, Figura I.5.





**Figura I.5. Elección de un nuevo diseño experimental cuando la función respuesta no presenta un máximo. (a) primer diseño; (b) diseño nuevo.**

Para el trazado de las rectas en un punto determinado  $(x_0, y_0)$  se tiene en cuenta la ecuación de la recta:

$$y = a + bx \quad (8)$$

donde b y a tienen las siguientes expresiones:

$$b = \operatorname{arctg} \frac{[\partial R / \partial y(x_0, y_0)]}{[\partial R / \partial x(x_0, y_0)]} \quad a = y_0 + bx_0 \quad (9)$$

Cuando se lleva a cabo la optimización de más de dos factores, la localización del punto crítico es “ligeramente” más compleja, ya que no hay forma de visualizar la superficie de respuesta. Algunos autores [27,31,32] recurren al análisis gráfico de superficies bifactoriales de la respuesta, en las que se estudia cómo varía la variable respuesta en función de dos factores, manteniendo el resto constantes; el estudio de estas superficies

conduce a la evaluación aproximada del óptimo, mientras que otros autores, como González y col. [20,28] determinan el punto crítico derivando la función de la superficie de respuesta.

Para caracterizar el punto crítico como máximo, mínimo o punto de silla se han propuesto varias alternativas: García-Campaña y col. [33] extienden el criterio de Lagrange para el estudio de tres factores aunque no lo desarrollan para un número superior de factores, mientras que González y col. [20] estudian los autovalores de la matriz cuadrada formada, al colocar en la diagonal principal los coeficientes de segundo grado  $b_{ii}$  y en las posiciones  $ij$ , un medio de los coeficientes  $b_{ij}$ . Si todos los autovalores son negativos, el punto crítico sería un máximo; si son positivos sería un mínimo y si fuesen negativos y positivos, el óptimo sería un punto de silla.

#### **I.1.1.1.b. Establecimiento de una función de conveniencia**

En la mayoría de los procedimientos cromatográficos en los que es posible la determinación de varios analitos, es necesario introducir una etapa de tratamiento de la muestra en la que suele ser muy frecuente recurrir a algún tipo de procedimiento de extracción (líquido-líquido, sólido-líquido, etc.).

El pre-requisito de cualquiera de estos sistemas es que extraigan los analitos preferentemente en su totalidad, o en su caso, que existan una condiciones en las que al menos, se extraigan en cantidad suficiente y reproducible. Su optimización es bastante compleja, ya que implica seleccionar unas condiciones que, generalmente, no son óptimas para cada uno de los analitos. Se suele llegar a una situación de compromiso entre las eficacias individuales de cada analito, el grado de co-extracción de otros componentes y la compatibilidad posterior de la fases extractante con la fase móvil del método cromatográfico.

Otro problema adicional se plantea en la selección de la variable respuesta que debe optimizarse, para lo cual, la bibliografía recoge soluciones que van desde la simple suma de

las respuestas individuales de cada analito (altura o área de pico) [25], hasta la aplicación de técnicas multivariantes que se han agrupado bajo la denominación genérica de “Enfoque multicriterio para la toma de decisiones” (*Multicriteria Decision Making, MCDM, Approach*) [9]. Estas técnicas se basan en la utilización de variables respuesta “no relacionadas físicamente” con las respuestas experimentales, pero que convenientemente definidas y analizadas, persiguen la obtención de las mejores condiciones operacionales. Entre todas las variables definidas cabe destacar la “función de conveniencia de Derringer, (*Desirability function*) [34,35], “el valor umbral múltiple” (*Multiple Threshold approach*) [36] y “punto condicionado óptimamente” (*Pareto optimality concept*) [37].

Centrándonos en la función de conveniencia -la única utilizada en esta Memoria- cabe indicar que puede considerarse como una variable respuesta definida a través de una función de funciones con la que es posible encontrar las mejores condiciones operativas, componiendo sus respuestas experimentales.

Desde el punto de vista matemático, la función de conveniencia  $D$  es el producto de  $m$  funciones de conveniencia individuales,  $d_i$ , dependientes de las variables respuesta experimentales, y que al componerse, equivalen a una función que dependerá directamente de las variables operativas.

Cada  $d_i$ , constituye una función normalizada, construida acotando la respuesta experimental entre dos valores extremos, 0 para la peor respuesta que no se desea, y 1, para la mejor. En este punto, el analista es el que decide cuales son los valores de las variables respuesta experimentales asociados a estas cotas: Así, los valores de  $d_i$  dependerán de los valores que tomen las variables respuesta instrumentales:

- $d_i = 0$  si  $Y_{ij} \leq Y_i^-$ ,
- $d_i = 1$  si  $Y_{ij} \geq Y_i^+$ ,
- $d_i = \left( \frac{Y_{ij} - Y_i^-}{Y_i^+ - Y_i^-} \right)^r$ , si  $Y_i^- \leq Y_{ij} \leq Y_i^+$ ,

donde:

$d_i$ : Función de conveniencia individual para la variable respuesta experimental  $Y_i$ .

$Y_{ij}$ : Valor de  $Y_i$  en el  $j$ -ésimo punto del diseño.

$Y_i^-$ : Valor más bajo de  $Y_{ij}$ , y por tanto no deseado.

$Y_i^+$ : Valor más alto de  $Y_{ij}$ , y por tanto más deseado.

$r$ : Parámetro a decidir por el usuario.

Este último parámetro,  $r$ , es el que verdaderamente condiciona a la función  $d_i$ , ya que si toma valores inferiores a 1, “potencia” las respuestas cercanas a la cota inferior, mientras que si toma valores superiores a 1 las penaliza, “potenciando” las respuestas cercanas a la cota superior. La situación más habitual y empleada en esta Memoria es la de atribuir a  $r$  el valor de 1 [38], de forma que  $d_i$  crece linealmente desde  $Y_i^-$  a  $Y_i^+$ .

Por otro lado, para tener en cuenta la importancia de cada una de las variables respuesta experimentales, a cada  $d_i$  se le puede asignar un determinado peso  $w_i$ . De esta forma, la expresión final de  $D$  sería:

$$D = \left( \prod_{i=1}^{i=m} d_i^{w_i} \right)^{1/\sum w_i} \quad (10)$$

que para  $r = 1$  y  $w_i = 1$  queda reducida a la expresión:

$$D = \left( \prod_{i=1}^{i=m} d_i \right)^{1/m} \quad (11)$$

La optimización de  $D$  se lleva a cabo utilizando tanto diseños secuenciales [39] como la Metodología de Superficie de Respuesta [9,35,40]. La diferencia entre ambas vías estriba en que con la primera se obtiene un valor puntual de  $D$ , mientras que con la segunda se obtiene una superficie de respuesta, en la que se puede observar cómo varía  $D$  en función de los factores considerados. En nuestra opinión esta última opción, aporta mayor versatilidad ya que en las condiciones más generales utilizadas para la definición de  $D$ ,  $w_i = 1$  y  $r = 1$ , un adecuado estudio de las gráficas de contorno de la superficie de respuesta obtenida (superficies equiconvencientes), suministra información general sobre las condiciones operacionales, pudiendo a partir de ella seleccionarlas para una situación concreta

En la Figura I.6 se esquematiza el procedimiento para la obtención y optimización de dicha función para el caso de  $h$  variables respuesta,  $k$  factores y utilizando un diseño de  $j$  puntos experimentales.

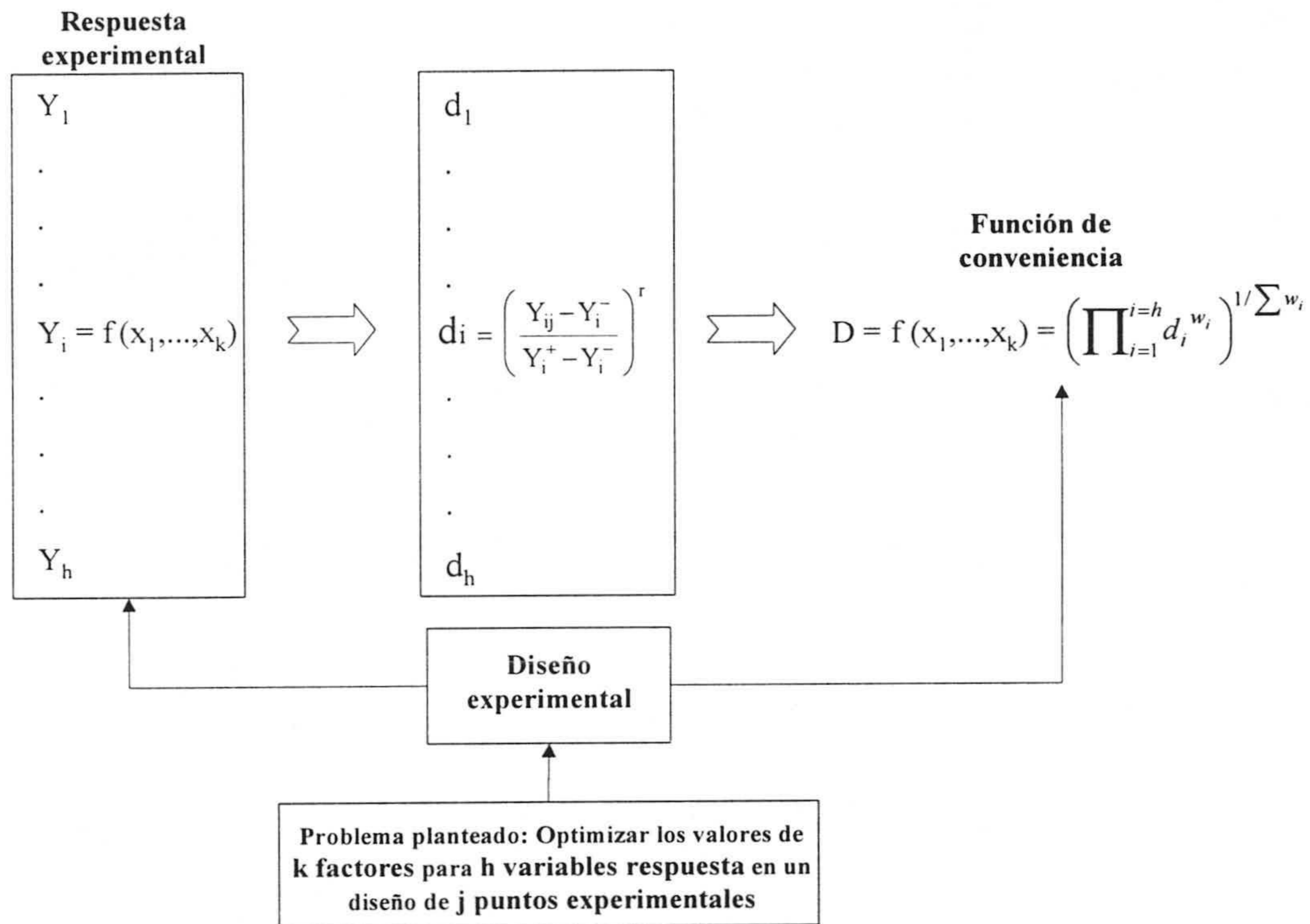


Figura I.6. Esquema para la obtención y optimización de la función de conveniencia  $D$

### **I.1.1.2. Estudio de robustez. Delimitación de la inercia**

La inercia es una medida de la capacidad del procedimiento para generar resultados fiables a pesar de los pequeños errores que se pueden cometer en la aplicación del método analítico. La evaluación de la inercia puede realizarse:

- Mediante un ejercicio interlaboratorio, en el que se evalúa la inercia cuando se modifican condiciones operacionales extrínsecas al proceso analítico, i.e. reactivos, consumibles, equipos, etc, (*solidez*) [41].
  
- Mediante un ejercicio intralaboratorio en el que se mide la inercia del método ante la influencia de los pequeños cambios en las condiciones experimentales que pueden ocurrir durante la aplicación del método (*robustez*) [42].

Actualmente se recomienda (cuando sea necesario) [43] llevar a cabo el estudio de robustez antes del establecimiento de los parámetros de calidad al ser considerada la inercia como una propiedad básica del método analítico y la robustez un parámetro de calidad que la sustenta [5].

El estudio de robustez se realiza mediante un diseño experimental balanceado, y las variaciones experimentales de las variables se provocan a partir del valor seleccionado como operacional (nominal, 0) de forma que, para cada una de ellas se estudian dos niveles, +1 y -1, estudiando cada factor el mismo número de veces en cada nivel [44,45].

En general, el efecto para una determinada variable respuesta se calcula empleando la ecuación:

$$E_{.xk} = \frac{2}{N} [\Sigma Y(+)._{xk} - \Sigma Y(-)._{xk}] \quad (12)$$

donde:

$E_{X_k}$ : Efecto del factor  $X_k$  sobre la respuesta  $Y$ .

$N$ : Número de experiencias del diseño experimental.

$\Sigma Y(+)_Xk$ : Sumatoria de las respuestas cuando el efecto  $X_k$  se ensaya al nivel +1.

$\Sigma Y(-)_Xk$ : Sumatoria de las respuestas cuando el efecto  $X_k$  se ensaya al nivel -1.

El efecto calculado usando esta expresión indica la variación total introducida en la respuesta  $Y$  cuando el factor  $X_k$  cambia desde un nivel extremo a otro, como se puede observar en la Figura I.7.

Sin embargo, cuando se está evaluando la robustez de un método analítico en general y cromatográfico en particular, las variaciones en los niveles de los factores suelen producirse desde el valor nominal a un valor superior, +1, o inferior -1, por lo que creemos que **el efecto debería de considerarse como la variación en la respuesta cuando el factor varía desde el valor nominal, a uno de los valores extremos**, [46] y como se puede apreciar en la Figura I.7, su valor sería la mitad del efecto tradicional, y se podría calcular a partir de la ecuación (13):

$$E'_{Xk} = \frac{1}{N} \left[ \Sigma Y(+)_Xk - \Sigma Y(-)_Xk \right] \quad (13)$$





Figura I.7. Diferencia entre los dos tipos de efecto considerado. a) Efecto tradicional; b) Efecto propuesto.

Por otro lado, aunque la Regresión Lineal Múltiple (RLM) permite obtener información acerca del efecto asociado a cada variable, las conclusiones obtenidas resultan mucho más útiles si se considera la nueva definición de efecto.

De acuerdo con lo que propone esta metodología, podemos asociar la función matemática  $Y = b_0 + \Sigma(b_k X_k)$ , a la de la señal analítica cuando está sometida a pequeñas variaciones sobre su valor nominal, siendo  $b_0$  la respuesta media, y  $b_k$  el coeficiente de regresión estimado para la variable  $X_k$  **que, en nuestra opinión, representa una medida de la sensibilidad de la respuesta Y a la variable  $X_k$ , por lo que lo denominamos “coeficiente de sensibilidad”**.

A partir de la definición propuesta de efecto, y empleando las variables codificadas, el efecto,  $E'_{X_k}$ , y el coeficiente de regresión,  $b_k$ , coinciden en los valores extremos +1 y -1:

$$E'_{X_k} = \frac{1}{2} [Y(+1) - Y(-1)] = \frac{1}{2} [(b_0 + b_k(+1)) - (b_0 + b_k(-1))] = \frac{1}{2} 2b_k = b_k \quad (14)$$

Para un caso general, en el que la variable tome un valor dentro de los límites considerados,

$$E'_{X_k} = b_k X_k \quad (15)$$

**A partir de esta ecuación, la obtención del coeficiente de sensibilidad permitirá, además, evaluar el efecto producido por la variación del factor dentro del intervalo considerado, y no sólo la diferencia de la respuesta entre los valores nominal y extremo del efecto, por lo que el estudio de robustez aportará mayor información sobre el método.**

La significación de los efectos calculados puede realizarse de dos maneras:

- a) *Mediante análisis gráfico.*

La robustez del método puede evaluarse de forma aproximada, estudiando las superficies de respuesta lineales, al tener en cuenta que las ecuaciones (14) y (15) establecen la equivalencia entre el efecto,  $E'_{X_k}$  y el coeficiente de regresión (pendiente)  $b_k$ , para dicho factor. De esta forma, **geométricamente, se puede considerar la robustez como una medida de la horizontalidad de la respuesta en el intervalo de valores experimentalmente controlado para cada variable estudiada.**

A modo de ejemplo, en la Figura I.8.A se representa la superficie de respuesta obtenida en la optimización de la respuesta  $Y$  para dos variables  $X_1$  y  $X_2$  a través de un diseño (óptimo  $O$ ) y en la Figura I.8.B la superficie de respuesta correspondiente al estudio de robustez. Relacionando ambas figuras se puede ver que en el diseño de optimización el óptimo para la variable  $X_1$  está situado en un máximo muy acusado, mientras que para  $X_2$  se encuentra sobre una meseta.

Al realizar el estudio de robustez se observa como  $Y$  varía sustancialmente al provocar pequeñas variaciones de  $X_1$ , mostrando un alto valor de su coeficiente de regresión, mientras que para la variable  $X_2$ ,  $Y$  no está afectada por pequeñas variaciones de la variable (coeficiente de regresión próximo a cero).

Por tanto, la respuesta  $Y$  no será robusta para la variable  $X_1$  pero sí lo será para  $X_2$ .

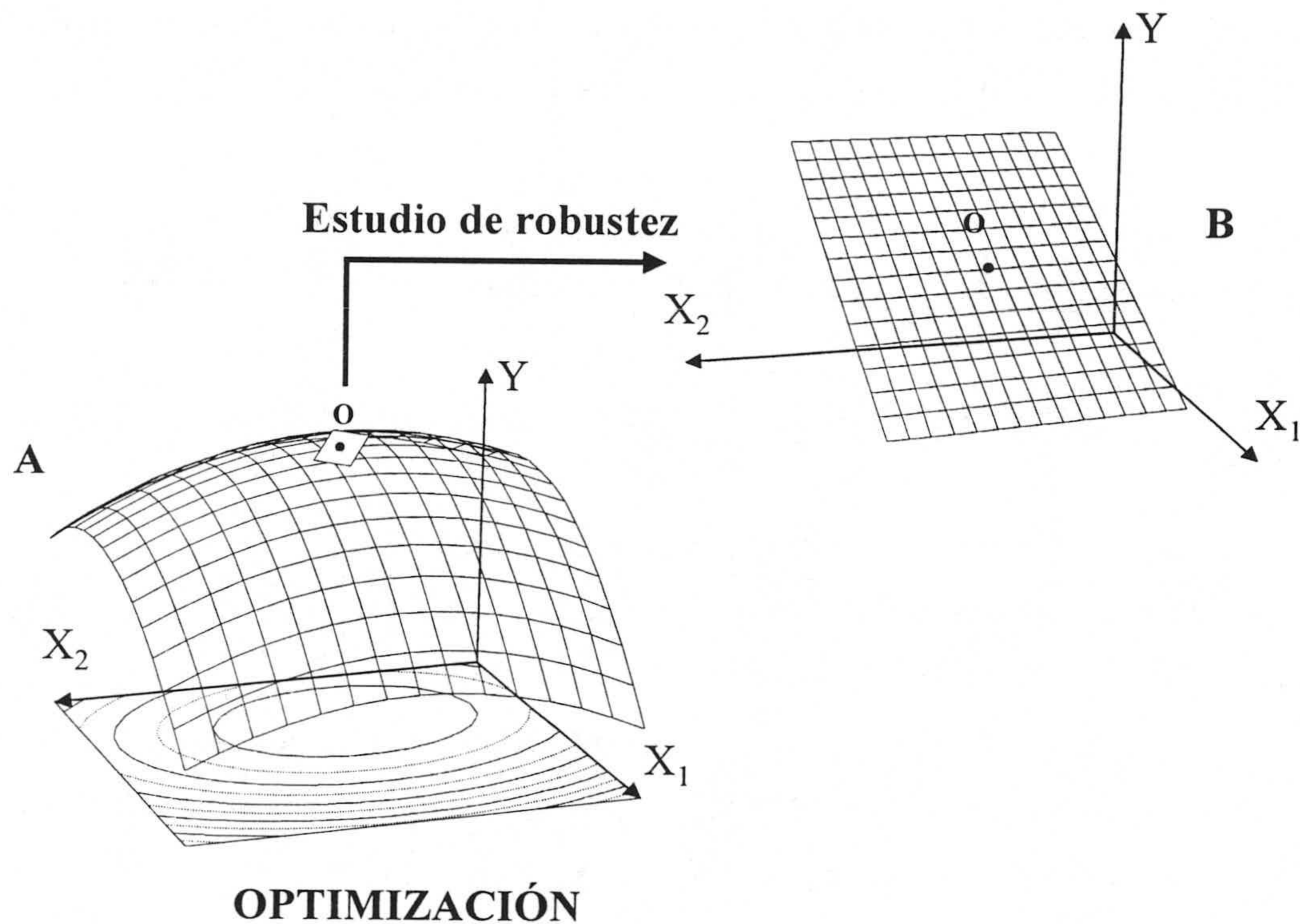


Figura I.8. Interpretación geométrica del estudio de robustez y su relación con la superficie de respuesta lineal para las variables  $X_1$  y  $X_2$

*Si el valor óptimo seleccionado está situado en una meseta, el valor de los coeficientes estará próximo a cero, por lo que el método será robusto. Sin embargo, si el óptimo se encuentra en un máximo muy acusado, los coeficientes tendrán un valor muy alto, y por lo tanto, el método no será robusto.*

b) *Mediante análisis estadístico.*

Un efecto es estadísticamente significativo cuando la variación en la respuesta obtenida, como consecuencia de la modificación introducida, es mayor que la variación debida a la propia dispersión de los resultados experimentales.

La significación de los efectos se puede determinar realizando un test de la t de Student [45,47], donde la hipótesis nula es  $|E'_{Xk}| = 0$ , calculándose el estadístico

$$t_{crit} = \frac{|E'_{Xk}|}{SE} \quad (16)$$

donde:

$|E'_{Xk}|$ : Valor absoluto del efecto.

SE: Desviación estándar asociada al efecto.

Este estadístico calculado se compara con el valor crítico de la t de Student de dos colas,  $t_{crit}(\alpha, v)$ , para un nivel de significación  $\alpha = 0.05$  y  $v$  grados de libertad, que dependen de la forma de calcular SE, la cual puede hacerse:

(i) A partir de la *desviación estándar de los residuales*, obtenida considerando todos los datos del diseño; si se utiliza esta opción, SE es una sobreestimación del error experimental, al estar incluido en ese cálculo, no sólo el posible error experimental, sino las variaciones

producidas por los propios efectos [48].

(ii) A partir de la *desviación estándar predicha* por los datos de un calibrado [44,45].

(iii) Utilizando el algoritmo de Dong [49], para la distribución de los efectos.

(iv) Empleando variables fantasma [48,50].

(v) A partir de réplicas en cualquier punto del diseño experimental, incluido el valor nominal [49].

Cuando se obtiene SE a partir de valores replicados del valor nominal o de cualquier punto ensayado, se suele subestimar el error experimental, ya que puede considerarse como una medida de la variabilidad en condiciones de repetibilidad, lo que origina un valor pequeño de SE. Sin embargo, la modificación de parámetros realizada en el estudio de robustez implica la cuantificación de los efectos en condiciones de reproducibilidad. Vander Heyden y col. [51] señalan que las mejores opciones para estimar SE, son el empleo de variables fantasma, o la realización de réplicas del valor nominal o de cualquier punto del diseño experimental, siempre que éstos estén distribuidos de forma aleatoria durante la ejecución del mismo.

Cuando se realizan réplicas aleatorias del valor nominal y/o réplicas de cualquier punto del diseño, SE se calcula mediante la ecuación

$$SE = \sqrt{\frac{s^2}{N}} \quad (17)$$

donde N es el número de experimentos definidos en el diseño, sin contar las réplicas, y  $s^2$  representa la varianza obtenida, calculada a partir de

$$s^2 = \frac{\sum_i \sum_{j=1}^{r_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2}{\sum_i (r_i - 1)} \quad (18)$$

donde:

$Y_{ij}$ : Cada una de las réplicas en el punto  $i$  del diseño.

$\bar{Y}_i$  : Valor medio de las réplicas.

$r_i$ : Número de réplicas para cada punto del diseño replicado.

Si sólo se realizan réplicas del valor nominal, la ecuación (18) se reduce a

$$s^2 = \frac{\sum (Y_{0j} - \bar{Y}_0)^2}{r_0 - 1} \quad (19)$$

donde:

$Y_{0j}$ : Valor de la respuesta obtenida al valor nominal.

$\bar{Y}_0$  : Valor medio de las réplicas.

$r_0$ : Número de réplicas realizadas en el valor nominal.

siendo en este caso el número de grados de libertad  $r_0 - 1$ .

En definitiva, el test se basa en realizar la siguiente comparación:

$$\begin{aligned} |E'_{Xk}| \leq E'_{crit} = t_{crit} \cdot SE &\Rightarrow \text{Efecto no significativo} \\ |E'_{Xk}| > E'_{crit} = t_{crit} \cdot SE &\Rightarrow \text{Efecto significativo} \end{aligned}$$

Por otro lado, tanto los efectos calculados como los críticos se pueden normalizar de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\%E'_{Xk} = 100 \frac{E'_{Xk}}{\bar{Y}_0} \quad (20)$$

$$\%E'_{crit} = 100 \frac{E'_{crit}}{\bar{Y}_0} \quad (21)$$

donde  $\bar{Y}_0$  es el valor medio de la variable respuesta en condiciones nominales. Estos efectos normalizados permiten comparar la influencia de los factores para distintas variables respuesta, independientemente de la interpretación estadística, especialmente cuando difieren en varios órdenes de magnitud.

#### **I.1.1.2.a. Procedimiento para el estudio de robustez**

Para el estudio de robustez de un método cromatográfico se propone el procedimiento general mostrado en la Figura I.9, y comentado a continuación.

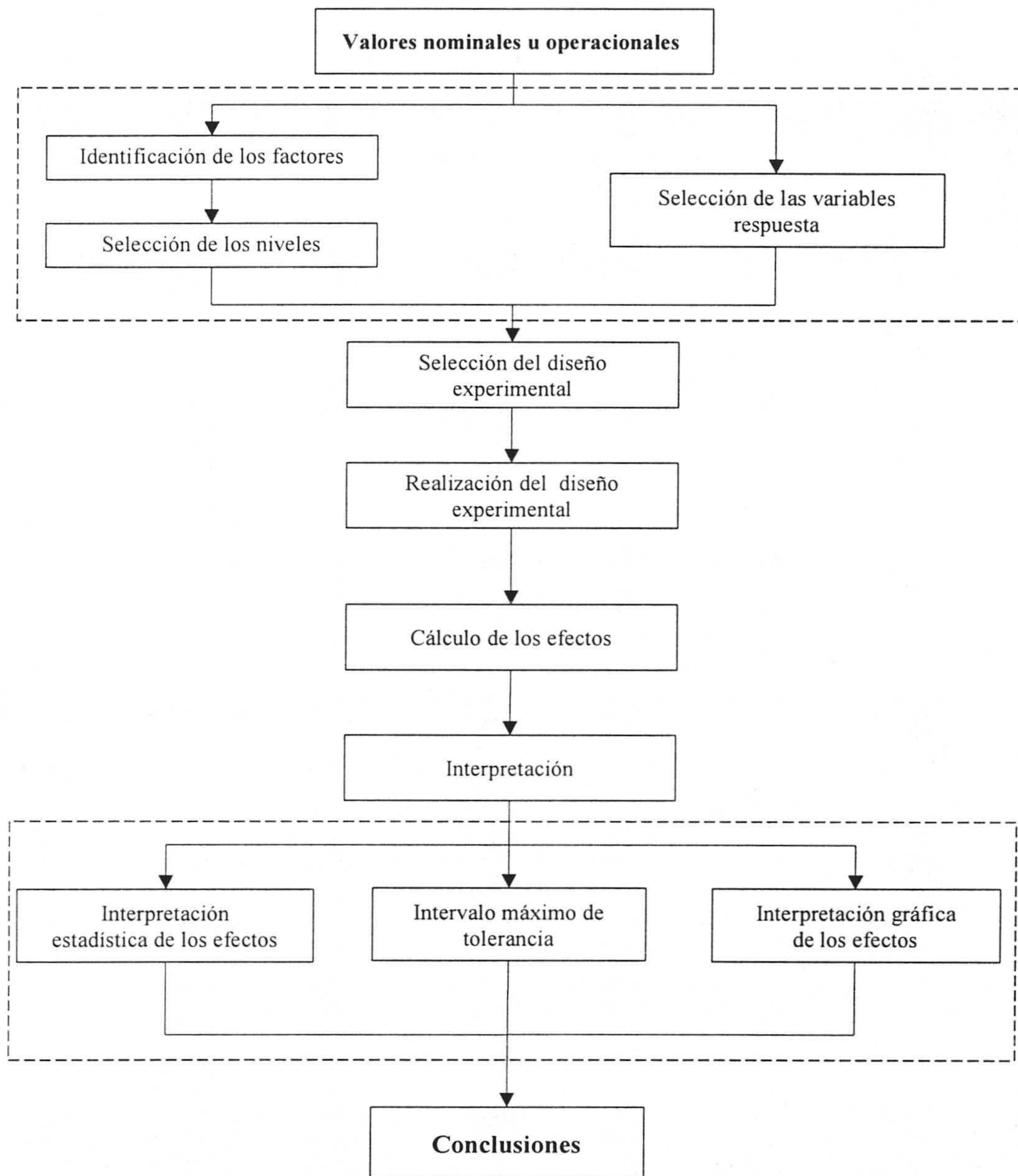


Figura I.9. Diagrama de flujo para la realización de un estudio de robustez



### Identificación de los factores y selección de sus niveles

El primer paso es la selección de las variables experimentales incluidas en dicho estudio, las cuales pueden estar relacionadas con las etapas de preparación de la muestra, separación, detección, etc. En concreto, para métodos cromatográficos con detección espectrofotométrica, se han descrito más de 50 factores [52], entre los que destacan, el pH de las disoluciones que componen la fase móvil, la longitud de onda de detección o la temperatura de la columna.

La elección final entre los posibles factores potenciales la hará el químico analítico en función del conocimiento del método, adquirido durante la etapa de optimización del mismo, o a partir de las variables implicadas en el procedimiento propuesto.

El número de factores seleccionados suele ser limitado por razones prácticas y en general, cuando es mayor de ocho, se reúnen en grupos, en función de que afecten a la etapa de separación, derivatización o detección [47].

Los niveles de los factores seleccionados se definen de forma simétrica alrededor del valor operacional (nominal) descrito en el procedimiento de trabajo, aunque a veces, se suelen examinar intervalos asimétricos [53], debido básicamente a limitaciones instrumentales. El número de niveles utilizados para cada factor suele ser de tres (inferior, superior y nominal), y lo más habitual es utilizar los niveles extremos, realizando tres ó más réplicas en el valor nominal.

Puesto que este estudio va dirigido a controlar las influencias de pequeñas variaciones en los factores, los valores de los niveles seleccionados estarán relacionados con los cambios que se puedan atribuir a un error del operador o del instrumento cuando se aplica el procedimiento operatorio.

### Selección de las variables respuesta

Con objeto de obtener la mayor información sobre la robustez del método analítico, es aconsejable seleccionar como variable respuesta cualquier parámetro de utilidad para el analista [42,43,47].

En los métodos cromatográficos, puede ser de tipo cuantitativo, como la altura o área de pico, o puede estar relacionada con la “calidad” de la separación, como la resolución, tiempo de retención o factor de separación.

### Selección del diseño experimental

Se suelen emplear diseños saturados a dos niveles como los diseños factoriales fraccionados a dos niveles [45] o los diseños Plackett-Burmann [48,51], que se caracterizan porque el número de experimentos, sin contar las réplicas, es igual al número de variables más uno, y porque los efectos no están confundidos entre sí.

Si se estudian un gran número de factores, se agrupan en función de la etapa del método analítico sobre la que pueden tener influencia o bien, se utilizan los diseños supersaturados [54], en los que el número de factores estudiados es mayor que el número de experimentos. Estos diseños no permiten estudiar los efectos de los factores individualmente, sino que como medida de la robustez, se compara la varianza obtenida en el diseño con la varianza obtenida en las condiciones nominales.

### Realización del diseño experimental

En todos los casos, los experimentos implicados en el diseño deben llevarse a cabo en un orden aleatorio, especialmente si se utilizan réplicas del valor nominal, con objeto de minimizar factores no controlados. A veces, si se obtiene una deriva de la señal medida, es necesario corregir los valores de las respuestas obtenidas, para obtener una estimación real

de los efectos [55].

### Cálculo de los efectos

Se calculan a partir de la ecuación (13) o si se dispone del programa estadístico adecuado, mediante Regresión Lineal Múltiple.

### Interpretación

Calculados los efectos, es necesario identificar los que son significativos, para lo cual, se recurre a un análisis estadístico y/o a un análisis gráfico. En este último, además de representar las superficies de respuesta lineales, se suele realizar una representación de los efectos en un gráfico de probabilidad normal [47]. De esta forma, si los efectos se sitúan sobre una línea recta no serán significativos, mientras que si se alejan si lo serán.

Por otro lado, y teniendo en cuenta la relación entre efecto y coeficiente de sensibilidad, descrito en la ecuación (15), es posible estimar los intervalos de las variables experimentales en los cuales, los efectos significativos dejan de serlo sobre las distintas variables respuesta. Así, a partir de la ecuación

$$E'_{crit} = b_k \cdot X_{krit} \quad (22)$$

donde  $X_{krit}$  es el valor del factor para el que el efecto deja de ser significativo, se obtiene el intervalo

$$X_{krit} = \pm \frac{E'_{crit}}{b_k} \quad (23)$$

Dado que esta expresión se utiliza en valores codificados, “descodificando”  $X_{krit}$ , se puede obtener el intervalo, en valores reales de trabajo, para las distintas variables, lo cual

permite establecer *los intervalos máximos de tolerancia que se pueden introducir en el valor nominal de las variables experimentales, sin que se “resienta” el método analítico.*

Estos intervalos máximos de tolerancia solo se pueden calcular para las variables experimentales continuas.

### Conclusiones

Para finalizar el estudio de robustez, se informa de cuales son las variables experimentales críticas sobre las variables respuesta analizadas y cuales no, así como de la necesidad de reoptimizar el método en función de los resultados obtenidos.

#### **I.1.1.3. Establecimiento de la función de calibración**

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos, por tanto, para obtener la concentración de analito presente en una muestra, es necesario realizar la comparación de la medida física, con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que se llama, proceso de calibración metodológica [56].

El modelo de calibración más utilizado en el campo de la Química Analítica es el **lineal univariante**, basado en un modelo de lineal, que está justificado por dos hechos fundamentales:

- a) La existencia de un soporte teórico en forma de ley, p. ej. ecuación de Lambert-Beer, que pone de manifiesto la relación lineal entre señal instrumental y concentración de analito.
- b) Porque en muchos casos es conveniente acotar el intervalo de concentración en el que se

cumple una relación lineal, ya que la no linealidad (términos de orden superior o igual a dos en el modelo utilizado) introduce “*curvaturas*” que podrían traducirse en:

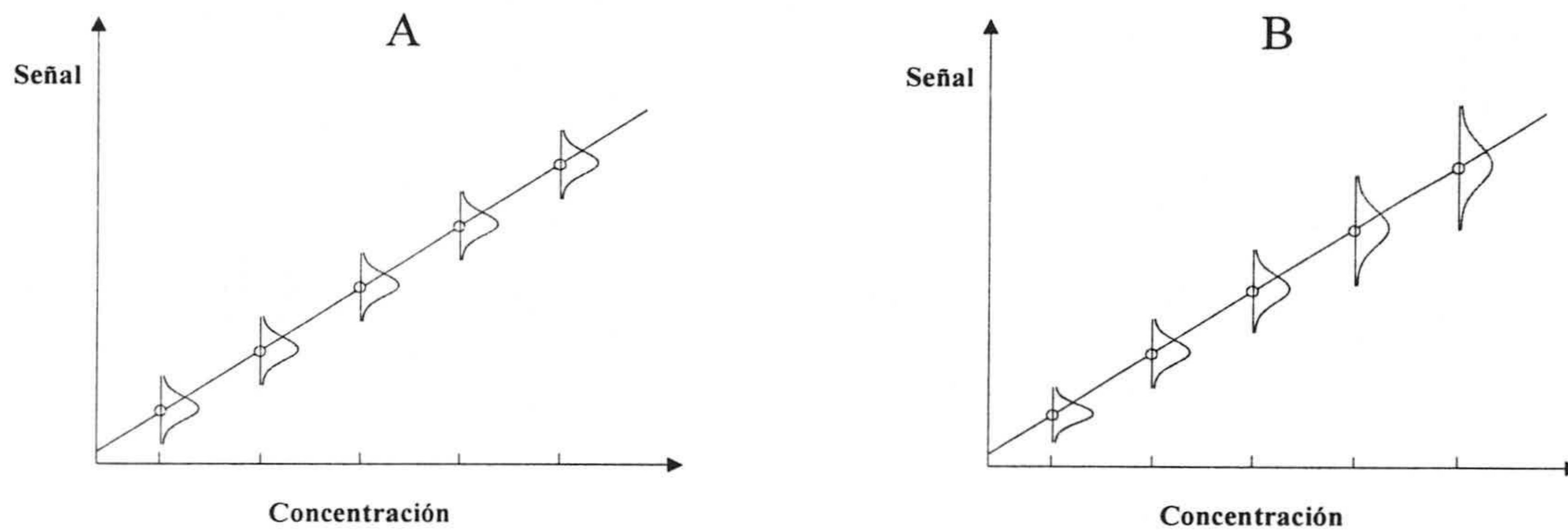
b.1) Pérdida de sensibilidad del análisis, puesto que al disminuir el valor de la pendiente aparece un incremento en la imprecisión asociada a la estimación de la concentración de analito.

b.2) Modificación sustancial de la respuesta del problema al interpolar en la “zona curva”.

De acuerdo con el Comité de Métodos Analíticos de la División Analítica de la Real Sociedad de Química Inglesa [57], para poder entrar en la discusión de la linealidad de una calibración, es importante aclarar que se entiende por **función de calibración lineal**. En una “calibración analítica”, se utiliza un número de materiales (patrones) o “matrices efectivamente idénticas”, en las cuales el analito a determinar se encuentra presente en concentración diferente pero “perfectamente conocida”. Para cada concentración “c”, un instrumento originará una señal instrumental S, la cual está sometida a un error, de manera que al realizar medidas repetidas para una misma concentración, réplicas, las señales instrumentales obtenidas no serán idénticas, pero si variarán de acuerdo con una distribución de frecuencias. De este modo, puede asumirse que la obtención de una medida puntual se corresponde con un valor independiente y aleatorio que pertenece a una población infinita.

Una descripción técnica de la calibración lineal, es aquella en la que se establece una relación funcional de tipo lineal,  $\mu_R = \alpha + \beta c$ , entre las medias de las poblaciones de señales y las concentraciones correspondientes, idea que (de un modo exagerado) quedaría recogida en la Figura I.10. En la situación representada por A, se asume que para cada concentración, la dispersión de las medidas es la misma y que resulta por tanto, independiente de la concentración de analito, pudiendo caracterizarse por una única desviación estándar  $\sigma$ ,

situación que se denomina HOMOCEDASTICIDAD. En el caso B, la desviación estándar de las medidas aumenta con la concentración de analito (caso que resulta ser muy frecuente en el análisis químico). En esta situación, la desviación estándar tiene que ser específica y evaluada para cada valor de concentración, o ser expresada como una función de ésta, originándose lo que se considera situación de HETEROCEDASTICIDAD.



**Figura I.10. Modelo de regresión lineal.** Distribución de las observaciones alrededor de la función de calibración para el cumplimiento de la condición de (A) homocedasticidad; (B) heterocedasticidad.

En la práctica, la respuesta de la media de la población se desconoce y el analista tiene que trabajar con estimaciones de un pequeño número de medidas individuales realizadas para cada concentración. Así, si hay  $n$  patrones y  $p$  medidas realizadas sobre cada uno de ellos, se obtiene un conjunto de resultados que quedarían expresados por:

$$\begin{array}{l}
 c_1 \longrightarrow S_{11} \dots S_{1j} \dots S_{1p} \\
 \dots \dots \dots \\
 \dots \dots \dots \\
 c_n \longrightarrow S_{n1} \dots S_{nj} \dots S_{np}
 \end{array}$$

La calibración lineal se estima por regresión lineal de mínimos cuadrados de este conjunto de datos. Como las medidas de la respuesta instrumental son variables aleatorias, la función estimada,  $S = a + bc$  difiere de la función verdadera. Los valores de  $a$  y  $b$  se obtienen:

a) Para el caso de que se cumpla la situación de homocedasticidad, minimizando la ecuación

$$\sum_{ij} (S_{ij} - \hat{S}_i)^2 \quad (24)$$

donde  $\hat{S}_i = a + bc_i$ .

b) En el caso de que se de la condición de heterocedasticidad, se estiman mejor los parámetros si se realiza un “regresión ponderada”, la cual se basa en minimizar la expresión dada por

$$\sum_{ij} w_i (S_{ij} - \hat{S}_i)^2 \quad (25)$$

donde, como se puede observar, “la ponderación” se introduce con el término  $w_i$ , denominado por ello “factor de ponderación”, que representa la inversa de la varianza ( $s_i^2$ ) de las respuestas, para la concentración  $c_i$ .

En ambos casos, los valores  $s_{ij}$  recogidos en la siguiente ecuación, se denominan “residuales” y representan las distancias verticales entre los puntos experimentales y la línea o recta ajustada,

$$s_{ij} = (S_{ij} - \hat{S}_i) \quad (26)$$

El siguiente paso consiste en la comprobación experimental de que este modelo matemático constituye una simplificación correcta de la serie de puntos experimentales que se poseen [58]. En definitiva, comprobar que el modelo es válido en su establecimiento y para predecir valores de concentración desconocidos.

Por tanto, esto implicaría la evaluación de apartados como:

- 1) *Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.*
- 2) *Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales.*

- 1) *Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.*

Para poder utilizar la regresión lineal univariante por mínimos cuadrados, se requiere la comprobación preliminar de las hipótesis que afectan a las variables. Con este fin se pueden seguir dos procedimientos generales:

- a) El análisis de representaciones gráficas de los residuales [58] frente a valores experimentales de señal o concentración, o bien
- b) la aplicación de test de hipótesis [8,59].

Como procedimiento general se lleva a cabo primero un análisis visual de las gráficas de los residuales y en caso de indicios de incumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas, se recurre a la evaluación de las mismas mediante test de hipótesis.

Las hipótesis matemáticas que se deben cumplir son:

- *Aleatoriedad.* Se controla observando los residuales frente a los valores de concentración. Se asume esta propiedad si el 50 % de los mismos son positivos y el 50 % restante, negativos.
- *Normalidad.* La normalidad de los datos, se suele asumir, siempre y cuando no estén afectados por valores anómalos [8]. Para ello, primero se detectan los posibles



valores anómalos, procediendo al análisis gráfico de los residuales mediante la representación gráfica de éstos frente a los valores experimentales de la concentración. Si en dicha representación se observa algún valor anómalo, se hace un tratamiento estadístico para eliminarlo. En esta memoria, se ha utilizado el procedimiento empleado por el programa Statgraphics [60], basado en la desviación relativa de cada residual respecto al modelo propuesto, usando todos los puntos excepto el supuesto residual. Para ello, se observa el residual de mayor valor y se calcula su valor de nivelación o “leverage” mediante la ecuación:

$$l_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2} \quad (27)$$

donde:

$x_i$ : Valor de concentración o cantidad de analito para el que se calcula el valor de leverage.

$n$ : Número de puntos del calibrado.

$\bar{x}$  : Valor medio de las concentraciones o cantidades usadas en el calibrado.

A continuación, se obtiene la desviación estándar de regresión eliminando el posible valor anómalo y se calcula de nuevo el valor del residual “tipificado” (studentized)

$$z_i = \frac{e_i}{s_{RC} \sqrt{1 - l_i}} \quad (28)$$

siendo:

$e_i$ : Valor del residual original.

$s_{RC}$ : Desviación estándar de la regresión sin el posible valor anómalo.

$l_i$ : Valor del leverage.

De esta forma,  $z_i$  mide, cómo de alejado está dicho posible valor anómalo de la línea recta obtenida al no tener en cuenta dicho punto. En general, se suele considerar valor anómalo (outlier), aquel punto que presente un valor absoluto de  $z$  superior a 3.

Una vez comprobada la existencia de valores anómalos éstos deben ser eliminados, controlando el número total de los mismos [61], ya que un número elevado, indica que en el establecimiento de la función de calibración se están produciendo errores de magnitud considerable, por lo que se debería plantear la posibilidad de volver hacia atrás en el proceso de validación, llevando a cabo una reoptimización del método si fuera necesario.

Cuando el modelo de regresión lineal se establece como relación entre señales relativas y concentración (método de calibrado con patrón interno, muy usado en cromatografía), la normalidad se evalúa mediante el test de Kolmogorov-Smirnov [62], ya que un cociente de señales no tiene por qué ajustarse a una distribución normal. El test se basa en comparar la curva de frecuencias acumuladas de los datos que se desean contrastar con la curva de frecuencias acumuladas de la distribución propuesta como hipótesis. Para ello se transforman los datos originales en la variable normal estándar  $z$ :

$$z = \frac{S_i - \bar{S}}{s} \quad (29)$$

donde:

$S_i$ : Cada uno de los valores de las señales obtenidas.

$\bar{S}$ : Media muestral.

$s$ : Desviación estándar obtenida.

A continuación, se construye la gráfica de frecuencias experimental acumuladas con los valores estandarizados  $z$ , realizándose el test, y comparando el valor tabulado con la máxima diferencia entre los valores de frecuencias experimental y teórico. La hipótesis nula no se rechaza cuando el valor calculado (máxima diferencia) es inferior al tabulado para un nivel de significación fijado, generalmente 0.05, y  $n$  (datos experimentales) como los grados de libertad.

- *Homogeneidad de varianzas.* Para su evaluación estadística, se pueden aplicar algunos test descritos en bibliografía [8,61], entre los que destaca por su simplicidad el que compara las varianzas de las respuestas obtenidas para las concentraciones ensayadas, mediante el test correspondiente de comparación de varianzas. Para ello se seleccionan dos niveles de concentración, el superior y el primer inferior distinto de cero.

En esta memoria se empleó el test de Cochran, que se basa en calcular las varianzas  $s_i^2$  de cada conjunto de valores de la señal obtenida para el mismo valor de concentración, obteniendo el estadístico:

$$G_{calc} = \frac{s_{i,max}^2}{\sum_{i=1}^k s_i^2} \quad (30)$$

comparandolo con el correspondiente valor tabulado, para un nivel de significación  $\alpha$ , generalmente del 5 %, y para  $n$  réplicas realizadas para cada concentración, siendo  $k$  el número de varianzas.

Si se comprueba la existencia de heterocedasticidad (no hay homogeneidad de varianzas), la calibración deberá hacerse mediante una regresión lineal ponderada.

2) *Comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales.*

Para comprobar la tendencia lineal de los datos, se ha optado por la evaluación del fallo de ajuste del modelo, ya que la significación del coeficiente de correlación,  $r$ , como parámetro estimador de la linealidad, puede considerarse muy reducida [63].

Este test de fallo de ajuste se realiza sobre una serie de  $n_i$  réplicas para cada valor de  $c_i$ , comparando el valor del estadístico  $F$ , calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste y al error puro con los valores tabulados, para un determinado nivel de significación  $\alpha$ , con  $k-2$  y  $n-k$  grados de libertad, donde  $k$  representa el número de patrones de calibración diferentes, y  $n$  el número total de observaciones.

$$F_{cal} = \frac{MS_{FA}}{MS_{EP}} \quad (31)$$

La varianza asociada con el grado de acoplamiento,  $MS_{FA}$ , viene dada por,

$$MS_{FA} = \frac{\sum n_i (\bar{S}_i - \hat{S}_i)^2}{k - 2} \quad (31)$$

donde:

$\bar{S}_i$ : Valor medio de las  $n_i$  repeticiones  $S_{ij}$  para  $c_i$ .

$\hat{S}_i$ : Valor medio de  $S$  estimado por el modelo lineal para un cierto  $c_i$ .

La varianza asociada al “error puro”,  $MS_{EP}$ , viene dada por:

$$MS_{EP} = \frac{\sum \sum (S_{ij} - \bar{S}_i)^2}{n - k} \quad (32)$$

Así, si el estadístico calculado  $F$ , es inferior al tabulado, se asumirá que los datos se ajustan al modelo lineal, aceptando finalmente el modelo de regresión.

#### **I.1.1.4. Selección de la señal instrumental para el análisis cuantitativo**

Cualquier determinación analítica, y por tanto, aquella que se basa en una separación cromatográfica, debe poseer las características de veracidad y precisión adecuadas, por lo que se debe evaluar la mejor respuesta que se relaciona con la concentración y que será usada para las determinaciones cuantitativas.

En cromatografía, la medida de la señal analítica puede hacerse en alturas o áreas de pico. Generalmente, el área de pico es el parámetro que se relaciona correctamente con la concentración, pero existen ciertas situaciones que hacen que la altura de pico sea un mejor estimador de la misma. Por tanto, la selección entre altura y área de pico no es fácil de hacer categóricamente ya que existen diversos factores que afectan a la veracidad y precisión de las medidas de áreas y alturas. Se puede decir que, la elección de un parámetro u otro dependerá de la calidad de la separación cromatográfica, pudiendo establecerse que para buenas separaciones, cromatogramas con buena resolución entre los picos, es recomendable utilizar el área de pico, mientras que la altura de pico es mejor cuando las separaciones son pobres.

Hay que resaltar otro hecho que vuelve a cuestionar esta elección, y radica en la utilización de sistemas cromatográficos modernos e integrados en los que al permitir controlar de modo preciso el flujo de la fase móvil, a la vez que el manejo informatizado de los datos mediante el uso de un ordenador, presentan generalmente mayor veracidad en la medida de alturas. De hecho, si el flujo de fase móvil no es constante, los detectores dependientes de la concentración podrían introducir un gran error en la medida del área.

Por tanto, se puede decir que en general, si se producen cambios en condiciones

cromatográficas, como en la temperatura o en la forma de introducir la muestra, que puedan afectar a la anchura o a la altura, pero no al área, es recomendable realizar la medida en áreas, aunque *a la hora de optimizar formalmente una cuantificación, debe llevarse a cabo un estudio sobre cual de las dos es la respuesta más adecuada.*

Teniendo en cuenta que en cromatografía se suele producir una fluctuación de la señal, es habitual recurrir a un tipo particular de calibrado, conocido como calibración con patrón interno [64], donde se relaciona el cociente entre la altura (área) de pico del analito y la altura (área) de pico del patrón interno, con la concentración.

Para que una sustancia pueda ser utilizada como patrón interno debe reunir las siguientes características:

- Propiedades físicas y químicas similares a las del analito.
- No debe ser un componente o constituyente normal de la muestra.
- En general, el analito y patrón interno deben eluir juntos y bien resueltos.

Cuando se emplea el patrón interno para resolver problemas de inestabilidad del sistema de detección o de irreproducibilidad en el sistema de inyección, éste debería de incorporarse a la muestra justo antes de la inyección, con objeto de reducir la variabilidad de la señal [62].

A veces, la utilización del patrón interno, no supone una mejoría en la determinación del analito [65,66], por lo que no siempre es necesario, debiéndose comprobar su utilidad, antes de decidir sobre su uso o no.

Por tanto, a la hora de optimizar formalmente una cuantificación, debe realizarse un estudio adecuado tanto de las dos formas de calibración más conocidas (patrón externo o interno), así como de la respuesta más adecuada, para relacionarla con la concentración o

cantidad de analito. Bagur y col. [67] indican que la elección se debe basar en los datos recogidos de la calibración utilizando las distintas respuestas. Para ello, y verificados previamente los modelos lineales, se selecciona la señal y el método de calibración para el que los puntos están menos dispersos alrededor de la línea obtenida por el modelo de mínimos cuadrados, es decir, se elige aquél en el que los puntos experimentales se ajusten mejor al modelo lineal propuesto.

Aunque el término linealidad está generalmente aceptado, no está muy claro. Así, la Conferencia Internacional de Armonización, la define como la habilidad (dentro de un rango de concentración) de obtener un resultado directamente proporcional a la concentración (cantidad) de analito en la muestra [8].

Par realizar la elección mediante un criterio objetivo, Bagur y col. utilizan la linealidad “on-line”, utilizada en algunos trabajos como parámetro de calidad [68]. Dicho término nos indica el mayor o menor ajuste de los datos experimentales al modelo lineal propuesto y su valor viene dado por la ecuación

$$\text{Lin (\%)} = 100 \cdot (1 - \text{DER}(b)) \quad (34)$$

donde DER(b) representa la desviación estándar relativa de la pendiente expresada en tanto por uno.

Cuanto más próximo esté el valor calculado al valor máximo de linealidad (100%), mayor será el ajuste de los datos experimentales al modelo lineal propuesto.

#### **I.1.1.5. Establecimiento de los parámetros de calidad del método analítico**

Establecida la función de calibración, es posible obtener algunos de los parámetros de calidad a partir de la misma [69].

- *Rango dinámico lineal*

Asumidas la veracidad y precisión, el rango dinámico lineal se define como el intervalo de concentración para el que la pendiente de calibrado se mantiene constante [70,71].

- *Límite de detección y cuantificación*

El límite de detección de un método analítico,  $L_D$ , se puede definir, como la menor concentración o cantidad de compuesto que puede ser detectada con un nivel de confianza determinado, mientras que el límite de cuantificación,  $L_Q$ , es la menor concentración o cantidad de analito que puede ser cuantitativamente determinada con un nivel aceptable de precisión.

Estas definiciones, propuestas por la IUPAC [72,73], y el cálculo de dichos parámetros, se basan en la teoría estadística de los tests de hipótesis. Así,  $L_D$  depende de la señal del blanco,  $\mu_{bl}$ , de la dispersión de la respuesta al nivel del blanco,  $\sigma_{bl}$ , y de las probabilidades que el analista esté dispuesto a asumir al cometer dos tipos de errores, *detectar el analito cuando está ausente* (error  $\alpha$  o de tipo I) o *no detectar el analito cuando sí está presente en la muestra* (error  $\beta$  o de tipo II). Si las medidas se ajustan a una distribución normal, tal que  $\sigma$  para  $L_D$  es igual a  $\sigma_{bl}$ , y considerando  $\alpha = \beta = 0.05$ , los valores de  $L_D$  y  $L_Q$  vienen dados por:

$$L_D = 3.29 (\sigma_{bl}/b) \quad (35)$$

$$L_Q = k_Q (\sigma_{bl}/b) \quad (36)$$

donde la IUPAC [72] propone un valor para  $k_Q$  de 10.



Cuando  $L_D$  se calcula a partir de una estimación de  $\sigma_{bl}$ , es decir,  $s_{bl}$ , en la ecuación (35) el valor de 3.29 debe sustituirse por un nuevo estadístico tabulado  $\Delta$ , que corresponde a una distribución no central de t. Su valor viene establecido para valores de  $\alpha$  y  $\beta$  seleccionados por el analista ( $\alpha = \beta = 0.05$ ), y  $v$  grados de libertad, los cuales dependen de la forma de calcular  $s_{bl}$ .

De esta forma, la ecuación (35) quedaría:

$$L_D = \Delta (s_{bl}/ b) \quad (37)$$

Generalmente, en cromatografía, no se suelen medir los blancos, por lo que para estimar  $\sigma_{bl}$  se pueden seguir dos recomendaciones [74]:

-Utilizar la relación señal-ruido.

-Utilizar los datos de la regresión, obteniendo el valor de  $L_D$  a partir de la expresión propuesta por Clayton y col. [75]:

$$L_D = \Delta \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{c}^2}{\sum(c_i - \bar{c})^2} \frac{s_{RC}}{b}} \quad (38)$$

donde:

$\Delta$ : Estadístico correspondiente a una distribución no central de t, dependiente de las probabilidades de falso positivo y de falso negativo.

$m$ : Número de réplicas medidas sobre cada patrón de concentración.

$n$ : Número total de parejas de valores utilizados para calcular la ecuación de la recta de regresión.

$\bar{c}$  : Media aritmética de todos los valores de concentración utilizados.

$c_i$ : Cada uno de los valores de concentración utilizados en el análisis.

$s_{RC}$ : Desviación estándar de regresión.

$b$ : Pendiente de la recta de calibrado.

---

Con esta posibilidad, utilizada en esta memoria, el procedimiento de cálculo de límite de detección y cuantificación consta de dos etapas [76]:

- 1.- Determinación de la relación lineal entre concentración y señal, garantizándose cuidadosamente el cumplimiento del modelo de mínimos cuadrados.
- 2.- Establecimiento del límite de detección como un test de hipótesis en relación a la presencia de analito en la muestra problema.

De acuerdo con lo comentado, el **límite de detección** (y por extensión el de cuantificación) *dependerá de las probabilidades de falso positivo y negativo, del diseño experimental del calibrado, de la sensibilidad que éste presente, y de la calidad de la regresión.*

- *Sensibilidad y resolución analítica.*

La sensibilidad de un método analítico se puede definir como la derivada de la respuesta respecto de la concentración [71], y se acepta como valor de la misma el de la pendiente de la función de calibrado, dependiendo ésta de las condiciones instrumentales utilizadas.

Además, se puede considerar la sensibilidad analítica [77], que es inversamente proporcional a la capacidad de discernir pequeñas diferencias de concentraciones, calculándose como el cociente entre la pendiente de la función de calibración ( $b$ ) y la desviación estándar de las medidas de la señal analítica para una concentración dada ( $s_R$ ). Expresada así, el valor de dicha sensibilidad se establece para una concentración de analito, lo cual no sería adecuado si lo que se pretende es caracterizar a un método analítico.

Cuadros y col. [69] proponen el cálculo de esta sensibilidad analítica a partir del análisis de regresión, dividiendo la desviación estándar de regresión ( $s_{RC}$ ) por la pendiente (b). Así definida, se refiere a la capacidad de discriminación, indicando la mínima variación en la concentración que un método analítico es capaz de discernir. Sin embargo, y puesto que la IUPAC, recomienda hablar solo de sensibilidad para referirse a la pendiente de calibrado, este término de sensibilidad analítica ha sido redefinida como resolución analítica [4] o desviación estándar del método [78]

- *Selectividad*

Se define como la capacidad de un método analítico de determinar una serie de analitos en una mezcla sin que los otros componentes de la misma interfieran [79].

Hoy en día, los métodos cromatográficos ofrecen una elevada selectividad [80], minimizando la influencia de la matriz, dependiendo el grado de selectividad del tipo de interacción del analito con la fase estacionaria y de las propiedades de la fase móvil. Además, esta selectividad puede incrementarse mediante el adecuado tratamiento de la muestra o de una posible reacción de derivatización.

- *Precisión*

Al efectuar determinaciones repetidas sobre un mismo material, los resultados obtenidos se distribuyen alrededor de un valor medio, de manera que la dispersión de los mismos da una idea de la precisión, que es uno de los criterios más utilizados para medir la calidad de un método analítico. La precisión se define como *el grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitiva o independientemente el mismo método analítico a alícuotas de la misma muestra* [81].

Es un término que debe utilizarse con cuidado, ya que su valor depende de la forma de obtener ese grupo de resultados. Si la precisión se estima cuando se aplica el método a

alícuotas de la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operario y con las mismas “herramientas” analíticas en un corto intervalo de tiempo, se habla de *repetibilidad*, mientras que si se estima cuando se aplica el método a alícuotas de la misma muestra pero con distintos operadores, diferente equipamiento y laboratorios, y distintos días, se habla de *reproducibilidad*. Sin embargo, esto no es siempre posible, por lo que se introduce el término de *precisión intermedia*, cuando uno o dos de los factores -operador, equipamiento o tiempo- son los que se cambian [82].

Dentro de la validación característica, se suele evaluar la precisión empleando disoluciones patrón, y estudiando las distintas etapas del método.

Matemáticamente la precisión suele expresarse mediante la desviación estándar relativa expresada en porcentaje,

$$DER(\%) = 100 \frac{s_c}{c} \quad (39)$$

donde  $s_c$  es la desviación estándar para la concentración estudiada y  $s_c$  puede calcularse de dos formas diferentes:

1) A partir de los datos de calibrado [70], mediante la ecuación:

$$s_c = \frac{s_{RC}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{S - \bar{S}}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad (40)$$

donde:

b: Pendiente de la ecuación de regresión.

$s_{RC}$ : Desviación estándar de regresión de la señal R sobre la concentración.

m: Número de réplicas de calibración utilizadas para cada concentración ensayada.

n: Número total de pares de valores utilizados para calcular la ecuación de regresión.

S: Media aritmética de señales obtenidas en los m análisis.

$\bar{S}$ : Media aritmética de las señales obtenidas en el cálculo de la ecuación de regresión.

$c_i$ : Valores de las concentraciones determinadas en el análisis.

$\bar{c}$  : Media aritmética de todos los valores de concentración utilizados en la calibración.

En función de que el calibrado se realice en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad, la precisión habrá sido estimada en unas condiciones u otras.

Aunque este cálculo se puede realizar para las concentraciones utilizadas en la recta de calibrado, el modelo permite representar los datos obtenidos para cada valor de concentración, y por interpolación, estimar la precisión para cualquier valor del intervalo de concentraciones del calibrado, mediante la representación de DER (c) frente a la concentración.

2) Evaluando la precisión para una determinada concentración de analito, de forma que, se aplica el método “n” veces a una disolución patrón y se obtienen “n” disoluciones de medida, cada una de las cuales se inyecta en el cromatógrafo una sola vez, evaluando la variabilidad de la respuesta en “n” aplicaciones del método a una única disolución patrón.

## **I.1.2. VALIDACIÓN APLICADA**

Según Horwitz [83], un método tiene que ser evaluado también en cuanto a su aplicabilidad y practicabilidad. La aplicabilidad se refiere a su validez para ser usado en un amplio rango de muestras y la practicabilidad se refiere al costo, tiempo y habilidad del operador, asumiendo una mayor importancia estas dos características cuando se trata de seleccionar un método entre varios.

Por ello, una vez estimados los parámetros de calidad de un método analítico, el siguiente paso es comprobar que éstos son apropiados para la *aplicación* del método a problemas y por tanto a muestras concretas, determinando la veracidad y precisión de los resultados obtenidos en dichas muestras.

### **I.1.2.1. Evaluación de la veracidad**

Evaluar la veracidad consiste en estimar la concentración de analito en la muestra y compararla con un valor de referencia representativo que se considera como verdadero, mediante la herramienta estadística adecuada. Dado que es imposible conocer el valor verdadero, es necesario disponer de un valor verdadero convencional para usarlo como valor de referencia, utilizando para ello estudios interlaboratorios o intralaboratorios [84]. Dentro de esta segunda posibilidad, es necesario el uso de materiales de referencia, métodos de referencia, o bien la aplicación de diversos procedimientos estadísticos.

La elección de los materiales de referencia o patrones sobre las que se establece la comparación, es la parte más importante dentro de este proceso de evaluación, ya que hay que tener en cuenta, que los materiales de referencia, pueden perder la garantía o la certificación por una mala manipulación o un almacenamiento no adecuado.

En la mayor parte de los casos es necesario someter los patrones al procedimiento analítico completo, es decir, desde la preparación de la muestra hasta la obtención de los resultados, e incluso, en algunos casos es conveniente recurrir a la calibración química por adición de patrón.

Un **Material de Referencia (RM)**, es un material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente homogéneas y establecidas, que permiten su empleo para [85]:

- a) Calibrar un aparato o instrumento.
- b) Evaluar la veracidad de un método analítico.
- c) Asignar valores a un material o sistema.

Desde este punto de vista, Venkatesh y Wayne [86] utilizan la siguiente terminología para identificar las diferentes clases de estos materiales:

- (1) Patrones primarios (PS).
- (2) Materiales de Referencia Primarios (Primary RMs).
- (3) Materiales de Referencia Secundarios (Secondary RMs).
- (4) Materiales de Referencia Terciarios (Tertiary RMs).

(1) y (2) se recogen según la ISO, bajo la denominación global de Materiales de Referencia Certificados (CRMs) y generalmente se producen o fabrican por instituciones de experiencia y prestigio analíticos reconocidos, p. ej. NIST → National Institute of Standard and Technology; BCR → Community Bureau of Reference; LGC → Laboratory of the Government Chemist; LNE → Laboratoire National d'Essais.

-Los “patrones primarios” son sustancias químicas puras que se usan para la calibración de un instrumento.

Los Materiales de Referencia Primarios están constituidos por matrices (naturales o con “sustancias añadidas”) diseñadas básicamente para: evaluar procedimientos analíticos nuevos y para “evaluar el control de calidad en el desarrollo de métodos de validación de los materiales de referencia secundarios”.

(3) Los Materiales de Referencia Secundarios representan un amplio grupo de materiales para el control de calidad analítico. En general son de naturaleza muy variada, y por su coste, son de uso relativamente frecuente, sobre todo para ejercicios interlaboratorio de ámbito regional o para evaluar problemas prácticos.

(4) Los Materiales de Referencia Terciarios representan varios tipos de “artificios caseros” para el control de calidad de matrices seleccionadas para uso interno de un laboratorio por un grupo reducido de investigadores. En algunos casos, se utilizan para suministrar matrices específicas no disponibles a partir de Materiales de Referencias Secundarios.

#### **I.1.2.1.a. Influencia de la matriz en la veracidad de un resultado analítico**

La evaluación de la veracidad se realiza a través del estudio de los errores sistemáticos, puesto que su presencia indicaría una falta de veracidad en los resultados obtenidos.

El error sistemático en el análisis químico de una muestra se puede dividir en dos componentes: a) una componente de error constante que no depende de la concentración de analito en la misma y b) una componente de error proporcional que presenta una dependencia de primer orden con la concentración.

Aunque hay otras fuentes de error sistemático además de los efectos de la matriz,



estos últimos son los que se van a considerar. A este respecto, se puede distinguir:

- a) Efecto matriz de orden cero (constante).
- b) Efecto matriz de primer orden, independiente de la cantidad de analito dentro del rango dinámico lineal.
- c) Efecto matriz de primer orden respecto a la cantidad de analito, independiente de la relación matriz/analito.

En bibliografía hay un acuerdo respecto de que un efecto matriz de orden cero es independiente del tamaño de muestra tomado para el análisis [87]. También hay un acuerdo en que se debe usar un blanco para corregir este efecto, por lo que cuando se analiza una muestra real, es necesario determinar correctamente este blanco. Según Torrades y col. [88], se pueden distinguir cuatro tipos de blanco:

- Blanco del método, o contribución de la instrumentación, reactivos, disolventes, factores personales y en general, cualquier fuente que pueda contribuir a la señal, exceptuando al analito y a la matriz.
- Blanco del placebo, que comprende cualquier contribución de la matriz a la señal, o blanco, que además de considerar al Blanco del método, incluye cualquier contribución debida a la matriz. Este blanco sólo tiene sentido en el análisis de muestras sintéticas puesto que en muestras reales es muy difícil aislar la matriz del analito.
- Blanco del sistema, obtenido a partir de la experiencia de calibrado, y que corresponde con la ordenada en el origen del mismo.
- Blanco Total de Youden, que comprende cualquier contribución de la señal, debida a la matriz, reactivos empleados, analito, etc., entendiéndose como el “verdadero blanco” [88,89], y obteniéndose por extrapolación del calibrado de Youden.

Ferrús y Torrades [89] proponen, con objeto de garantizar la correcta similitud en el comportamiento de patrones y muestras, que es conveniente utilizar la calibración química por adición de patrón, porque además, bajo determinadas circunstancias, puede llegar a eliminar el efecto matriz de primer orden.

En bibliografía, se pueden encontrar dos formas de preparar la adición de patrón:

- 1.- La más común es tomar varios volúmenes iguales de la disolución obtenida después de tratar la muestra y añadirle a todos menos a uno, cantidades perfectamente conocidas del analito.
- 2.- También se puede realizar la adición de patrón justo antes de proceder al tratamiento de la muestra.

Se obtiene así una recta de calibrado representando las señales obtenidas frente a las concentraciones o cantidades adicionadas. Si no existe interferencia, dicha recta y la de un calibrado con patrones deben tener la misma pendiente, en caso contrario, dejan de ser paralelas, cruzándose o no en el intervalo de trabajo.

Hay que tener en cuenta que el método de adición de patrón se basa en dos premisas que no siempre son válidas:

- a) Se supone que en el sistema analítico, el analito patrón adicionado se comporta de la misma forma que el analito presente en la muestra.
- b) Se supone que la relación señal/concentración mantiene la misma función lineal (misma pendiente) fuera del margen de calibrado, pues la concentración se deduce por extrapolación.

Desde un punto de vista práctico, el método de adición de patrón se aplica con cuatro objetivos fundamentales [90]:

- ✓ Identificar y determinar el tipo de interacción matriz-analito presente en la muestra.

- ✓ Determinación de analitos en muestras en las que hay interacciones analito/matriz. En este caso, si se utiliza un calibrado con patrones, no se obtendrían resultados veraces.
- ✓ Detección de analitos que se encuentran en la muestra en un nivel inferior al del límite de cuantificación del método, pero superior a la desviación estándar del método.
- ✓ Comprobación de la veracidad de un resultado analítico cuando no se dispone de un material o método de referencia.

En el caso de que el efecto matriz sea de primer orden respecto a la cantidad de analito, e independiente de la relación matriz/analito, la aplicación del método de adición de patrón, puede que no llegue a ser nunca adecuada por que no se encuentre una situación equivalente a la del caso en el que el efecto matriz de primer orden, sea independiente de la cantidad de analito dentro del rango dinámico lineal, es decir, tal y como indica Tyson [91], porque no se alcance un porcentaje de variación de la pendiente constante, es decir, porque el efecto de la matriz no sea independiente de la relación matriz/analito. De todo esto puede deducirse, que la aplicación del método de adición de patrón depende de un adecuado estudio de la zona de aplicabilidad del mismo, cosa que habrá que tener en cuenta si se evalúa la veracidad a través del mismo.

- Evaluación de la veracidad mediante la “metodología de adición de patrón”.

a) En ausencia de efecto matriz

Cuadros y col. [92] describen un protocolo estadístico para llevar a cabo la validación de un método analítico por aplicación del método de adición de patrón en el que los datos necesarios se obtienen a partir de tres experiencias de calibrado: con patrones (CP), con adición de patrón (AP) y con porciones de muestra o calibrado de Youden (CY), donde

se comparan las pendientes obtenidas en el calibrado con patrones y con adición de patrón.

De acuerdo con lo recogido por Thompson [93] las rectas de dos calibrados pueden presentar cuatro disposiciones distintas:

- ▶ Una superpuesta sobre la otra (Identidad de calibrados).
- ▶ Una desplazada paralelamente respecto a la otra (Existencia de un error sistemático constante o traslacional).
- ▶ Ambas rectas, partiendo del mismo punto, presentan distinta pendiente (Existencia de un error sistemático proporcional o rotacional).
- ▶ Ambas rectas se cortan en un punto distinto del origen (Combinación de ambos tipos de errores).

Aplicando el análisis de regresión lineal, se calcula para cada recta su pendiente, ordenada en el origen y desviación estándar de la regresión. La veracidad del resultado analítico se comprueba mediante la comparación de los contenidos de analito obtenidos a partir de los distintos calibrados, tal como se indica a continuación:

*1) Se calcula la desviación estándar de regresión.*

La aplicación del protocolo empieza con la comprobación inicial de la hipótesis de homogeneidad de varianzas de los calibrados con patrones y de adición de patrón. Para ello se utiliza un análisis de la varianza de una vía en el que el estadístico F de Snedecor calculado se compara con el tabulado para un valor de  $\alpha = 0.05$  y un número de grados de libertad dado por  $n_{CP} - 2$  y  $n_{AP} - 2$ , donde  $n_{CP}$  y  $n_{AP}$  son el número de datos experimentales para el calibrado con patrones y adición de patrón respectivamente. A su vez, se toma como desviación estándar promedio la dada por la ecuación

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_{CP} - 2)s_{CP}^2 + (n_{AP} - 2)s_{AP}^2}{n_{CP} + n_{AP} - 4}} \quad (41)$$

2) Se comparan las pendientes de CP y AP.

Para ensayar la igualdad de pendientes se utiliza un test de la t de Student. El estadístico a utilizar con  $(n_{CP} + n_{AP} - 4)$  grados de libertad, viene dado por la expresión:

$$t(b) = \frac{|b_{CP} - b_{AP}|}{s_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_{CP}^2} + \frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_{AP}^2}}} \quad (42)$$

Se acepta la hipótesis nula (pendientes iguales) para un nivel de significación menor del 1%. En este test, no se utiliza el valor usual del 5% ya que es un test excesivamente "robusto" para el número de grados de libertad utilizados.

3) Se obtiene la pendiente representativa de los calibrados con patrones y por adición de patrón.

La pendiente promedio representativa de dichos calibrados se calcula a partir de la ecuación

$$b_p = \frac{\sum (c_i - \bar{c})_{CP} (S_i - \bar{S})_{CP} + \sum (c_i - \bar{c})_{AP} (S_i - \bar{S})_{AP}}{\sum (c_i - \bar{c})_{CP}^2 + \sum (c_i - \bar{c})_{AP}^2} \quad (43)$$

4) Se calculan las ordenadas en el origen. Estimación del Blanco Total de Youden.

A partir del valor obtenido de la pendiente promedio, se calculan los nuevos valores de ordenada en el origen para las rectas de calibrado con patrones y por adición de patrón, utilizando las ecuaciones

$$a'_{CP} = \bar{S}_{CP} - b_p \bar{c}_{AP} \quad (44)$$

$$a'_{AP} = \bar{S}_{AP} - b_p \bar{c}_{AP} \quad (45)$$

Una diferencia entre los valores de las ordenadas en el origen de las rectas correspondientes a los calibrados con patrones y con porciones de muestra (CY),  $a_{CP}$  y  $a_Y$ , indica la existencia de un componente de error sistemático, que hay que tener en cuenta, debido al efecto matriz de la muestra.

Dado que dichos valores se obtienen a partir de distintas variables independientes, no es posible establecer un test de comparación. Sin embargo, se puede evaluar una diferencia entre ambos, comprobando si el valor de  $a_Y$  queda incluido en el intervalo de confianza del valor de  $a_{CP}$ .

El intervalo de confianza se calcula a partir de la siguiente ecuación, utilizando una  $t$  de Student con  $(n_{CP} - 2)$  grados de libertad, y para  $\alpha = 0.01$ .

$$a_Y \in a'_{CP} \pm t_{\alpha} s_p \quad (46)$$

Si  $a_Y$  no está incluido en el intervalo, se calcula el “verdadero blanco de la muestra” (Blanco Total de Youden) aplicando la ecuación:

$$YB = a_Y - a'_{CP} \quad (47)$$

5) *Se comprueba la veracidad del resultado analítico.*

Se realiza comparando los contenidos de analito en la disolución a medir, obtenidos a partir de los calibrados con patrones y con adición de patrón, de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$\text{CP} \quad c_{x,CP} = \frac{(S_x - a_Y)}{b_p} \quad (48)$$

$$\text{AP} \quad c_{x,AP} = \frac{(a'_{AP} - a_Y)}{b_p} \quad (49)$$

Ambos valores pueden compararse con un test de la t de Student de comparación de dos medias. El estadístico a calcular, con  $(n_{CP} + n_{AP} - 3)$  grados de libertad -se tiene un grado de libertad más por utilizar una pendiente común a ambos calibrados-, viene dado por la expresión

$$t(c) = \frac{|c_{x,CP} - c_{x,AP}|}{\frac{s_p}{b_p} \sqrt{\frac{1}{n_{CP}} + \frac{1}{n_{AP}}}} \quad (50)$$

Sí se acepta la hipótesis nula los resultados no son diferentes y en consecuencia el método es veraz, con un nivel de significación del 5%.

Cuadros y col. señalan que el valor obtenido para este estadístico es aproximado. Sin embargo, constatan que, teniendo en cuenta que dicho valor es siempre mayor que el que se obtendría utilizando la expresión no aproximada [92], si se concluye que el método es veraz, siempre se obtendrá la misma conclusión al utilizar el valor sin aproximar.

b) En presencia de un efecto matriz

Si la aplicación de la metodología de adición de patrón desarrollada en el apartado anterior no origina un error sistemático constante, sino que las rectas de adición de patrón y la de calibrado con patrones se cortan en un punto distinto del origen, existirá una combinación de componentes de error sistemático, traslacional y rotacional.

Cuando este tipo de error está presente, aún es posible usar la metodología de adición de patrón trabajando en la zona de saturación del efecto interactivo matriz/analito, donde los resultados están libres de error sistemático, pues dicho efecto no cambia con la relación matriz/analito [91].

Para evaluar esta zona de saturación es necesario realizar dos adiciones de patrón con diferente cantidad de muestra y establecer si las pendientes observadas para las dos adiciones son iguales o no. Para ello se aplicó el siguiente protocolo, basado en los desarrollados previamente en bibliografía [94,95]:

1) *Se calcula la desviación estándar de regresión.*

La aplicación del protocolo comienza con la comprobación inicial de la condición de homogeneidad de varianzas de las dos adiciones de patrón. Para ello, se utiliza un análisis de la varianza de una vía en el que el estadístico F de Snedecor calculado se compara con el tabulado para un valor de  $\alpha = 0.05$  y un número de grados de libertad dado por  $n_{AP1} - 2$  y  $n_{AP2} - 2$ , donde  $n_{AP1}$  y  $n_{AP2}$  son el número de datos experimentales para las dos adiciones de patrón. Comprobada dicha condición, se obtiene la desviación estándar promedio, a partir de la ecuación:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_{AP1} - 2)s_{AP1}^2 + (n_{AP2} - 2)s_{AP2}^2}{n_{AP1} + n_{AP2} - 4}} \quad (51)$$



2) Se evalúa la igualdad de pendientes, para las adiciones de patrón obtenidas a diferentes niveles.

La evaluación de la igualdad de pendientes debe hacerse aplicando el test de la t de Student descrito anteriormente. En este caso, el estadístico calculado se compara con el tabulado para  $n_{AP1} + n_{AP2} - 4$  grados de libertad, aceptándose la hipótesis nula para un nivel de significación menor del 1%, lo que puede indicar que se ha alcanzado una saturación del efecto interactivo matriz/analito.

3) Se obtiene la pendiente representativa de las dos adiciones de patrón.

Una vez comprobada la igualdad de pendientes, se procede a calcular la pendiente promedio representativa de dichos calibrados de forma similar al apartado anterior.

4) Se calcula el contenido de analito.

El contenido de analito se obtiene de los dos calibrados de adición de patrón, usando las ecuaciones:

$$AP_1 \quad c_{x,AP1} = \frac{(a'_{AP1} - a_Y)}{b_p} \quad (52)$$

$$AP_2 \quad c_{x,AP2} = \frac{(a'_{AP2} - a_Y)}{b_p} \quad (53)$$

donde  $a'_{AP1}$  y  $a'_{AP2}$  son las ordenadas en el origen recalculadas, ecuación (45),  $b_p$  es la pendiente promedio de los dos calibrados con adición de patrón y  $a_Y$  es el blanco de Youden obtenido mediante un calibrado de Youden en el que se incluyen los dos niveles de muestra ensayados.

El contenido de analito para cada nivel de muestra, se relaciona con la concentración final en la muestra original,  $C_{AP1}$  y  $C_{AP2}$ .

5) *Se comprueba la veracidad.*

Para comprobar la veracidad, estas dos cantidades se comparan mediante un test de la t de Student, con  $(n_{AP1} + n_{AP2} - 3)$  grados de libertad de acuerdo con la ecuación simplificada:

$$t(c) = \frac{|c_{AP1} - c_{AP2}|}{\frac{s_p}{b_p} \sqrt{\frac{1}{n_{AP1}} + \frac{1}{n_{AP2}}}} \quad (54)$$

donde  $s_p$  es la desviación estándar promedio de las dos adiciones de patrón:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_{AP1} - 2)s_{AP1}^2 f_1 + (n_{AP2} - 2)s_{AP2}^2 f_2}{n_{AP1} + n_{AP2} - 4}} \quad (55)$$

donde  $f_1$  y  $f_2$  son los números por los que se debe multiplicar  $c_{x,AP1}$  y  $c_{x,AP2}$  para obtener  $C_{AP1}$  y  $C_{AP2}$ .

Se acepta la hipótesis nula (los resultados no son diferentes y en consecuencia el método es veraz) con un nivel de significación del 5%. Esto indicaría que los resultados están libres de error sistemático proporcional y que el contenido se puede estimar a partir de las adiciones de patrón para una porción de muestra comprendida en el intervalo estudiado.

García-Campaña y col. señalan que el valor obtenido para este estadístico, ecuación (54), es aproximado. Sin embargo, constatan que, teniendo en cuenta que dicho valor es

siempre mayor que el que se obtendría utilizando la expresión no aproximada [95] y si se concluye que el método es veraz, siempre se obtendrá la misma conclusión al utilizar el valor sin aproximar.

Estos mismos autores, en su trabajo original [95], proponían un ANCOVA, para comparar de una sola vez las pendientes de CP, AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub>, y detectar de esta forma la existencia de un efecto matriz. Sin embargo, y para reducir el trabajo experimental, en esta Memoria, se empleó un solo calibrado por adición de patrón, y si al aplicar el protocolo a) se detectaba la existencia de efecto matriz, se realizaba una segunda adición de patrón, comparando directamente las pendientes de AP<sub>1</sub> y AP<sub>2</sub>, mediante el protocolo a).

#### **I.1.2.2. Evaluación de la precisión**

Dentro de la validación aplicada, la precisión, estimada en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad, se evalúa sobre la muestra, siendo la forma más habitual de evaluarla mediante la aplicación “n” veces, en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad, del método a la muestra, obteniendo un valor de  $s_c$  a partir de,

$$s_c = \sqrt{\frac{\sum(c_i - \bar{c})^2}{n - 1}} \quad (56)$$

donde:

$c_i$ : Valores de las concentraciones obtenidas.

$\bar{c}$  : Media aritmética de los valores de concentración.

n: Número de medidas realizadas en condiciones de repetibilidad o reproducibilidad.

Con objeto de determinar si la precisión obtenida por el método es aceptable para

la concentración obtenida, se puede comparar el valor calculado con el obtenido teóricamente aplicando la fórmula de Horwitz [83], en condiciones de reproducibilidad:

$$\text{DER (\%)} = 2^{(1-0.5 \log c)} \quad (57)$$

donde  $c$  se expresa en forma potencial. Para condiciones de repetibilidad, el valor de DER (%), suele estar comprendido entre 0.5 y 0.67 veces el calculado mediante la ecuación (57). Así, para una concentración de 1 ppm ( $c = 10^{-6}$ ), los valores de DER esperados serían de 16% en condiciones de reproducibilidad y del 8-11% en condiciones de repetibilidad.

## **I.2. RECONOCIMIENTO DE PAUTAS CON DATOS QUÍMICOS**

La solución a gran cantidad de problemas analíticos que proceden del campo alimentario requiere la utilización de técnicas quimiométricas fiables que permiten obtener no solo información acerca de la composición del alimento, sino establecer índices de calidad del mismo con relación a aspectos como origen, posible adulteración, irregularidades en su elaboración o manipulación, etc...

En una primera aproximación, el análisis de los datos analíticos obtenidos puede realizarse mediante un estudio univariante, donde cada variable o propiedad química se estudia por separado, aplicando el análisis de la varianza [96], llevando a cabo estudios de correlación entre variables [97] o determinando la capacidad discriminante de cada una de ellas [98].

Este análisis univariante de los datos tiene como ventaja la simplicidad de los cálculos a realizar, pero presenta como inconveniente, la pérdida de información que puede originarse al estudiar las variables de una en una.

En contraste, el análisis multivariante permite estudiar y evaluar todas las propiedades químicas, utilizando toda la información obtenida a la vez. En su forma más sencilla, tiene como finalidad la utilización de los datos medidos para buscar la “pauta típica” de cada clase, es decir:

- Verificar asociaciones entre variables.
- Agrupar los objetos en grupos naturales.
- Clasificar los objetos.

En este tipo de estudio es habitual agrupar cada conjunto de datos en forma de matriz, cuyas filas son los objetos (muestras analizadas) y cuyas columnas son las variables o propiedades químicas medidas. Una **clase** o **categoría** es cada grupo de objetos cuyo comportamiento similar se desea modelar mediante los datos experimentales, y se supone que está bien definida, es decir, que un objeto solo se puede asignar a una única categoría, donde éstas son disjuntas.

En ocasiones es normal transformar las variables o los datos antes de proceder al análisis de los mismos. Dependiendo del tipo de datos y de la finalidad del análisis existen transformaciones especialmente adecuadas en cada caso. Entre las de uso general se encuentran, el centrado por columnas, centrado por filas, autoescalado y centrado respecto a la media, aunque no siempre sea necesario hacer dicho tratamiento, sí es conveniente estudiar tal posibilidad.

Posteriormente, el reconocimiento de pautas se puede llevar a cabo mediante dos tipos de métodos:

- Métodos no supervisados.
- Métodos supervisados.

### **I.2.1. MÉTODOS NO SUPERVISADOS**

Se caracterizan por establecer relaciones entre objetos sin tener un conocimiento previo respecto a la pertenencia de los mismos a las distintas categorías. Su finalidad es detectar la presencia de grupos “naturales” de objetos y variables en un determinado problema, y entre otros destacan, el Análisis en Componentes Principales y Análisis de Agrupaciones o Análisis de clusters.

### **I.2.1.1. Análisis en Componentes Principales (ACP)**

Es un método de transformación de las variables originales en unas nuevas no correlacionadas, denominadas componentes principales (CP), donde cada una de ellas es una combinación lineal de las variables originales. Se obtienen un conjunto de ejes ortogonales que representan las direcciones de máxima varianza de los datos, consiguiendo una estructura de los mismos y una reducción de la dimensionalidad.

La idea fundamental es expresar la matriz original  $X_{n \times m}$ , que contiene los  $m$  objetos y  $n$  variables, como producto de dos matrices:

$$S_{n \times m} L_{m \times m} = X_{n \times m} \quad (57)$$

donde:

$S_{n \times m}$ : Matriz de las puntuaciones o *scores*, que contiene información sobre los objetos, al indicar el valor de cada objeto sobre cada una de las componentes principales.

$L_{m \times m}$ : Matriz de las contribuciones o *loadings* de cada una de las variables sobre las componentes principales.

La primera CP se calcula de forma que ésta se dirige en la dirección de la máxima variabilidad de los datos, con la condición de que la suma de cuadrados de sus contribuciones esté normalizada a la unidad. Las sucesivas componentes principales se determinan en las direcciones de máxima varianza residual, con la misma condición de normalización para las contribuciones y condición de ortogonalidad respecto a las CP previas [99].

La solución al problema de calcular las componentes principales, o lo que es igual, de calcular la matriz  $L_{m \times m}$ , se logra mediante el álgebra de matrices y se realiza a partir de la matriz cuadrada de covarianzas o de correlación de los datos [100]:

- A partir del polinomio característico, siendo éste el polinomio en  $\lambda$ , de grado  $m$ , que se tiene al igualar a cero el determinante  $|\mathbf{C} - \lambda\mathbf{I}|$ , donde las raíces o soluciones del polinomio son los autovalores.

Finalmente, los componentes principales del sistema se obtiene diagonalizando la matriz  $\mathbf{C}$ , mediante el álgebra de matrices, siendo los autovalores, las varianzas de las componentes principales, y los autovectores, las contribuciones o *loadings* [99].

Una vez obtenidas todas las componentes principales, se procede a la selección del número de CP que se van a incluir dentro del modelo, permitiendo reducir la dimensionalidad de los datos, al retener en varias componentes principales la mayor parte de la variabilidad de los datos originales. Para ello, hay diversos criterios [99]:

- Autovalor medio.
- Porcentaje de varianza explicada.
- Bastón roto.
- Gráfico de autovalores.
- Validación cruzada.

El más utilizado, y el empleado por ello en esta memoria, es el criterio del autovalor medio, que consiste en retener las componentes cuyo autovalor sea mayor que el autovalor medio. En el caso de datos autoescalados, se cumple que el autovalor medio presenta un valor de uno, y como las variables tienen varianza unidad, se rechazan aquellas componentes cuya varianza es menor que las de las variables originales.

Después de la determinación del número de componentes principales con el que puede obtenerse una descripción adecuada del sistema en estudio, se puede hacer uso de las CP consideradas para visualizar la estructura de los datos en un espacio de dimensión



reducida. Las representaciones gráficas de las puntuaciones, *scores*, y contribuciones, *loadings*, utilizando como ejes las componentes principales, permiten encontrar:

- Grupos de objetos similares.
- Correlación entre las variables e importancia de las mismas.
- Relaciones entre variables y efectos, que permiten a su vez obtener la habilidad discriminante de las variables.

#### **I.2.1.2. Análisis de agrupaciones o clusters**

Es un procedimiento no supervisado en el que se agrupan los objetos basándose en las variables que los caracterizan, sin ningún conocimiento previo de la pertenencia de cada uno de los objetos a un grupo o categoría determinado.

Las muestras se agrupan de acuerdo con la similitud o distancia entre ellas en el espacio de los datos, pero las clases no existen a priori, sino que se está investigando la existencia de grupos, y si al final se puede dar un significado al grupo obtenido, podemos entonces considerarlo como una clase o categoría.

Los métodos de análisis de agrupaciones se dividen en dos grandes grupos:

- *Métodos no jerárquicos.*

En esta modalidad, se decide a priori el número de agrupaciones o *clusters* a obtener, y se estudia la pertenencia de cada objeto a cada agrupación. Estos procedimientos no jerarquizados se denominan frecuentemente como agrupación de K-medias.

- *Métodos jerárquicos.*

Agrupar en función de una jerarquía establecida entre los objetos. A su vez se dividen en aglomerativos (cuando se parte de tantos grupos como objetos individuales originales) y divisivos (cuando se parte de un único grupo conteniendo la totalidad de los objetos). Los métodos jerárquicos aglomerativos son los más empleados.

Mediante el cálculo de las distancias Euclídea, Manhattan, Minkowski o Mahalanobis a través de una métrica definida entre todos los objetos, se calcula la matriz de distancias, que es un reflejo de la similitud entre los mismos. A partir de esta matriz, los dos objetos con menor distancia (mayor similitud) forman un grupo o *cluster*. El proceso se repite  $n-1$  veces, siendo  $n$  el número de objetos; en cada ocasión se calculan las distancias entre todos los objetos entre los que el nuevo grupo formado se considera un objeto más. El agrupamiento se vuelve a realizar atendiendo a la menor distancia (parejas de objetos u objeto-grupo).

Los distintos métodos aglomerativos surgen de acuerdo con la manera de calcular la distancia entre grupos:

-*Unión media ponderada (weighted average linkage)*: Dados dos grupos,  $G_H$  y  $G_K$ , proviniendo  $G_H$  de la unión de otros dos grupos,  $G_O$  y  $G_P$ , la distancia entre  $G_H$  y  $G_K$  es el valor medio de las distancias con los grupos progenitores,  $G_O$  y  $G_P$ :

$$d(G_K, G_H) = \frac{d(G_K, G_O) + d(G_K, G_P)}{2} \quad (59)$$

-*Unión simple (single linkage)*: La distancia entre dos grupos se define como la menor entre los objetos de ambos grupos.

-*Unión completa (complete linkage)*: La distancia entre dos grupos se define como la mayor de las distancias entre los objetos de ambos grupos.

-*Método de Ward*: Une dos grupos de modo que el incremento de la varianza que supone añadir más objetos a un grupo sea mínima. De este modo, el método tiende a generar grupos tales que la dispersión crezca lo menos posible.

Dado que a priori ningún método aglomerativo es mejor que otro, se deben probar todos para un problema concreto.

La interpretación de los resultados se hace mediante un dendograma, que es la representación gráfica de la unión de los objetos a medida que progresa el computo. En la Figura I.11 se puede observar cómo primero se han unido los objetos 2 y 5 que se encontraban a menor distancia, formando un primer grupo, y éste a su vez se une al objeto 3. Por otro lado, los objetos 1 y 4, forman un grupo que finalmente se une al grupo formado por los objetos 2, 3 y 5, formando un único grupo.

El número de grupos obtenidos, a la vista del dendograma, depende del nivel de similitud o distancia deseado. Así, por ejemplo, para el valor de distancia seleccionado en la Figura se observa que los cinco objetos forman dos grupos, uno que contiene a los objetos 2, 3 y 5 y otro a los objetos 1 y 4.

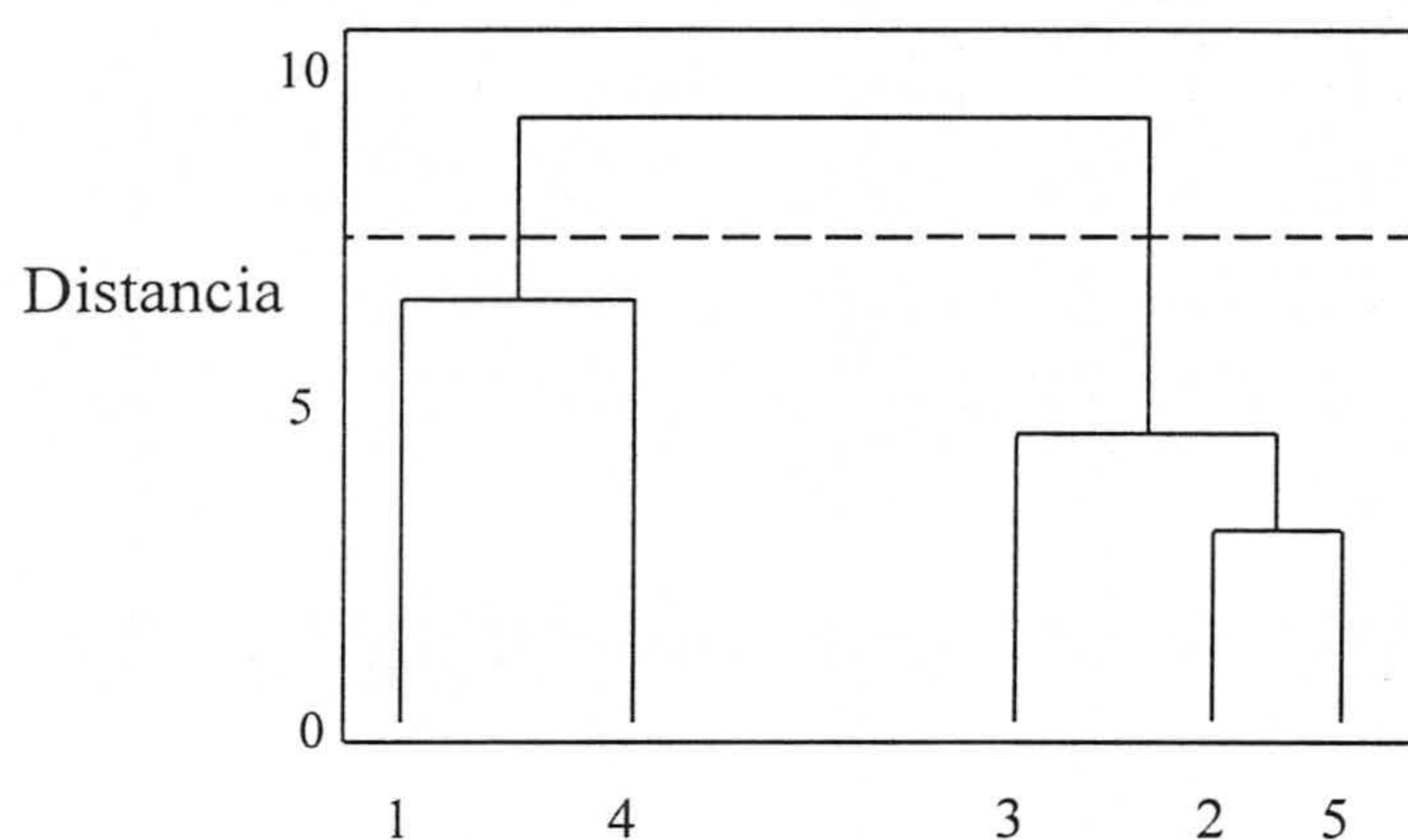


Figura I.11. Representación de la secuencia de agrupaciones mediante un dendograma

### I.2.2. MÉTODOS SUPERVISADOS

Se aplican cuando se conocen el número de categorías y la pertenencia de cada objeto a la categoría. Permiten obtener unas reglas de clasificación, que asignan los objetos a las clases o categorías en función del valor de sus propiedades químicas. Dentro de estos métodos se pueden distinguir:

- Métodos de *clasificación*:
  - Análisis discriminante lineal.
  - Método del entorno próximo.
- Métodos de *modelado*:
  - Análisis discriminante cuadrático.
  - SIMCA (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*).

Existe una diferencia conceptual muy importante entre un método de clasificación y uno de modelado, pues mientras el primero divide el espacio en tantas regiones como categorías, de modo que cualquier objeto es asignado a una de ellas, el segundo genera un recinto cerrado para cada clase, de modo que es posible identificar objetos que no son de ninguna de ellas.

En esta Memoria, sólo se han utilizado métodos de clasificación y en concreto, el análisis discriminante lineal.

### **I.2.2.1. Análisis Discriminante Lineal (ADL)**

El ADL es un método de clasificación bien conocido propuesto por Fisher [101] y que ha sido aplicado con frecuencia en quimiometría, en el que se acepta que las clases tienen la misma distribución multinormal y que se separan de forma lineal.

Dada una variable dependiente cualitativa y un conjunto de una o más variables independientes cuantitativas, el análisis discriminante consiste en obtener unas funciones lineales de las variables independientes, denominadas funciones discriminantes, que adoptan la siguiente forma:

$$Z_{jk} = a + \sum_{i=1}^{i=n} W_i X_{ik} \quad (60)$$

donde:

$Z_{jk}$ : Puntuación Z discriminante de la función discriminante j para el objeto k.

a: Término constante.

$W_i$ : Ponderación discriminante para la variable independiente i

$X_{ik}$ : Valor de la variable independiente i para el objeto k.

El número de funciones discriminantes será igual al número de categorías menos una, o bien, al número de variables, dependiendo de cual presente el menor valor.

Como se puede ver en la ecuación (60) cada variable independiente se multiplica por su correspondiente ponderación y se suman estos productos. El resultado es una única puntuación discriminante  $Z$  para cada objeto del análisis. Promediando las puntuaciones discriminantes para todos los objetos dentro de una categoría particular, se obtiene la media de la categoría, conocida como centroide. Los centroides indican la situación más común de cualquier objeto de una categoría determinada, y una comparación de los centroides muestra lo apartadas que se encuentran las categorías a lo largo de las dimensiones que se están controlando.

Las clases se separarán de forma satisfactoria si los centroides de cada una de ellas están suficientemente distantes y son compactas. En términos matemáticos esto significa que la varianza entre-clases es grande comparada con la varianza dentro de cada clase (intra-clase).

Cualquier objeto es asignado a la clase para la que su puntuación  $Z$  esté más cerca del centroide correspondiente.

Otra forma de clasificar los objetos en las distintas categorías es mediante el empleo de las funciones de clasificación, existiendo tantas como categorías. Cada función permite calcular las puntuaciones de clasificación para cada objeto, mediante la ecuación:

$$S_{hk} = a_h + \sum_{i=1}^{i=n} P_i X_{ik} \quad (61)$$

donde:

$S_{hk}$ : Puntuación  $S$  de la función de clasificación de la categoría  $h$  para el objeto  $k$ .

$a_h$ : Término constante para la función de clasificación de la categoría  $h$ .

$P_i$ : Peso para la variable independiente  $i$  para la función de clasificación.

$X_{ik}$ : Valor de la variable independiente  $i$  para el objeto  $k$ .

Obtenidas las puntuaciones de clasificación, se asigna cada objeto a la categoría para la que dicha puntuación sea mayor.

Al considerar varias variables con fines de discriminación el investigador puede aplicar dos enfoques de cálculo, en función del objetivo perseguido:

a) Si el objetivo es simplemente determinar las capacidades discriminantes de todas las variables, sin considerar la influencia de ninguna individualmente, en el modelo se deben incluir todas las variables simultáneamente.

b) Si el objetivo del análisis es determinar que variables son las más eficaces para discriminar entre clases, se utiliza un modelo por etapas: *Análisis discriminante lineal por etapas*, que puede desarrollarse en dos direcciones:

- *Método de selección paso a paso hacia adelante (Forward Discriminant Analysis)*. De acuerdo con este método, la primera variable que entra a formar parte del análisis es la que maximiza la separación entre grupos. A continuación, se forman parejas entre esta variable y las restantes, de modo que se encuentren las parejas que producen la mayor discriminación. La variable que contribuye a la mejor pareja es seleccionada en segundo lugar. Con ambas variables, podrían formarse ternas de variables para determinar cuál de éstas resulta más discriminante. De este modo quedaría seleccionada la tercera variable. El proceso se repite hasta que todas las variables hayan sido seleccionadas o las variables restantes no supongan un incremento significativo en la capacidad de discriminación.

• *Método de selección paso a paso hacia atrás (Backward Discriminant Analysis)* [101]. Inicialmente, se consideran todas las variables y van siendo excluidas una a una en cada etapa. Se eliminan aquéllas cuya supresión produce el menor descenso en la discriminación entre los grupos.

Cuando se dispone de un número de variables inferior a 15, se suele recomendar el proceso de selección hacia atrás, ya que conduce a un conjunto óptimo de variables para la discriminación. Como criterio de selección es preciso utilizar alguna medida de la discriminación.

Habitualmente se emplea el valor de la lambda de Wilks, que mide las desviaciones dentro de cada grupo respecto a las desviaciones globales. Su valor se calcula a partir de la homogeneidad dentro de los grupos y la variabilidad total, promoviendo la selección de un modelo que maximiza las distancias entre las categorías, al tiempo que aumenta la cohesión de las mismas. De acuerdo con la ecuación (62), a partir de la aproximación de Rao este valor se puede transformar en un estadístico F, que permite contrastar la existencia de diferencias significativas entre los grupos, y que se utiliza para garantizar que el incremento de discriminación debido a las variables supera un valor fijado:

$$F = \left( \frac{1 - \Lambda^{1/s}}{\Lambda^{1/s}} \right) \cdot \left( \frac{ms - v}{t(g-1)} \right) \quad (62)$$

donde:

$\Lambda$ : Lambda de Wilks.

t: Número de variables independientes.

g: Número de categorías.

m = (2gn-t-g-2)/2, siendo n el número de objetos promedio por categoría.

v = (t(g-1)-2)/2

s = ((t<sup>2</sup>(g-1)<sup>2</sup> - 4)/(t<sup>2</sup> + (g-1)<sup>2</sup> - 5))<sup>1/2</sup>



Para dicho valor de F, los grados de libertad son  $t(g-1)$  y  $ms-v$ .

Además, se cuenta con un método adicional de interpretar la capacidad discriminante de las variables independientes, por medio del uso de los valores parciales de F, que permitirán la inclusión o el rechazo de variables en el modelo.

Así, se puede distinguir una F de entrada, que evalúa el incremento producido en la discriminación tras la incorporación de una variable (hacia adelante). Un valor de F pequeña aconsejaría no seleccionar la variable, pues su aporte a la discriminación de los grupos no sería importante.

También se distingue una F de salida, que permite valorar el descenso de la discriminación si una variable es eliminada del modelo (hacia atrás), descartándola si origina un valor de F bajo antes de proceder a un nuevo paso en el método de selección de variables.

Una vez seleccionadas las variables incluidas en el modelo discriminante, y haciendo uso de las funciones de discriminación o de clasificación, se obtiene la matriz de clasificación, que muestra el número de objetos que están correctamente clasificados y cuales no.

## CAPÍTULO II

### DISOLUCIONES, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN



## DISOLUCIONES, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

En este capítulo se reúnen las disoluciones, reactivos e instrumentación utilizados a lo largo de todo el trabajo experimental desarrollado en esta Memoria. También se indican las distintas muestras analizadas.

## II.1. DISOLUCIONES Y REACTIVOS

### II.1.1. DISOLUCIONES

- *Disoluciones estándar de aminos:* Se prepararon disoluciones de aminos de concentración  $0.5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  por pesada exacta de las cantidades de sustancia correspondiente, y posterior disolución en ácido clorhídrico, 0.1 M, que contiene 0.2 % (m/v) de ácido 3,3'-tiodipropiónico, usado como antioxidante (Tabla II.1).

Tabla II.1. Disoluciones patrón de aminos biogénicos

<i>Amina biogénica</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Pureza</i>	<i>C (mg·l<sup>-1</sup>)</i>
<i>Triptamina</i>	Fluka (Alemania)	> 98 %	500
<i>Feniletilamina</i>	Fluka (Alemania)	> 99 %	500
<i>Putrescina</i>	Sigma (EE.UU.)	> 98 %	500
<i>Cadaverina</i>	Sigma (EE.UU.)	> 98 %	500
<i>Histamina</i>	Sigma (EE.UU.)	> 99 %	500
<i>Tiramina</i>	Sigma (EE.UU.)	> 99 %	500
<i>Espermidina</i>	Fluka (Alemania)	> 99 %	500
<i>Espermina</i>	Fluka (Alemania)	> 99 %	500
<i>1,7-diaminoheptano</i>	Aldrich (Alemania)	98 %	500

Las disoluciones fueron conservadas en botes de cristal ámbar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para comprobar la estabilidad de las disoluciones, se hizo un seguimiento periódico del valor de la señal analítica correspondiente, y se observó ésta con el tiempo. Se comprobó que no existían diferencias superiores al 5% en la señal emitida por las

distintas disoluciones durante un periodo de tres meses, excepto la espermina y espermidina, que debían de prepararse mensualmente.

Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de las obtenidas en la Tabla II.1 por dilución con la disolución de ácido clorhídrico, 0.1M, que contiene 0.2 % (m/v) de ácido 3,3'-tiodipropiónico.

- *Disolución de ácido clorhídrico y ácido 3,3'-tiodipropiónico:* Se preparó por dilución con agua desionizada de 8.18 ml de ácido clorhídrico concentrado, 37%, (Panreac, España) y disolución de 2 gramos de ácido 3,3'-tiodipropiónico (Fluka) en un matraz aforado de 1000 cc de capacidad.
- *Disolución de cloruro de dabsilo:* Las disoluciones de cloruro de dabsilo utilizadas, se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de reactivo (Fluka) en acetona (Merck, Alemania).
- *Disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ :* Se preparó por disolución de 1.06 gramos de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Panreac) en 50 ml de agua desionizada.
- *Disolución de dilución:* Consiste en una mezcla de 50 ml de acetonitrilo (Panreac), 25 ml de etanol (Panreac) y 25 ml del eluyente A, empleado en la fase móvil.

## II.1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

- *HCl conc. (37 %) R.A. (Panreac y Merck).*
- *HClO<sub>4</sub> conc. (70 %) R.A. (Panreac).*
- *H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> conc. (85 %) R.A. (Merck).*
- *Ácido acético glacial R.A. (Panreac y Merck).*
- *H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> anhidro P. A. (Merck).*
- *NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O P. A. (Merck).*
- *Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro P. A. (Panreac).*
- *Acetato sódico anhidro P. A. (Panreac).*
- *Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> anhidro P.A. (Merck).*
- *Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro P.A. (Panreac).*
- *NaHCO<sub>3</sub> anhidro P.A. (Panreac).*
- *Ácido etilendiaminotetracético anhidro P.A. (Merck).*
- *NaOH P.A. (Panreac y Eka Nobel, Suecia).*

- *Etanol* PAI (Panreac y Primalco Solveco, Suecia).
- *Acetona* R.A. (Merck).
- *Agua desionizada*. Obtenida en el equipo de ósmosis inversa Milli RO 12 Plus (MILLIPORE, USA) acoplado con un equipo de refinado Milli Q Plus 185 (MILLIPORE). La conductividad del agua fue controlada periódicamente, no superando en ningún momento el valor de 10  $\mu$ S.
- *Acetonitrilo* PAI (Panreac y Merck).
- *Tert-butilmetileter* (Fluka).
- *Dimetilformamida* (Fluka y Merck).
- *Trietilamina* (Carlo Erba, Italia y Fluka).
- *Di-n-hexiléter* (Sigma).
- *6- undecanona* (Sigma).
- *Tri-2-etilhexilfosfato* (Fluka).
- *Ácido di-2-etilhexilfosfórico* (Sigma).
- *Óxido de tri-n-octilfosfina* (Fluka).



### **II.1.3. GASES EMPLEADOS**

- Helio* AIR LIQUID ALFA Gaz 99.999% de pureza.
- Nitrógeno* AIR LIQUID ALFA Gaz 99.999% de pureza.

## **II.2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL**

### **II.2.1. INSTRUMENTACIÓN**

- ◆ *Balanzas analíticas* METTLER PJ360 Delta Range y METTLER AE 163.
- ◆ *pH-metro digital* CRISON, modelo Micro pH 2000, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata y *pH-metro digital* PHM 83 Autocal, RADIOMETER.
- ◆ *Molinillo eléctrico* MOULINEX, modelo 505.
- ◆ *Mezclador* VORTEX HEIDOLPH, modelo Reax 2000.
- ◆ *Agitador vibratorio de matraces* VIBROMATIC, modelo 384.
- ◆ *Termostato* PRECISTERM, modelo S-137.
- ◆ *Centrífuga* BHG, modelo FIXETTE II.

- ◆ *Baño de ultrasonidos SELECTA, de 1 litro de capacidad.*
- ◆ *Agitador de tubos HEIDOLPH REAX 2000.*
- ◆ *Bomba de agua para vacío BUCHI B-169 Vacuum System.*
- ◆ *Frigorífico y congelador ZANUSSI.*
- ◆ *Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HEWLETT-PACKARD, serie 1050, equipado con:*
  - *Detector espectrofotométrico de longitud de onda variable.*
  - *Inyector manual RHEDOYNE 7125 con un bucle de 20 µl.*
  - *Integrador HEWLETT-PACKARD modelo 3396-A.*
  - *Microjeringa HAMILTON para HPLC, modelo 1810 RNE, con 100 µl de capacidad.*
  - *Columna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, de dimensiones 244-4.4 (244 x 4.4 mm d.i.), equipada con una precolumna (10 x 4.4 mm), empaquetada con la misma fase estacionaria.*
- ◆ *Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, equipado con:*
  - *Dos bombas WATERS (USA), modelo 515.*
  - *Inyector automático GILSON (Francia), modelo 231-401, con un bucle de 20 µl.*
  - *Detector de diodos en fila WATERS, modelo DA 996.*
  - *El sistema estaba controlado por el sistema de datos Millenium<sup>32</sup>, WATERS.*
  - *Columna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, de dimensiones 244-4.4 (244 x 4.4 mm d.i.), equipada con una precolumna (10 x 4.4 mm), empaquetada con la misma fase estacionaria.*

- ◆ *Equipo para extracción en membrana, que consiste en:*
  - Dos bloques circulares de politetrafluoroetileno, (diámetro 120 mm y espesor 8 mm), con ranuras dispuestas en espiral de Arquímedes (profundidad 0.25 mm, anchura de 1.5 mm y longitud de 250 cm), con un volumen total próximo a 0.95 ml.
  - Dos bloques circulares de aluminio de 6 mm de espesor, entre los cuales se colocan los bloques de politetrafluoroetileno.
  - Membrana MILLIPORE FG (MILLIPORE) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, con una porosidad del 70% y un espesor total de 175  $\mu\text{m}$ .
  - Dos bombas peristálticas Minipuls 3 (Gilson).
  - Tubos Acid-Flexible, Elkay Products, USA.
  - Tubos de politetrafluoroetileno de 0.5 mm de diámetro interno.

## **II.2.2. MATERIAL**

- Matraces aforados AFORA de clase A, de diferentes capacidades.
- Pipetas graduadas y aforadas AFORA clase A y B, de diferentes capacidades.
- Embudos de cristal AFORA de distintos tamaños.
- Kit de filtración de disolventes MILLIPORE de 47 mm de diámetro.
- Filtros de membrana MILLIPORE FG FGLP04700 hidrofóbicos con trama, de 0.20  $\mu\text{m}$

de tamaño de poro, para filtración de disolventes orgánicos.

- Filtros de membrana MILLIPORE FH FHUP04700 sin trama, de 0.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtración de metanol.
- Filtros de membrana MILLIPORE HA HA WP04700 sin trama, de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtración de agua y disoluciones acuosas.
- Filtros desechables ANOTOP (Merck y Whatman) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Papel WHATMAN n° 40 para filtración.
- Jeringa HAMILTON, modelo 1010 TLL luer tip, con 10 cc de capacidad.
- Para el control de la temperatura de la columna, se utilizó una cámara de vidrio con sistema de recirculación de agua conectado a un termostato Ultra-Thermostat K5, Colora Messtechnick (Alemania), o directamente, un sistema de termostatación Croco Cil™.
- Goteros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, pesa sustancias, así como otro tipo de material elemental de vidrio que podemos encontrar en cualquier laboratorio analítico.

## **II.3. SOPORTE INFORMÁTICO**

### **II.3.1. ORDENADORES**

- ⊕ Ordenador personal tipo PC con Placa base P5A ATX y Procesador AMD K6-2/450.

### **II.3.2 IMPRESORAS**

- ▣ Hewlett Packard Laserjet 1100.

- ▣ Hewlett Packard Laserjet 4L.

### **II.3.3. PAQUETES INFORMÁTICOS**

- ▣ Las representaciones gráficas se han realizado mediante el programa Microsoft® Excel 2000 y Power Point®, Copyright © 1987-1999, Microsoft Corporation.
- ▣ Las estructuras químicas se han dibujado con el programa CS ChemDraw Ultra®, Cambridge Soft Corporation, (1985-1999).
- ▣ Los valores de log P (coeficiente de partición octanol/agua) se obtuvieron con el programa ACD/log P DB, Advanced Chemistry Development (Toronto, Canada).
- ▣ Los programas de cálculo utilizados son:
  - Statgraphics Plus for Windows 4.1, STSC., Statistical Graphics Corporation, USA (1999).

- Statistica for Windows, Statsoft Inc., USA (1996).
- Systat for Windows, ver 7.0, SPSS, USA (1997).
- Modde for Windows, Umetri AB, Suecia (1996).
- Quimio, ver 1.0, Ed. Rafael Cela, Autores: M. Blanco, R. Boqué, R. Cela, J. Coello, S. Maspoch, M<sup>a</sup> C. Ortiz, J. Riba, F. X. Rius, A. Ruiz, L. A. Sarabia, X. Tomás. Secretariado de Publicaciones, Universidad de Santiago de Compostela, España (1993).

#### II.4. MUESTRAS ANALIZADAS

A lo largo de esta Memoria se han analizado las siguientes muestras:

- **Vinos tinto, clarete y blanco**, adquiridos en supermercados locales y de amplio consumo.
- **Malta** procedente de Castilla La Mancha.
- **Maíz**.
- **Cervezas**, de diferentes características y tipos, elaboradas por distintas marcas comerciales.
- **Mosto, Fermento y Fermento de cerveza almacenado en bodega**, elaborado en plantas cerveceras españolas.

## **II.5. METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA**

- Previamente a cada sesión de trabajo, se preparaban las disoluciones que se iban a utilizar en la composición de la fase móvil, las cuales eran filtradas y desgasificadas.
- Asimismo, antes de cada sesión de trabajo o experiencia, se sometía la columna a un *proceso de equilibrado con la fase móvil correspondiente* hasta obtener una línea base estable.

## CAPÍTULO III

### OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS





## OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS

En este Capítulo se describe la optimización de un método cromatográfico para la separación y determinación de aminas biógenas, basado en una reacción de derivatización precolumna con cloruro de dabsilo (cloruro de 4-dimetilamino-azobencen-4'-sulfonilo).

Las variables estudiadas están relacionadas tanto con la reacción de derivatización, como con la separación y detección cromatográfica de los derivados dabsilados.

### III.1. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DABSILACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS

En bibliografía se han descrito diversas formas de obtener los derivados dabsilados de aminas y aminoácidos, en medio básico, esquematizadas en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Procedimientos seguidos para la reacción de derivatización con cloruro de dabsilo

Analitos	Dis. Reguladora	pH	C <sub>R</sub> (mM) <sup>1</sup>	T <sub>c</sub> (°C) <sup>2</sup>	t <sub>c</sub> (min.) <sup>3</sup>	Ref.
<i>Aminoácidos</i>	NaHCO <sub>3</sub> / Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	8.9	10	70	6	[1]
<i>Aminoácidos</i>	NaHCO <sub>3</sub>	9.0	4	70	10-15	[2]
<i>Aminoácidos</i>	NaHCO <sub>3</sub>	8.1	4	70	10	[3]
<i>Aminoácidos</i>	----	7.5-9.0	4	70	10	[4]
<i>Aminas y Aminoácidos</i>	NaHCO <sub>3</sub>	8.6	12.4	70	15	[5]
<i>Aminas</i>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	----	5	T <sub>ambiente</sub>	30	[6]

<sup>1</sup> Concentración de reactivo.

<sup>2</sup> Temperatura de calentamiento.

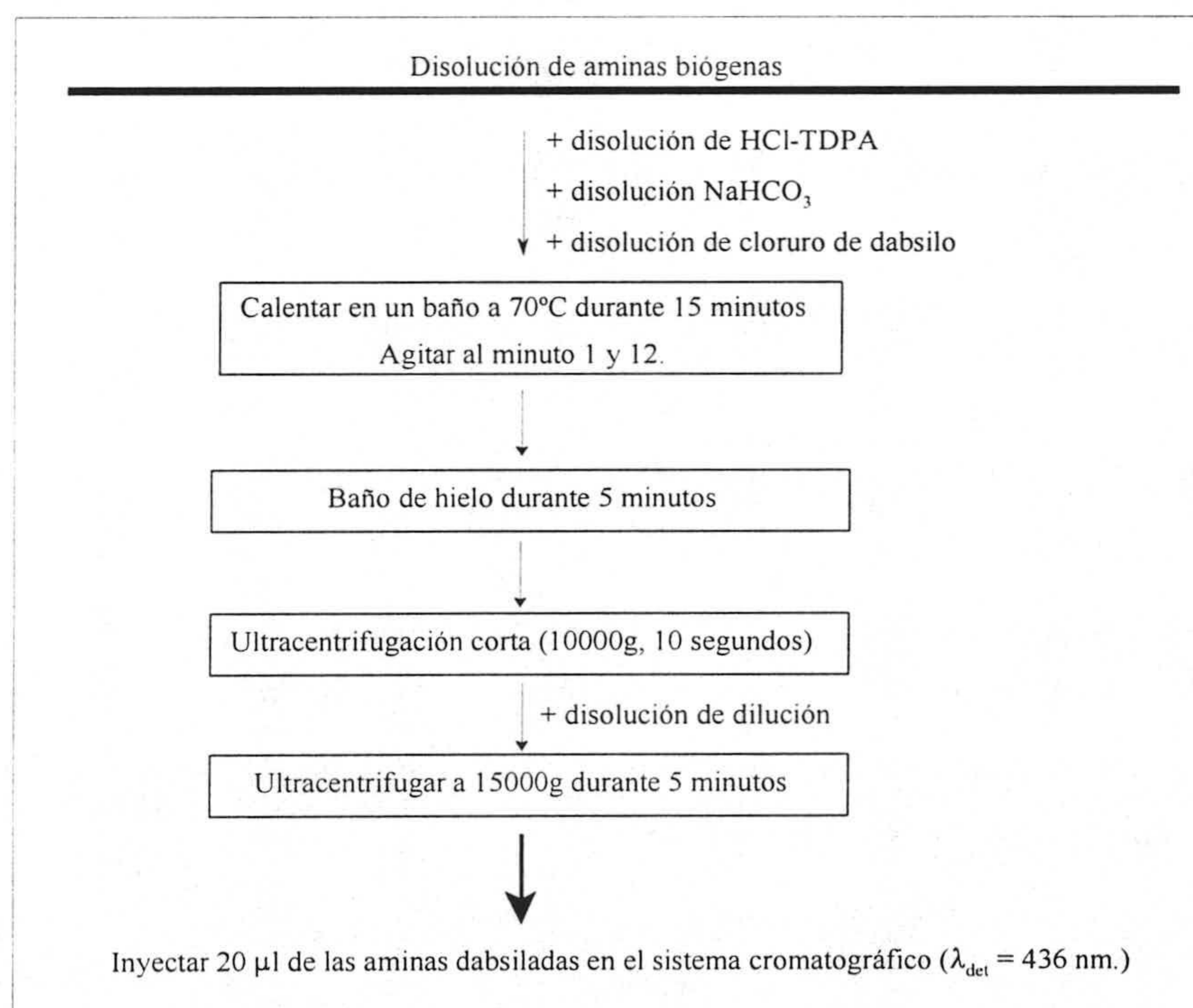
<sup>3</sup> Tiempo de calentamiento.

Se puede observar que existen claras diferencias entre los valores de pH, concentración de agente derivatizante, temperatura y tiempo de calentamiento, establecidos por los diferentes autores.

También hay que señalar que, una vez finalizada la reacción de dabsilación y antes de la determinación cromatográfica de los derivados, las estrategias seguidas son muy diferentes, variando desde la disolución de un precipitado por simple calentamiento [1], hasta la utilización de la extracción líquido-líquido [6].

### III.1.1. ESTUDIOS PRELIMINARES

Entre los procedimientos descritos, se escogió el propuesto por Krause y col. [5], puesto que en su estudio se incluyen las aminas biógenas que eran de nuestro interés, y cuya descripción detallada se encuentra en el Esquema III.1.



Esquema III.1. Procedimiento para la dabsilación propuesto por Krause y col. [5]

El siguiente paso fue reproducir íntegramente el procedimiento descrito y obtener un cromatograma de las aminas en estudio, para compararlo con los datos bibliográficos. Las condiciones cromatográficas utilizadas, fueron [7]:

- *Fase estacionaria:*

Columna LICHROSPHER 100 RP-18 (244 x 4.4 mm, 5  $\mu$ m), con una precolumna LICHROSPHER (10 x 4.4 mm).

- *Fase móvil:*

Eluyente A: 95.82 % de disolución 9 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , a la que previamente se le ajusta el pH a 6.55 con ácido fosfórico diluido, 4 % de Dimetilformamida, 0.18 % de Trietilamina (v/v/v).

Eluyente B: 80% de Acetonitrilo, 10% de Tert-Butilmetiléter y 10% de agua (v/v/v).

- *Temperatura de la columna:* 50°C.

- *Gradiente:*

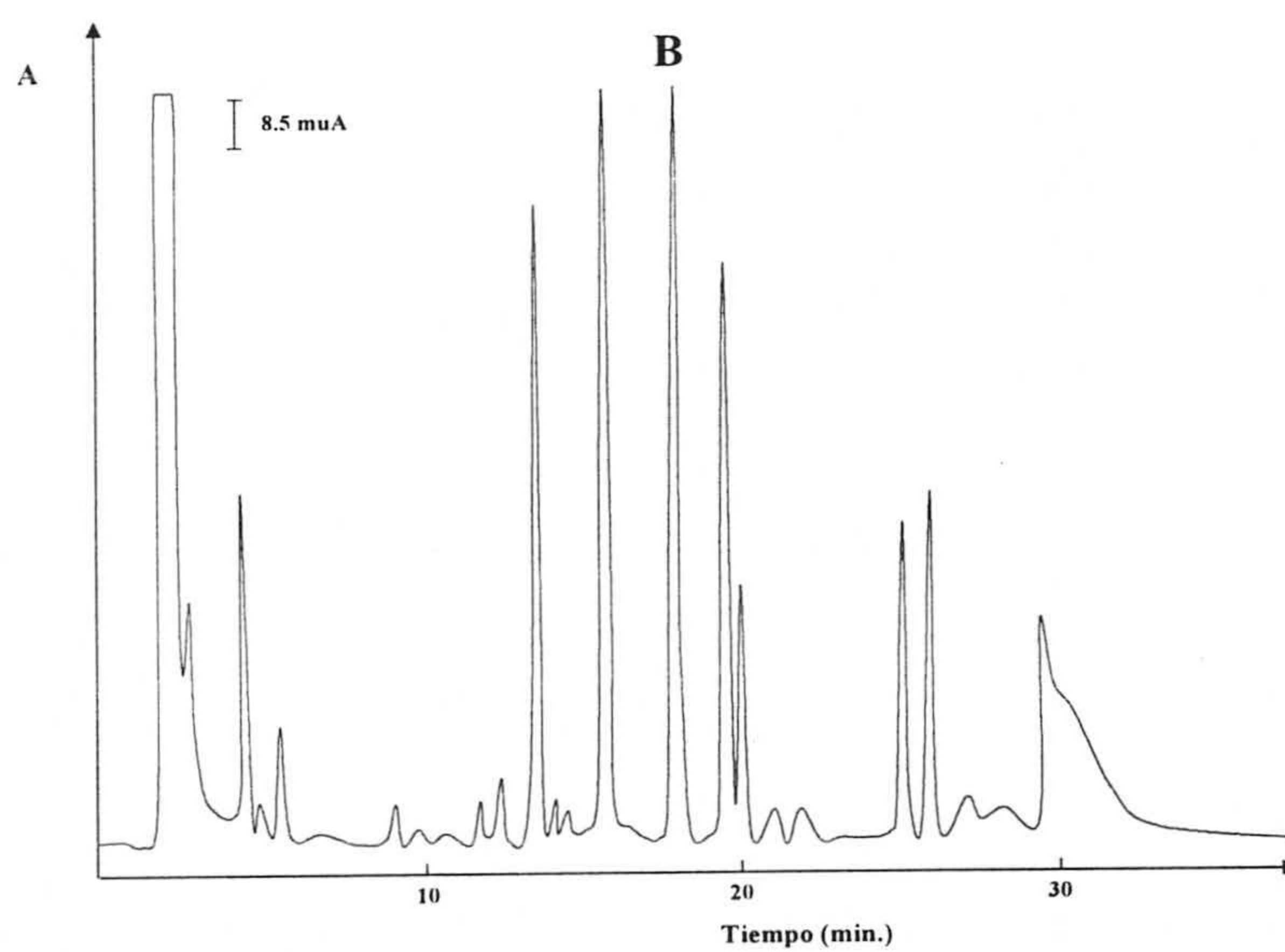
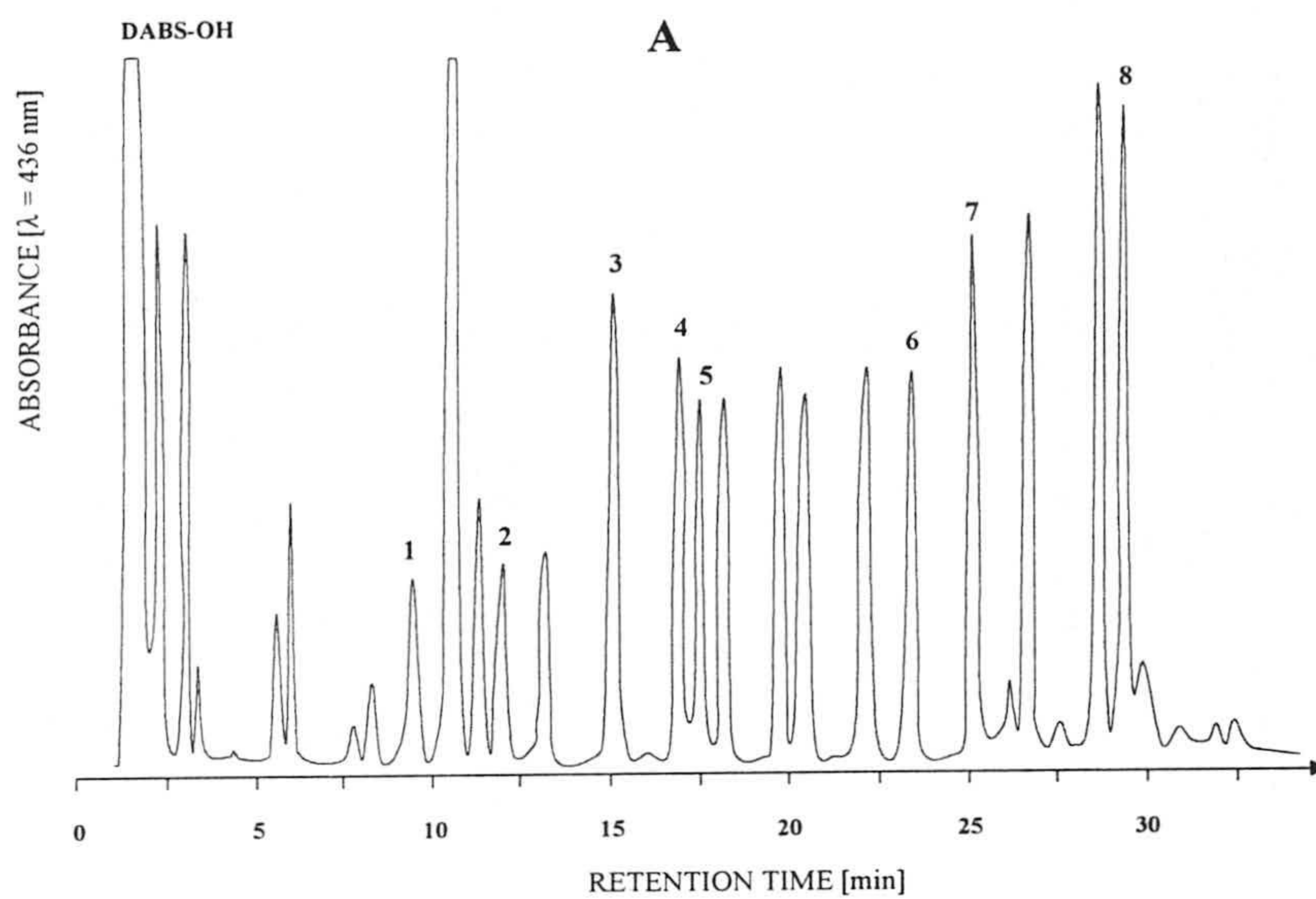
Tiempo (min)	0.0	5.0	20.0	30.0	40.0	40.5	57.0
% Eluyente B	55	55	75	100	100	55	55

- *Flujo de fase móvil:* 1ml·min<sup>-1</sup>.

- *Detección:* Espectrofotométrica a 436 nm.

- *Volumen de inyección:* 20  $\mu$ l.

Las únicas diferencias existentes con el método descrito son, **el tipo y tamaño de partícula de la fase estacionaria**. El cromatograma obtenido se recoge en la Figura III.1, junto con el obtenido por Bockhardt y col.[7].



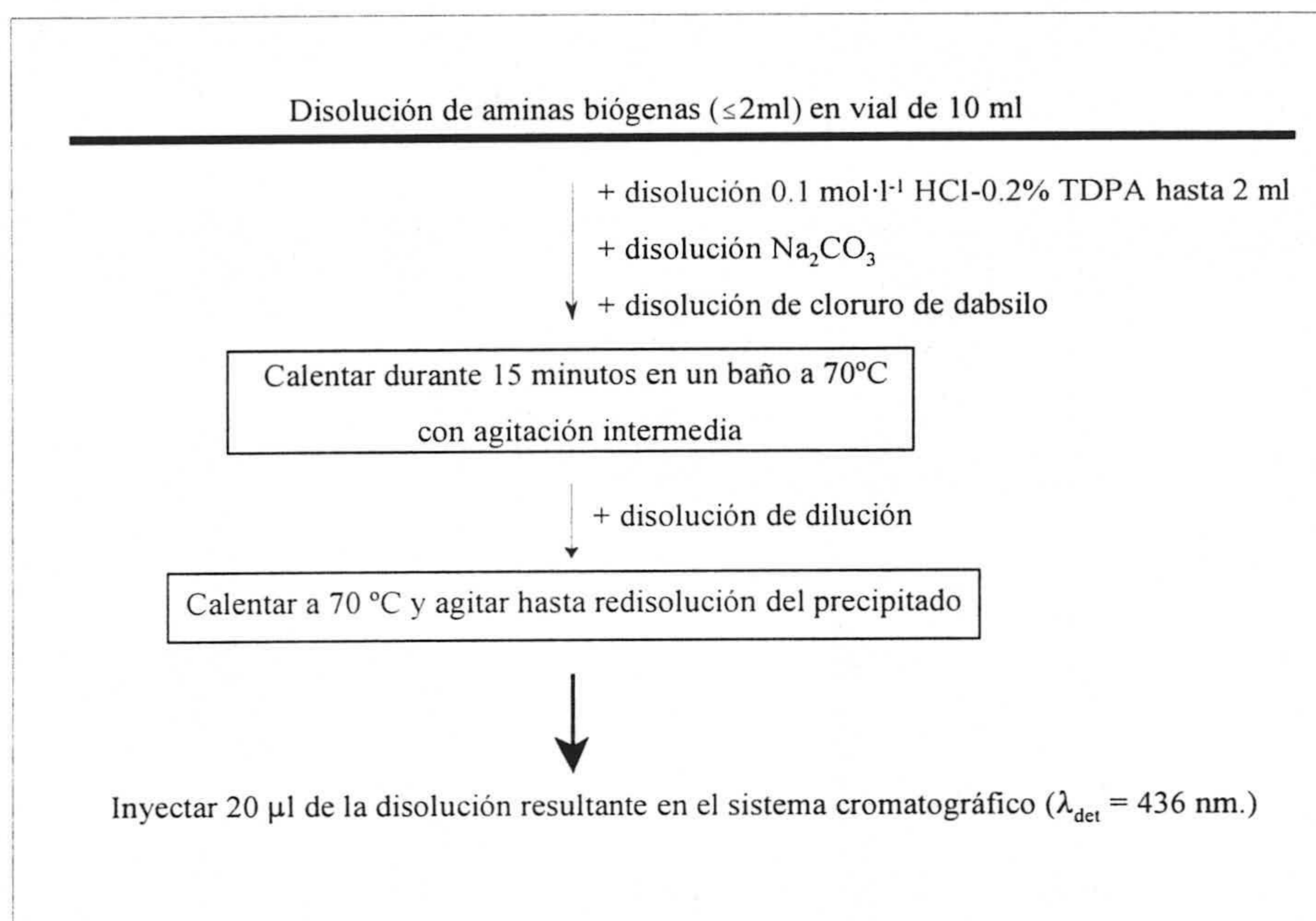
**Figura III.1.** (A) Cromatograma obtenido por Bockhardt y col [7]. Reproducido con permiso de Springer Verlag. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina. (B) Cromatograma obtenido utilizando las condiciones indicadas por Krause y col. [5].

Al inyectar varias veces la misma disolución conteniendo las aminos dabsiladas, observamos **una gran irrepetibilidad**, tanto en los tiempos de retención, como en las áreas de los picos, no pudiendo hacer una asignación de picos fidedigna, asociándolo a la **presencia de un precipitado en el fondo del vial**, ya que los resultados cromatográficos dependían de cual fuese la zona de la disolución de donde se tomara la alícuota inyectada, es decir, de su mayor o menor distancia al precipitado. Además, la ultracentrifugación recomendada por los autores, no mejoraba los resultados.

Por esta razón, se realizaron una serie de experiencias, con objeto de **eliminar el precipitado**, lo que se consiguió, **adicionando una disolución de dilución formada por acetonitrilo, etanol y eluyente A, en proporción 2:1:1 (v:v:v) y calentando a 70° C durante 20 minutos**. De esta forma, **se suprimen además los pasos de enfriamiento en baño de hielo y ultracentrifugación**, con lo que se simplifica el procedimiento.

Otro hecho significativo, es que **si se trabaja con la disolución indicada de NaHCO<sub>3</sub>, 0.15 M**, el pH de la reacción de dabsilación es de 6.5, fuera del valor indicado. Por ello, **se sustituye dicha disolución por otra de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de concentración 0.15 M**, con la que sí se consigue trabajar en este rango de pH.

Después de estas modificaciones, el procedimiento que se empleó en las siguientes experiencias fue el recogido en el Esquema III.2.



**Esquema III.2. Procedimiento seguido en la reacción de dabsilación**

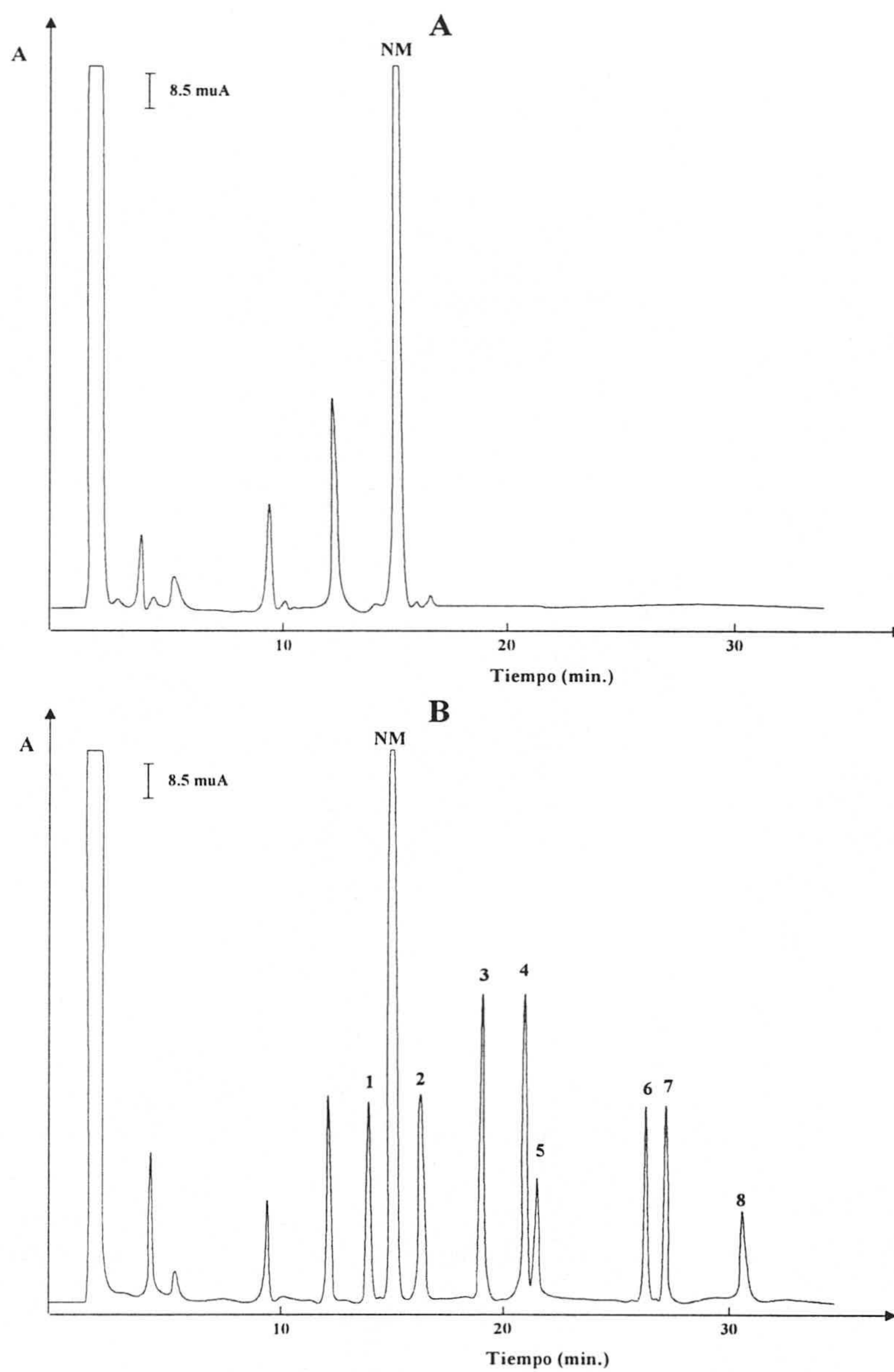
#### **III.1.1.1. Asignación de los picos**

Con objeto de proceder a la asignación de los picos aparecidos en el cromatograma, se realizaron las siguientes inyecciones:

- a) Una disolución de derivados dabsilados preparada de acuerdo con el Esquema III.2.
- b) Disoluciones de cada una de las aminas dabsiladas.
- c) Una disolución de agente derivatizante preparada del mismo modo (blanco analítico).

Los cromatogramas obtenidos se reúnen en la Figura III.2.





**Figura III.2. Cromatogramas obtenidos para (A) un blanco analítico y (B) disolución de derivados dabsilados. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina. NM: Naranja de Metilo.**

La comparación de los tiempos de retención para los picos obtenidos en los diferentes cromatogramas, nos permitió realizar las asignaciones reunidas en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Asignación de los picos cromatográficos

Tiempo de retención (minutos)	Asignación
1.710	Reactivo
1.966	Reactivo
2.139	Reactivo
4.543	Reactivo
9.776	Reactivo
12.595	Reactivo
14.395	Triptamina
15.491	Naranja de Metilo [2]
16.806	Feniletilamina
19.610	Putrescina
21.351	Cadaverina
21.931	Histamina
26.833	Tiramina
27.756	Espermidina
31.193	Espermina

Por último, con **objeto de eliminar un pico muy agudo que salía a un tiempo de retención de 42.5 minutos**, atribuible a un cambio en la composición de la fase móvil de uno de los pasos del gradiente, **se realizó la modificación recogida a continuación:**

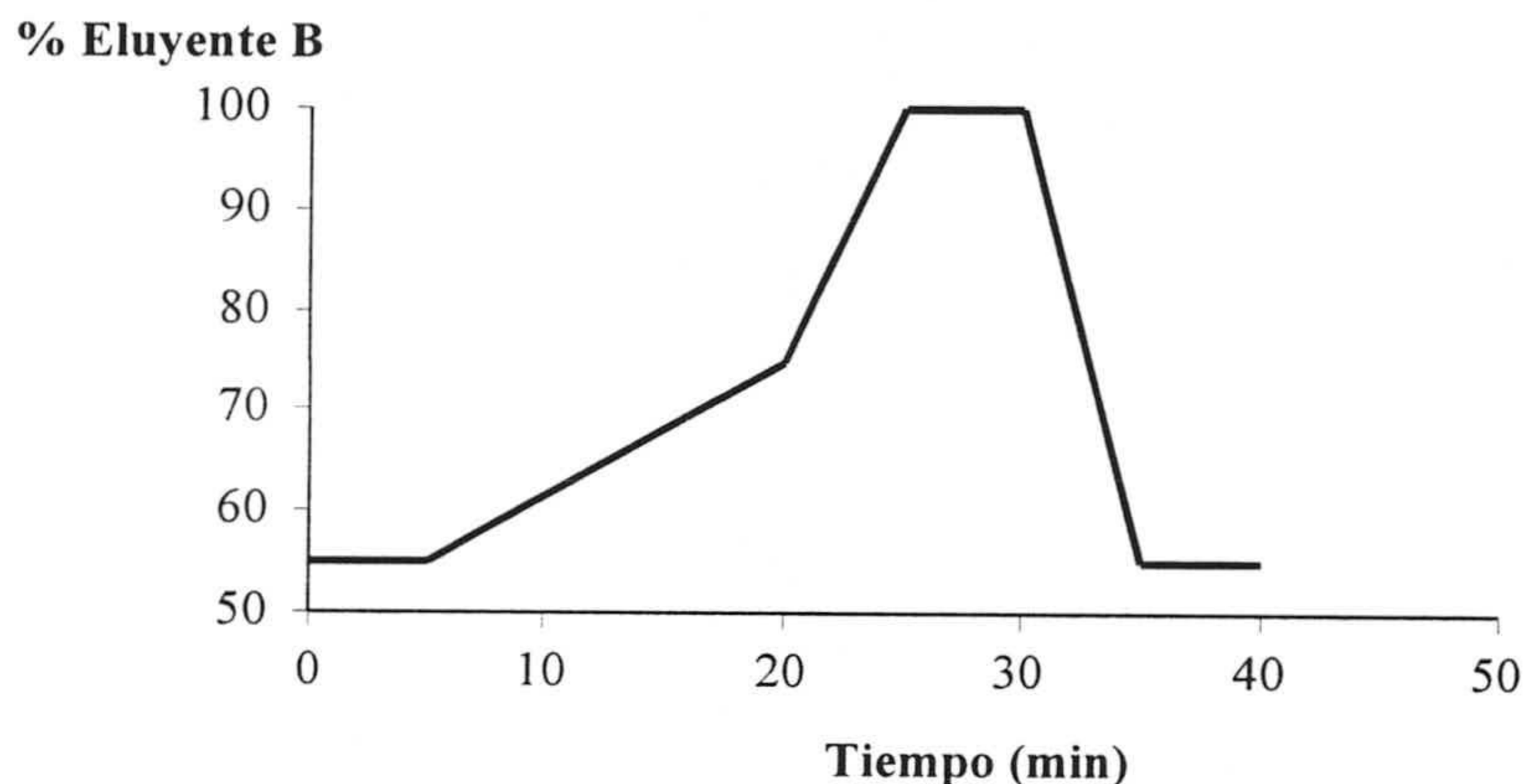
Tiempo (min)	0.0	5.0	20.0	30.0	40.0	<b>45.0</b>	57.0
% Eluyente B	55	55	75	100	100	<b>55</b>	55

### **III.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DABSILACIÓN**

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas en el procedimiento de dabsilación seleccionado, así como la irrepetibilidad observada, se consideró necesario proceder a la optimización de las condiciones experimentales para llevar a cabo la reacción de derivatización.

Dada la duración del cromatograma (1 hora), se decidió llevar a cabo la optimización sólo con las cuatro aminas con menor tiempo de retención (triptamina, feniletilamina, putrescina y cadaverina), para lo cual se realizó una modificación del gradiente de elución, tal como se refleja en la Figura III.3.

Tiempo (min)	0.0	5.0	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0
% Eluyente B	55	55	75	100	100	55	55



**Figura III.3. Programa de elución utilizado en el estudio de la reacción de derivatización**

Posteriormente se comprobó, si las condiciones óptimas obtenidas, eran adecuadas para el resto de las aminas. En caso de no serlo, habría que realizar una nueva optimización.

Como variable respuesta se seleccionó la altura total de pico ( $hp_T$ ), definida como la suma de las alturas de pico individuales de las aminas [8-10], ya que ésta es sensible a los cambios realizados en el sistema y además, un mayor rendimiento de la reacción de dabsilación implica una mayor altura de pico individual y por tanto, total.

Las variables implicadas en la reacción de dabsilación, susceptibles de ser optimizadas son:

- pH
- Concentración de reactivo derivatizante:  $C_R$
- Temperatura de calentamiento:  $T_C$

- Tiempo de calentamiento:  $t_c$

### **III.1.2.1. Diseño I: Optimización de las variables implicadas en la derivatización**

Inicialmente, se planteó la realización de un diseño que permitiera optimizarlas de una sola vez, por lo que se escogió un diseño Doehlert de 4 factores [11,12]. La selección del punto central del diseño se obtuvo de la bibliografía [1-7], eligiendo los siguientes valores:

$$C_R: 1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$pH: 8.0$$

$$t_c: 15 \text{ minutos}$$

$$T_c: 70^\circ\text{C}$$

La Tabla A.1, recogida en el anexo, muestra la matriz del diseño, donde se puede observar que, la concentración de reactivo se estudia entre  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  y  $2.45 \times 10^{-3} \text{ M}$ , el pH entre 6.5 y 9.5, el tiempo de calentamiento entre 5 y 25 minutos y la temperatura de calentamiento entre 60 y 80° C.

Los valores de pH y concentración de reactivo se estudiaron a 7 niveles, al no estar claramente establecidos en la bibliografía, mientras que el tiempo y temperatura de calentamiento se estudiaron a 5 y 3 niveles, respectivamente.

La Tabla III.3, recogida a continuación, muestra los resultados obtenidos.

Tabla III.3. Resultados experimentales correspondientes al diseño I

N°	$hp_T$ (u.a.) <sup>1</sup>		N°	$hp_T$ (u.a.)	
	<i>Experimental</i>	<i>Predicha</i>		<i>Experimental</i>	<i>Predicha</i>
1	930160	835006	11	905711	910491
2	942789	908166	12	1010239	959139
3	959386	869810	13	207080	258180
4	770319	989672	14	813230	758448
5	992919	992919	15	177274	232056
6	1029932	1004990	16	975863	862392
7	805491	830429	17	112575	226046
8	1040643	1021530	18	915011	1010160
9	937800	956915	19	874135	908758
10	805317	800537	20	890780	980356
			21	683224	463871

<sup>1</sup> Altura total de pico dada en unidades arbitrarias del integrador.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas.

Del análisis gráfico de los residuales se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- *Normalidad*: Los valores experimentales de  $hp_T$ , cumplen la condición de normalidad.
- *Independencia*: La gráfica de los residuales frente a los valores predichos de la altura total de pico, muestra que no hay ninguna relación entre ésta y

los residuales y por tanto se acepta la hipótesis de independencia entre ellos.

- *Homocedasticidad*: La representación de los residuales frente a cada variable, indica que no hay indicios de desigualdad de varianzas y por tanto, se cumple la hipótesis de “homocedasticidad”.

Se puede observar, que los datos experimentales se ajustan al modelo, existiendo una buena concordancia entre éstos y la altura total de pico predicha (Tabla III.3), obteniéndose un valor de  $r^2 = 0.8906$ .

- Análisis de la varianza (ANOVA).

Los resultados obtenidos se reúnen en la Tabla III.4, pudiéndose observar que no existen interacciones entre las variables y que solo hay dos términos significativos ( $P < 5\%$ ), la concentración de reactivo y su término cuadrático.

Tabla III.4. Análisis de la varianza

Efecto	SC <sup>1</sup>	g.l. <sup>2</sup>	MC <sup>3</sup>	F <sub>cal</sub>	P (%)
$C_R$	7.2362x10 <sup>11</sup>	1	7.2362x10 <sup>11</sup>	25.27	2.40
$pH$	8.5659x10 <sup>08</sup>	1	8.5659x10 <sup>08</sup>	0.03	87.01
$t_C$	3.8091x10 <sup>10</sup>	1	3.8091x10 <sup>10</sup>	1.33	29.26
$T_C$	7.1703x10 <sup>09</sup>	1	7.1703x10 <sup>09</sup>	0.25	63.97
$C_R pH$	1.0345x10 <sup>08</sup>	1	1.0345x10 <sup>08</sup>	0.00	95.46
$C_R t_C$	4.2648x10 <sup>09</sup>	1	4.2648x10 <sup>09</sup>	0.15	71.68
$C_R T_C$	5.1572x10 <sup>07</sup>	1	5.1572x10 <sup>07</sup>	0.00	96.80
$pH t_C$	1.7878x10 <sup>10</sup>	1	1.7878x10 <sup>10</sup>	0.62	46.76
$pH T_C$	1.2645x10 <sup>08</sup>	1	1.2645x10 <sup>08</sup>	0.00	94.99
$T_C t_C$	2.0187x10 <sup>09</sup>	1	2.0187x10 <sup>09</sup>	0.07	80.22
$C_R^2$	2.7951x10 <sup>11</sup>	1	2.7951x10 <sup>11</sup>	9.76	2.05
$pH^2$	3.1739x10 <sup>09</sup>	1	3.1739x10 <sup>09</sup>	0.11	75.39
$t_C^2$	3.7708x10 <sup>09</sup>	1	3.7708x10 <sup>09</sup>	0.13	73.28
$T_C^2$	1.2340x10 <sup>09</sup>	1	1.2340x10 <sup>09</sup>	0.04	84.45
<b>Error total</b>	1.7178x10 <sup>11</sup>	6	2.8630x10 <sup>10</sup>		
<b>Total (corr.)</b>	1.5696x10 <sup>12</sup>	20			

- 1.- SC: Suma de cuadrados.
- 2.- g.l.: Grados de libertad.
- 3.- MC: Cuadrados medios = SC/g.l.

La relación entre la altura total de pico (variable respuesta) y las 4 variables a optimizar, viene dada por la ecuación:

$$\begin{aligned}
 hp_T = & -2.14796x10^6 + 8.23548x10^8 C_R + 26848 pH - 13832 t_C + 44730 T_C \\
 & + 5.16046x10^6 C_R pH + 5.73653 \cdot 10^6 C_R t_C + 518271 C_R T_C + 8914 pH t_C - 689 \\
 & pH T_C - 477 t_C T_C - 2.91325 \cdot 10^{11} C_R^2 - 23000 pH^2 - 752 t_C^2 - 255 T_C^2
 \end{aligned}$$



- Estimación de los valores óptimos.

Utilizando las derivadas parciales de la variable respuesta respecto a cada una de las variables a optimizar para calcular el punto crítico de dicha ecuación resulta:

$$\partial hp_T / \partial C_R = 8.23548 \times 10^8 - 5.8265 \times 10^{11} C_R + 5.16046 \times 10^6 \text{ pH} + 5.73653 \times 10^6 t_C + 518271 T_C$$

$$\partial hp_T / \partial \text{pH} = 26848 - 5.16046 \times 10^6 C_R - 46000 \text{ pH} + 8914 t_C + 689 T_C$$

$$\partial hp_T / \partial t_C = -13832 + 5.73653 \times 10^6 C_R + 8914 \text{ pH} - 1504 t_C - 477 T_C$$

$$\partial hp_T / \partial T_C = 44730 + 518271 C_R + 689 \text{ pH} - 477 t_C - 510 T_C$$

Igualando a cero dichas ecuaciones, se obtienen los siguientes resultados para el punto crítico, que aplicando el criterio de los signos de los autovalores [13] sería un punto de silla:

$C_R$ :	$1.55 \times 10^{-3} \text{ M}$
pH:	5.2
$t_C$ :	2 minutos
$T_C$ :	80 °C

*Los valores de pH y tiempo de calentamiento, además de encontrarse fuera del dominio experimental ensayado, suponen unas condiciones en las que no tiene lugar la reacción de dabsilación. Por otro lado, la temperatura de calentamiento, se encuentra al borde de dicho dominio, mientras que la concentración de reactivo presenta un valor situado dentro de la región experimental.*

Dado que estas coordenadas no tienen una significación química y teniendo en cuenta que es imposible obtener una representación gráfica de una superficie de respuesta para 5 variables, se procedió a estimar de forma aproximada los valores óptimos de las 4 variables, mediante el análisis gráfico de las superficies de respuesta de 2 en 2 factores [14]. En todas ellas se incluyó como una de las variables, la concentración de reactivo,  $C_R$ , ya que ésta y su término cuadrático, son las que presentan un efecto significativo. En la Figura III.4, se representa:

- Altura total de pico vs concentración de agente derivatizante y pH. (A)
- Altura total de pico vs concentración de agente derivatizante y tiempo de calentamiento. (B)
- Altura total de pico vs concentración de agente derivatizante y temperatura de calentamiento. (C)

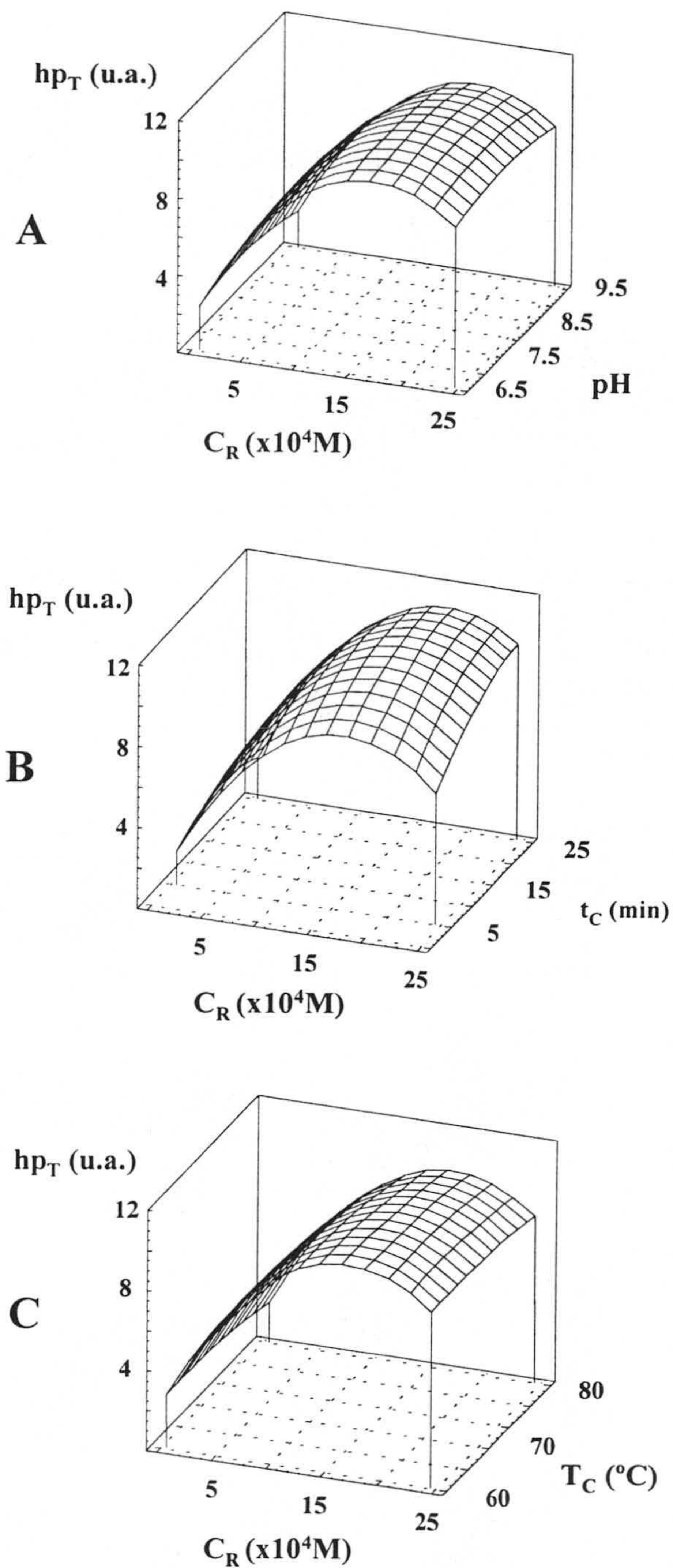


Figura III.4. Superficies de respuesta bifactoriales para el diseño I

Del estudio de estas gráficas se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- En la Figura A se observa un máximo local para una  $C_R$  aproximada de  $1.7 \times 10^{-3}$  M, a un pH aproximado de 8.

- En la Figura B se puede observar de nuevo la aparición de un máximo local para un valor de  $C_R$  de  $1.9 \times 10^{-3}$  M (cercano al obtenido en la gráfica anterior) y a un tiempo de calentamiento de 23 minutos.

- En la Figura C se observa la aparición de un máximo local a una temperatura cercana a los  $65^\circ\text{C}$  y a una concentración de reactivo de  $1.7 \times 10^{-3}$  M, que está en concordancia con lo obtenido en las 2 gráficas anteriores.

A la vista de los resultados aproximados obtenidos, se procedió a realizar una optimización de las variables, utilizando diseños de dos factores.

### **III.1.2.2. Diseño II. Optimización del pH y tiempo de calentamiento**

En primer lugar, se procedió a la realización de un diseño en el que se optimizaron el pH y el tiempo de calentamiento. El dominio experimental ensayado se amplió para valores superiores, considerando los resultados obtenidos en el Diseño I. Respecto a las otras dos variables, se trabajó con los siguientes valores:

$$C_R: 1.7 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$T_C: 65^\circ\text{C}$$

Se seleccionó como punto central del diseño, el correspondiente a un valor de pH de 9.0 y tiempo de calentamiento de 25 minutos.

La Tabla A.2 (ver anexo) recoge la matriz del diseño y en la Tabla III.5 se encuentran los valores experimentales y los predichos por el modelo.

**Tabla III.5. Resultados correspondientes al diseño II**

Nº	$hp_T$ (u.a.) <sup>1</sup>	
	<i>Experimental</i>	<i>Predicha</i>
1	897739	925053
2	768262	740876
3	946604	919230
4	988709	988672
5	419727	447028
6	968865	996178
7	735538	708151

<sup>1</sup> Altura total de pico dada en unidades arbitrarias del integrador.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Del análisis gráfico de los residuales, se deduce que se cumplen las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia necesarias para la verificación del modelo.

Como se puede observar en la Tabla III.5, existe una buena concordancia entre los valores de altura de pico obtenidos y los predichos por el modelo, tal como indica el valor

de  $r^2$  obtenido ( $r^2 = 0.9815$ ).

- Análisis de la varianza.

Se puede observar en la Tabla III.6 que ningún efecto es significativo, aunque el término correspondiente al pH y su término cuadrático presentan valores de P cercanos al 10%.

Tabla III.6. Análisis de la varianza

Efecto	SC	g.l.	MC	F <sub>cal</sub>	P (%)
<i>pH</i>	1.6722x10 <sup>11</sup>	1	1.6722x10 <sup>11</sup>	37.27	10.20
<i>t<sub>c</sub></i>	3.6868x10 <sup>08</sup>	1	3.6868x10 <sup>08</sup>	0.08	82.47
<i>pHt<sub>c</sub></i>	2.6962x10 <sup>09</sup>	1	2.6962x10 <sup>09</sup>	0.60	58.68
<i>pH<sup>2</sup></i>	6.2238x10 <sup>10</sup>	1	6.2238x10 <sup>10</sup>	13.87	16.47
<i>t<sub>c</sub><sup>2</sup></i>	5.7614x10 <sup>09</sup>	1	5.7614x10 <sup>09</sup>	1.28	45.20
<i>Error total</i>	4.4867x10 <sup>09</sup>	1	4.4867x10 <sup>09</sup>		
<i>Total (corr.)</i>	2.4269x10 <sup>11</sup>	6			

A partir de estos datos, se obtiene la siguiente función cuadrática,

$$hp_T = -5.1800 \times 10^{-6} + 1.3218 \times 10^6 pH + 59187 t_c - 2596 pHt_c - 76386 pH^2 - 697 t_c^2$$

recogiéndose su representación gráfica en la Figura III.5.

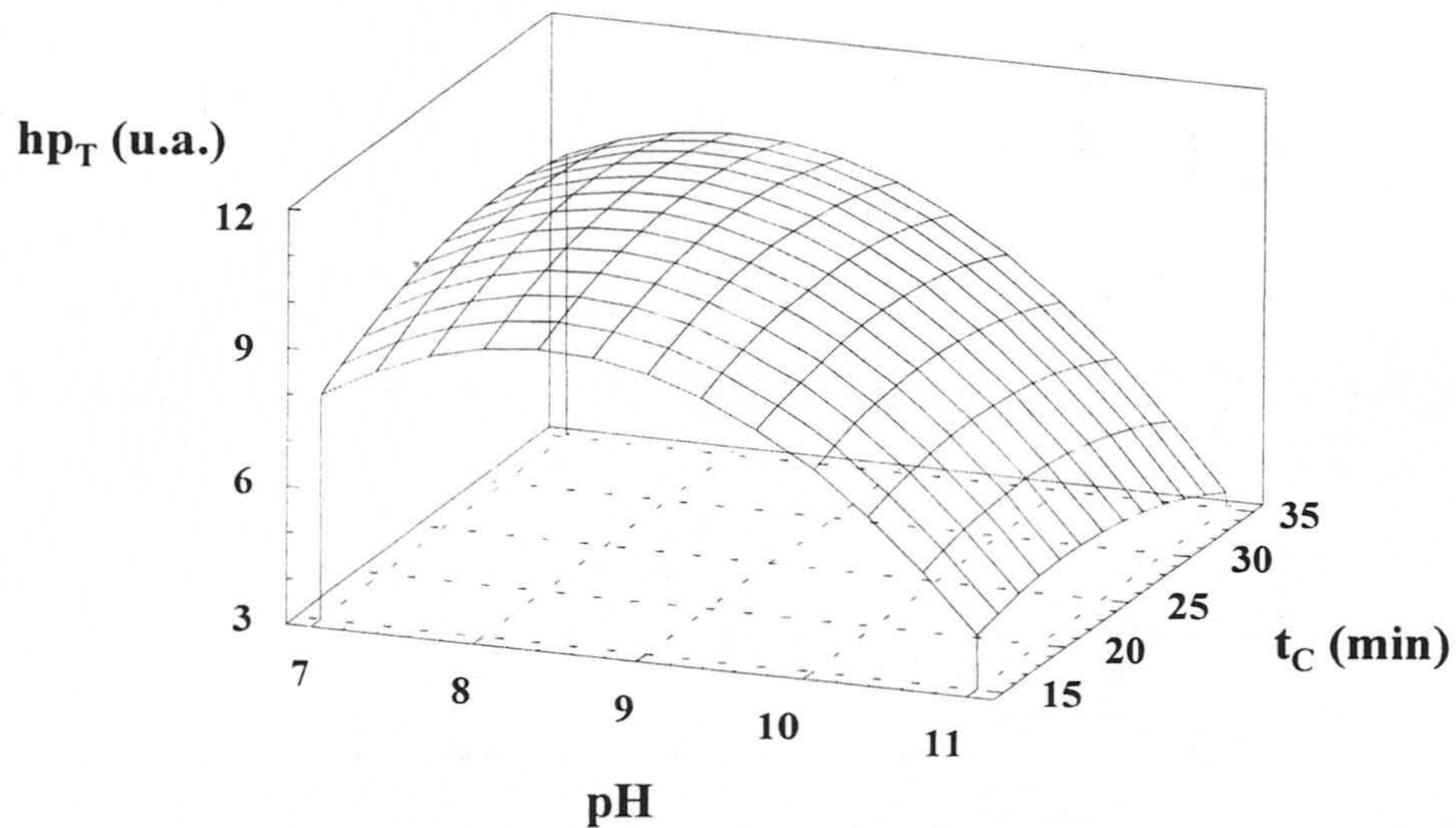


Figura III.5. Superficie de respuesta correspondiente al Diseño II

- Cálculo del óptimo.

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un máximo ya que:  $H(\text{pH}, t_C) = 2.06 \times 10^8 > 0$ , que  $\partial^2 hp_T / \partial \text{pH}^2 = -152772 < 0$  y que  $\partial^2 hp_T / \partial t_C^2 = -1394 < 0$

Las coordenadas del máximo son: **pH = 8.19** y  **$t_C = 27.2$  minutos**, valores muy próximos a los obtenidos gráficamente en el diseño I, al analizar las gráficas bifactoriales.

**III.1.2.2.a. Variación del pH a tiempo de calentamiento constante**

La ecuación que recoge la influencia del pH sobre la altura total de pico a un tiempo de calentamiento de 27.2 minutos es:

$$hp_T = -4085979 + 125482 pH - 76386 pH^2$$

En la Tabla III.7 se recogen los valores predichos para la variable respuesta al reemplazar en la ecuación el pH por distintos valores. Se puede observar que se produce la máxima señal para valores de pH de 8.0 y 8.5. Fuera de esos valores, se produce un considerable descenso de la altura total de pico.

**Tabla III.7. Influencia del pH a tiempo de calentamiento constante**

<i>pH</i>	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0
<i>hp<sub>T</sub> × 10<sup>-5</sup></i>	9.290	10.013	10.350	10.300	9.874	9.064	7.872	6.299	4.343

**III.1.2.2.b. Variación del tiempo de calentamiento a pH constante**

La relación entre la altura total de pico y el tiempo de calentamiento para un valor de pH = 8.2 es:

$$hp_T = 522539 + 37898 t_C - 697 t_C^2$$

En la Tabla III.8 se muestran los valores predichos por el modelo para la altura total de pico, al reemplazar en la ecuación anterior, el tiempo de calentamiento por distintos valores.



**Tabla III.8. Influencia del tiempo de calentamiento a pH constante**

$t_c$ (min.)	15	20	22	25	27	30	32	35
$hp_T \times 10^{-5}$	9.340	10.016	10.188	10.342	10.375	10.319	10.213	9.948

Los datos obtenidos muestran una constancia en la variable respuesta entre el minuto 25 y 30, pudiéndose ampliar la zona entre los minutos 22 y 32.

### **III.1.2.3. Diseño III: Optimización del tiempo y temperatura de calentamiento**

La variable que está aun sin optimizar es la temperatura de la reacción de dabsilación. Para su estudio se decidió plantear de nuevo un diseño de 2 factores, siendo el segundo factor en estudio, el tiempo de calentamiento, optimizado en el diseño anterior.

Dado que la temperatura no se había estudiado previamente, se ensayó a 5 niveles y el tiempo de calentamiento a 3.

En esta experiencia se trabajó con una *concentración de reactivo de  $1.75 \times 10^{-3} M$*  y  $a_{pH} = 8.2$ .

En este diseño, y como novedad respecto al anterior, se realizaron réplicas en el punto central, con objeto de estimar el error puro y detectar si el sistema presenta o no fallo de ajuste respecto al modelo cuadrático propuesto.

La matriz del diseño, y los resultados obtenidos (valores experimentales y predichos

para la altura total de pico) se recogen en las Tablas A.3 (anexo) y III.9, respectivamente.

**Tabla III.9. Resultados correspondientes al diseño III**

Nº	$hp_T$ (u.a.) <sup>1</sup>	
	<i>Experimental</i>	<i>Predicha</i>
1	899410	897424
2	914969	916895
3	868338	870270
4	974440	954036
5	955647	954036
6	933167	954036
7	898553	896274
8	918446	916461
9	921356	923282

<sup>1</sup> Altura total de pico en unidades arbitrarias del integrador.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Del análisis gráfico de los residuales, se deduce el cumplimiento de la normalidad, homocedasticidad e independencia, necesarias para la aplicación del modelo.

- Análisis de la varianza.

Los datos reunidos en la Tabla III.10 muestran que el término cuadrático de la temperatura presenta un valor de P cercano a la significación, mientras que el resto de los

términos, presentan valores de P superiores al 20%.

El valor de P obtenido para el test de fallo de ajuste (**P = 84.02%**) permite afirmar que el sistema se ajusta al modelo propuesto.

**Tabla III.10. Análisis de la varianza**

Efecto	SC	g.l.	MC	F <sub>cal</sub>	P (%)
$T_C$	$5.1875 \times 10^{08}$	1	$5.1875 \times 10^{08}$	1.22	38.51
$t_C$	$1.6158 \times 10^{08}$	1	$1.6158 \times 10^{08}$	0.38	60.68
$T_C t_C$	$3.9999 \times 10^{07}$	1	$3.9999 \times 10^{07}$	0.09	79.13
$T_C^2$	$6.0275 \times 10^{09}$	1	$6.0275 \times 10^{09}$	14.13	6.41
$t_C^2$	$1.1339 \times 10^{09}$	1	$1.1339 \times 10^{09}$	2.66	24.46
<b>Fallo ajuste</b>	$2.2995 \times 10^{07}$	1	$2.2995 \times 10^{07}$	0.05	84.02
<b>Error puro</b>	$8.5332 \times 10^{08}$	2	$4.2666 \times 10^{08}$		
<b>Total (corr.)</b>	$7.9671 \times 10^{09}$	8			

Los resultados experimentales se ajustan a la siguiente función polinómica,

$$hp_T = -2083960 + 10801 T_C + 14285 t_C - 63 T_C t_C - 709 T_C^2 - 230546 t_C^2$$

cuya representación gráfica se recoge en la Figura III.6.

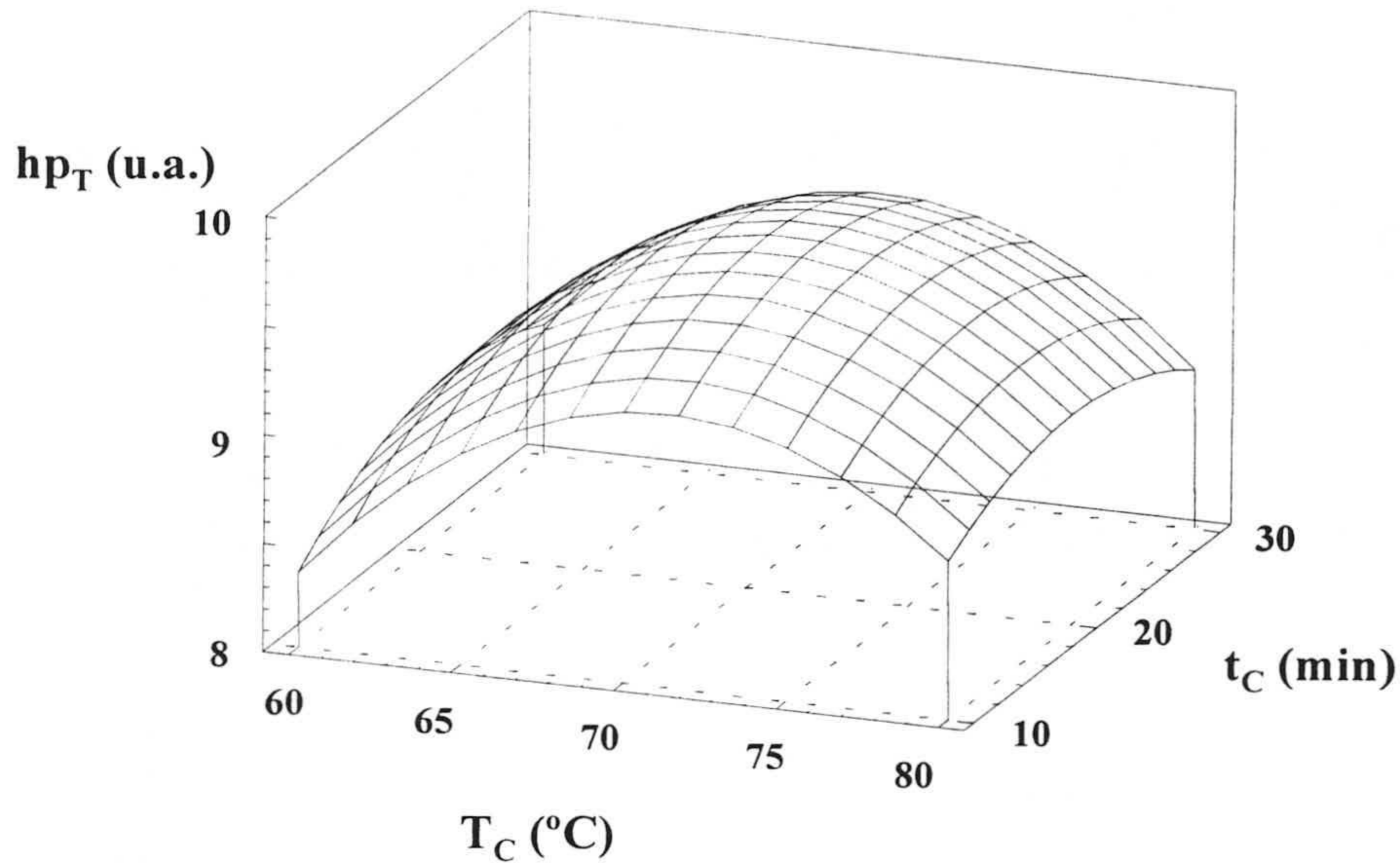


Figura III.6. Superficie de respuesta obtenida en el Diseño III

- Cálculo del óptimo.

Al aplicar el criterio de Lagrange se tiene que, por una parte, el Hessiano  $(T_C, t_C) = 650000 > 0$ , que  $\partial^2 hp_T / \partial T_C^2 = -1417 < 0$ , y que  $\partial^2 hp_T / \partial t_C^2 = -461 < 0$ .

Esto indica la presencia de un máximo cuyas coordenadas son:

$$T_C: 70.9^\circ\text{C}$$

$$t_C = 21.2 \text{ minutos}$$

Se puede observar, un menor tiempo de calentamiento al trabajar a mayor temperatura.

### III.1.2.3.a. Variación del tiempo de calentamiento a una temperatura constante

La influencia del tiempo de calentamiento a una temperatura fija, se obtiene al reemplazar en la ecuación anterior, la temperatura por su valor máximo. La ecuación resultante es solo función del tiempo de calentamiento para una temperatura de 71°C:

$$hp_T = 851065 + 9802 t_C - 231 t_C^2$$

En la Tabla III.11 se recogen los valores predichos de la variable respuesta al reemplazar en la ecuación anterior el tiempo de calentamiento por distintos valores.

Tabla III.11. Influencia del tiempo de calentamiento a una temperatura constante

$t_c(\text{min})$	10.0	12.5	15.0	17.5	20.0	22.5	25.0	27.5	30.0
$hp_T \times 10^{-5}$	9.260	9.375	9.462	9.520	9.548	9.549	9.520	9.462	9.366

Se puede observar que los valores mayores de altura de pico se obtienen para tiempos de calentamiento de entre 17.5 y 25.0 minutos.

### III.1.2.3.b. Variación de la temperatura a un tiempo de calentamiento constante

De forma similar se obtiene la influencia de la temperatura para un tiempo de calentamiento constante de 21.5 minutos. La ecuación resultante es:

$$hp_T = - 260204 + 100432 T_C - 709 T_C^2$$

En la Tabla III.12 se recogen los resultados obtenidos al darle diferentes valores a la temperatura en la ecuación anterior.

**Tabla III.12. Influencia de la temperatura a un tiempo de calentamiento constante**

$T_c$ (°C)	60.0	62.5	65.0	67.5	70.0	72.5	75.0	77.5	80.0
$hp_7 \times 10^{-5}$	8.717	9.057	9.309	9.472	9.547	9.533	9.433	9.239	8.959

Se observa una mayor influencia de la temperatura sobre la señal, manteniéndose ésta constante entre 67 y 72°C.

### **III.1.3. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE OPTIMIZACIÓN**

#### **III.1.3.1. Estudio de la influencia de la concentración de reactivo sobre la altura total de pico**

Concluida la optimización de las cuatro variables, se estudia la influencia de la concentración de reactivo (significativo en el diseño I), sobre la altura total de pico, manteniendo fijos los valores de las otras 3 variables, en los valores óptimos obtenidos en los diseños II y III:

*t<sub>c</sub>: 21 minutos*

*pH: 8.2*

*T<sub>c</sub>: 70°C*

Cuando se varía la concentración de reactivo entre  $0.25 \times 10^{-3}$  M y  $2.25 \times 10^{-3}$  M, se obtienen los resultados recogidos en la Tabla III.13, y representados en la Figura III.7.

Se puede observar que a partir de una concentración de reactivo  $1.00 \times 10^{-3}$  M (correspondiente a un exceso de reactivo de 20:1, en relación a la concentración total de aminas), la altura total de pico permanece prácticamente constante, y que el valor óptimo de  $1.75 \times 10^{-3}$  M, obtenido en el diseño I, está dentro de la zona donde en la que  $h_{p_T}$  permanece constante.

Tabla III.13. Estudio de la concentración de reactivo

$C_R$	$hp_T$ (u.a.) <sup>1</sup>
$0.25 \times 10^{-3}$ M	563754
$0.50 \times 10^{-3}$ M	843974
$0.75 \times 10^{-3}$ M	927009
$1.00 \times 10^{-3}$ M	960959
$1.25 \times 10^{-3}$ M	971322
$1.50 \times 10^{-3}$ M	969546
$1.75 \times 10^{-3}$ M	992813
$2.00 \times 10^{-3}$ M	976202
$2.25 \times 10^{-3}$ M	973702

1.- Altura de pico total dada en unidades arbitrarias del integrador.

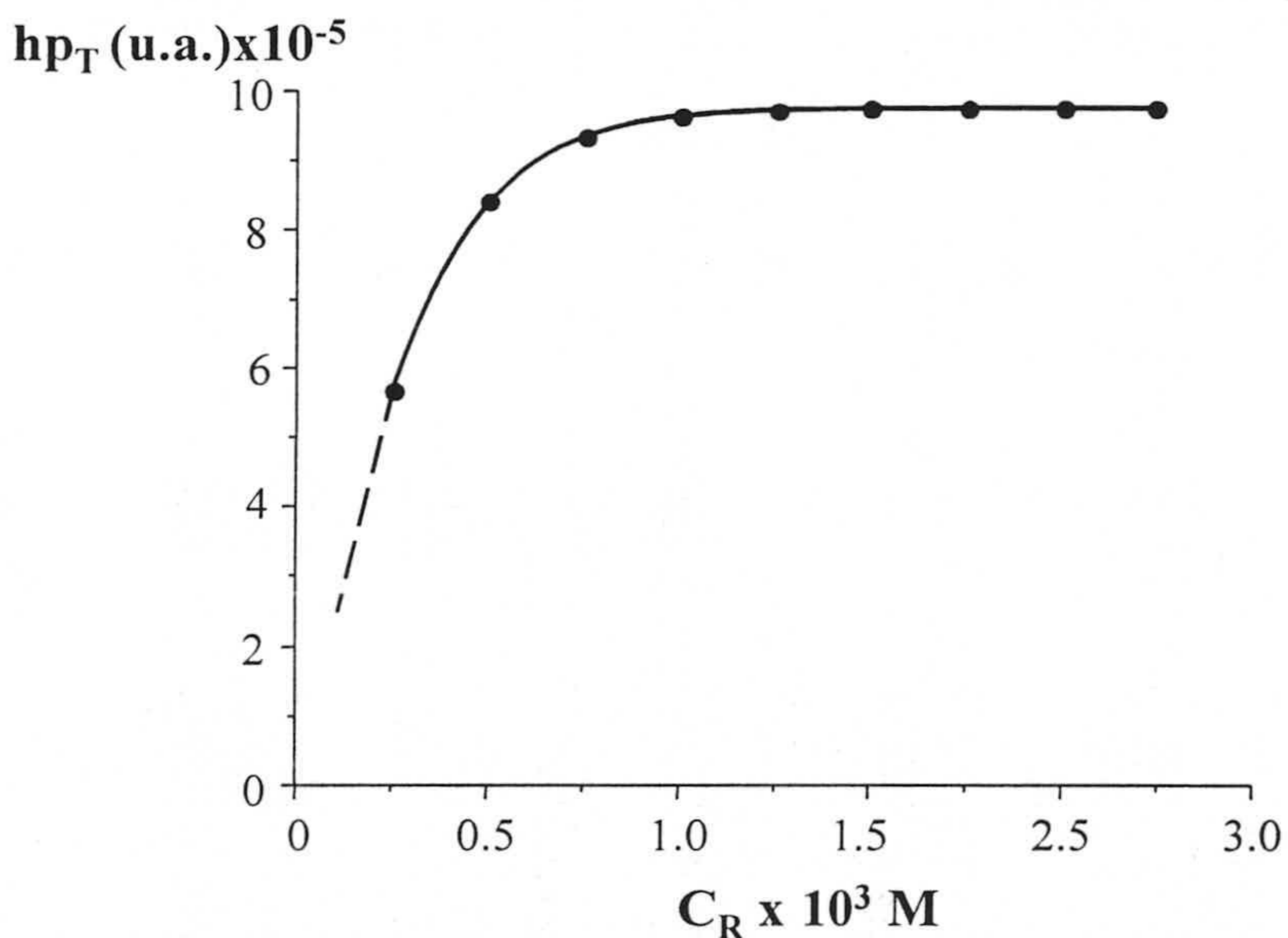


Figura III.7. Altura total de pico en función de la concentración de reactivo



**III.1.3.2. Diseño IV: Estudio de los valores óptimos de pH y tiempo de calentamiento a una concentración de reactivo de  $1.25 \times 10^{-3}$  M y temperatura de 70 °C**

Este diseño se realiza con objeto de verificar los resultados obtenidos. Para ello, se estudian de nuevo el pH y el tiempo de calentamiento, para una concentración de reactivo de  $1.25 \times 10^{-3}$  M, valor que está situado al inicio de la meseta encontrada en la experiencia anterior. La temperatura se fija a 70 °C.

De nuevo se emplea un diseño de 2 factores cuyo punto central presenta un valor de pH = 9 y un tiempo de calentamiento de 20 minutos. Los datos de la matriz del diseño, así como los resultados obtenidos, se reúnen en la Tabla A.4 (ver anexo) y III.14, respectivamente.

**Tabla III.14. Resultados experimentales obtenidos en el diseño IV**

Nº	$hp_T$ (u.a.) <sup>1</sup>	
	<i>Experimental</i>	<i>Predicha</i>
1	815795	781788
2	457835	491842
3	815618	849842
4	906252	906252
5	206965	172958
6	842853	808846
7	388118	422125

<sup>1</sup> Altura total de pico dada en unidades arbitrarias del integrador.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

El análisis gráfico de los residuales, permitió comprobar que se cumplen las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia.

Los resultados obtenidos, como valores reales, no codificados, se ajustan a la ecuación

$$hp_T = - 5880490 + 1559770 \text{ pH} + 51837 t_C + 2419 \text{ pH} t_C - 98740 \text{ pH}^2 - 1814 t_C^2$$

Los valores predichos por esta ecuación, cuya representación gráfica se recoge en la Figura III.8, están de acuerdo con los valores experimentales de  $hp_T$  ( $r^2 = 0.9848$ ).

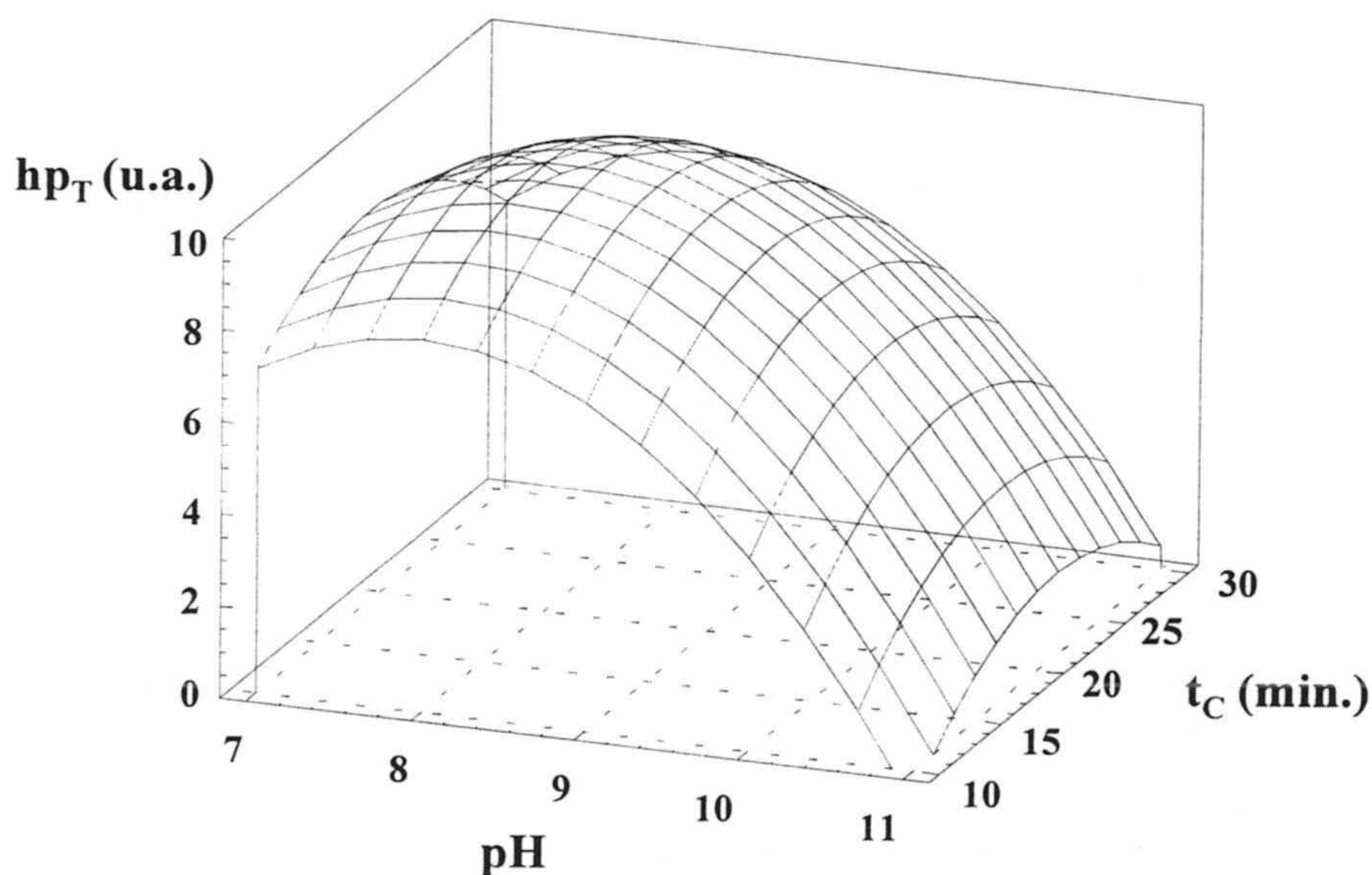


Figura III.8. Superficie de respuesta obtenida en el Diseño IV

- Cálculo del óptimo.

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un máximo ya que,  $H(pH, t_c) = 7.10 \times 10^8 > 0$ ,  $\partial^2 h_{p_T} / \partial pH^2 = -197480 < 0$  y  $\partial^2 h_{p_T} / \partial t_c^2 = -3627 < 0$ .

El máximo calculado presenta unas coordenadas de **pH = 8.14** y un **tiempo de calentamiento de 19.72 minutos**, confirmándose por tanto los resultados obtenidos en los diseños anteriores.

- Análisis de la varianza.

De la Tabla III.15 se deduce que no hay ningún efecto significativo, aunque el término lineal de pH sigue presentando un valor de P cercano al 5%.

**Tabla III.15. Análisis de la varianza**

Efecto	SC	g.l.	MC	F <sub>cal</sub>	P (%)
<i>pH</i>	3.4341x10 <sup>11</sup>	1	3.4341x10 <sup>11</sup>	49.49	8.87
<i>t<sub>c</sub></i>	4.5495x10 <sup>08</sup>	1	4.5495x10 <sup>08</sup>	0.07	84.26
<i>pHt<sub>c</sub></i>	2.3414x10 <sup>09</sup>	1	2.3414x10 <sup>09</sup>	0.34	66.99
<i>pH<sup>2</sup></i>	1.0400x10 <sup>11</sup>	1	1.0400x10 <sup>11</sup>	14.99	15.87
<i>t<sub>c</sub><sup>2</sup></i>	3.8983x10 <sup>10</sup>	1	3.8983x10 <sup>10</sup>	5.62	25.06
<i>Error total</i>	6.9389x10 <sup>09</sup>	1	6.9389x10 <sup>09</sup>		
<i>Total (corr.)</i>	4.5762x10 <sup>11</sup>	6			

### **III.1.4. CONCLUSIONES FINALES: PROCEDIMIENTO PARA LA REACCIÓN DE DABSILACIÓN**

Con objeto de comprobar que las condiciones óptimas encontradas para la derivatización de triptamina, feniletilamina, putrescina y cadaverina, son igualmente válidas para las cuatro aminas restantes (histamina, tiramina, espermidina y espermina) se comparan las áreas y alturas de los picos obtenidos a partir de una disolución de las ocho aminas. Para ello, se somete dicha disolución al proceso de derivatización en las condiciones iniciales, y en las obtenidas en el proceso de optimización, empleando el programa de elución mostrado en la página 172.

Los resultados obtenidos cuando se realizaron 6 réplicas, se muestran en la Tabla III.16, donde se puede observar un aumento en las señales de la histamina, tiramina, espermidina y espermina, así como una mejora en la precisión de las alturas y áreas de pico de las ocho aminas, respecto a la metodología empleada antes del proceso de optimización.

Tabla III.16. Evaluación del proceso de optimización

Amina	Antes de la optimización				Después de la optimización			
	$hp^1$	$DER\% hp^2$	$Ap^1$	$DER\% Ap^2$	$hp$	$DER\% hp$	$Ap$	$DER\% Ap$
<i>Triptamina</i>	164863	2.68	2139588	2.43	164921	2.80	2288841	0.98
<i>Feniletillamina</i>	170400	2.59	2203274	2.42	170658	1.91	2218521	0.91
<i>Putrescina</i>	282810	3.36	3797018	2.48	283023	2.60	4054449	2.50
<i>Cadaverina</i>	274409	2.69	3672270	2.56	394930	1.50	5585845	2.00
<i>Histamina</i>	135253	10.70	2188304	12.83	140727	5.00	2200645	5.59
<i>Tiramina</i>	230413	8.10	2281680	6.90	339647	2.56	3500464	2.50
<i>Espermidina</i>	220555	8.00	2140356	8.10	432255	5.80	4233569	5.89
<i>Espermina</i>	141597	10.90	1428506	10.86	424350	4.00	6107202	0.99

<sup>1</sup> Altura y área de pico en unidades arbitrarias.

<sup>2</sup> Valor obtenido para seis réplicas.

De todas las experiencias realizadas, se pueden sacar las siguientes conclusiones, que están resumidas en la Tabla III.17:

- ▶ Se debe de trabajar con una concentración de reactivo mínima de  $1.00 \times 10^{-3}$  M.
- ▶ El pH de la reacción de derivatización, debe situarse sobre 8.2, siendo una variable crítica, debido a que a pH superiores a 8.5 e inferiores a 8.0, la señal analítica disminuye considerablemente.
- ▶ La temperatura de la reacción de derivatización debe estar alrededor de  $70^{\circ}\text{C}$ .
- ▶ El tiempo de calentamiento debe ser aproximadamente de 21 minutos, que es ligeramente mayor que los señalados en bibliografía [4].

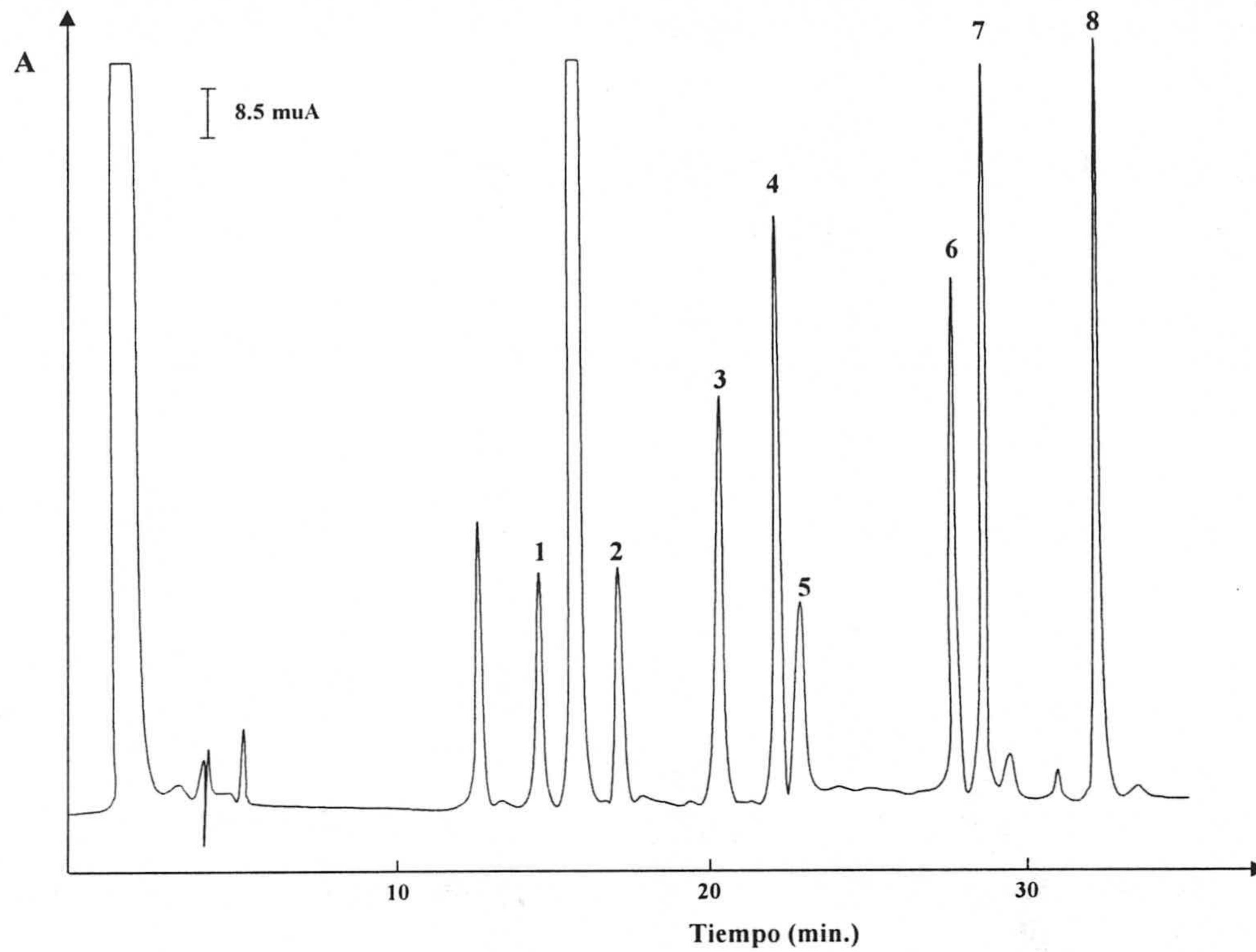
**Tabla III.17. Valores óptimos de las variables estudiadas**

<i>Variable</i>	<i>Valor óptimo</i>
<i>Concentración de reactivo (<math>C_R</math>)</i>	<i><math>1.75 \times 10^{-3} \text{M}</math></i>
<i>pH de la reacción</i>	<i>8.2</i>
<i>Temperatura (<math>T_{\mathcal{D}}</math>)</i>	<i><math>70^{\circ}\text{C}</math></i>
<i>Tiempo de calentamiento (<math>t_{\mathcal{D}}</math>)</i>	<i>21 minutos</i>

Una vez estudiada la influencia que las principales variables ejercen sobre la reacción de dabsilación de las aminas biógenas, se concluye que de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Se toma un volumen de hasta 2 ml de la disolución que contiene a las aminas ( si es necesario se diluye con disolución 0.1 M de HCl, teniendo un 0.2% (m/v) de ácido 3,3'-tiodipropiónico) y se ajusta a pH 8.2, con una disolución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.15 M, llevando a continuación a 3.8 ml con agua desionizada. Se añade 1.6 ml de la disolución de cloruro de dabsilo 12.4 mM, y se mezcla y calienta en un baño de agua a una temperatura de 70 °C, durante 21 minutos. A continuación se adicionan 4.6 ml de la disolución de dilución y se deja la mezcla en el baño de agua durante aproximadamente 20 minutos, agitando cada 2-3 minutos.

De esta manera es posible la es posible la obtención de derivados dabsilados de una manera repetible. En la Figura III.9 se muestra un cromatograma tipo de las ocho aminas, después del proceso de dabsilación.



**Figura III.9. Cromatograma ilustrativo de las 8 aminas biógenas dabsiladas siguiendo el procedimiento propuesto. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina.**



## **III.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA**

Una vez optimizados los parámetros de la reacción de dabsilación, utilizando las condiciones cromatográficas propuestas por Bockhardt y col. [7], se observó que la resolución del cromatograma,  $R_s$ , definida respecto a la pareja de picos cadaverina/histamina, por ser los peor resueltos, era de 1.320, con un coeficiente de variación de 9.41% para seis determinaciones. Dicha resolución se puede considerar como no aceptable [15] para la obtención de resultados cuantitativos precisos. Por esta razón, se estimó conveniente proceder a la optimización de los principales parámetros cromatográficos.

### **III.2.1. TEMPERATURA DE LA COLUMNA**

Puesto que la temperatura es un parámetro crítico para la reacción de dabsilación, se pensó optimizar en primer lugar la temperatura de la columna cromatográfica.

Para evaluar la influencia de la temperatura de la columna sobre la separación de los derivados dabsilados, se realizaron 5 experiencias, variando la temperatura de la misma entre 35 y 62°C, manteniendo constantes el resto de las condiciones cromatográficas.

Los resultados obtenidos a partir del registro de los cromatogramas correspondientes se recogen en las Tablas A.5 y A.6 (ver anexo), y se representan en las Figuras III.10-III.12.

Los valores de resolución obtenidos para las distintas temperaturas, se recogen en la Tabla III.18 y se representan en la Figura III.13.

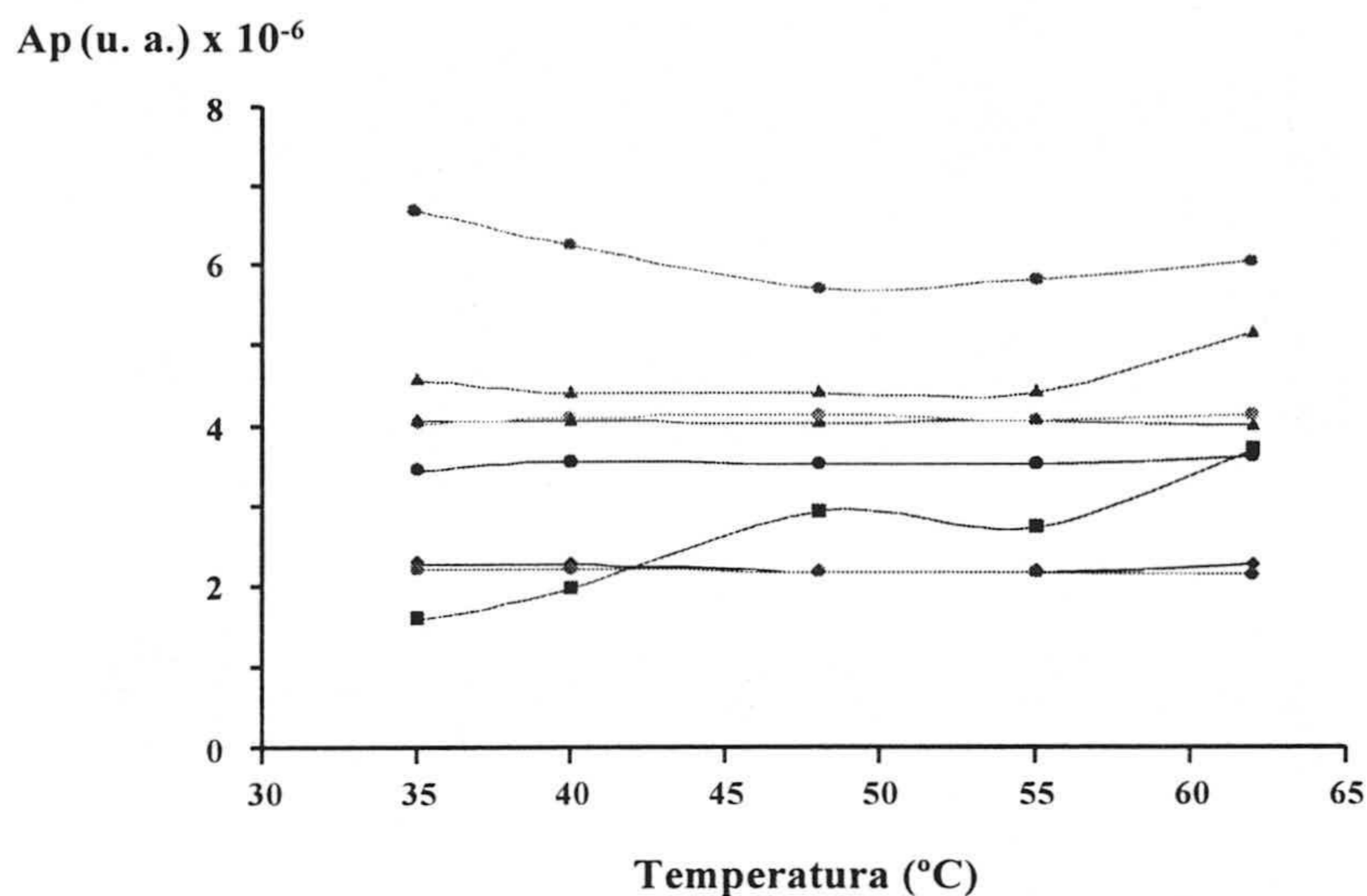


Figura III.10. Influencia de la temperatura de la columna sobre el área de pico. (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (●) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

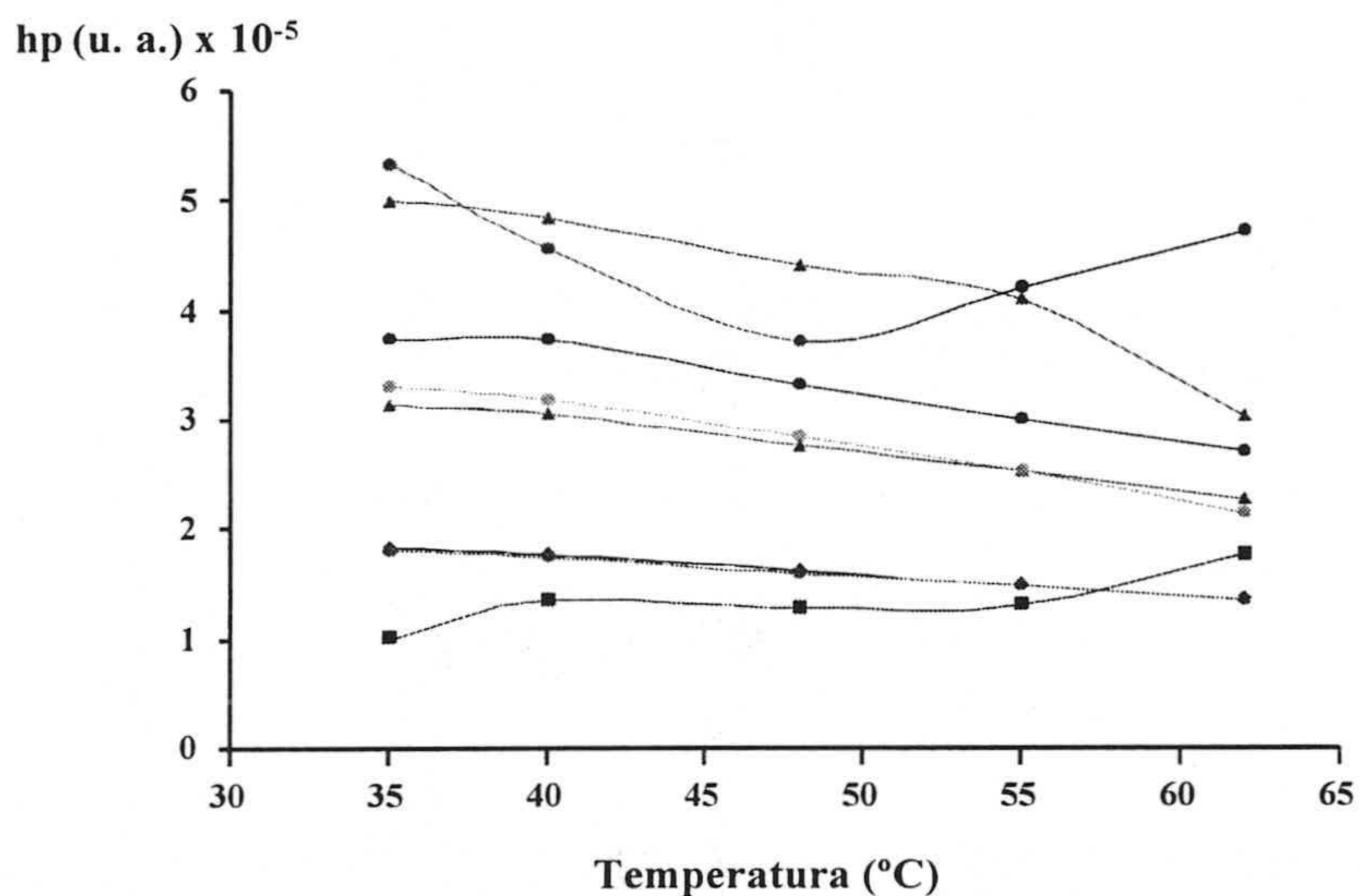
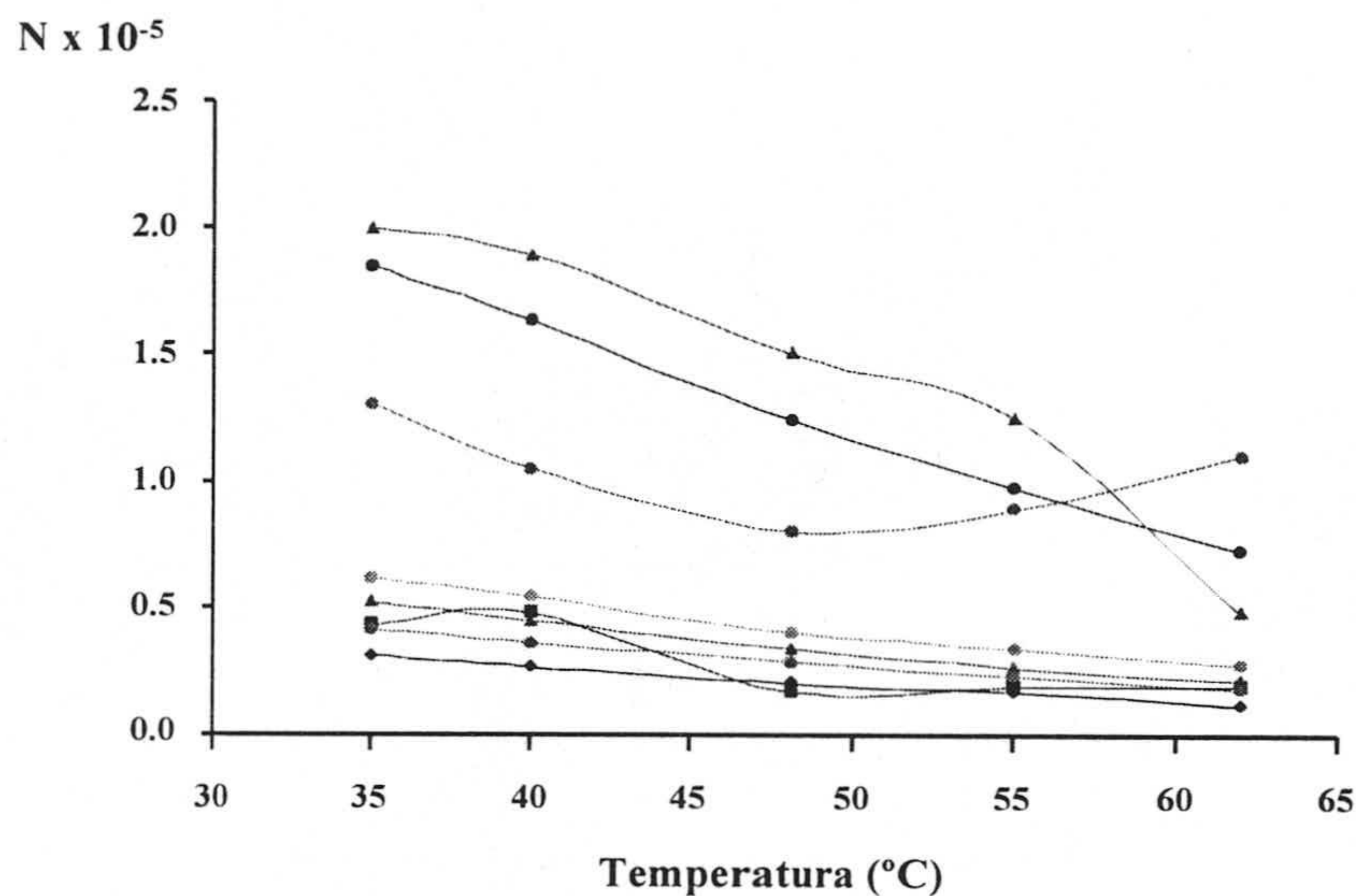


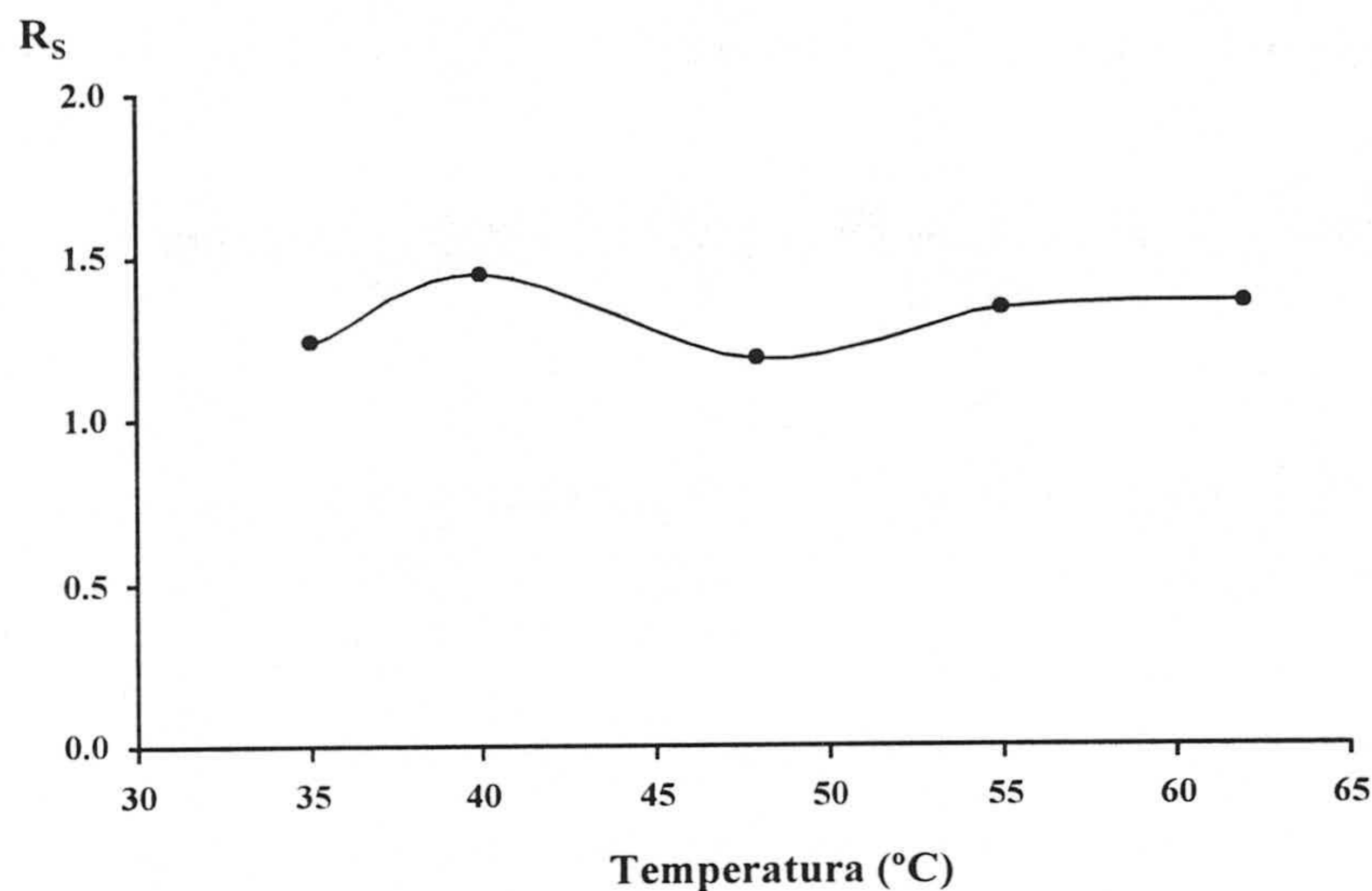
Figura III.11. Influencia de la temperatura de la columna sobre la altura de pico. (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (●) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.



**Figura III.12. Influencia de la temperatura de la columna sobre N.** (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (◉) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

**Tabla III.18. Influencia de la temperatura de la columna sobre la resolución entre la cadaverina e histamina**

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>R<sub>s</sub></i>
35	1.233
40	1.446
48	1.179
55	1.335
62	1.358



**Figura III.13. Influencia de la temperatura de la columna sobre la resolución**

De los resultados obtenidos, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

*-Un aumento de la temperatura a la que tiene lugar la separación cromatográfica, origina una disminución en la altura de los picos de los analitos, siendo más acusada a partir de 48 °C, excepto para la histamina y espermina, que a mayor temperatura, presentan mayor altura de pico; sin embargo, las áreas de pico, experimentan una menor variación con la temperatura, excepto la histamina y espermina.*

*-El número de platos teóricos de la columna para cada analito, disminuye de forma general a medida que la separación se realiza a mayor temperatura.*

*- La resolución entre la cadaverina e histamina es máxima a una temperatura de 40 °C ( $R_s = 1.446$ ).*

**Por tanto, para posteriores experiencias se seleccionó como temperatura de trabajo de la columna, 40 °C en la cual la resolución es máxima.**

### **III.2.2. COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL**

#### **III.2.2.1. Influencia del pH de la disolución reguladora en el eluyente A**

Para determinar el valor óptimo del pH de la disolución reguladora de la fase móvil, se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que se varió el mismo entre 4 y 8, manteniendo constante la concentración de dicha disolución en 9 mM. Los pH 4 y 5 se ajustaron con una disolución reguladora ácido acético-acetato sódico y los comprendidos entre 6 y 8 con dihidrogenofosfato y monohidrogenofosfato sódico.

En todos los casos, los porcentajes de Dimetilformamida y Trietilamina en el eluyente A fueron del 4 % y 0.18 % (v/v/v), respectivamente.

Con objeto de obtener datos para calcular la repetibilidad de áreas y alturas de pico, se realizaron réplicas para cada valor de pH.

La Tabla A.7 reúne los datos correspondientes a las áreas de pico, expresadas como valores medios, así como los datos relativos a la desviación estándar relativa y en la Figura III.14 se representan dichos resultados. La Tabla A.8 y la Figura III.15 contienen los datos correspondientes a las alturas de pico.

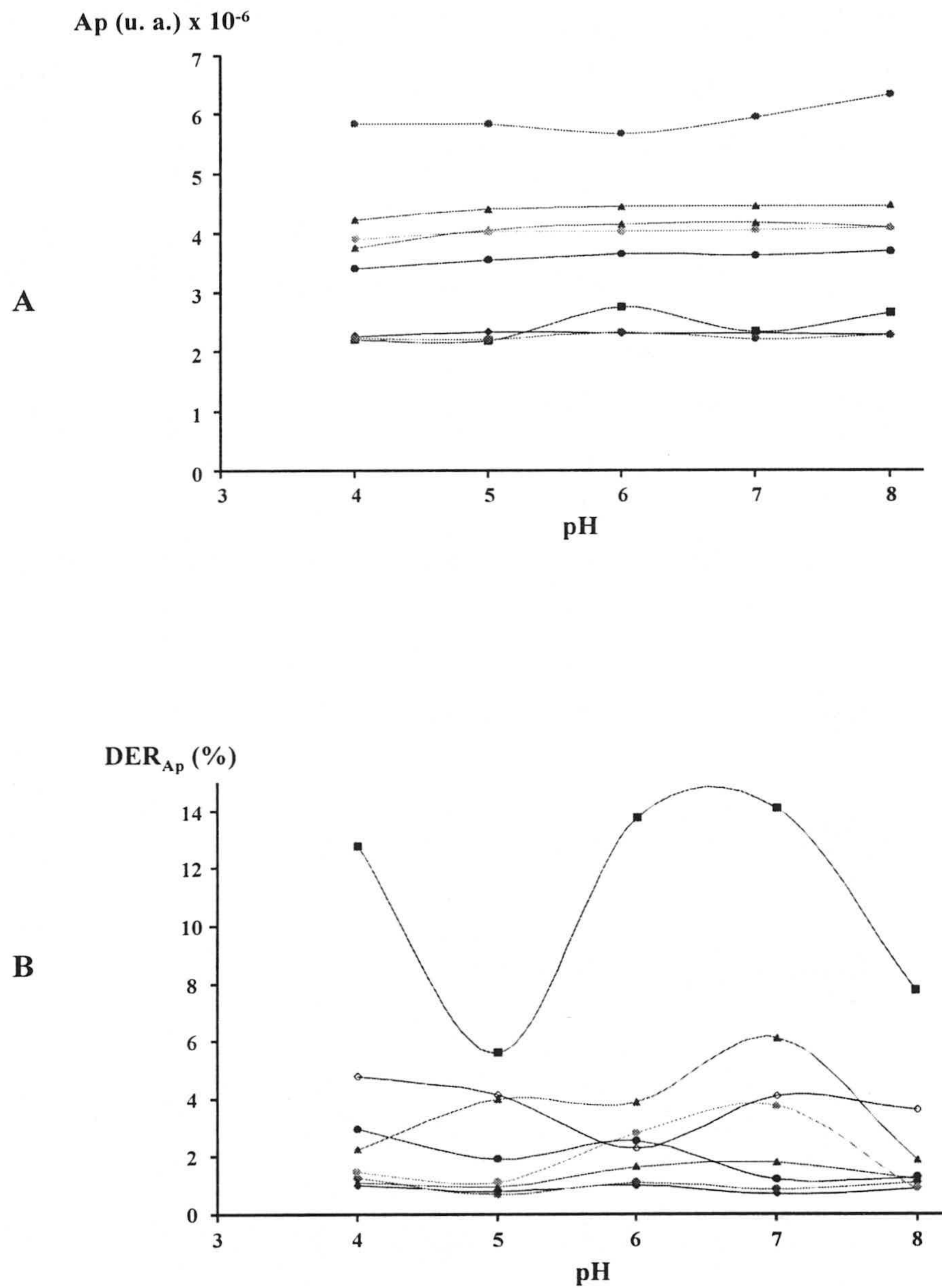


Figura III.14. Influencia del pH sobre: (A) Área de pico y (B) desviación estándar relativa (%). (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (●) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

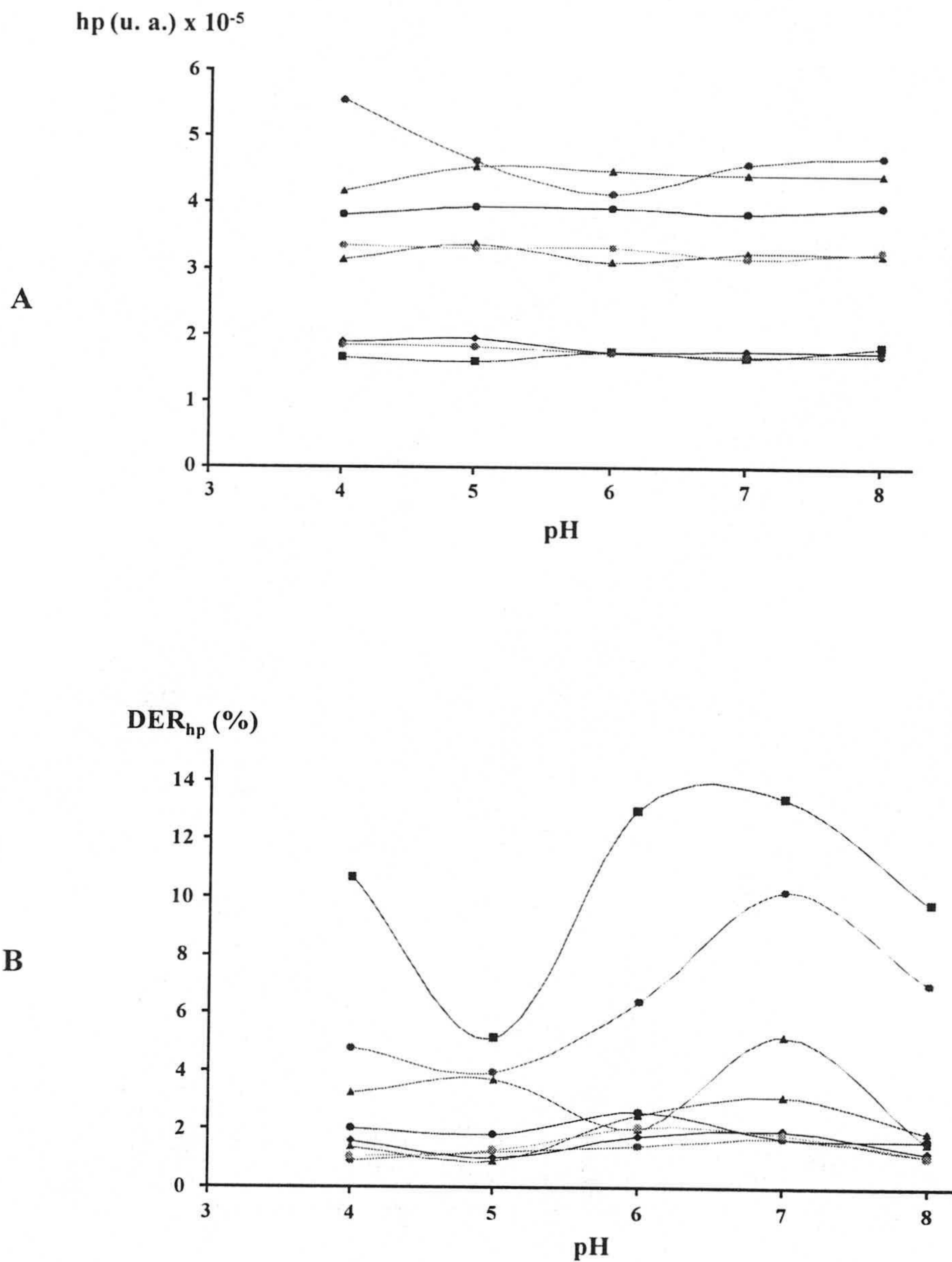


Figura III.15. Influencia del pH sobre: A) Altura de pico y B) desviación estándar relativa (%). (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (◐) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

La variación de la resolución ente la cadaverina y histamina en función del pH de la disolución reguladora utilizada en la fase móvil, así como su desviación estándar relativa, se recoge en la Tabla III.19, y se representa en la Figura III.16.

Tabla III.19. Valores de la resolución obtenida para los pH ensayados

pH	$R_s$	n	DER (%)
4	1.512	7	2.82
5	1.510	6	2.59
6	1.387	7	1.67
7	1.339	6	3.60
8	1.379	6	1.94

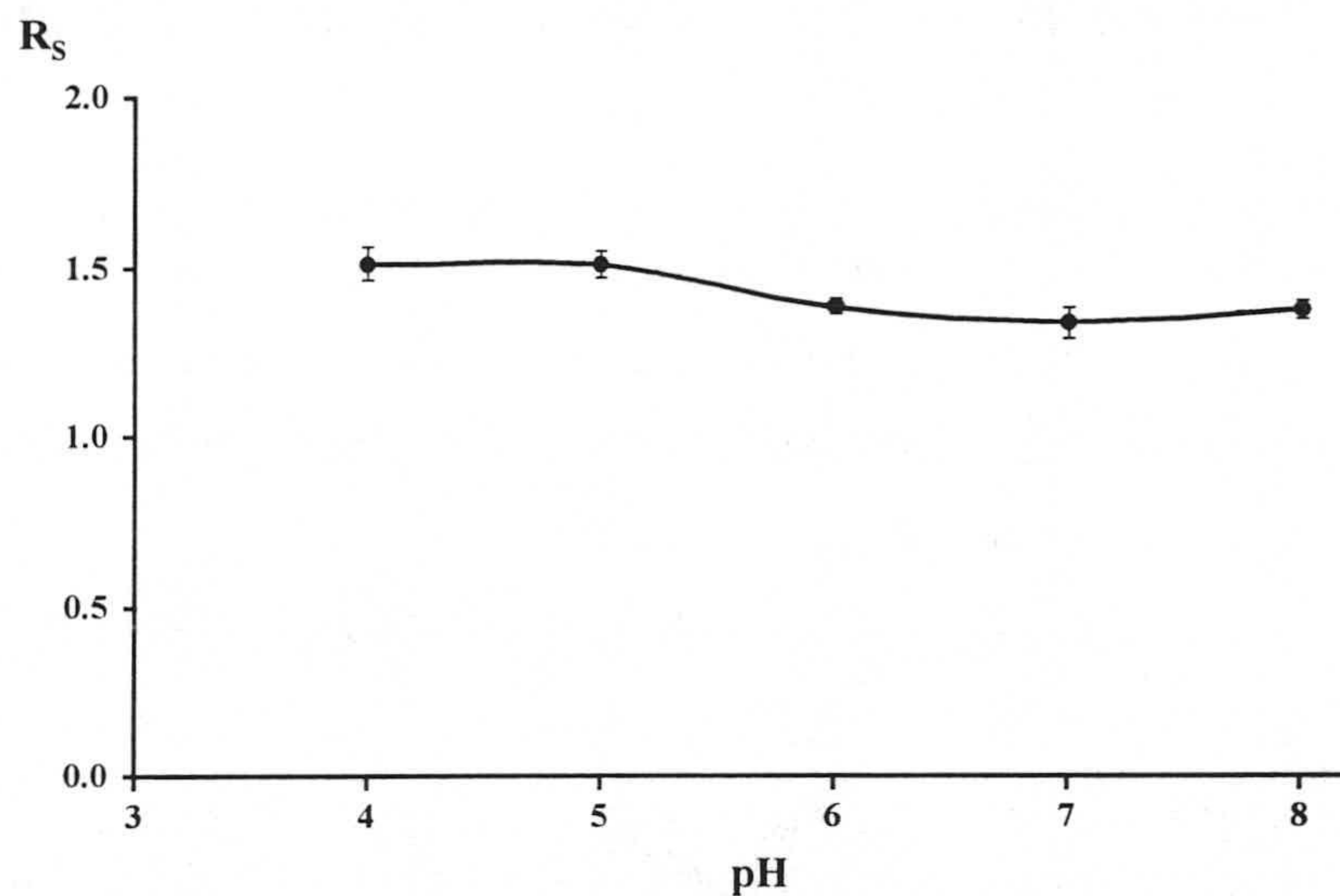


Figura III.16. Variación de la resolución en función del pH



A la vista de los resultados, se puede concluir que:

*-En relación a la repetibilidad hay que señalar que tanto para el área como la altura de pico se obtienen en la mayor parte de los casos unos valores de desviación estándar relativa inferiores al 4 %. La histamina es la que muestra una mayor dispersión en los valores de área y altura de pico con valores de DER (%), que varían entre un 5 y un 15 %.*

*-La resolución ente la cadaverina y histamina es mayor a medida que disminuye el pH de la disolución reguladora utilizada en la fase móvil, siendo superior a 1.5 a pH inferiores a 5, y oscilando entre 1.3 y 1.4 a pH superiores.*

Por lo tanto, *se seleccionó como pH adecuado de la disolución reguladora de la fase móvil, un valor de 5, ya que los valores de desviación estándar relativa para las áreas y alturas de pico son los más bajos, y la resolución es aceptable [15].*

### **III.2.2.2. Influencia de la concentración de la disolución reguladora utilizada en la fase móvil**

Fijado el pH de la disolución reguladora empleada en la fase móvil, se estudió cual era la concentración óptima de la misma. Para ello, se registraron una serie de cromatogramas variando su concentración entre 11 y 130 mM, manteniendo constante el resto de los parámetros cromatográficos.

La influencia que la concentración de la disolución reguladora ejerce sobre el área y la altura de pico se representa en las Figuras III.17 y III.18, y los datos correspondientes se encuentran en la Tabla A.9.

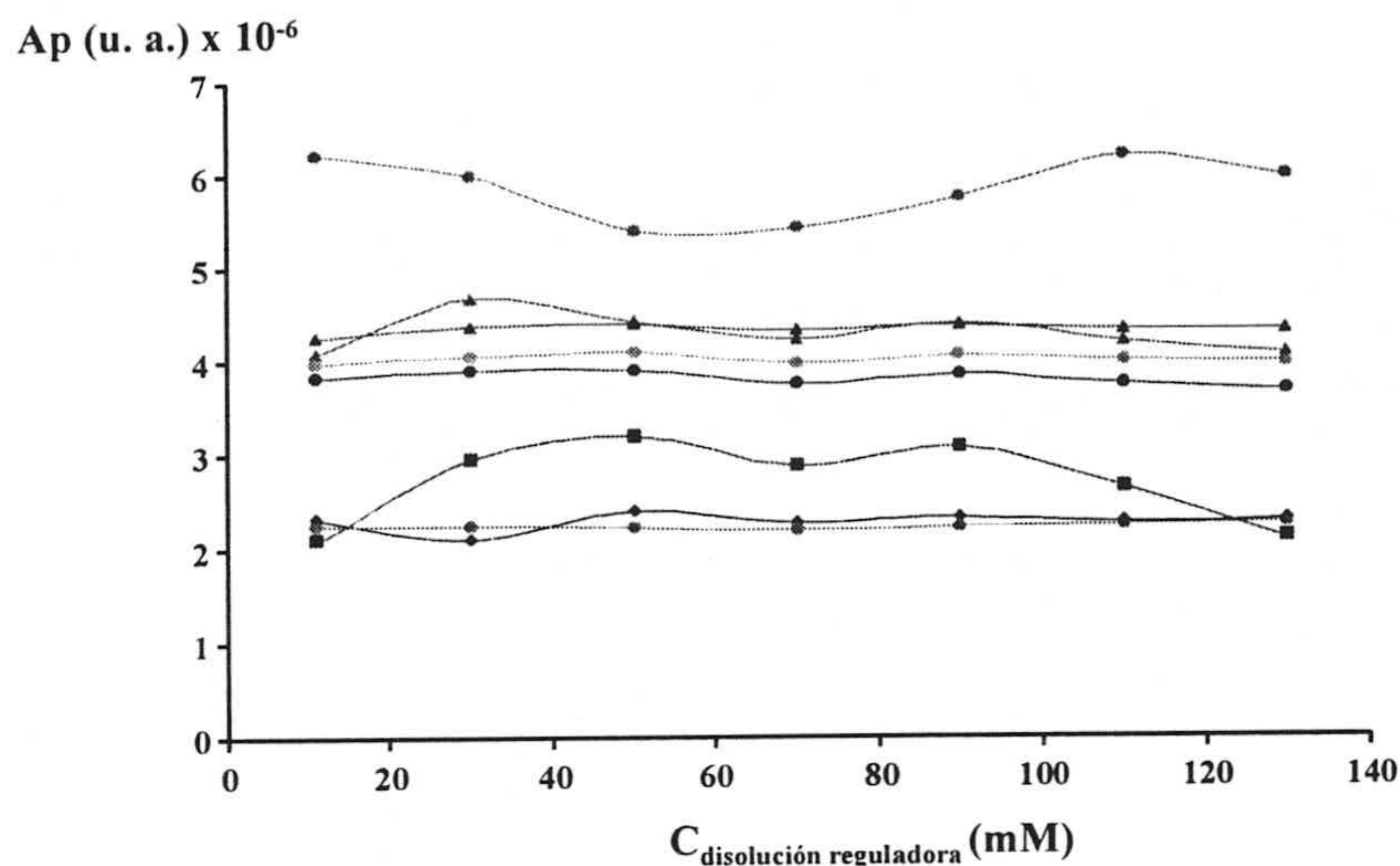


Figura III.17. Influencia de la concentración de la disolución reguladora sobre el área de pico. (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (◐) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

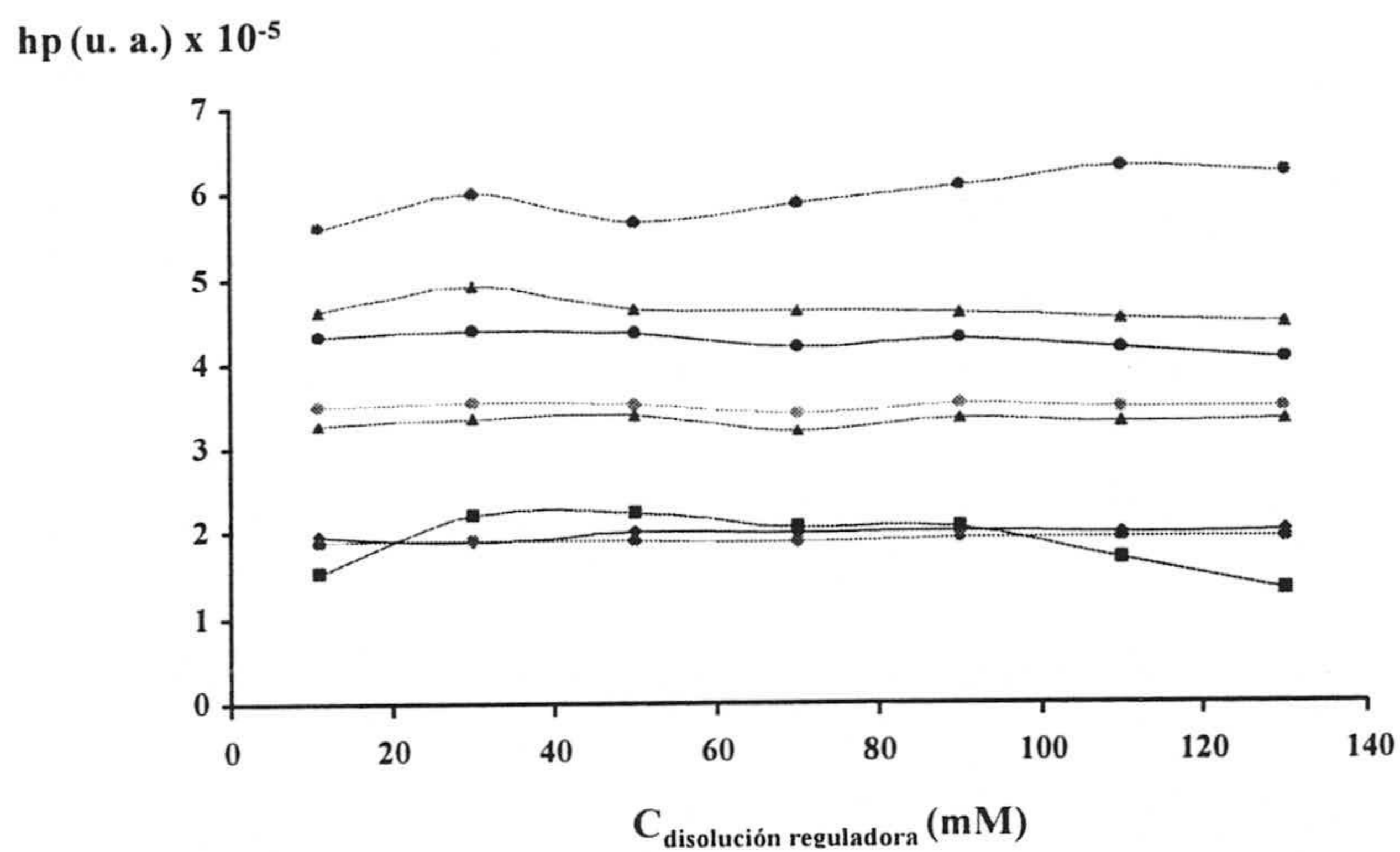


Figura III.18. Influencia de la concentración de la disolución reguladora sobre la altura de pico. (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (◐) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

La resolución obtenida en cada caso se recoge en la Tabla III.20 y se representa en la Figura III.19.

Tabla III.20. Variación de la resolución en función de la concentración de la disolución reguladora

$C_{\text{disolución reguladora}} \text{ (mM)}$	$R_s$
11	1.548
30	1.612
50	1.597
70	1.596
90	1.596
110	1.575
130	1.574

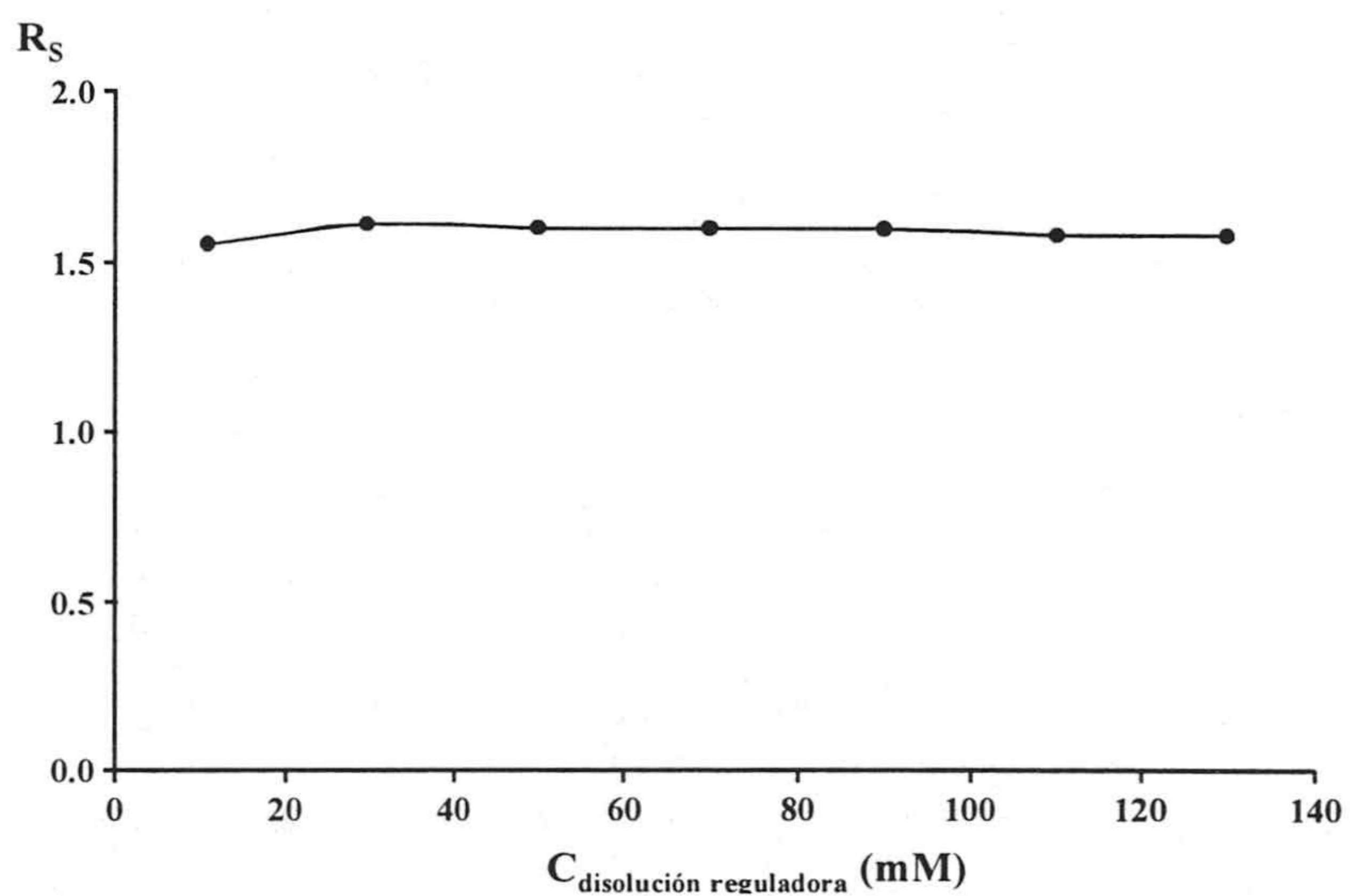


Figura III.19. Influencia de la concentración de la disolución reguladora sobre la resolución

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

*-La concentración de la disolución reguladora, en el intervalo estudiado, no ejerce una gran influencia sobre los valores de área y altura de pico de los derivados dabsilados, salvo en el caso de la histamina, que solo se mantienen constantes en la zona central del intervalo estudiado.*

*-La resolución se mantiene constante sobre 1.6 para las concentraciones de disolución reguladora comprendidas entre 30 y 90 mM, disminuyendo ligeramente a concentraciones superiores e inferiores.*

A partir de esta experiencia *se establece una concentración óptima de disolución reguladora de 40 mM.*

### **III.2.2.3. Estudio de la influencia de los porcentajes de trietilamina y dimetilformamida**

Para conocer la influencia sobre la resolución del porcentaje de trietilamina (TEA) y dimetilformamida (DMF) en el eluyente A de la fase móvil, así como la posible interacción entre ambas variables, se realizó un estudio conjunto de las mismas utilizando el diseño Doehlert. En esta ocasión, no se observó una variación sobre la altura y área de pico al cambiar estos dos factores.

#### **III.2.2.3.a. Diseño I**

El punto central del diseño (0,0), se corresponde con los valores óptimos indicados por A. Bockhardt y col. [7], o sea, 4% de DMF y 0.18% de TEA.

El porcentaje de TEA se varió desde un 0.06 hasta un 0.30% y el de DMF desde un 2 hasta un 6%.

Se procedió siguiendo la manera habitual de trabajo, dejando suficiente tiempo entre los cromatogramas para estabilizar la nueva fase móvil. La matriz del diseño se recoge en la Tabla A.10, mientras que los valores experimentales y predichos de la resolución se recogen en la Tabla III.21.

**Tabla III.21. Resultados correspondientes al diseño I**

Nº	<i>Resolución</i> <sup>1</sup>	
	<i>Experimental</i>	<i>Predicha</i>
1	1.323	1.340
2	1.361	1.344
3	1.493	1.510
4	1.527	1.527
5	1.507	1.490
6	1.603	1.620
7	1.652	1.635

<sup>1</sup> Resolución obtenida entre la cadaverina e histamina.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Del análisis gráfico de los residuales, se deduce que se cumplen las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia necesarias para la verificación del modelo.

Como se puede observar en la Tabla III.21, existe una buena concordancia entre los valores de resolución obtenidos y los predichos por el modelo, tal como indica el valor de  $r^2$  obtenido ( $r^2 = 0.980$ ).

- Análisis de la varianza.

En la Tabla III.22, se observa que ningún efecto es significativo ( $P > 5\%$ ). Solo el % DMF puede presentar indicios de significación. El término cruzado que relaciona los porcentajes de TEA y DMF no es significativo ( $P = 91.67\%$ ) y por tanto no existe interacción entre estas variables.

Tabla III.22. Análisis de la varianza

Efecto	SC	g.l.	MC	F <sub>cal</sub>	P (%)
% TEA	0.00029	1	0.00029	0.17	75.41
% DMF	0.08151	1	0.08151	47.94	9.01
%TEA%DMF	0.00003	1	0.00003	0.02	91.67
%TEA <sup>2</sup>	0.00049	1	0.00049	0.29	69.20
%DMF <sup>2</sup>	0.00149	1	0.00149	0.88	52.86
<i>Error total</i>	0.00170	1	0.00170		
<i>Total (corr.)</i>	0.08502	6			

Los resultados experimentales de este diseño se ajustan a la siguiente función cuadrática:

$$R_s = 1.0405 + 0.6653 \%TEA + 0.1383 \%DMF + 0.0292 \%TEA\%DMF - 1.8750 \%TEA^2 - 0.0088 \%DMF^2$$

que recoge la relación entre la resolución y las concentraciones de TEA y DMF expresadas como % (v/v/v) en el eluyente A de la fase móvil.

Su representación gráfica se recoge en la Figura III.20, donde se observa la presencia de un posible máximo, pero fuera de la zona experimental estudiada.

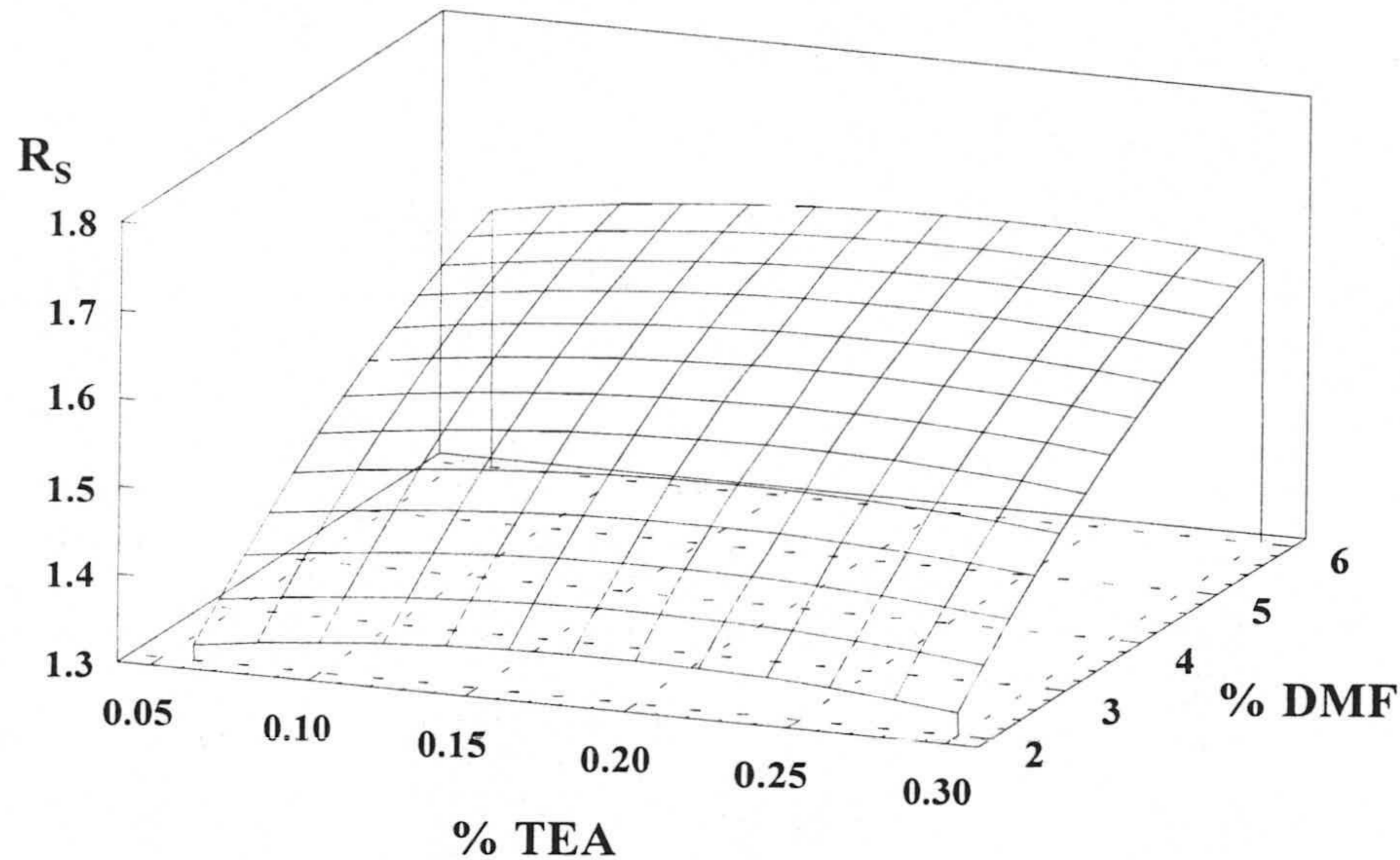


Figura III.20. Superficie de respuesta correspondiente al Diseño I

- Cálculo del óptimo.

La aplicación del criterio de Lagrange indica la presencia de un máximo puesto que:  $H(\%TEA, \%DMF) = 0.066 > 0$  y tanto  $\partial^2 R_s / \partial \%TEA^2 = -3.75$ , como  $\partial^2 R_s / \partial \%DMF^2 = -0.0178$ , son inferiores a cero.

Este máximo está localizado en la posición *0.23% de TEA y 8% de DMF*, fuera del dominio experimental.

Por ello, se planteó la realización de un segundo diseño para confirmar y ajustar los valores obtenidos en este primero [16].

**III.2.2.3.b. Diseño II**

Este segundo diseño (Figura III.21), está centrado sobre el máximo calculado en el anterior, y presenta una mayor área [16,17], ampliándose la zona de estudio del porcentaje de DMF, al ser el factor que origina una mayor variación en la variable respuesta.

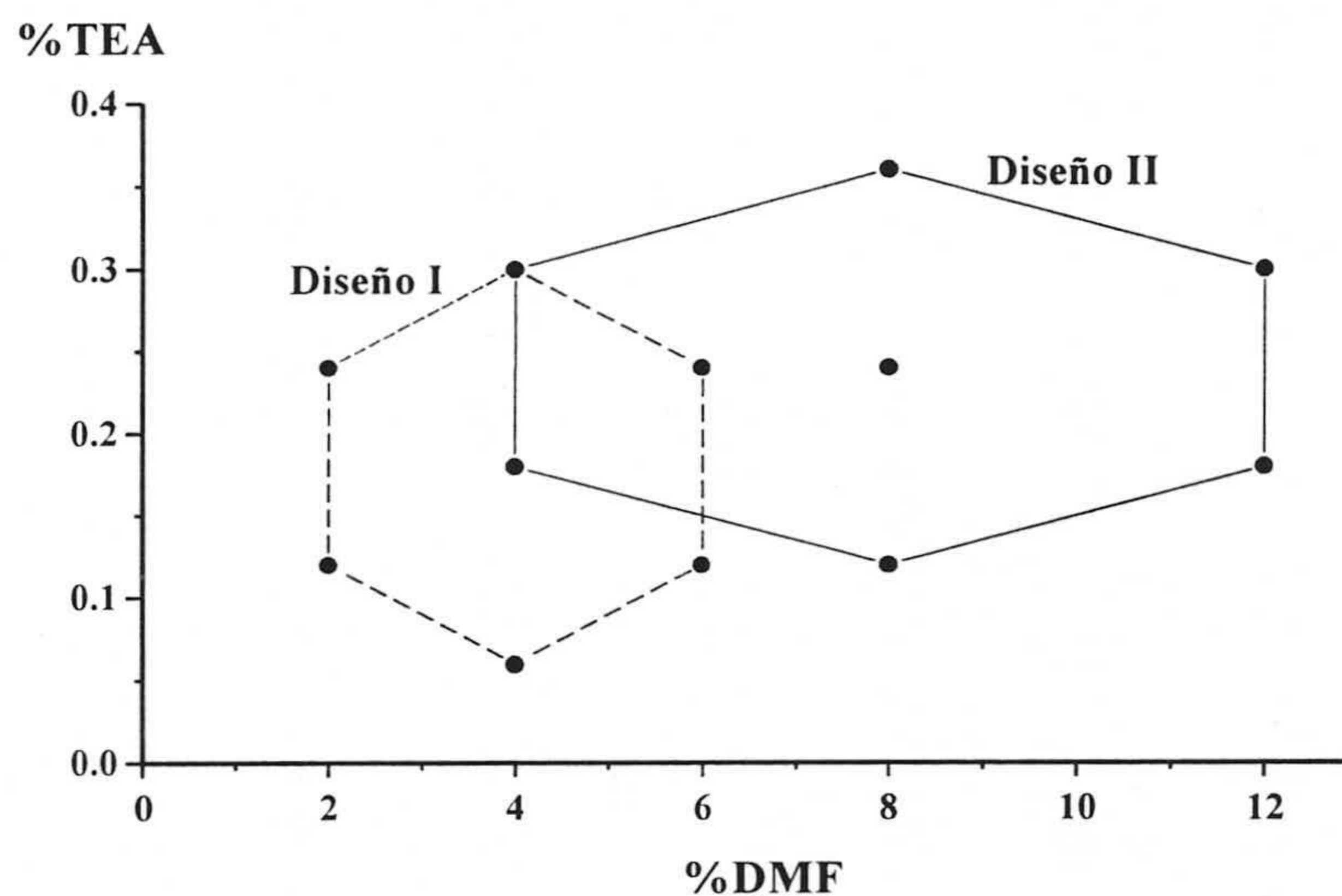


Figura III.21. Representación conjunta de los Diseños I y II

La matriz del diseño se recoge en la Tabla A.11, mientras que los valores experimentales y predichos de la resolución se recogen en la Tabla III.23.



Tabla III.23. Resultados correspondientes al diseño II

Nº	Resolución <sup>1</sup>	
	<u>Experimental</u>	<u>Predicha</u>
1	1.567	1.536
2	1.532	1.563
3	1.599	1.568
4	1.713	1.713
5	1.563	1.594
6	1.726	1.695
7	1.613	1.644

<sup>1</sup> Resolución obtenida entre la cadaverina e histamina.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas.

Del análisis gráfico de los residuales se deduce el cumplimiento de la normalidad, homocedasticidad e independencia necesarias para la aplicación del modelo.

Por otra parte, existe una menor concordancia entre los valores de la resolución predicha por el modelo y las obtenidas experimentalmente,  $r^2 = 0.834$ , debido posiblemente a que en la zona del máximo, el ajuste de la función con una ecuación cuadrática pueda ser insuficiente.

- Análisis de la varianza.

Se puede observar, a partir de la Tabla III.24, que ni los efectos lineales ni

cuadráticos correspondientes a los porcentajes de TEA y DMF son significativos. Asimismo, el término de interacción tampoco lo es.

Tabla III.24. Análisis de la varianza

Efecto	SC	g.l.	MC	F <sub>cal</sub>	P (%)
% TEA	0.00048	1	0.00048	0.09	82.16
% DMF	0.01440	1	0.01440	2.55	35.07
%TEA%DMF	0.00152	1	0.00152	0.27	69.96
%TEA <sup>2</sup>	0.01162	1	0.01162	2.06	38.16
%DMF <sup>2</sup>	0.00589	1	0.00589	1.04	48.48
<i>Error total</i>	0.00564	1	0.00564		
<i>Total (corr.)</i>	0.03407	6			

La función polinómica de segundo grado obtenida para este diseño es:

$$R_s = 0.6523 + 4.9444 \%TEA + 0.1050 \%DMF - 0.0813 \%TEA \%DMF - 9.1667 \%TEA^2 - 0.0044 \%DMF^2$$

En la Figura III.22 se representa la correspondiente superficie de respuesta, donde se puede observar la presencia de un máximo.

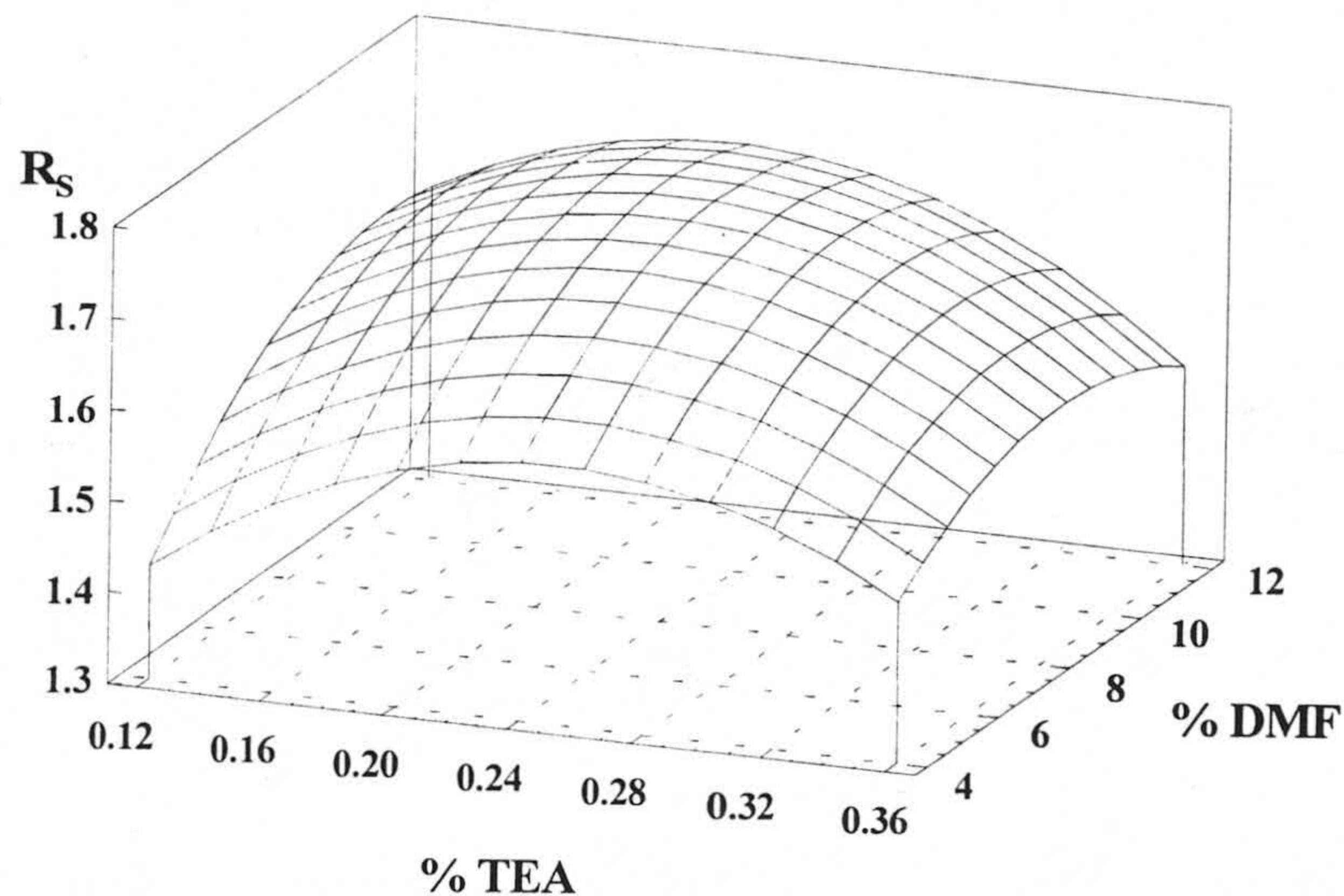


Figura III.22. Superficie de respuesta correspondiente al Diseño II

- Cálculo del óptimo.

La aplicación del criterio de Lagrange indica la presencia de un máximo puesto que:  $H(\%TEA, \%DMF) = 0.155 > 0$ , y tanto  $\partial^2 R_s / \partial \%TEA^2 = -18.3$ , como  $\partial^2 R_s / \partial \%DMF^2 = -0.008$  son inferiores a cero. Este máximo está localizado en la posición **0.23% de TEA y 9.82% de DMF**.

- ▶ Variación del porcentaje de DMF manteniendo constante el porcentaje de TEA.

La ecuación que recoge la influencia del % de DMF sobre la resolución para un porcentaje de TEA constante (en este caso, el máximo encontrado de 0.23 %) es:

$$R_s = 1.3010 + 0.0866 \%DMF - 0.0044 \%DMF^2$$

En la Tabla III.25 se recogen los valores predichos para la resolución al reemplazar en la ecuación anterior el porcentaje de DMF por distintos valores.

**Tabla III.25. Influencia del % DMF para un % TEA constante**

% DMF	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$R_s$	1.578	1.625	1.663	1.692	1.713	1.724	1.727	1.721	1.707

Se puede observar que entre el 8 y 12% de DMF, la resolución se mantiene constante, *escogiéndose un 10% de DMF como valor óptimo para posteriores experiencias.* Además, se puede ver como la resolución disminuye cuando se trabaja con porcentajes de DMF inferiores al 6%, tal y como se observaba en el primer diseño.

- Variación del porcentaje de TEA para un % de DMF constante.

La relación existente entre resolución y % de TEA, para un porcentaje de DMF del 10% es

$$R_s = 1.2585 + 4.1466 \%TEA - 9.1667 \%TEA^2$$

En la Tabla III.26 se muestran los valores predichos de resolución si se sustituyen varios valores de % de TEA en la ecuación.

**Tabla III.26. Influencia del % DMF para un % TEA constante**

% TEA	0.12	0.15	0.18	0.21	0.24	0.27	0.30	0.33	0.36
$R_s$	1.624	1.674	1.708	1.725	1.726	1.710	1.677	1.629	1.563

Se puede ver que la resolución se mantiene constante para valores de porcentaje de TEA comprendidos entre el 0.18 y el 0.27 %, por lo que se seleccionó un **0.23 % de TEA** como valor óptimo para siguientes experiencias.

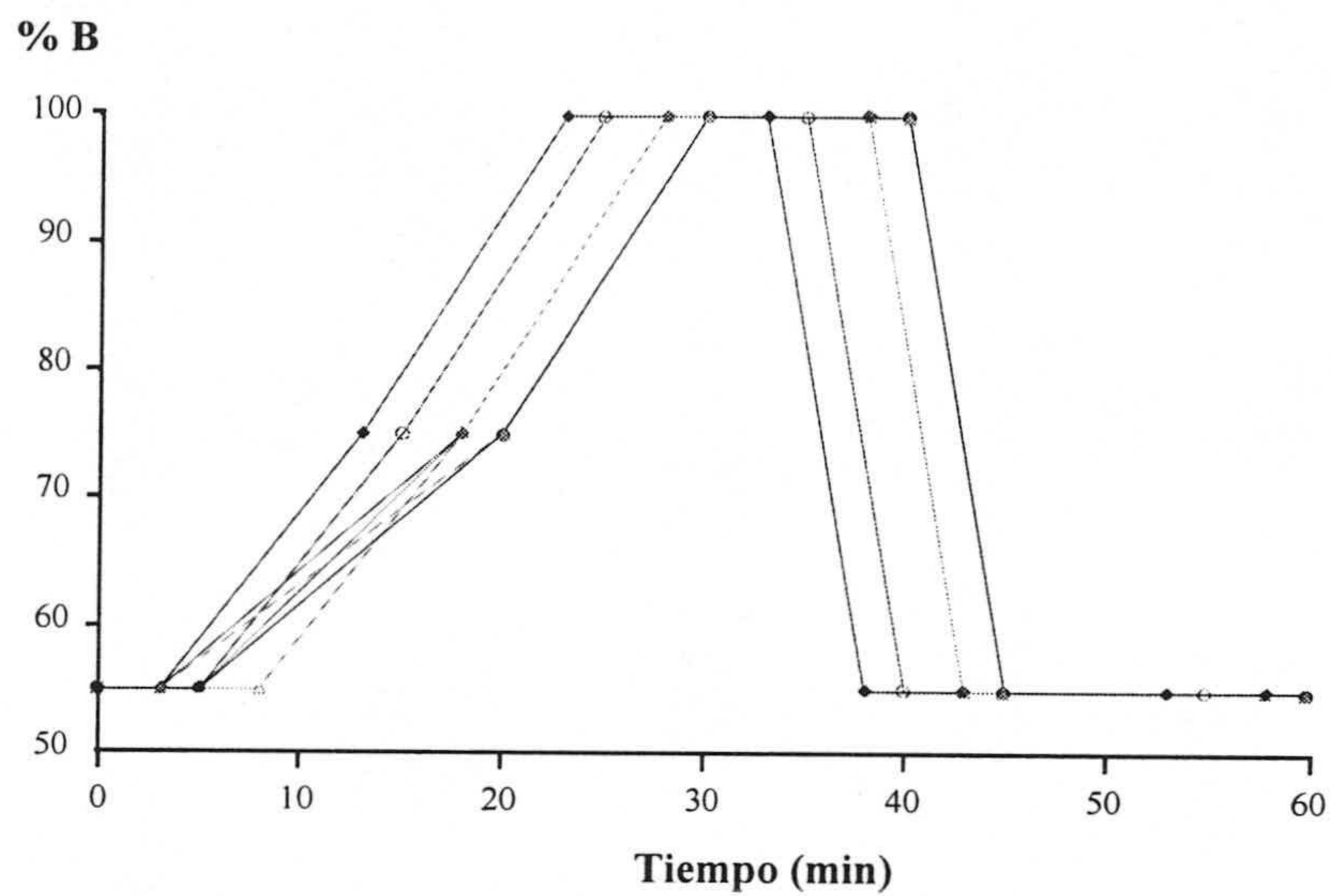
#### **III.2.2.4. Influencia de la modificación del gradiente de elución sobre la separación cromatográfica**

Con objeto de mejorar la resolución del cromatograma se estudió la influencia que tenía sobre la resolución la modificación de los intervalos de tiempo y las pendientes del programa de elución en gradiente, tomando como base de este estudio, el gradiente recogido en la página 172.

Los gradientes utilizados se indican en la Tabla III.27 así como en la Figura III.23.

**Tabla III.27. Gradientes empleados para mejorar la resolución cromatográfica**

	Tiempo de gradiente (minutos)						
	0	5	20	30	40	45	60
<i>Gradiente 0</i>	0	5	20	30	40	45	60
<i>Gradiente 1</i>	0	5	18	28	38	43	58
<i>Gradiente 2</i>	0	5	15	25	35	40	55
<i>Gradiente 3</i>	0	3	20	30	40	45	60
<i>Gradiente 4</i>	0	3	18	28	38	43	58
<i>Gradiente 5</i>	0	3	13	23	33	38	53
<i>Gradiente 6</i>	0	8	18	28	38	43	58
<i>% Eluyente B</i>	55	55	75	100	100	55	55



**Figura III.23. Gradientes utilizados para mejorar la separación cromatográfica.** (●) Gradiente 0; (◆) Gradiente 1; (○) Gradiente 2; (▲) Gradiente 3; (◇) Gradiente 4; (◆) Gradiente 5; (△) Gradiente 6.

La resolución entre los picos de la cadaverina y histamina, obtenida en cada caso, se recoge en la Tabla III.28.

Tabla III.28. Resolución obtenida para cada gradiente ensayado

<u>Gradiente</u>	<u>R<sub>s</sub></u>
0	1.710
1	1.657
2	1.618
3	1.543
4	1.575
5	1.740
6	1.500

Se puede observar que:

*-La mejor resolución se obtiene utilizando el gradiente número 5, que es el que a su vez permite una menor duración del cromatograma.*

Por tanto para posteriores experiencias, se **eligió como programa de elución en gradiente, el recogido a continuación:**

Tiempo (min)	0	3	13	23	33	38	53
% Eluyente B	55	55	75	100	100	55	55

### III.2.2.5. Efecto del porcentaje de agua en el eluyente B y del gradiente, sobre la resolución, el tiempo de retención, el área y la altura de pico

Se estudió el efecto del porcentaje de agua en el eluyente B, compuesto de una mezcla de acetonitrilo, tert-butilmetiléter y agua, sobre la resolución, las áreas y alturas de los picos y los tiempos de retención, tanto para el gradiente indicado en la página 172 (gradiente 0), como para el seleccionado en la anterior experiencia (gradiente 5).

Para ello, se varió el porcentaje de agua entre el 2.5 y el 10.0% (v/v/v), manteniendo constante el porcentaje de Tert-Butilmetiléter en el 10 % (v/v/v).

Los valores de resolución obtenidos se recogen en la Tabla III.29.

**Tabla III.29. Resolución obtenida para cada porcentaje de agua y gradiente utilizado**

% $H_2O$	$R_s$	
	<i>Gradiente 0</i>	<i>Gradiente 5</i>
10.0	1.710	1.740
5.0	1.631	1.750
2.5	1.677	1.780

Los datos obtenidos al realizar una ANOVA de dos vías para estudiar la variabilidad introducida en la resolución al modificar el gradiente y el porcentaje de agua se recogen en la Tabla III.30.



Tabla III.30. Análisis de la varianza de dos vías

Efecto	SC	g.l.	MC	F <sub>cal</sub>	P (%)
<i>Gradiente</i>	0.01215	1	0.01215	9.00	9.55
<i>% H<sub>2</sub>O</i>	0.00237	2	0.00119	0.88	53.26
<i>Residual</i>	0.00270	2	0.00135		
<i>Total (corr.)</i>	0.01722	5			

Se puede observar que ninguno de los dos factores presenta un efecto significativo sobre esta variable respuesta. Sin embargo, el cambio de gradiente provoca un mayor cambio en la resolución que el porcentaje de agua. En este sentido, la resolución es mayor cuando se utiliza el gradiente seleccionado en el anterior apartado (Figura III.24A). En relación al porcentaje de agua, se puede ver que para los niveles estudiados (10, 5 y 2.5), la resolución no varía significativamente (Figura III.24B), aunque es mejor cuando se utiliza un porcentaje de agua en el eluyente B de 2.5 %.

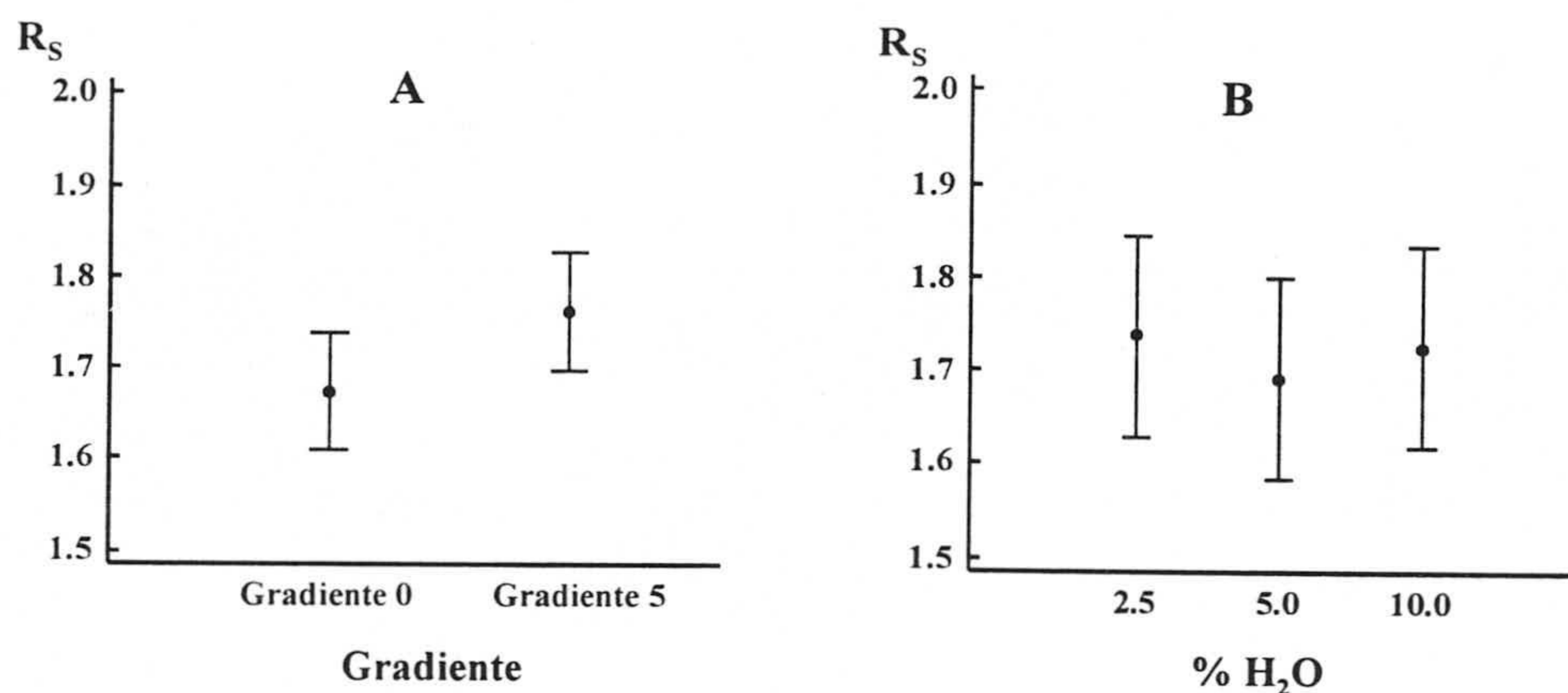


Figura III.24. Valores medios de resolución obtenidos para: (A) los gradientes ensayados y (B) los porcentajes de agua estudiados.

Al realizar el análisis de la varianza sobre los datos obtenidos para el tiempo de retención, área y altura de pico recogidos en la Tabla A.12, se obtienen los valores de niveles de probabilidad recogidos en la Tabla III.31.

**Tabla III.31. Resultado del ANOVA para tiempo de retención, área y altura de pico**

	<i>Factor</i>	<b>P (%)</b>		
		<i>t<sub>r</sub></i>	<i>Ap</i>	<i>hp</i>
<b>Triptamina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	1.53	25.14	1.50
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	2.68	46.00	18.98
<b>Feniletilamina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.77	37.23	0.14
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	2.38	21.50	2.56
<b>Putrescina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.56	10.47	0.18
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	2.69	35.29	5.54
<b>Cadaverina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.55	3.11	0.27
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	3.15	14.00	9.83
<b>Histamina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.47	24.20	0.38
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	2.93	89.44	12.29
<b>Tiramina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.11	54.21	2.24
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	1.37	74.27	98.79
<b>Espermidina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.06	95.41	3.81
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	0.82	91.18	45.61
<b>Espermina</b>	<i>Tipo de gradiente</i>	0.01	26.38	42.75
	<i>% H<sub>2</sub>O</i>	0.09	40.81	87.65

A partir de los valores de P obtenidos, se deduce que:

*-Los tiempos de retención varían significativamente al cambiar los factores estudiados ( $P < 5\%$ ).*

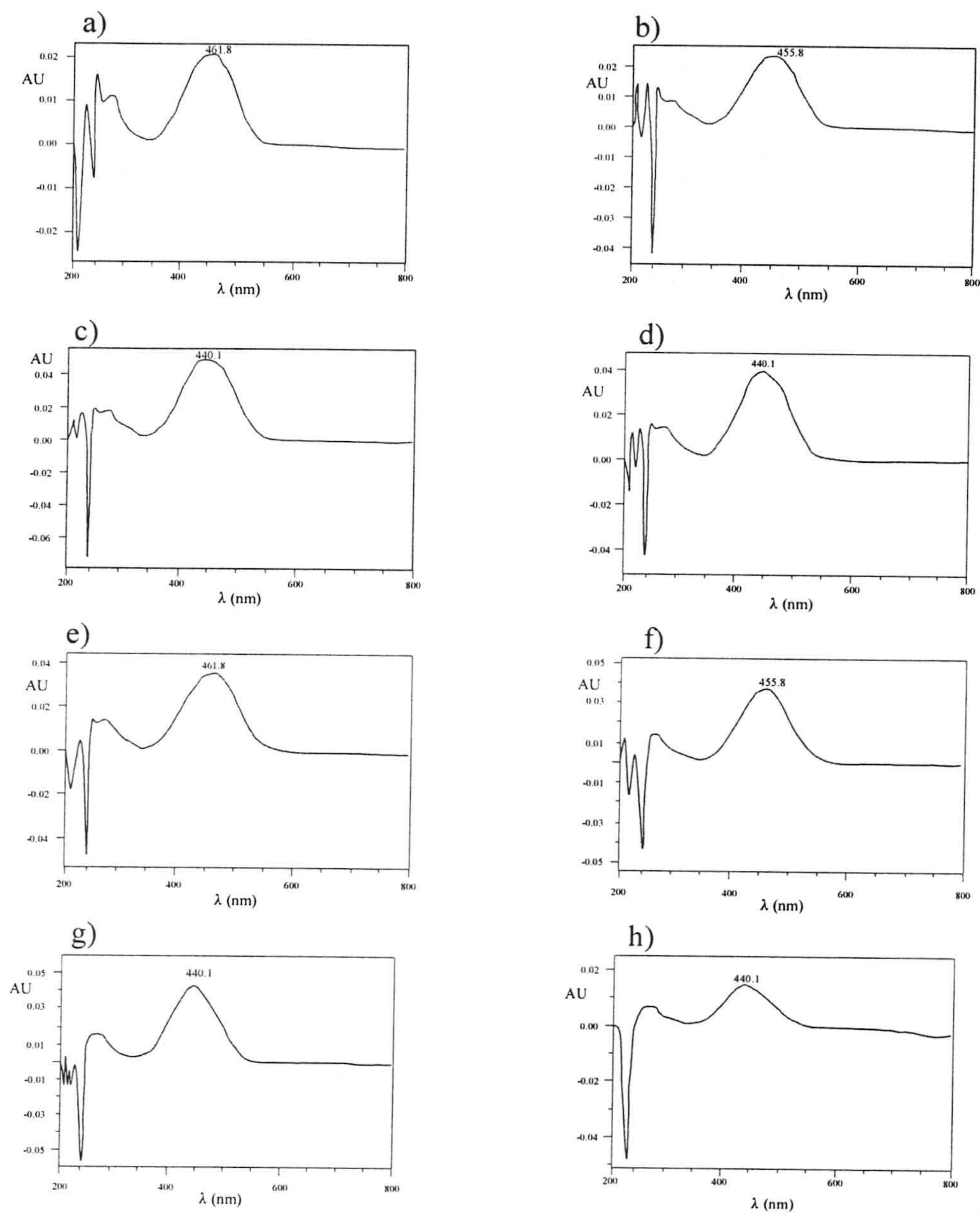
*-La altura de pico se ve afectada tanto por el tipo de gradiente como por el porcentaje de agua, mientras que el área de pico no varía significativamente al cambiar ambos factores.*

*Por lo tanto, se elige como porcentaje de agua en el eluyente B para las siguientes experiencias 2.5% (v/v/v) así como el gradiente seleccionado en la anterior experiencia.*

### **III.2.3. LONGITUD DE ONDA DE DETECCIÓN**

Para determinar cual era la longitud de onda más adecuada para llevar a cabo la detección de las aminos dabsiladas, se registraron en primer lugar los espectros de absorción de los derivados, Figura III.25.

Se puede ver que los máximos de absorción se encuentran a longitudes de onda que van desde 440. a 462 nm.



**Figura III.25. Espectros de absorción de los derivados dabsilados de las aminas biogénas. a) Triptamina; b) Feniletilamina; c) Putrescina; d) Cadaverina; e) Histamina; f) Tiramina; g) Espermidina; h) Espermina.**

En bibliografía se encuentra que los diversos autores utilizan diferentes longitudes de onda para la detección de los derivados dabsilados de aminos biógenas. Por ejemplo, Bokhardt y col. [7] llevan a cabo la detección a 436 nm, mientras que Jansen y col. [4] usan 456 nm.

Por esta razón, se planificó una experiencia en la que se varió la longitud de onda de detección entre 416 y 496 nm.

En la Tabla III.32, se recogen las áreas y alturas de pico totales en función de la longitud de onda utilizada, que se encuentran representadas en la Figura III.26, donde se observa que entre 436 y 456 nm, ambos parámetros se mantienen prácticamente constantes, con un máximo a 446 nm, mientras que para longitudes de onda superiores e inferiores se produce una disminución de las variables respuesta.

**Tabla III.32. Área y altura total de pico en función de la longitud de onda utilizada**

<i>Longitud de onda (nm.)</i>	<i>Ap<sub>T</sub></i>	<i>hp<sub>T</sub></i>
416	26544145	2898787
436	31032700	3324430
456	30774211	3285947
476	27600827	3022858
496	19905846	2349463

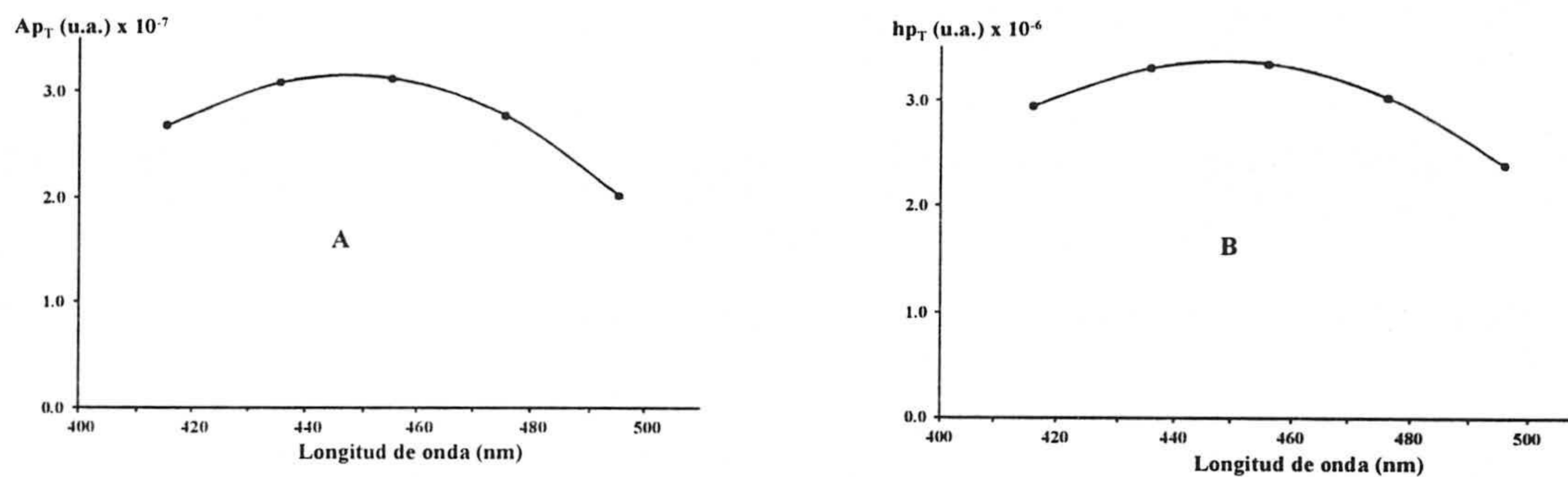


Figura III.26. Variación del área total de pico (A) y altura total de pico (B) en función de la longitud de onda

A partir de esta experiencia, *se selecciona una longitud de onda de 446 nm, como la óptima para la detección cromatográfica de las aminas en estudio.*

### III.2.4. CONDICIONES PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS

Una vez estudiada la influencia que las diferentes variables ejercen sobre el comportamiento cromatográfico de los derivados dabsilados de las aminas en estudio, se concluye que en las siguientes condiciones

▶ *Fase estacionaria:* Columna LICHROSPHER 100 RP-18 (244x4.4 mm, 5  $\mu$ m.), con una precolumna LICHROSPHER (10x 4.4 mm).

▶ *Fase móvil:*

Eluyente A: 89.77% de disolución 40 mM de Acetato sódico, ajustando el pH a 5.00 con ácido acético diluido, 10% de Dimetilformamida y 0.23% de Trietilamina (v/v/v).

Eluyente B: 87.5% de Acetonitrilo, 10.0% de Tert-Butilmetiléter y 2.5% de agua (v/v/v).

▶ *Temperatura de la columna:* 40°C.

▶ *Gradiente:*

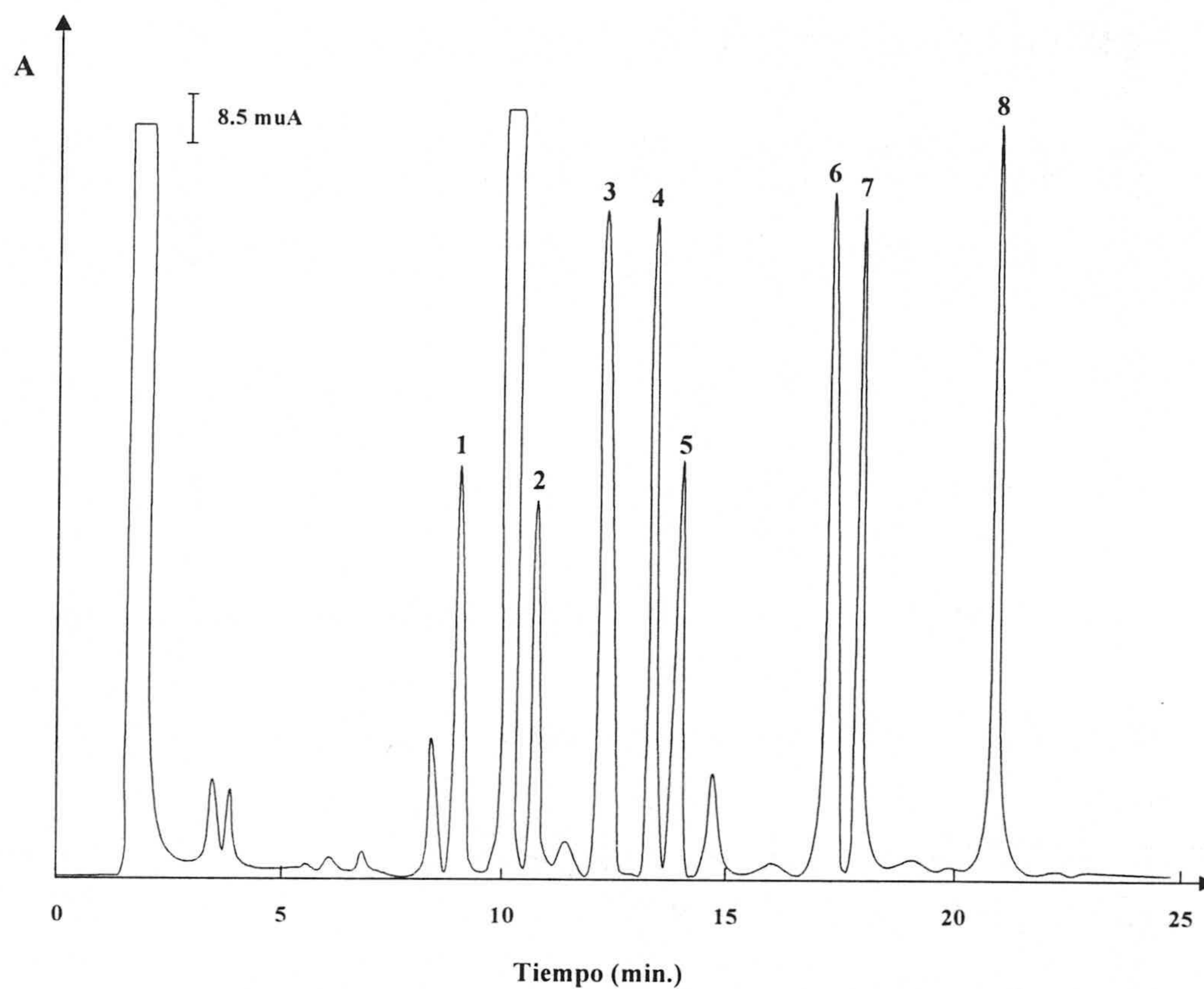
Tiempo (min)	0	30	130	230	330	380	530
% Eluyente B	55	55	75	100	100	55	55

▶ *Flujo de fase móvil:* 1 ml·min.

▶ *Detección:* Espectrofotométrica a 446 nm.

▶ *Volumen de inyección:* 20  $\mu$ l.

es posible la separación y determinación cromatográfica de los mismos. En la Figura III.27 se muestra un cromatograma típico.



**Figura III.27. Cromatograma ilustrativo de las 8 aminas biógenas dabsiladas después del proceso de optimización cromatográfica. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina.**



### **III.3. PROCEDIMIENTO PROPUESTO PARA LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS**

Las experiencias llevadas a cabo nos permiten proponer el siguiente procedimiento para la separación cromatográfica de aminas biógenas, previa derivatización con cloruro de dabsilo:

Transferir a un vial de 10 ml, un volumen inferior o igual a 2.0 ml de la disolución que contiene las aminas (si es necesario se diluye con la disolución 0.1 M de HCl, conteniendo un 0.2 % (m/v) de ácido 3,3'-tiodipropiónico). Ajustar a  $\text{pH} \approx 8.2$  con la disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.15 M, y llevar con agua desionizada hasta 3.8 ml. Agitar y añadir 1.6 ml de la disolución de cloruro de dabsilo 12.4 mM, y calentar durante 21 minutos a  $70^\circ\text{C}$  en un baño de agua, agitando al minuto uno y quince. A continuación, adicionar 4.6 ml de la disolución de dilución, dejar la mezcla en el baño de agua durante aproximadamente 20 minutos, agitando cada 2 ó 3 minutos y seguidamente inyectar una alícuota de esta disolución en el cromatógrafo.

Para el análisis cromatográfico se emplea una columna LICHROSPHER 100 RP-18 (244 x 4.4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) que se equilibra a  $40^\circ\text{C}$ , con una fase móvil constituida por una mezcla de eluyente A: eluyente B (45:55, v/v), composición descrita en el apartado anterior, y empleando un flujo de  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , aplicando el siguiente gradiente:

Tiempo (min)	0	30	130	230	330	380	530
% Eluyente B	55	55	75	100	100	55	55

Se inyectan 20  $\mu\text{l}$  y se registra el cromatograma utilizando una longitud de onda de detección de 446 nm.

## CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE LA ROBUSTEZ Y ESTIMACIÓN DE LOS  
PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO:  
VALIDACIÓN CARACTERÍSTICA



## **ESTUDIO DE LA ROBUSTEZ Y ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO: VALIDACIÓN CARACTERÍSTICA.**

La etapa de validación de un método analítico debe comenzar realizando un estudio de robustez del mismo, informando de las posibles fuentes de variabilidad sobre una o varias variables respuestas al modificar ligeramente las variables experimentales.

Además, y siguiendo con el esquema de validación propuesto, se selecciona el modelo de calibración a partir del cual se obtienen los distintos parámetros de calidad del método analítico, como linealidad, sensibilidad, resolución analítica, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y/o reproducibilidad.

## **IV.1. ESTUDIO DE LA ROBUSTEZ DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE AMINAS BIÓGENAS**

En el estudio de robustez de la separación cromatográfica de aminos biógenas, se sigue la metodología explicada en el Capítulo I y que consta de los siguientes pasos:

- Selección de las variables experimentales y de sus niveles.
- Selección de las variables respuesta.
- Elección del diseño experimental empleado.
- Realización del diseño.
- Cálculo de los efectos principales.
- Interpretación de los resultados.
- Conclusiones.

### **IV.1.1. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES Y DE SUS NIVELES**

Las siguientes variables experimentales (factores) evaluadas en el estudio de robustez se han seleccionado atendiendo a su posible influencia sobre las distintas variables respuesta:

- ▶ Gradiente (GRA), entendido como el efecto producido sobre la fase estacionaria por los primeros gradientes, obtenidos después de la puesta en marcha.
- ▶ Temperatura de la columna (TEM).
- ▶ Concentración del tampón utilizado en la fase móvil (CON).
- ▶ pH de dicho tampón (pH).

- ▶ Longitud de onda de detección de los derivados dabsilados ( $\lambda_{\text{Det}}$ ).
- ▶ Porcentaje de Trietilamina (TEA).
- ▶ Porcentaje de Dimetilformamida (DMF).

Para cada variable experimental se seleccionaron tres niveles (superior (+1), inferior (-1) y nominal o central (0)). En este caso, los valores centrales o nominales se hacen coincidir con los óptimos encontrados en el Capítulo III. Para la variable GRA, no estudiada con anterioridad, los niveles ensayados son (-1) que corresponde con el primer gradiente, desde el minuto 0 hasta el 55, (0) correspondiente al segundo gradiente, desde el minuto 55 hasta el 110 y (+1), desde el minuto 110 hasta 165 y que coincide con el tercer gradiente.

En la Tabla IV.1 se recogen los niveles estudiados para las distintas variables experimentales.

**Tabla IV.1. Niveles de las variables experimentales usadas en el estudio de robustez**

Factor	Valor nominal (0)	Nivel inferior (-1)	Nivel superior (+1)	Variación (%)
<b>GRA</b>	1	0	2	
<b>TEM (°C)</b>	40	38	42	5
<b>CON (mM)</b>	40	36	44	10
<b>pH</b>	5	4.8	5.2	4
<b><math>\lambda_{\text{Det}}</math> (nm.)</b>	446	441	451	1
<b>TEA (% v/v/v)</b>	0.23	0.21	0.25	8
<b>DMF (%v/v/v)</b>	10	9.5	10.5	5

#### **IV.1.2. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES RESPUESTA**

Con objeto de obtener la máxima información posible del estudio de robustez, se seleccionaron variables respuesta que proporcionan información tanto cuantitativa como cualitativa del proceso cromatográfico.

Como variables relacionadas con la información cuantitativa, se escogieron:

- ▶ Altura y área de pico de los analitos.
- ▶ Altura y área de pico relativas, definidas como el cociente entre la altura o área de pico de cada analito y la altura o área de pico de un patrón interno. Como patrón interno se empleó el 1,7-diaminoheptano [1-3].

Y como variables respuesta relacionadas con la calidad de la separación cromatográfica, se estudiaron:

- ▶ Tiempo de retención.
- ▶ Retención relativa sin ajustar, definida como el cociente entre el tiempo de retención de cada analito y el del patrón interno (1,7-diaminoheptano).
- ▶ Resolución del cromatograma, definida como la resolución entre la cadaverina e histamina.

#### **IV.1.3. ELECCIÓN DEL DISEÑO EXPERIMENTAL EMPLEADO**

Las siete variables experimentales seleccionadas se estudian mediante la aplicación de un diseño factorial fraccional saturado a 2 niveles y centrado alrededor del óptimo (valor nominal),  $2^{7-4}$ , que permite obtener los efectos de hasta siete factores, con solo 8 puntos

experimentales. En este diseño, los efectos están confundidos con interacciones de segundo y tercer orden, por lo que para el estudio de robustez resulta adecuado, ya que estas interacciones suelen ser despreciables frente a los efectos principales [4].

El error experimental se estima realizando tres réplicas del valor nominal (punto central del diseño) de las variables experimentales [5]. De esta forma, el error estándar asociado al efecto se calcula aplicando la ecuación

$$SE = \sqrt{\frac{s^2}{N}} \quad (1)$$

donde  $N$  es el número de experimentos definidos en el diseño (nuestro caso, ocho), y  $s^2$  es la varianza obtenida, a partir de la expresión

$$s^2 = \frac{\sum (Y_{0j} - \bar{Y}_0)^2}{r_0 - 1} \quad (2)$$

donde  $Y_{0j}$  es cada una de las respuestas en el valor nominal,  $\bar{Y}_0$  es el valor medio de dichas réplicas y  $r_0$  es el número de réplicas realizadas en el valor nominal (3 en el presente estudio).

La estructura del diseño factorial fraccional saturado, junto con los puntos correspondientes a las réplicas del punto central, se recogen en la Tabla IV.2.



Tabla IV.2. Diseño experimental seleccionado para el estudio de robustez

Nº	Variable experimental							Resultados
	GRA	TEM	CON	pH	$\lambda_{Det}$	TEA	DMF	
1	1	1	1	1	1	1	1	$R_1$
2	1	1	-1	-1	1	-1	-1	$R_2$
3	1	-1	1	1	-1	-1	-1	$R_3$
4	1	-1	-1	-1	-1	1	1	$R_4$
5	-1	1	1	-1	-1	1	-1	$R_5$
6	-1	1	-1	1	-1	-1	1	$R_6$
7	-1	-1	1	-1	1	-1	1	$R_7$
8	-1	-1	-1	1	1	1	-1	$R_8$
0	0	0	0	0	0	0	0	$R_0(1)$
0	0	0	0	0	0	0	0	$R_0(2)$
0	0	0	0	0	0	0	0	$R_0(3)$

#### IV.1.4. REALIZACIÓN DEL DISEÑO

Dado que se utilizan réplicas del punto central, los experimentos se llevaron a cabo de forma aleatoria para conseguir una mejor estimación del error experimental, al tener en cuenta los posibles factores incontrolables [6,7].

Los valores de las diversas variables respuesta, se muestran en la Tabla A.13 recogida en el anexo.

### IV.1.5. CÁLCULO DE LOS EFECTOS

En este caso, los efectos de las diferentes variables experimentales sobre las variables respuesta, se calculan atendiendo a la ecuación 3:

$$E'_{X_k} = \frac{1}{N} [\Sigma Y(+)_X_k - \Sigma Y(-)_X_k] \quad (3)$$

donde  $E'_{X_k}$  es el efecto del factor X sobre la respuesta Y;  $\Sigma Y(+)_X_k$  y  $\Sigma Y(-)_X_k$  son las sumas de la respuesta de los distintos experimentos cuando el factor  $X_k$  toma el valor (+1) y (-1) respectivamente. En este sentido y como se comentó en el Capítulo I, el efecto calculado usando esta ecuación coincide con el coeficiente de regresión lineal multivariante.

Los efectos calculados, así como los críticos, se recogen en la Tabla A.14, donde el efecto crítico se calcula a partir de la ecuación 4,

$$E'_{\text{crit}} = t_{\text{crit}} \cdot SE \quad (4)$$

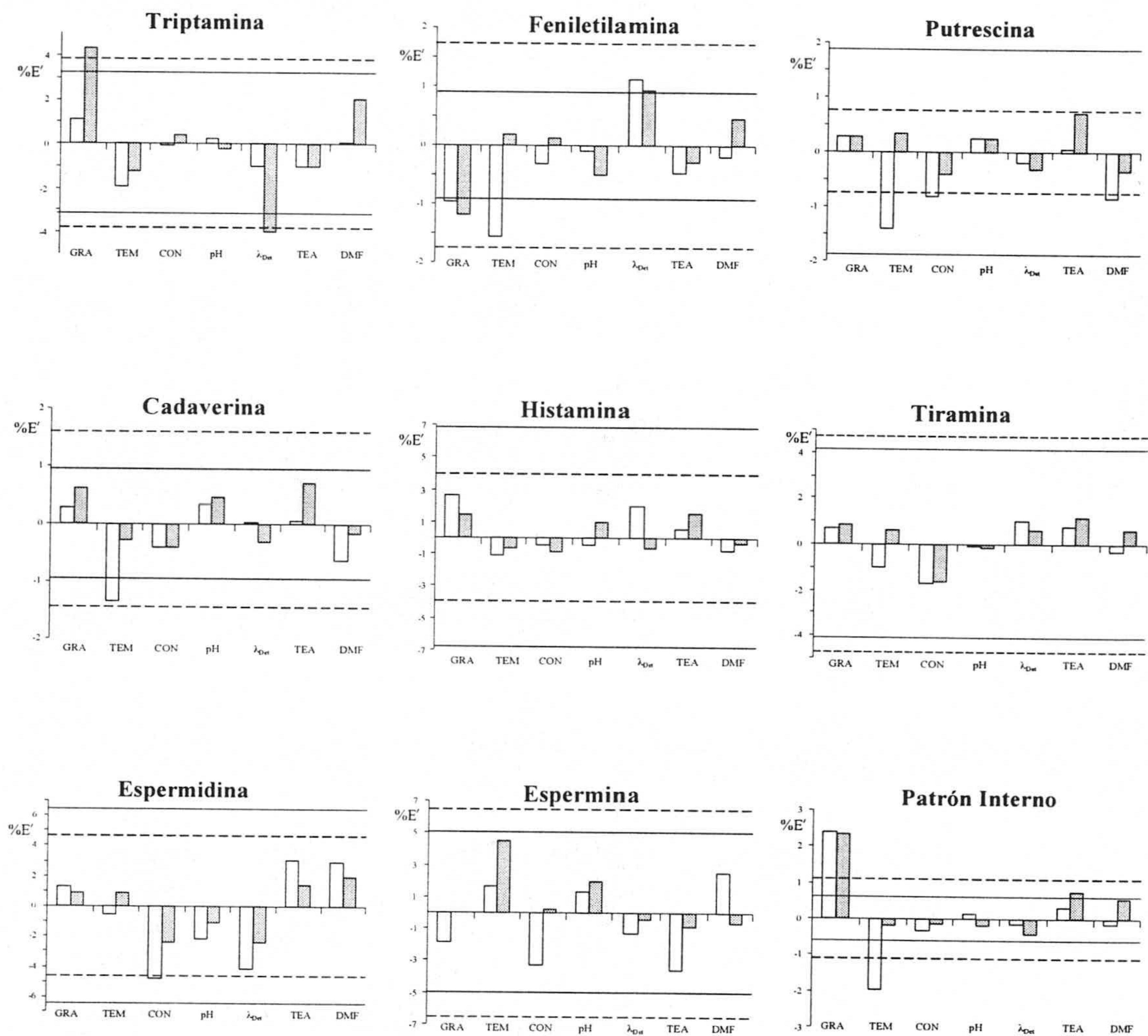
y en la que  $t_{\text{crit}}$  se obtiene para un nivel de significación  $\alpha = 0.05$  y 2 grados de libertad, ( $r_o - 1$ ).

### IV.1.6 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

#### IV.1.6.1. Altura y área de pico

En la Figura IV.1 y Tabla IV.3 se recogen los resultados obtenidos del estudio de

robustez para la altura y área de pico.



**Figura IV.1.** Efectos normalizados de la altura y área de pico. La barra blanca indica el efecto sobre la altura de pico y la oscura el efecto sobre el área de pico. La línea discontinua representa  $E'_{crit}$  nomalizado para la altura de pico y la discontinua para el área de pico.

Tabla IV.3. Efectos significativos para la altura y área de pico

	FACTOR						
	GRA	TEM	CON	pH	$\lambda_{Det}$	TEA	DMF
<i>Triptamina</i>	○	---	---	---	○	---	---
<i>Feniletilamina</i>	■	■	---	---	■	---	---
<i>Putrescina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Cadaverina</i>	---	■	---	---	---	---	---
<i>Histamina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Tiramina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Espermidina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Espermina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>1,7-diaminoheptano</i>	■○	■	---	---	---	---	---

--- = No significativo

■ = Significativo para la altura de pico ( $\alpha = 0.05$ )

○ = Significativo para el área de pico ( $\alpha = 0.05$ )

Se puede observar como CON, pH, TEA y DMF, no provocan un cambio significativo en el área y altura de pico de los diferentes analitos. En relación con el resto de factores estudiados, la longitud de onda de detección origina un efecto significativo para el área de pico de la triptamina y la altura de pico de la feniletilamina.

GRA y TEM provocan una mayor variación sobre la altura y área de pico. Así, el gradiente es una variable experimental que afecta significativamente tanto al área de la triptamina y del 1,7-diaminoheptano, como a la altura de pico de la feniletilamina y del patrón interno.

Por otro lado, TEM afecta significativamente a la altura de pico de la feniletilamina, cadaverina y patrón interno.

Ya se ha comentado que una de las ventajas de utilizar la ecuación (3) para el cálculo del efecto, es su coincidencia con el valor del coeficiente de regresión multivariante, al variar los valores de los factores entre  $\pm 1$  (valores codificados). En este sentido, mediante el estudio de las superficies de respuesta lineales obtenidas en la regresión lineal múltiple, se pueden observar los efectos que ejercen mayor influencia sobre las variables respuesta obtenidas. Así, el efecto y la pendiente observada en dichas figuras son equivalentes.

La Figura IV.2 muestra esta aproximación geométrica del estudio de robustez, para el caso de la altura de pico de la feniletilamina, donde se observan las tres posibilidades que se pueden encontrar en este estudio gráfico.

- Cuando se representa la altura de pico en función de CON y DMF manteniendo el resto de los factores se mantienen en el valor nominal, Figura IV.2.A, puede observarse cómo esta variable respuesta no es sensible a ninguno de los dos factores, que como se indicó en la Tabla IV.3, no eran significativos.
- En la Figura IV.2.B, que representa la influencia de TEM y  $\lambda_{Det}$  sobre la altura de pico, se observa cómo dicha variables es muy sensible a las variaciones de estos factores, que resultaban ser significativos en el estudio estadístico.
- Cuando se representa la altura de pico en función de TEM y TEA, Figura IV.2.C, se puede observar que esta variable es sensible a TEM (factor significativo) mientras que no lo es al factor TEA (factor no significativo).

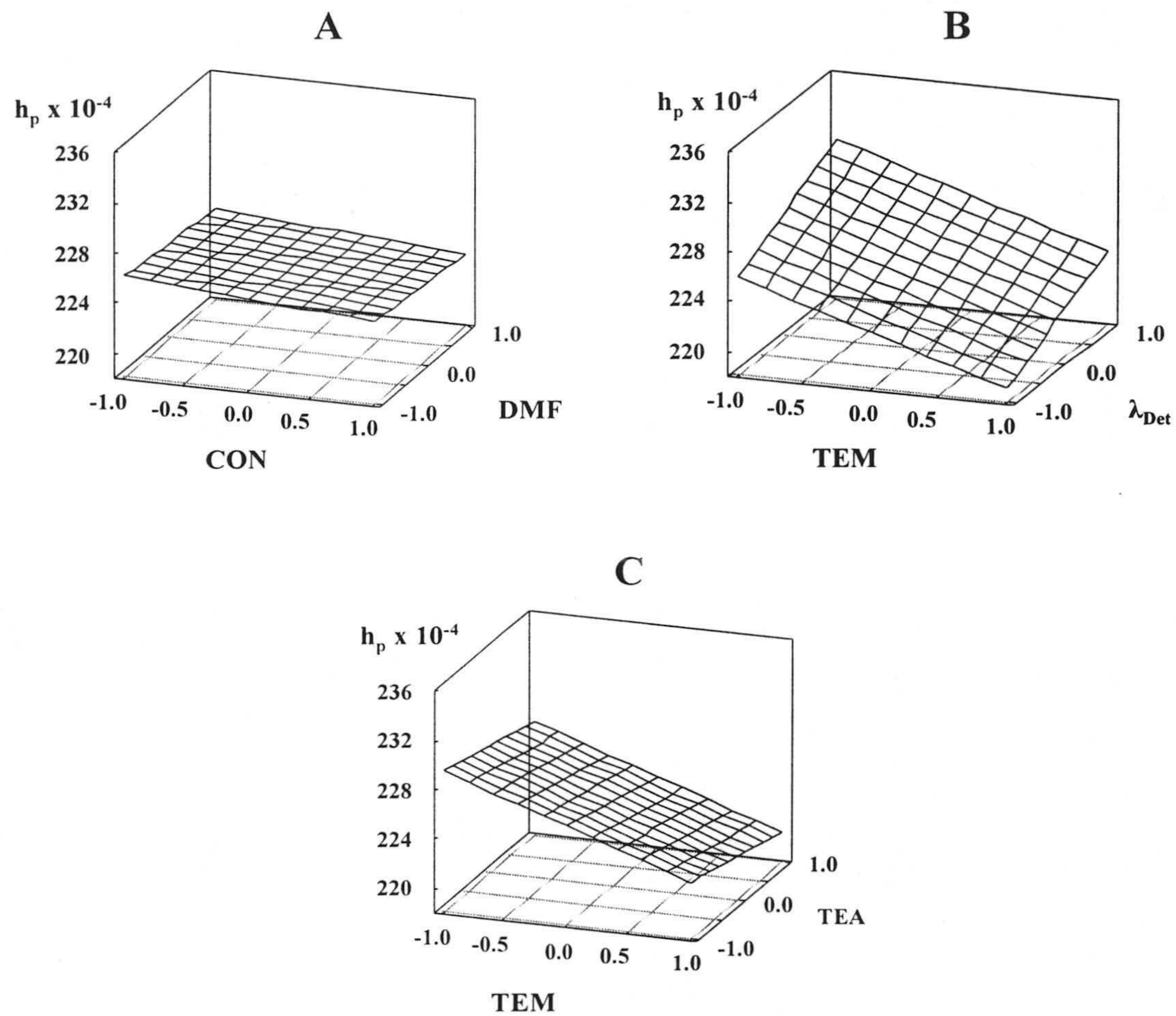


Figura IV.2. Superficies de respuesta lineales estimadas para la altura de pico de feniletilamina

- Al estudiar la altura y área de pico relativas, se obtienen los resultados recogidos en la Tabla IV.4 y Figura IV.3, donde puede observarse que aumenta el número de factores significativos. En este sentido, la altura de pico relativa se ve más afectada por pequeños cambios en los factores estudiados que el área de pico relativa.

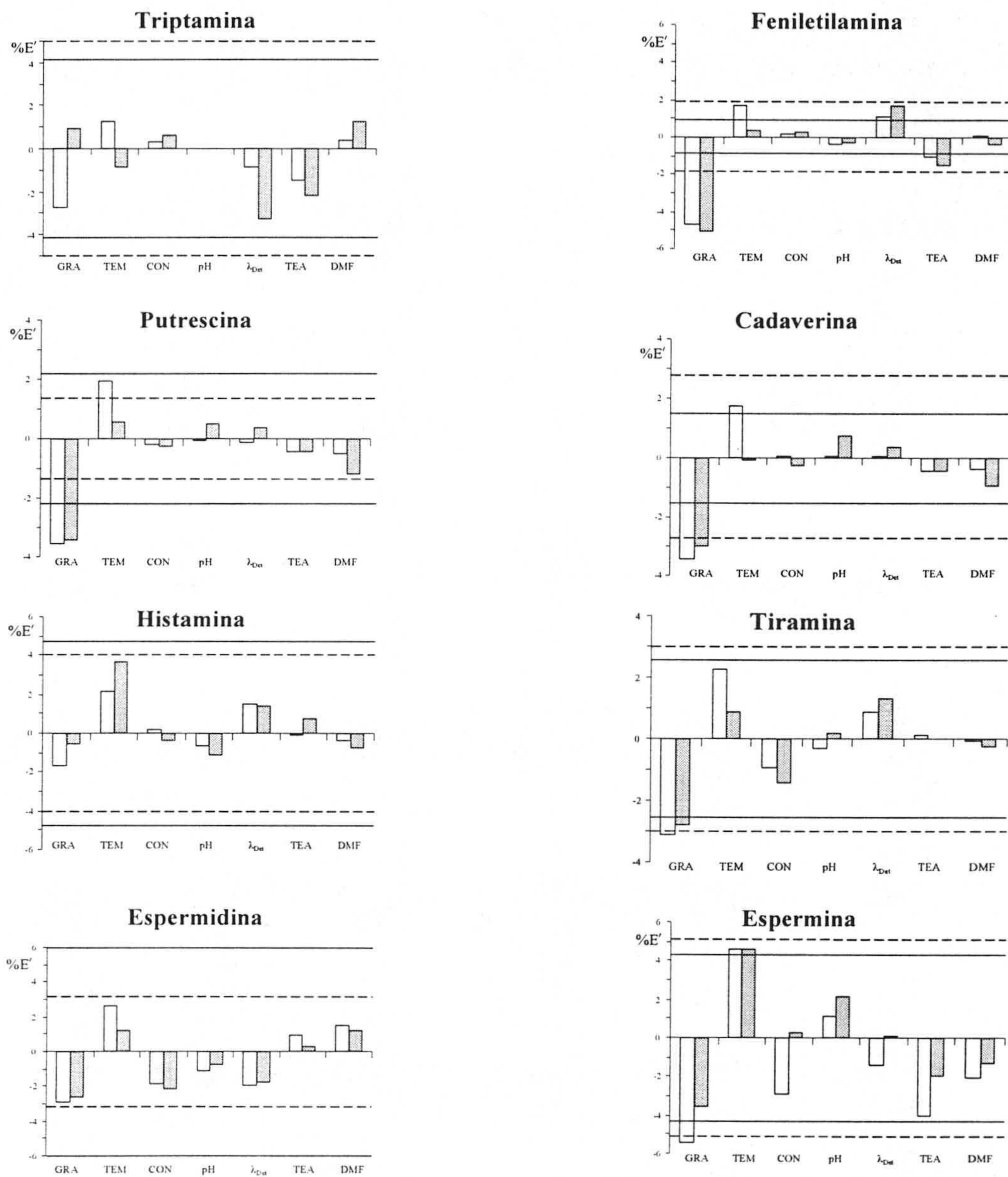
**Tabla IV.4. Efectos significativos para la altura y área de pico relativas**

	FACTOR						
	GRA	TEM	CON	pH	$\lambda_{Det}$	TEA	DMF
<i>Triptamina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Feniletilamina</i>	✕*	✕	---	---	✕	✕	---
<i>Putrescina</i>	✕*	---	---	---	---	---	---
<i>Cadaverina</i>	✕*	✕	---	---	---	---	---
<i>Histamina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Tiramina</i>	✕	---	---	---	---	---	---
<i>Espermidina</i>	---	---	---	---	---	---	---
<i>Espermina</i>	✕	✕	---	---	---	---	---

--- = No significativo

✕ = Significativo para la altura de pico relativa ( $\alpha = 0.05$ )

✕\* = Significativo para el área de pico relativa ( $\alpha = 0.05$ )



**Figura IV.3. Efectos normalizados de la altura y área de pico relativa.** La barra blanca indica el efecto sobre la altura relativa y la oscura el efecto sobre el área relativa. La línea discontinua representa  $E'_{crit}$  normalizado para la altura de pico relativa y la discontinua para el área de pico relativa.



De este estudio se deduce que el uso del patrón interno empeora la robustez del método respecto a la utilización de las áreas y alturas como variable respuesta.

#### IV.1.6.2. Tiempo de retención

En la Tabla IV.5 y en la Figura IV.4, que reúnen los resultados obtenidos en el estudio de robustez utilizando como variable respuesta el tiempo de retención y la retención relativa sin ajustar, puede observarse cómo la utilización de la última variable reduce el número de factores significativos en relación al tiempo de retención.

**Tabla IV.5. Efectos significativos para el tiempo de retención y la retención relativa sin ajustar**

	FACTOR						
	GRA	TEM	CON	pH	$\lambda_{Det}$	TEA	DMF
<i>Triptamina</i>	*	*	---	*	---	---	*◇
<i>Feniletilamina</i>	*	*	---	*	---	---	*◇
<i>Putrescina</i>	*	*	*	*	---	---	*◇
<i>Cadaverina</i>	*	*	*	*◇	---	---	*◇
<i>Histamina</i>	*◇	*	*	*◇	---	---	*◇
<i>Tiramina</i>	*	*◇	*	*◇	---	---	*◇
<i>Espermidina</i>	*	*◇	*	*	---	---	*◇
<i>Espermina</i>	*	*◇	◇	*	---	---	*◇
<i>1,7-diaminoheptano</i>	*	*	*	*	---	---	*◇

--- = No significativo

\* = Significativo para el tiempo de retención ( $\alpha = 0.05$ )

◇ = Significativo para la retención relativa sin ajustar ( $\alpha = 0.05$ ).

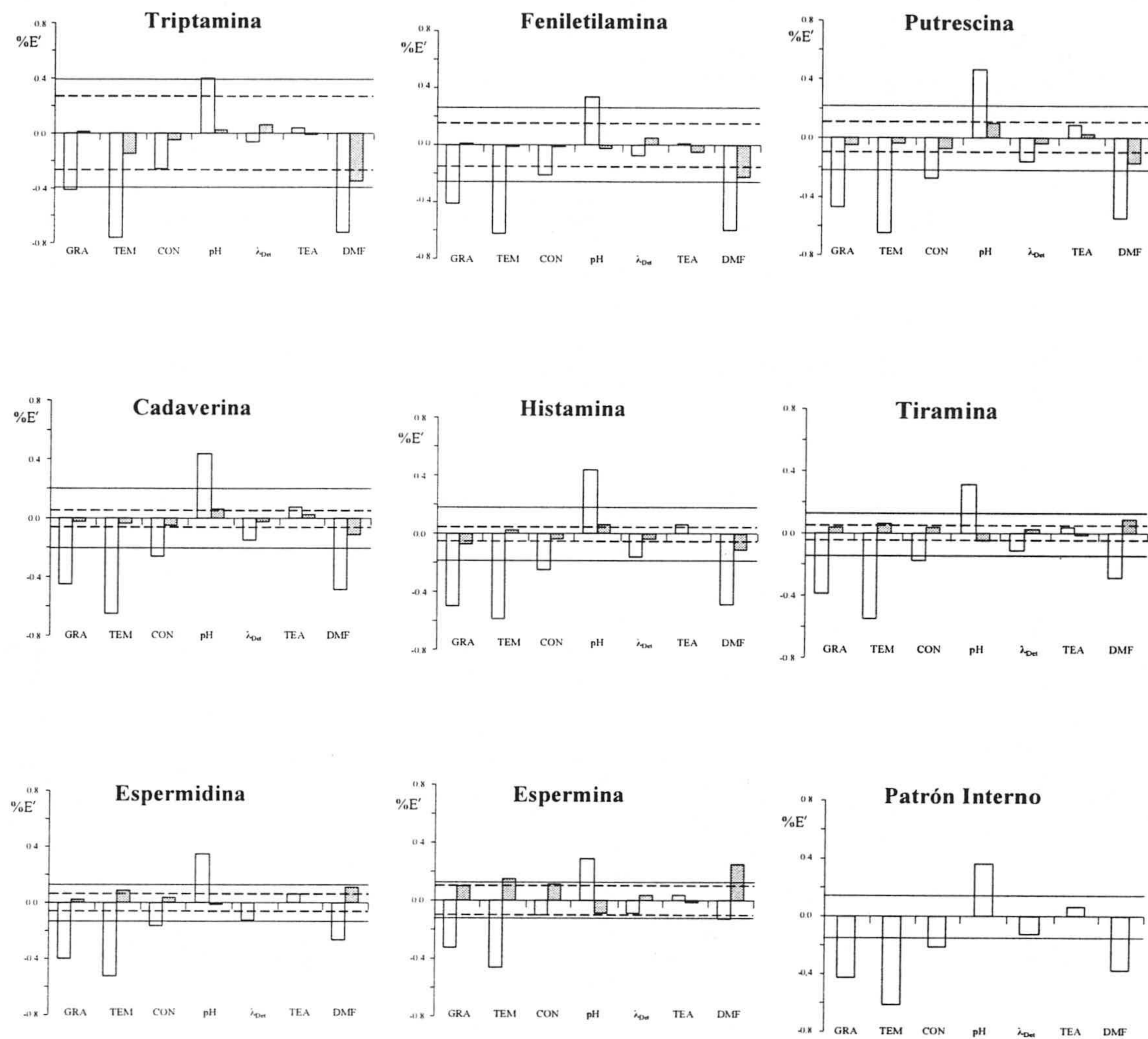


Figura IV.4. Efectos normalizados del tiempo de retención ( $t_r$ ) y retención relativa sin ajustar ( $R_{rsj}$ ). La barra blanca indica el efecto sobre  $t_r$  y la oscura el efecto sobre  $R_{rsj}$ . La línea discontinua representa  $E_{crit}^1$  normalizado para  $t_r$  y la discontinua para  $R_{rsj}$ .

Por tanto, se obtiene que la retención relativa sin ajustar es un parámetro más robusto que el tiempo de retención, pudiendo usarse en lugar de este último para identificar cada analito.

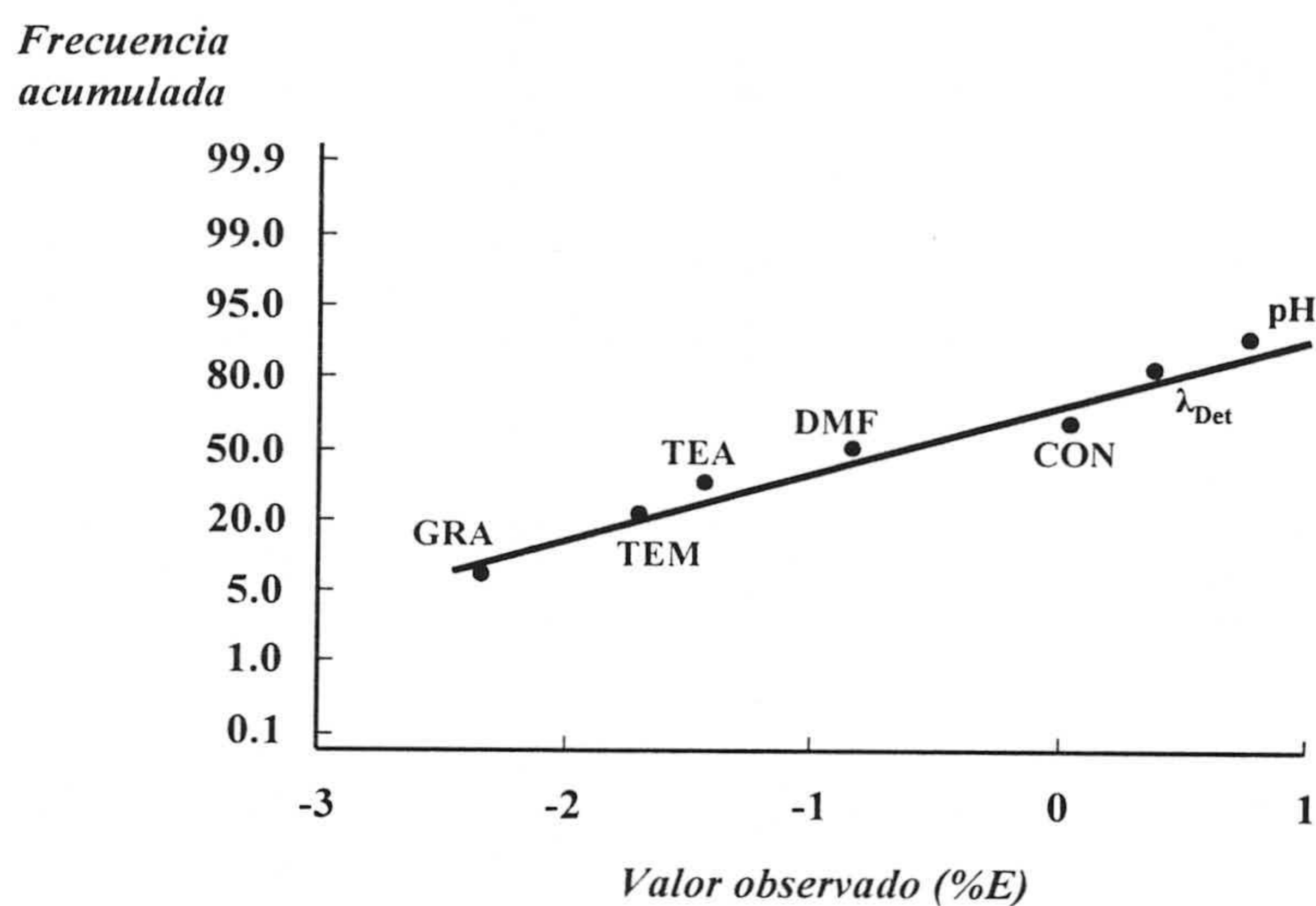
#### IV.1.6.3. Resolución

De los resultados recogidos en la Tabla IV.6, se deduce que ninguno de los factores presenta un efecto significativo sobre la resolución. Se obtienen los mismos resultados si se realiza la representación probabilística normal de los efectos normalizados [7] (Figura IV.5), observándose que ninguno de ellos es significativo.

Tabla IV.6. Valores de los efectos normalizados (%E) y crítico normalizado para la resolución entre la cadaverina e histamina

Factor	% E	Significación <sup>1</sup>
GRA	-0.233	No (11)
TEM	-0.170	No (18)
CON	0.006	No (95)
pH	0.075	No (70)
$\lambda_{Det}$	0.038	No (47)
TEA	-0.142	No (23)
DMF	-0.084	No (42)
$E_{crit}$	0.361	

<sup>1</sup> El valor de P se muestra entre paréntesis.



**Figura IV.5. Representación probabilística normal de los efectos normalizados de los factores sobre la resolución**

De este estudio, se puede deducir, que *la resolución es robusta frente a los pequeños cambios de las variables experimentales ensayadas.*

#### **IV.1.6.4. Estimación del intervalo máximo de tolerancia**

Finalmente, conocida la significación de los efectos de cada uno de los factores sobre las distintas variables respuesta, se calculan los intervalos de los factores, en los que dichos efectos dejan de ser significativos, utilizando la ecuación 5, comentada en el Capítulo

I,

$$X_{krit} = \pm \frac{E'_{crit}}{b_k} \quad (5)$$

En la Tabla A.15 y A.16 se muestran estos intervalos que se calculan para todos los factores significativos, excepto para GRA, debido a su carácter discreto.

En la Tabla IV.7, que contiene un resumen de ambas Tablas, se recogen los intervalos en los que los diferentes factores dejan de tener un efecto significativo para todas las aminos estudiadas. Puesto que ni para el área de pico relativa ni para la resolución había factores significativos, estas dos variables no se incluyen en dicha Tabla.

**Tabla IV.7. Intervalos máximos de tolerancia para las distintas variables respuesta**

Respuesta	FACTOR					
	TEM (°C)	CON (mM)	pH	$\lambda_{Det}$ (nm)	% TEA	%DMF
hp	40.0 ± 0.7			446.0 ± 4.3		
Ap				446.0 ± 4.9		
hp <sub>r</sub>	40.0 ± 1.0			446.0 ± 3.9	0.23 ± 0.02	
t <sub>r</sub>	40.0 ± 0.4	40 ± 3	5.0 ± 0.1			10.0 ± 0.2
Rr <sub>sj</sub>	40.0 ± 1.4	40 ± 4	5.0 ± 0.1			10.0 ± 0.2

Puede observarse cómo las variables cuantitativas altura y área de pico son las más robustas estando únicamente afectadas por los cambios en la temperatura de la columna y en la longitud de onda de detección.

Para el tiempo de retención y retención relativa sin ajustar, el número de factores significativos aumenta en relación a las otras variables, destacando que el uso de la retención

relativa sin ajustar, además de reducir el número de factores significativos, amplía los intervalos de aquellos que aún son significativos, como sucede básicamente con la temperatura de la columna, aumentando el intervalo desde  $\pm 0.4$  a  $\pm 1.4$  °C y concentración de tampón.

#### IV.1.7. CONCLUSIONES

- ✓ En general, la variable cuantitativa más robusta es el área de pico. La inclusión de 1,7-diaminoheptano como patrón interno no mejora la robustez del método.
- ✓ La significación de las variables experimentales sobre el tiempo de retención, se reduce si se emplea la retención relativa sin ajustar como parámetro para la identificación de los analitos. Sin embargo, aunque más robusto, requiere un control del porcentaje de DMF en la fase móvil.
- ✓ La resolución cromatográfica no se ve influida por pequeños cambios en las variables experimentales estudiadas.
- ✓ Se puede concluir finalmente que el método cromatográfico propuesto es robusto para el análisis de estos compuestos.

## **IV.2. ESTABLECIMIENTO DEL MODELO DE CALIBRACIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD**

Una vez estudiada la influencia que las principales variables ejercen sobre la separación cromatográfica de los derivados dabsilados, se procedió a establecer los límites de aplicabilidad del método respecto a las concentraciones de los analitos.

### **IV.2.1. EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD ENTRE LA SEÑAL INSTRUMENTAL Y LA CONCENTRACIÓN. ELECCIÓN DE LA SEÑAL INSTRUMENTAL**

Inicialmente se planificó una experiencia cuyo objetivo era estudiar el rango máximo de concentraciones para los analitos. Para ello se utilizaron los rangos de concentraciones de aminos biógenos en la disolución a inyectar mostrados en la Tabla IV.8.

Además, se utilizó el 1,7-diaminoheptano como patrón interno, evaluándose como posibles señales instrumentales las alturas y áreas de pico relativas.

Tabla IV.8. Rango de concentraciones ensayados

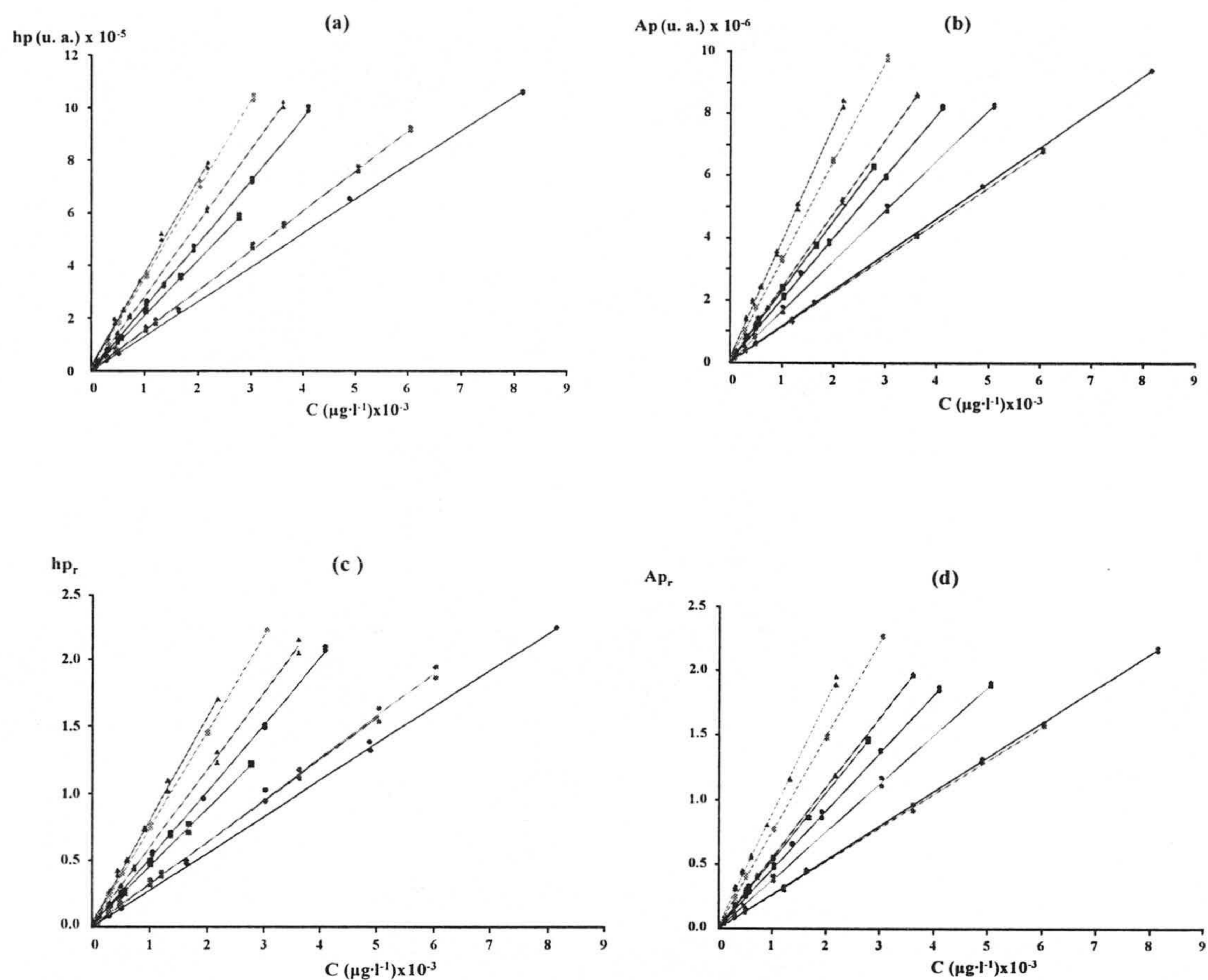
<u>Amina</u>	<u>Intervalo (<math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</u>
Triptamina	95-8135
Feniletilamina	99-6030
Purtescina	307-2179
Cadaverina	102-3054
Histamina	110-2776
Tiramina	111-4100
Espermidina	87-3603
Espermina	80-5059
1,7-diaminoheptano	2000

Mediante calibraciones lineales univariantes, se realizaron las correspondientes regresiones de los datos obtenidos, utilizando el método de mínimos cuadrados.

Se analizaron dos réplicas de cada una de las concentraciones ensayadas (correspondientes a 2 procesos de derivatización), preparando e inyectando los patrones en un orden aleatorio, es decir, variando la relación entre los distintos contenidos de las aminas, en los diversos puntos utilizados en el calibrado.

Los resultados obtenidos para las señales instrumentales evaluadas (altura, área, altura y área relativa) se recogen en la Tabla A.17, y se representan en la Figura IV.6.





**Figura IV.6. Calibrados con patrones.** (a) altura de pico; (b) área de pico; (c) altura relativa; (d) área relativa. (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (●) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para la verificación del cumplimiento de las hipótesis establecidas de aleatoriedad, normalidad y homogeneidad de varianzas, se procedió a un análisis gráfico de los residuales, mediante las representaciones de éstos frente a los valores experimentales de la concentración, para cada analito y señal estudiada, así como a la realización de los test de Kolmogorov-Smirnov y de Cochran, comentados en el Capítulo I.

Dicho estudio permitió comprobar que se *cumplieran las hipótesis de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad necesarias para la aplicación del modelo.*

De esta forma, en la Tabla IV.9, se muestran los principales parámetros estadísticos de los modelos calculados.

Se puede observar, como para algunas de las señales estudiadas, el valor de P obtenido en el test de fallo de ajuste, indica la existencia de curvatura ( $P < 5\%$ ), como sucede para la triptamina (altura de pico y altura relativa), putrescina (altura de pico) y tiramina (altura de pico relativa), indicando la necesidad de reducir el rango de concentraciones ensayadas para estas variables respuesta. Así, para obtener un valor de P superior al 5 % en el test de fallo de ajuste, la triptamina para ser cuantificada en base a la altura de pico o altura de pico relativa, debe encontrarse en una concentración inferior a  $1634 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , la putrescina hasta  $1307 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  si se evalúa en altura de pico, y la tiramina en altura de pico relativa sólo permite concentraciones hasta  $3012 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , mostrándose los parámetros estadísticos hasta estas concentraciones también en la Tabla IV.9, donde se puede observar que la reducción de las concentraciones no supone una mejora apreciable en el valor de P obtenido en el test del fallo de ajuste, aunque deja de ser significativo para un valor de  $\alpha = 0.05$ .

A raíz de estos resultados, se puede indicar que el rango de concentraciones que se

ajustan a una línea recta es menor para las alturas de pico que para las áreas de pico.

**Tabla IV.9. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados**

	Señal	a	s <sub>a</sub>	b (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>b</sub> (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>RC</sub>	r <sup>2</sup> (%)	P <sub>fallo ajuste</sub> (%)
<b>TRIPTAMINA</b>	hp	1888	2641	130.6	0.7	7838	99.96	<b>0.3</b>
	hp <sup>1</sup>	-2830	1717	139.1	2.2	4129	99.80	5.4
	Ap	18894	8447	1149.8	2.3	25070	100.00	5.1
	hp <sub>r</sub>	0.0020	0.0074	0.000276	0.000002	0.0216	99.92	<b>0.5</b>
	hp <sub>r</sub> <sup>1</sup>	-0.0070	0.0045	0.000295	0.000006	0.0108	99.70	9.5
	Ap <sub>r</sub>	0.0048	0.0028	0.000265	0.000001	0.0084	99.99	64.5
<b>FENILETILAMINA</b>	hp	-1053	1717	152.0	0.6	5040	99.98	99.0
	Ap	-9058	13099	1125.1	4.8	38450	99.98	98.6
	hp <sub>r</sub>	0.0005	0.0081	0.000315	0.000003	0.0239	99.89	99.7
	Ap <sub>r</sub>	-0.0037	0.0047	0.000259	0.000001	0.0139	99.95	95.4
<b>PUTRESCINA</b>	hp	16039	6993	357.7	6.6	16699	99.60	<b>3.6</b>
	hp <sup>2</sup>	5204	5702	380.3	7.8	11453	99.58	7.0
	Ap	157466	50168	3733.3	47.2	119804	99.81	5.5
	hp <sub>r</sub>	0.0269	0.0126	0.000769	0.000014	0.0289	99.65	34.2
	Ap <sub>r</sub>	0.0262	0.0110	0.000870	0.000012	0.0252	99.79	6.0
<b>CADAVERINA</b>	hp	7342	3825	341.7	2.6	10378	99.93	43.9
	Ap	54926	15598	3192.1	10.7	42318	99.99	9.7
	hp <sub>r</sub>	0.0145	0.0058	0.000722	0.000005	0.0155	99.95	17.9
	Ap <sub>r</sub>	0.0112	0.0048	0.000735	0.000003	0.0122	99.98	5.0

Tabla IV.9. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados (Cont.)

	Señal	a	s <sub>a</sub>	b (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>b</sub> (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>RC</sub>	r <sup>2</sup> (%)	P <sub>fallo ajuste</sub> (%)
<b>HISTAMINA</b>	hp	5549	2551	208.8	2.0	6784	99.89	42.7
	Ap	40581	22744	2249.1	17.4	60484	99.93	62.2
	hp <sub>r</sub>	0.0152	0.0069	0.000432	0.000005	0.0184	99.82	37.0
	Ap <sub>r</sub>	0.0064	0.0051	0.000519	0.000004	0.0135	99.93	39.8
<b>TIRAMINA</b>	hp	-286	3343	240.6	1.7	8936	99.93	41.7
	Ap	59859	22339	1973.4	11.0	59722	99.96	11.5
	hp <sub>r</sub>	0.0023	0.0072	0.000502	0.000004	0.019	99.93	<b>3.4</b>
	hp <sub>r</sub> <sup>3</sup>	0.0089	0.0065	0.000494	0.000004	0.016	99.91	10.8
	Ap <sub>r</sub>	0.0147	0.0052	0.000450	0.000003	0.014	99.95	29.7
<b>ESPERMIDINA</b>	hp	1869	2201	280.4	1.4	6283	99.97	85.6
	Ap	48259	13625	2365.1	8.4	38905	99.98	30.9
	hp <sub>r</sub>	0.0080	0.0099	0.000581	0.000006	0.0281	99.87	98.6
	Ap <sub>r</sub>	0.0127	0.0033	0.000542	0.000002	0.0093	99.98	34.9
<b>ESPERMINA</b>	hp	5931	3519	150.3	1.5	10272	99.87	74.1
	Ap	8695	16410	1619.8	7.2	47906	99.98	96.3
	hp <sub>r</sub>	0.0150	0.0106	0.000311	0.000005	0.0309	99.73	95.7
	Ap <sub>r</sub>	-0.0001	0.0057	0.000373	0.000002	0.0164	99.95	99.6

<sup>1</sup> Hasta 1634 μg·l<sup>-1</sup>.<sup>2</sup> Hasta 1307 μg·l<sup>-1</sup>.<sup>3</sup> Hasta 3012 μg·l<sup>-1</sup>.

Los intervalos de trabajo donde la señal es lineal con la concentración se muestra en la Tabla IV.10, donde se puede observar que en general, coincide con el intervalo ensayado (Tabla IV.8), excepto para aquellas aminas y señales que presentaban una falta de linealidad.

**Tabla IV.10. Valores de concentraciones donde se mantiene la linealidad**

Amina	Intervalo de trabajo ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )			
	$hp$	$Ap$	$hp_r$	$Ap_r$
Triptamina	95-1634	95-8135	95-1634	95-8135
Feniletilamina		99-6030		
Putrescina	307-1307	307-2179	307-2179	307-2179
Cadaverina		102-3054		
Histamina		110-2776		
Tiramina	111-4100	111-4100	111-3012	111-4100
Espermidina		87-3603		
Espermina		80-5059		

#### **IV.2.1.1. Linealidad: Elección de la mejor señal instrumental**

Los valores de linealidad “on-line” se muestran en la Tabla IV.11, para las distintas aminas y variables respuesta estudiadas.

Como se ha comentado en el Capítulo I, Bagur y col. [8] proponen el criterio de la

linealidad “on-line” como el parámetro de calidad para decidir la mejor señal que se relaciona con la concentración. Así, aquella que presente un mayor valor de linealidad “on-line”, será seleccionada como variable respuesta.

**Tabla IV.11. Valores de linealidad obtenidos**

Amina	Linealidad “on-line” (%)			
	<i>hp</i>	<i>Ap</i>	<i>hp<sub>r</sub></i>	<i>Ap<sub>r</sub></i>
Triptamina	98.41	99.80	99.12	99.71
Feniletilamina	99.58	99.57	99.04	99.33
Putrescina	97.94	98.74	98.22	98.63
Cadaverina	99.23	99.66	99.35	99.58
Histamina	99.06	99.22	98.77	99.25
Tiramina	99.31	99.44	99.19	99.42
Espermidina	99.52	99.65	98.96	99.63
Espermina	98.97	99.55	98.50	99.34

De dicha Tabla se puede deducir cómo en la mayoría de los casos se obtienen valores de linealidad superiores al 99 %.

Asimismo, en general se obtienen mejores resultados cuando se utiliza exclusivamente el área o altura de pico que con las alturas y áreas relativas. Por otra parte, entre la altura y área de pico, se observa una mejor linealidad para esta última, excepto para la feniletilamina, que muestra resultados similares.

Por tanto, y atendiendo al criterio de linealidad “on-line”, *se selecciona el área de pico como mejor señal instrumental para la cuantificación de las aminas biógenas, dentro del rango de concentraciones estudiado.*

#### IV.2.2. PARÁMETROS DE CALIDAD

Finalmente en la Tabla IV.12 se muestran los parámetros de calidad para el rango de concentraciones máximo, utilizando como señal instrumental el área de pico.

**Tabla IV.12. Parámetros de calidad del método analítico empleando como señal instrumental el área de pico**

AMINA	Parámetros de calidad					
	Lin “on-line”	$L_D^1$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$L_Q^2$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$S_{\text{calibrado}}$ ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$R_{\text{analítica}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	DER (%) <sup>3</sup>
Triptamina	99.80	50	152	1150	22	2.93
Feniletilamina	99.57	79	240	1125	34	1.28
Putrescina	98.74	75	228	3733	30	0.91
Cadaverina	99.66	31	94	3192	13	0.69
Histamina	99.22	62	188	2249	27	2.63
Tiramina	99.44	66	201	1973	30	1.25
Espermidina	99.65	38	116	2365	16	3.56
Espermina	99.55	68	207	1620	30	3.32

<sup>1</sup> Límite de detección calculado según [9].

<sup>2</sup> Límite de cuantificación.

<sup>3</sup> Desviación estándar relativa obtenida en condiciones de repetibilidad.

Por tanto, para muestras cuyo contenido en aminos biógenos sea lo suficientemente elevado, será recomendable utilizar este calibrado, en el que se utiliza como señal instrumental el área de pico.

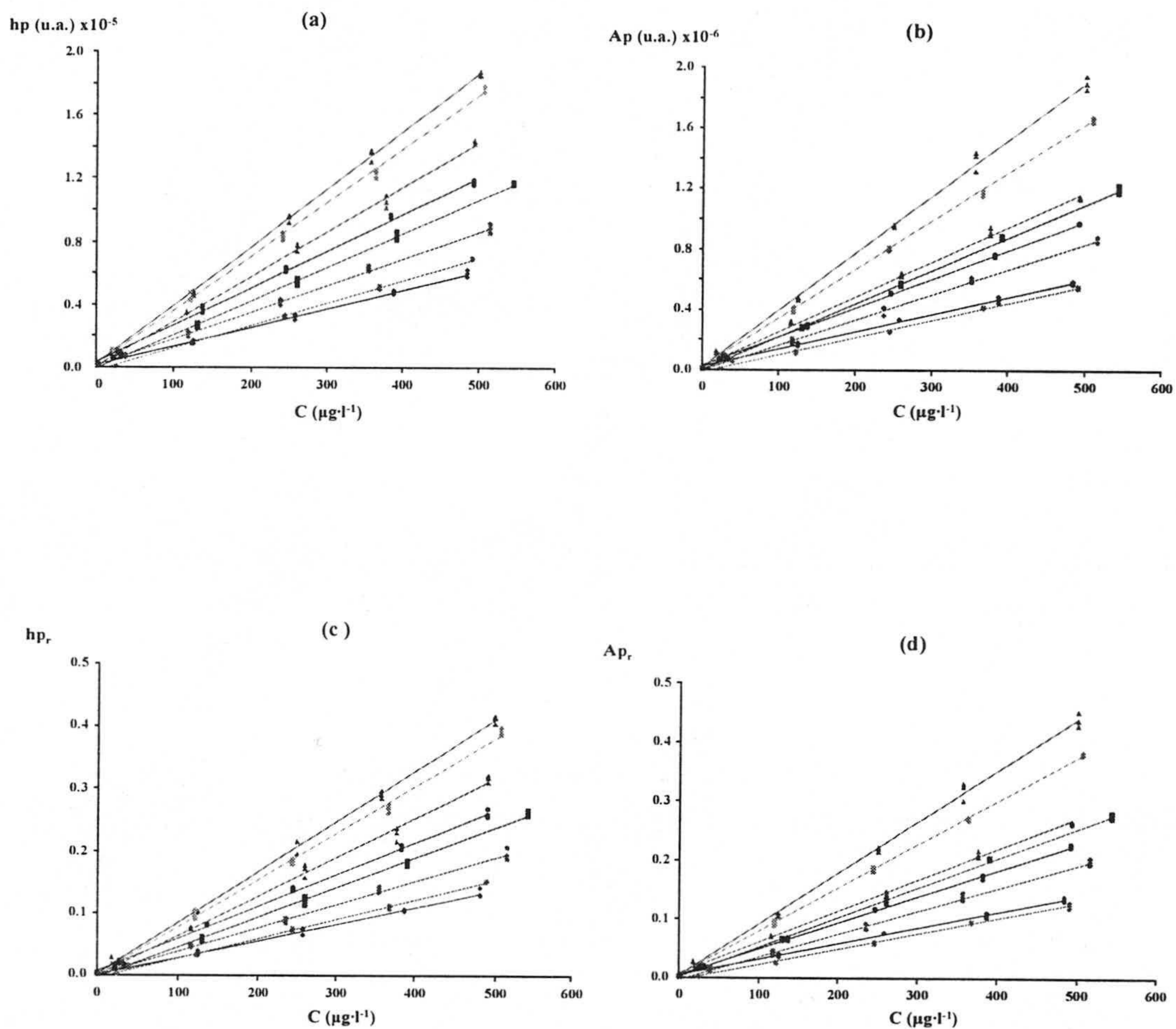
#### **IV.2.3. ESTUDIO DE LA ZONA DE LINEALIDAD ENTRE 0 Y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$**

Una vez establecido el rango dinámico lineal máximo, se realizó un estudio de la zona de linealidad donde pueden encontrarse mayoritariamente los contenidos de las aminos biógenos en las muestras que se van a analizar en la presente memoria. En este intervalo de concentraciones, más corto, se estudió de nuevo la mejor variable experimental, para comprobar si las conclusiones obtenidas en el apartado anterior siguen siendo válidas, puesto que en general, para concentraciones inferiores, la altura de pico suele dar mejores resultados que el área de pico.

Para ello, se planificó un estudio en un rango de concentraciones entre 0 y 500  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , y mediante una calibración lineal univariante, se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, aplicando la metodología de mínimos cuadrados. En esta ocasión se utilizaron tres réplicas de cada concentración y se inyectaron los patrones en orden aleatorio. Además, la experiencia se realizó en dos días, con objeto de tener una mejor estimación de los parámetros analíticos, en condiciones de precisión intermedia [10].

Los resultados experimentales obtenidos a partir de los cromatogramas registrados se recogen en la Tabla A.18 y se representan en la Figura IV.7.





**Figura IV.7. Calibrados con patrones.** (a) altura de pico; (b) área de pico; (c) altura relativa; (d) área relativa. ( $\blacklozenge$ ) Triptamina; ( $\bullet$ ) Feniletilamina; ( $\blacktriangle$ ) Putrescina; ( $\bullet$ ) Cadaverina; ( $\blacksquare$ ) Histamina; ( $\bullet$ ) Tiramina; ( $\blacktriangle$ ) Espermidina; ( $\bullet$ ) Espermina.

#### **IV.2.3.1. Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas**

Este estudio, llevado a cabo de forma similar a como se ha descrito anteriormente, indica que se *cumplen las hipótesis de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad necesarias para la aplicación del modelo.*

En la Tabla IV.13, se muestran los principales parámetros estadísticos de los modelos calculados.

Se puede observar, cómo para la altura de pico de la cadaverina y tiramina, el valor de P obtenido en el test de fallo de ajuste, indica la existencia de curvatura ( $P < 5\%$ ), por lo que se debería de reducir el rango de concentraciones. Así para obtener un valor de P superior al 5% en el test de fallo de ajuste, la altura de pico debe evaluarse hasta 365 y 384  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para la cadaverina y tiramina, respectivamente (Tabla IV.13).

Tabla IV.13. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados

	Señal	a	s <sub>a</sub>	b (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>b</sub> (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>RC</sub>	r <sup>2</sup> (%)	P <sub>fallo ajuste</sub> (%)
<b>TRIPTAMINA</b>	hp	1673	703	118.2	2.4	1630	99.44	31.3
	Ap	29036	6923	1131.9	23.3	16053	99.41	13.1
	hp <sub>r</sub>	0.031	0.0019	0.000261	0.000006	0.0044	99.16	44.6
	Ap <sub>r</sub>	0.0062	0.0017	0.000261	0.000006	0.0039	99.67	11.0
<b>FENILETILAMINA</b>	hp	-3460	296	146.1	1.0	635	99.94	76.6
	Ap	-33419	3599	1178.2	12.7	7595	99.86	5.1
	hp <sub>r</sub>	-0.0093	0.0011	0.000326	0.000004	0.0024	99.92	25.8
	Ap <sub>r</sub>	-0.0073	0.0010	0.000266	0.000003	0.0022	99.89	13.4
<b>PUTRESCINA</b>	hp	1713	1044	367.7	3.6	2496	99.87	59.9
	Ap	3144	16470	3800.9	56.2	39392	99.69	86.8
	hp <sub>r</sub>	0.0027	0.0022	0.000787	0.000007	0.0047	99.95	97.1
	Ap <sub>r</sub>	0.0061	0.0034	0.000854	0.000012	0.0082	99.87	29.3
<b>CADAVERINA</b>	hp	1283	1150	341.0	3.9	2768	99.82	<b>1.0</b>
	hp <sup>l</sup>	2587	941	330.0	4.3	2074	99.81	30.6
	Ap	20413	6045	3209.8	22.0	14338	99.94	12.9
	hp <sub>r</sub>	0.0037	0.0019	0.000728	0.000006	0.0045	99.95	15.2
	Ap <sub>r</sub>	0.0050	0.0014	0.000732	0.000005	0.0032	99.97	57.1

Tabla IV.13. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados (Cont.)

	Señal	a	s <sub>a</sub>	b (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>b</sub> (l·μg <sup>-1</sup> )	s <sub>RC</sub>	r <sup>2</sup> (%)	P <sub>fallo ajuste</sub> (%)
<b>HISTAMINA</b>	hp	-781	729	213.1	2.5	1729	99.83	46.1
	Ap	1184	6660	2189.4	21.0	16032	99.87	9.6
	hp <sub>r</sub>	-0.0041	0.0023	0.000476	0.000008	0.0055	99.82	14.1
	Ap <sub>r</sub>	-0.0006	0.0016	0.000506	0.000005	0.0038	99.93	9.09
<b>TIRAMINA</b>	hp	4316	896	231.8	2.9	1887	99.79	<b>3.1</b>
	hp <sup>2</sup>	2505	700	241.8	3.1	1513	99.82	24.9
	Ap	33999	3908	1886.0	13.0	8224	99.94	26.5
	hp <sub>r</sub>	0.0092	0.0036	0.000504	0.000016	0.0075	99.65	33.7
	Ap <sub>r</sub>	0.0077	0.0009	0.000432	0.000003	0.0019	99.97	54.5
<b>ESPERMIDINA</b>	hp	981	757	285.1	2.6	1784	99.89	44.9
	Ap	33705	5484	2264.6	18.9	12924	99.91	15.0
	hp <sub>r</sub>	0.0029	0.0015	0.000608	0.000005	0.0036	99.95	14.6
	Ap <sub>r</sub>	0.0072	0.0016	0.000527	0.000006	0.0038	99.92	5.1
<b>ESPERMINA</b>	hp	481	1063	170.4	3.6	2520	99.38	5.0
	Ap	-12200	8346	1681.0	27.9	19560	99.64	11.9
	hp <sub>r</sub>	0.0020	0.0019	0.000362	0.000006	0.0045	99.78	10.3
	Ap <sub>r</sub>	-0.0028	0.0022	0.000384	0.000007	0.0051	99.75	13.4

<sup>1</sup> Hasta 365 μg·l<sup>-1</sup>.<sup>2</sup> Hasta 384 μg·l<sup>-1</sup>.

#### **IV.2.3.2. Linealidad: Elección de la mejor señal instrumental**

Los valores de linealidad se muestran en la Tabla IV.14, para las distintas aminas y variables respuesta estudiadas.

**Tabla IV.14. Valores de linealidad obtenidos**

Amina	Linealidad "on-line" (%)			
	<i>hp</i>	<i>Ap</i>	<i>hp<sub>r</sub></i>	<i>Ap<sub>r</sub></i>
Triptamina	97.99	97.94	97.54	97.84
Feniletilamina	99.32	98.92	98.87	98.71
Putrescina	99.02	98.52	99.09	98.63
Cadaverina	98.70	99.31	99.13	99.33
Histamina	98.83	99.04	98.34	99.00
Tiramina	98.74	99.31	97.69	99.29
Espermidina	99.09	99.17	99.12	98.90
Espermina	97.89	98.34	98.24	98.10

Las magnitudes relativas, altura y área relativa, originan valores de linealidad inferiores que las magnitudes absolutas, altura y área de pico, excepto para la cadaverina, para la cual, se obtienen los mismos valores, 99.33 y 99.31% para el área relativa y área de pico respectivamente.

Entre la altura y área de pico, el área de pico origina los mejores valores de linealidad, excepto para la feniletilamina y putrescina, para las que la altura de pico produce una mejor linealidad.

---

A raíz de los resultados obtenidos, *se decide seleccionar como señal instrumental para posteriores experiencias el área de pico, en el rango de concentraciones estudiados.*

#### **IV.2.3.3. Obtención de los parámetros de calidad del método**

Seleccionada la mejor señal instrumental, se establecerán los parámetros de calidad comentados en el Capítulo I para el área de pico, mostrándose en el anexo, una tabla resumen con los parámetros de calidad para las señales instrumentales no seleccionadas (Tabla A.19).

- *Rango dinámico lineal.*

En todos los casos se obtiene una señal lineal con respecto a la concentración hasta  $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , excepto para la cadaverina y tiramina, que si se calibran en altura de pico, la respuesta sólo es lineal hasta  $365$  y  $384 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente.

- *Límites de detección y cuantificación.*

La determinación de estos parámetros de calidad se realizó a partir de la evaluación de las posibilidades de falso positivo y falso negativo recomendadas por la IUPAC [9] ( $\alpha = \beta = 0.05$ ), obteniendo los resultados mostrados en la Tabla IV.15.

Tabla IV.15. Valores obtenidos del límite de detección y cuantificación

Amina	$L_D^1$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$L_Q^2$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )
Triptamina	32	97
Feniletilamina	15	46
Putrescina	24	73
Cadaverina	10	30
Histamina	17	52
Tiramina	10	30
Espermidina	13	40
Espermina	27	82

<sup>1</sup>  $L_D$ : Límite de detección.

<sup>2</sup>  $L_Q$ : Límite de cuantificación.

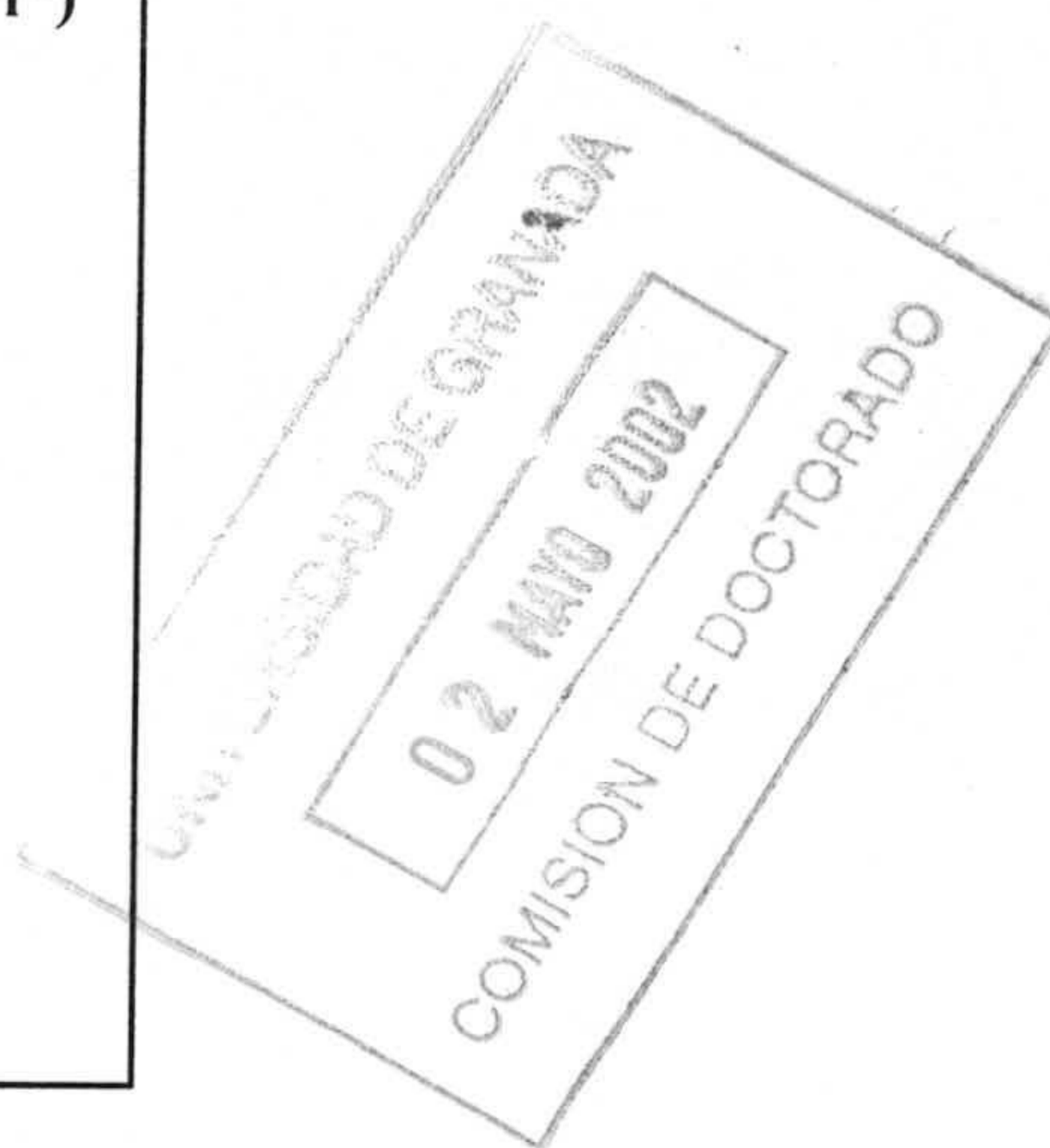
Se puede observar como el valor de límite de detección oscila entre los  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para la tiramina y cadaverina y  $32 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para la triptamina, mientras que el límite de cuantificación varía entre  $97 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para la triptamina y  $30 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para la tiramina y cadaverina.

- *Sensibilidad y resolución analítica.*

Los valores de sensibilidad y resolución analítica, obtenidas mediante el tratamiento estadístico de regresión lineal, se muestran en la Tabla IV.16.

Tabla IV.16. Sensibilidad obtenida para el método propuesto

Amina	$S_{\text{calibrado}} (l \cdot \mu\text{g}^{-1})$	$R_{\text{analítica}} (\mu\text{g} \cdot l^{-1})$
Triptamina	1132	14
Feniletilamina	1178	6
Putrescina	3801	10
Cadaverina	3210	4
Histamina	2189	7
Tiramina	1886	4
Espermidina	2265	6
Espermina	1681	12



Los valores de sensibilidad analítica indican en cada caso, cual puede ser el mínimo intervalo de confianza discernible en todo el rango de concentraciones estudiado, oscilando entre  $14 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  para la triptamina y  $4 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  para la tiramina y cadaverina.

- *Evaluación de la precisión.*

Dicho estudio se llevó a cabo en condiciones de reproducibilidad intermedia, procediendo de dos formas diferentes:

a) *Evaluándola a partir de los datos de calibrado.*

La precisión del método propuesto se evaluó a partir de los datos de calibrado, representando la desviación estándar relativa de la concentración (%) vs concentración, para cada una de las aminas, recogiendo los resultados en la Figura IV.8.



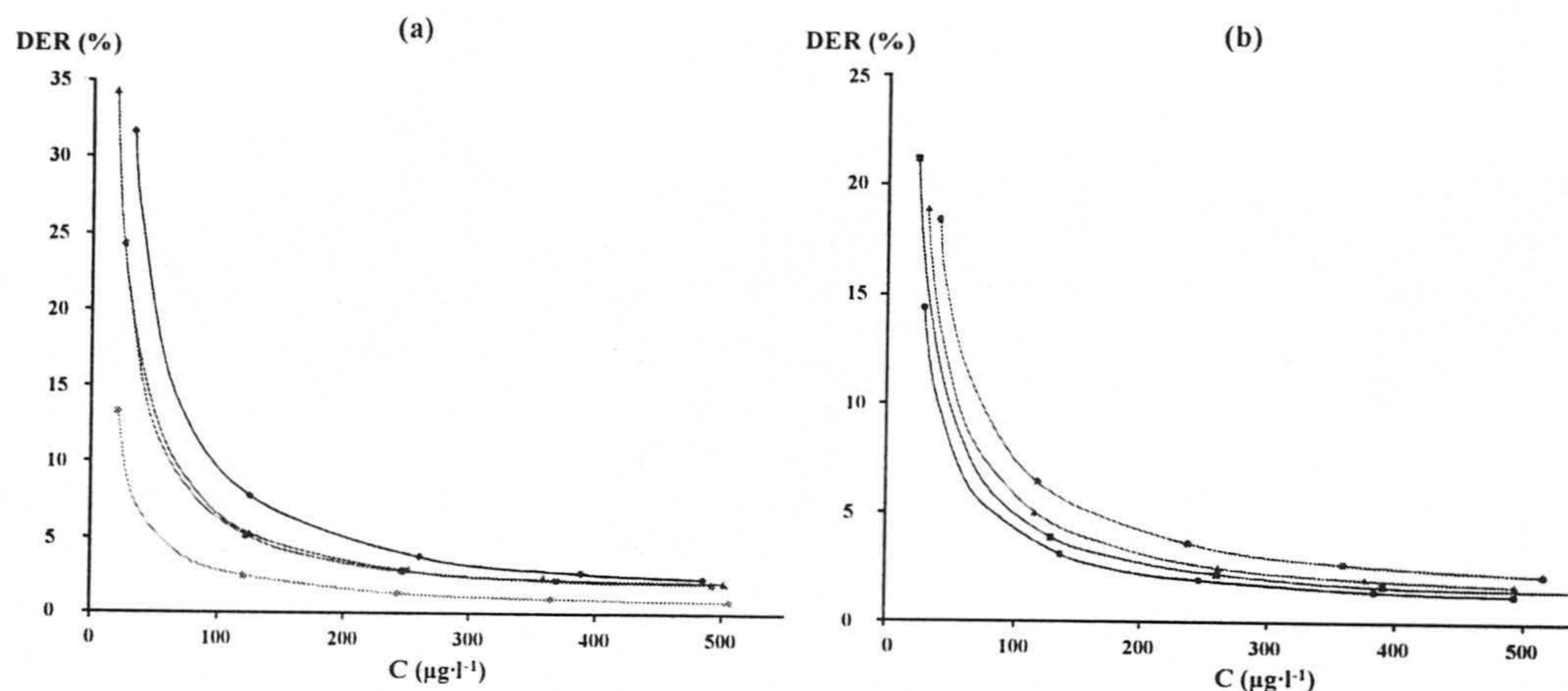


Figura IV.8.- Variación de la desviación estándar relativa (%) con las distintas concentraciones de aminas. (a) (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (■) Cadaverina; (b) (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Espermina.

*b) Evaluación de la precisión para una determinada concentración.*

Para ello, se partió de una serie de disoluciones que contenían aproximadamente  $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de cada amina, y se realizaron seis derivatizaciones de acuerdo con el método descrito, procediendo a su posterior determinación cromatográfica, en condiciones de reproducibilidad entre días [10] y obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla IV.17, en los que se observan unos buenos valores para la desviación estándar relativa.

Tabla IV.27. Reproducibilidad entre días del método analítico

Amina	$A_{p_{media}}$ (u.a.)	$C_{media}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$s_c$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	DER (%)
Triptamina	296778	236	5	2.12
Feniletilamina	270505	258	6	2.32
Putrescina	897553	235	4	1.70
Cadaverina	851120	259	4	1.54
Histamina	578145	260	4	1.54
Tiramina	514929	255	5	1.96
Espemidina	586907	244	5	2.05
Espermina	388640	239	8	3.35

- *Resumen de los parámetros analíticos.*

En la Tabla IV.18 se resumen los parámetros de calidad del método utilizando como señal instrumental el área de pico, que será utilizada posteriormente durante la etapa de aplicación del método a diversas muestras.

**Tabla IV.18. Parámetros de calidad del método analítico empleando como señal instrumental el área de pico**

AMINA	Parámetro de calidad					
	Lin "on-line"	$L_D$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$L_Q$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$S_{\text{calibrado}}$ ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$R_{\text{analítica}}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	DER (%) <sup>1</sup>
Triptamina	97.94	32	97	1132	14	3.6
Feniletilamina	98.92	15	46	1178	6	2.7
Putrescina	98.52	24	73	3801	10	2.8
Cadaverina	99.31	10	30	3210	4	1.3
Histamina	99.04	17	52	2189	7	2.0
Tiramina	99.31	10	30	1886	4	1.8
Espermidina	99.17	13	40	2265	6	2.4
Espermina	98.34	27	82	1681	12	3.5

<sup>1</sup> Desviación estándar relativa (%) para el valor medio del rango de concentración estudiado.

## CAPÍTULO V

### DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS



## DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS

El método analítico propuesto se aplicó a vinos de distinta naturaleza y procedencia estudiando el efecto ejercido por la matriz sobre los resultados obtenidos.

Asimismo, se estudió la diferencia del contenido en aminos biógenos entre vinos tintos, claretes y blancos, haciendo uso del análisis multivariante.

## **V.1. VALIDACIÓN APLICADA PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO**

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de las aminas biógenas estudiadas en 19 vinos de mesa, tintos, claretes y blancos procedentes de las áreas vitivinícolas de Granada, Murcia, Ciudad Real y Badajoz.

### **V.1.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras de vino se filtran a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . A continuación se toma un volumen del vino filtrado y se diluye con la disolución de HCl 0.1M con 0.2 % (m/v) de ácido 3,3'-tiodipropiónico, hasta 10 ml, tomando a continuación 1.5 ml para su derivatización.

### **V.1.2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO TINTO**

#### **V.1.2.1. Validación del método en un vino tinto: Verificación de la veracidad**

Para verificar la veracidad del método propuesto, primero se escogió un vino tinto, al que se le aplicó la metodología de adición de patrón, y se realizó un ensayo de recuperación.

En este vino, las únicas aminas biógenas detectadas fueron putrescina, cadaverina, histamina, tiramina y espermina. En la Tabla A.20 (ver anexo), se recogen las áreas de pico para cada uno de los cromatogramas obtenidos.

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos de la tabla anterior, se reúnen en la Tabla V.1, donde se pone de manifiesto que únicamente existe efecto matriz para la putrescina y cadaverina, pero encontrándose la zona de saturación del efecto interactivo matriz/analito en los niveles de muestra ensayados.

**Tabla V.1. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminas biógenas en el vino tinto (1)**

	PUTRESCINA			
	CY	CP	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>
Pendiente	552806	3733	2888	2738
O. origen	421745	157466	1560510	2742260
S <sub>RC</sub>	74747	119804	55231	81232
n	5	14	5	5
¿Hom. Varianzas? Sí	S <sub>p</sub> = 109665 S <sub>p</sub> = 69459			
¿Igualdad de pendientes?	No (P < 1%) Sí (P = 12.9%) b <sub>p</sub> 2813			
Blanco de Youden	Existe componente de error sistemático constante			
Test de veracidad	t <sub>cal</sub> = 1.450 < t <sub>tab</sub> = 2.365 (P = 19.0%)			
Contenido de analito	13.67 mg · t <sup>-1</sup> ; DER % (n = 7) = 3.4			



Tabla V.1. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminos biógenas en el vino tinto (1) (Cont)

	CADAVERINA			
	CY	CP	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>
Pendiente	77465	3210	2667	2625
O. origen	-69990	20413	84813	225753
S <sub>RC</sub>	21814	14338	18735	21144
n	5	15	5	5
¿Hom. Varianzas? Sí	S <sub>p</sub> = 15259 S <sub>p</sub> = 19976			
¿Igualdad de pendientes?	No (P < 1%) Sí (P = 92.7%) b <sub>p</sub> 2646			
Blanco de Youden	Existe componente de error sistemático constante			
Test de veracidad	t <sub>cal</sub> = 0.153 < t <sub>tab</sub> = 2.365 (P = 88.3%)			
Contenido de analito	1.88 mg · t <sup>-1</sup> ; DER % (n = 6) = 4.3			

	HISTAMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	96283	2189	2113
O. origen	163898	1184	363917
S <sub>RC</sub>	12379	16032	10733
n	5	16	5
Hom. Varianzas	¿Son homogéneas? Sí (P = 27.8%) S <sub>p</sub> 15231		
¿Igualdad de pendientes?	Sí (P = 22.6%) b <sub>p</sub> 2171		
Blanco de Youden	Existe componente de error sistemático constante		
Test de veracidad	t <sub>cal</sub> = 1.803 < t <sub>tab</sub> = 2.101 (P = 8.8 %)		
Contenido de analito	3.21 mg · t <sup>-1</sup> ; DER % (n = 6) = 7.2		

Tabla V.1. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminas biógenas en el vino tinto (1) (Cont.)

	TIRAMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	66740	1886	1871
O. origen	123360	33999	254856
$S_{RC}$	19466	8224	14023
n	5	15	5
<b>Hom. Varianzas</b>	¿Son homogéneas? Sí (P = 20.6%)		
	$S_p$ 9666		
<b>¿Igualdad de pendientes?</b>	Sí (P = 72.9%)		
	$b_p$ 1884		
<b>Blanco de Youden</b>	Existe componente de error sistemático constante		
<b>Test de veracidad</b>	$t_{cal} = 1.392 < t_{tab} = 2.110$ (P = 18.0 %)		
<b>Contenido de analito</b>	<b><math>2.55 \text{ mg } t^{-1}</math> ; DER % (n = 6) = 8.4</b>		

	ESPERMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	10678	1681	1766
O. origen	6884	-12200	27947
$S_{RC}$	2435	22312	11670
n	4	16	5
<b>Hom. Varianzas</b>	¿Son homogéneas? Sí (P = 15.7%)		
	$S_p$ 20832		
<b>¿Igualdad de pendientes?</b>	Sí (P = 67.8%)		
	$b_p$ 1693		
<b>Blanco de Youden</b>	No existe componente de error sistemático constante		
<b>Test de veracidad</b>	$t_{cal} = 0.810 < t_{tab} = 2.101$ (P = 42.8 %)		
<b>Contenido de analito</b>	<b><math>0.57 \text{ mg } t^{-1}</math> ; DER % (n = 5) = 8.6</b>		

Los resultados pusieron de manifiesto que en todos los casos, **el método conducía a resultados veraces, para un nivel de significación del 5%, y a valores de precisión satisfactorios.**

Con objeto de comprobar si la matriz permitía la determinación de las ocho aminas estudiadas, se procedió a la adición de cantidades conocidas de ellas a la muestra de vino analizada, evaluando la matriz, teniendo en cuenta las recomendaciones de la IUPAC [1]. El cálculo del porcentaje de recuperación se llevó a cabo determinando primero la concentración encontrada del analito, con las siguientes consideraciones:

a.- Para las aminas no detectadas en el vino, la concentración se calculó por interpolación en los correspondientes calibrados con patrones.

b.- Para las aminas detectadas que no presentan efecto matriz, la concentración se obtuvo a partir de los correspondientes calibrados con patrones.

c.- Finalmente, en los casos de aminas detectadas que presentan efecto matriz, el cálculo de la concentración de analito se obtuvo a partir de la pendiente promedio obtenida con las dos adiciones de patrón. Tanto en este caso como en el anterior se tuvo en cuenta la existencia o no de Blanco de Youden.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V.2, donde se muestran los valores de P, al comparar los porcentajes de recuperación obtenidos con el 100%.

Tabla V.2. Estudio del porcentaje de recuperación en el vino tinto (1)

Amina	C <sub>vino</sub> <sup>1</sup>	C <sub>añadida</sub>	C <sub>encontrada</sub>	% Rec	DER <sup>2</sup> (%)	P(%)
Triptamina	----	3.03	2.87	94.8	5.4 (n = 8)	22.6
Feniletilamina	----	4.11	4.13	100.5	4.1 (n = 6)	76.4
Putrescina	13.67	10.88	22.72	92.6	3.4 (n = 5)	0.6
Cadaverina	1.88	1.36	3.21	99.1	4.8 (n = 5)	69.6
Histamina	3.21	1.94	4.76	92.4	6.8 (n = 7)	1.89
Tiramina	2.55	2.45	4.77	95.3	5.8 (n = 6)	9.37
Espermidina	----	2.88	2.11	73.4	7.3 (n = 8)	0.0
Espermina	0.57	0.53	1.02	92.7	5.5 (n = 5)	16.71

<sup>1</sup> Concentración expresada en mg·l<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> Entre paréntesis, el número de determinaciones.

Puede observarse que para la mayoría de las aminas, se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores al 90 %, siendo en todos los casos, salvo para putrescina e histamina, significativamente iguales al 100 %.

La espermidina, sin embargo, presentó un porcentaje de recuperación del 73 %, inferior al considerado como aceptable para la concentración estudiada [2]. Dado que esto puede ser indicativo de la presencia de una interacción espermidina/matriz, se decidió aplicar la metodología de adición de patrón, para estudiar dicha interacción.

Para ello, se probaron 2 niveles de muestra, 2 y 4 ml de vino, a las que se adicionó previamente espermidina, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla V.3.

Tabla V.3. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de la espermidina

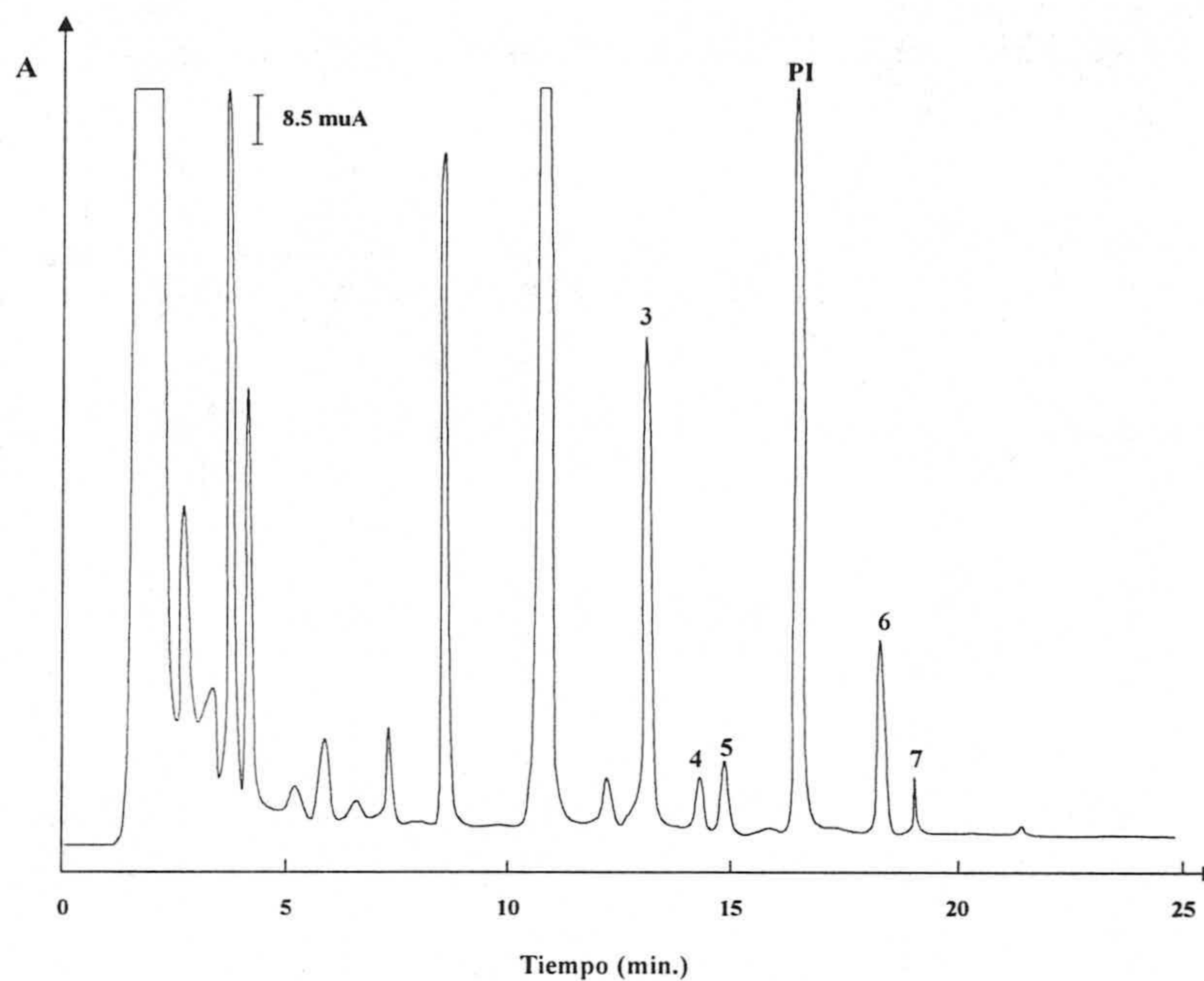
	ESPERMIDINA			
	CY	CP	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>
Pendiente	79679	2265	1984	1962
O. origen	11403	33705	173286	346950
S <sub>RC</sub>	9823	12924	12193	6206
n	5	16	4	4
¿Hom. Varianzas? Sí	S <sub>p</sub> = 12834 S <sub>p</sub> = 9674			
¿Igualdad de pendientes?	No (P < 1%) Sí (P = 81.0 %) b <sub>p</sub> 1973			
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante			
Test de veracidad	t <sub>cal</sub> = 0.116 < t <sub>tab</sub> = 2.571 (P = 91.2 %)			
Contenido de analito	2.90 mg·l <sup>-1</sup> ; DER % (n = 8) = 4.8			

De la tabla, se puede apreciar la existencia de un efecto matriz, encontrándose en los niveles ensayados, la saturación del efecto matriz/analito.

Teniendo en cuenta la concentración de analito encontrada (2.90 mg·l<sup>-1</sup>) y adicionada (2.88 mg·l<sup>-1</sup>), se obtiene un porcentaje de recuperación de 101 %, estando dentro de los límites establecidos [2] y considerados como aceptables.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir, que *el método es veraz para la determinación de aminos biógenas en vinos tintos, corrigiéndose la existencia de la interacción entre los analitos y la matriz del vino.*

En la Figura V.1, se muestra un cromatograma tipo del vino tinto analizado, donde puede observarse que los picos correspondientes a las aminos esta bien resueltos.



**Figura V.1. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en el vino tinto (1). 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

### **V.1.2.2. Análisis de muestras de vino tinto**

A continuación, se procedió el análisis de otras cinco muestras de vino tinto, para comprobar la utilidad del método propuesto. Las áreas de pico para cada uno de los cromatogramas registrados se recogen en las Tablas A.21-A-25 (ver anexo) y los resultados del tratamiento estadístico en las Tablas A.26-A.30, mostrándose en la Tabla V.4 un resumen de los mismos.

**Tabla V.4. Resumen del análisis estadístico del análisis de aminos biógenos en muestras de vino tinto**

<i>Muestra</i>	<i>Amina</i>	<i>Efecto matriz</i>	<i>BY</i>	<u>¿Pendientes diferentes?</u>		<i>¿Resultado veraz?</i>
				<i>CP&amp;AP</i>	<i>AP<sub>1</sub>&amp;AP<sub>2</sub></i>	
<b>Vino (1)</b>	Putrescina	Sí	Sí	Sí	No	Sí (P = 19.0 %)
	Cadaverina	Sí	Sí	Sí	No	Sí (P = 88.3 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 8.8 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 18.0 %)
	Espermina	No	No	No	----	Sí (P = 42.8 %)
<b>Vino (2)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 76.4 %)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 54.1 %)
	Histamina	No	No	No	----	Sí (P = 26.6 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 99.8 %)
<b>Vino (3)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 83.8 %)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 88.9 %)
	Histamina	No	No	No	----	Sí (P = 82.3 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 91.2 %)
<b>Vino (4)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 35.1 %)
	Cadaverina	Sí	Sí	Sí	No	Sí (P = 36.0 %)
	Histamina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 69.5 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 18.2 %)
<b>Vino (5)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 50.2 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 20.8 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 8.0 %)
	Espermina	No	No	No	----	Sí (P = 75.8 %)
<b>Vino (6)</b>	Putrescina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 64.8 %)
	Histamina	No	No	No	----	Sí (P = 63.2 %)

Se pueden observar varios hechos:

- *Unicamente se observa interacción matriz/analito saturada en el intervalo de volúmenes estudiados para la putrescina en el vino (1) y (6), cadaverina en el vino (1), (3) y (4), e histamina y tiramina en el vino (1).*
- *A excepción del vino (2) y (6), para el resto se observa la presencia Blanco de Youden para algunos analitos,, indicando en estos casos, la existencia de error sistemático a causa de la matriz.*
- *En todos los casos, al comparar el contenido de analito calculado a partir del calibrado con patrones (CP) y con el calibrado con adición de patrón (AP), cuando no hay efecto matriz, ó comparando el contenido de analito calculado a partir de los calibrados de las dos adiciones de patrón ( $AP_1$  y  $AP_2$ ), cuando hay efecto matriz, se observa que el método es veraz con un nivel de significación del 5%.*

En la Tabla V.5, se muestran los contenidos de aminas biógenas encontrados en las diferentes muestras, expresados como  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tabla V.5. Contenido de aminas biógenas en muestras de vino tinto**

	<u>Putrescina</u>	<u>Cadaverina</u>	<u>Histamina</u>	<u>Tiramina</u>	<u>Espermina</u>
Vino (1)	13.67 (3.4) <sup>a</sup> <sub>7</sub>	1.88 (4.3) <sub>6</sub>	3.21 (7.2) <sub>6</sub>	2.55 (8.4) <sub>6</sub>	0.57 (8.6) <sub>6</sub>
Vino (2)	6.90 (6.8) <sub>5</sub>	1.45 (6.3) <sub>5</sub>	4.74 (8.4) <sub>5</sub>	5.91 (4.3) <sub>5</sub>	No detectada
Vino (3)	7.33 (5.3) <sub>5</sub>	3.15 (9.0) <sub>5</sub>	3.95 (9.5) <sub>5</sub>	3.58 (4.1) <sub>5</sub>	No detectada
Vino (4)	19.10 (5.3) <sub>5</sub>	2.20 (8.6) <sub>6</sub>	2.31 (6.5) <sub>5</sub>	3.17 (8.0) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (5)	4.67 (3.2) <sub>6</sub>	No detectada	0.39 (10.3) <sub>5</sub>	2.24 (8.3) <sub>6</sub>	0.38 (7.0) <sub>5</sub>
Vino (6)	5.91 (3.1) <sub>7</sub>	No detectada	1.95 (6.8) <sub>7</sub>	No detectada	No detectada

<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa en %, para el número de determinaciones indicado en el subíndice.



Los resultados obtenidos concuerdan con los datos encontrados en bibliografía para este tipo de muestras [3,4].

### **V.1.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO CLARETE**

#### **V.1.3.1. Verificación de la veracidad**

El estudio del contenido en aminas biógenas de la muestra de vino clarete se llevó a cabo de forma similar al análisis de vino tinto. En este caso, se detectó únicamente la presencia de putrescina, histamina y tiramina. En la Tabla A.31 se recogen las área de pico y en la Tabla V.6 los resultados del tratamiento estadístico, donde se pone de manifiesto la existencia de un efecto matriz para la putrescina, pero encontrándose la zona de saturación del efecto interactivo matriz/analito en los niveles de muestra ensayados.

Tabla V.6. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminas biógenas en el vino clarete (1)

	PUTRESCINA			
	CY	CP	AP <sub>1</sub>	AP <sub>2</sub>
Pendiente	186817	3801	3061	3039
O. origen	85171	3144	471081	866226
S <sub>RC</sub>	21691	39392	16409	24083
n	5	16	5	5
¿Hom. Varianzas? Sí	S <sub>p</sub> = 36406 S <sub>p</sub> = 20606			
¿Igualdad de pendientes?	No (P < 1%) Sí (P = 82.4%) b <sub>p</sub> 3050			
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante			
Test de veracidad	t <sub>cal</sub> = 0.008 < t <sub>tab</sub> = 2.365 (P = 99.4 %)			
Contenido de analito	4.20 mg · t <sup>-1</sup> ; DER % (n = 6) = 3.7			

	HISTAMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	78104	2189	2100
O. origen	19367	1184	112810
S <sub>RC</sub>	4393	16032	12549
n	5	16	5
Hom. Varianzas	¿Son homogéneas? Sí (P = 38.2%) S <sub>p</sub> 15474		
¿Igualdad de pendientes?	Sí (P = 41.4%) b <sub>p</sub> 2186		
Blanco de Youden	Existe componente de error sistemático constante		
Test de veracidad	t <sub>cal</sub> = 0.047 < t <sub>tab</sub> = 2.101 (P = 98.3 %)		
Contenido de analito	0.45 mg · t <sup>-1</sup> ; DER % (n = 6) = 16.4		

Tabla V.6. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminas biógenas en el vino clarete (1) (Cont.)

	TIRAMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	6065	1886	1981
O. origen	37892	33999	54625
$S_{RC}$	715	8224	4835
n	5	15	5
<b>Hom. Varianzas</b>	¿Son homogéneas? Sí (P = 20.7%)		
	$S_p$ 7703		
<b>¿Igualdad de pendientes?</b>	Sí (P = 32.7%)		
	$b_p$ 1904		
<b>Blanco de Youden</b>	No existe componente de error sistemático constante		
<b>Test de veracidad</b>	$t_{cal} = 1.181 < t_{tab} = 2.110$ (P = 25.4 %)		
<b>Contenido de analito</b>	<b>0.33 mg t<sup>-1</sup> ; DER % (n = 6) = 13.5</b>		

Los resultados obtenidos, indican que **el método era veraz para los tres analitos detectados, para un nivel de significación del 5%**, al comparar el contenido de los analitos obtenidos a partir del calibrado con patrones y adición de patrón (no hay efecto matriz) o usando los dos calibrados por adición de patrón (efecto matriz saturado).

La experiencia del ensayo de recuperación se llevó a cabo de forma análoga a la utilizada en la muestra de vino tinto.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V.7, mostrándose los valores de P obtenidos al comparar los porcentajes de recuperación calculados con el 100%.

**Tabla V.7. Estudio del porcentaje de recuperación en el vino clarete (1)**

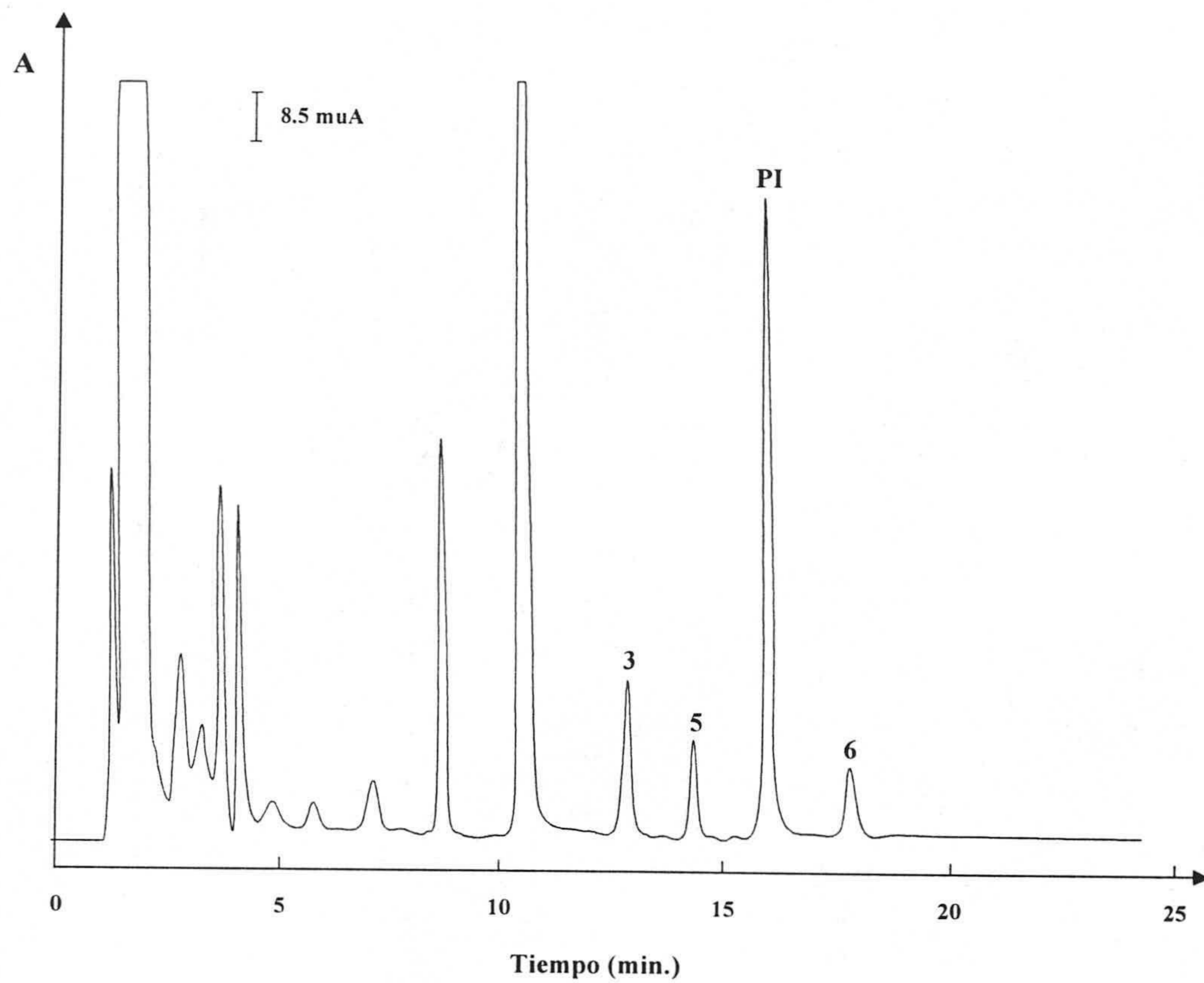
<b>Amina</b>	<b>C<sub>vino</sub><sup>1</sup></b>	<b>C<sub>añadida</sub></b>	<b>C<sub>encontrada</sub></b>	<b>% Rec</b>	<b>DER<sup>2</sup> (%)</b>	<b>P (%)</b>
Triptamina	----	1.42	1.45	102.3	13.4 (n = 7)	67.7
Feniletilamina	----	1.50	1.51	100.7	13.2 (n = 7)	88.8
Putrescina	4.20	4.29	8.71	102.5	2.5 (n = 5)	9.7
Cadaverina	----	0.63	0.66	105.0	13.0 (n = 7)	37.3
Histamina	0.45	0.48	0.90	97.3	6.2 (n = 7)	27.6
Tiramina	0.33	0.43	0.78	102.7	6.9 (n = 7)	34.7
Espermidina	----	1.41	1.34	95.2	7.0 (n = 7)	10.7
Espermina	----	1.17	1.20	102.1	9.9 (n = 7)	59.7

<sup>1</sup> Concentración expresada en mg·l<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> Entre paréntesis, el número de determinaciones.

Puede observarse, cómo para todas las aminas, se obtuvieron porcentajes de recuperación comprendidos entre el 95 y el 105%. Dichos valores no eran significativamente diferentes del 100 % teórico ( $P > 5\%$ ), por lo que se concluye que *el método es veraz para la determinación de aminas biógenas en vinos claretes*.

En la Figura V.2, se muestra un cromatograma tipo correspondiente al análisis de esta muestra de vino.



**Figura V.2. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminos detectadas en el vino clarete (1). 3: Putrescina; 5: Histamina; 6: Tiramina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

### **V.1.3.2. Análisis de diversas muestras de vino clarete**

Procediendo de forma similar que con las muestras de vino tinto se obtuvieron una serie de cromatogramas cuyas áreas de pico se recogen en las Tablas A.32-A.37 del anexo.

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos que aparecen en las tablas anteriores se reúnen en las Tablas A.38-A.43, mostrándose en la Tabla V.8 un resumen de los mismos, donde pueden observarse varios hechos:

- *Para este tipo de vinos sólo se observa una interacción matriz/analito saturada en el intervalo de volúmenes estudiados para la putrescina en los vinos (1), (6) y (7).*
- *En todos los vinos, alguna de las aminos detectadas, presenta Blanco de Youden, de mayor magnitud que en los vinos tintos.*
- *En todos los casos, se observó que el método es veraz con un nivel de significación del 5%.*

**Tabla V.8. Resumen del tratamiento estadístico del análisis de aminos biógenas en diferentes muestras de vino clarete**

<i>Muestra</i>	<i>Amina</i>	<i>Efecto matriz</i>	<i>BY</i>	<u>¿Pendientes diferentes?</u>		<i>¿Resultado veraz?</i>
				<i>CP&amp;AP</i>	<i>AP<sub>1</sub>&amp;AP<sub>2</sub></i>	
<b>Vino (1)</b>	Putrescina	Sí	Sí	Sí	No	Sí (P = 99.4 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 98.3 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 25.4 %)
<b>Vino (2)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 96.6 %)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 70.6 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 8.1 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 48.2 %)
<b>Vino (3)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 99.0 %)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 45.6 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 38.7 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 68.7 %)
<b>Vino (4)</b>	Putrescina	No	Sí	No	----	Sí (P = 89.7 %)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 7.2 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 91.1 %)
	Espermidina	No	No	No	----	Sí (P = 93.4 %)
<b>Vino (5)</b>	Putrescina	No	Sí	No	----	Sí (P = 80.8 %)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 72.8 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 93.0 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 23.0 %)
<b>Vino (6)</b>	Putrescina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 87.0 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 88.0 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 25.8 %)
<b>Vino (7)</b>	Putrescina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 77.8 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 85.8 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 78.8 %)

En la Tabla V.9, se muestran los contenidos de aminas biógenas en los vinos analizados, expresados como  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tabla V.9. Contenido de aminas biógenas en muestras de vino clarete**

	<u>Putrescina</u>	<u>Cadaverina</u>	<u>Histamina</u>	<u>Tiramina</u>	<u>Espermidina</u>
Vino (1)	4.20 (3.7) <sup>a</sup> <sub>6</sub>	No detectada	0.45 (16.4) <sub>6</sub>	0.33 (13.5) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (2)	3.25 (1.5) <sub>6</sub>	0.39 (6.6) <sub>5</sub>	2.92 (4.3) <sub>6</sub>	0.86 (10.7) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (3)	9.33 (0.5) <sub>6</sub>	0.41 (6.9) <sub>6</sub>	3.24 (3.1) <sub>6</sub>	1.49 (4.9) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (4)	3.63 (0.7) <sub>5</sub>	2.87 (1.3) <sub>6</sub>	No detectada	1.23 (7.0) <sub>6</sub>	0.64 (5.1) <sub>5</sub>
Vino (5)	3.58 (3.2) <sub>6</sub>	0.26 (15.7) <sub>7</sub>	1.62 (5.3) <sub>7</sub>	1.63 (3.0) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (6)	9.60 (2.2) <sub>6</sub>	No detectada	3.10 (7.6) <sub>6</sub>	2.59 (6.8) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (7)	8.67 (2.9) <sub>7</sub>	No detectada	1.36 (4.7) <sub>7</sub>	1.05 (3.7) <sub>6</sub>	No detectada

<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa en %, para el número de determinaciones indicado en el subíndice.

#### **V.1.4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS DE VINO BLANCO**

##### **V.1.4.1. Verificación de la veracidad**

En este vino, las únicas aminas biógenas detectadas fueron putrescina, histamina y tiramina. En la Tabla A.44 (ver anexo), se recogen las áreas de pico para cada uno de los cromatogramas y en la Tabla V.10 se reúnen los resultados obtenidos en el tratamiento



estadístico, donde se observa que para ninguna de las tres aminas detectadas hay efecto matriz.

**Tabla V.10. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminas biógenas en el vino blanco (1)**

	PUTRESCINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	94312	3801	3842
O. origen	116142	3144	332465
$s_{RC}$	8430	39392	36918
n	5	16	5
<b>Hom. Varianzas</b>	¿Son homogéneas? Sí (P = 52.4%)		
	$S_p$ 38966		
<b>¿Igualdad de pendientes?</b>	Sí (P = 90.4%)		
	$b_p$ 3808		
<b>Blanco de Youden</b>	Existe componente de error sistemático constante		
<b>Test de veracidad</b>	$t_{cal} = 0.296 < t_{tab} = 2.101$ (P = 77.1 %)		
<b>Contenido de analito</b>	<b><i>1.62 mg l<sup>-1</sup> ; DER % (n = 7) = 7.3</i></b>		

Tabla V.10. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de aminas biógenas en el vino blanco (1) (Cont.)

	HISTAMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	54351	2189	2144
O. origen	41402	1184	132030
$S_{RC}$	11573	16032	11824
n	5	16	5
<b>Hom. Varianzas</b>	¿Son homogéneas? Sí (P = 34.0%)		
	$S_p$ 15373		
<b>¿Igualdad de pendientes?</b>	Sí (P = 54.8%)		
	$b_p$ 2180		
<b>Blanco de Youden</b>	Existe componente de error sistemático constante		
<b>Test de veracidad</b>	$t_{cal} = 1.138 < t_{tab} = 2.101$ (P = 27.0 %)		
<b>Contenido de analito</b>	<b><i>1.35 mg t<sup>-1</sup> ; DER % (n = 7) = 5.5</i></b>		

	TIRAMINA		
	CY	CP	AP
Pendiente	7522	1886	1824
O. origen	33522	33999	62390
$S_{RC}$	851	8224	4615
n	5	15	5
<b>Hom. Varianzas</b>	¿Son homogéneas? Sí (P = 18.6%)		
	$S_p$ 7639		
<b>¿Igualdad de pendientes?</b>	Sí (P = 47.9%)		
	$b_p$ 1885		
<b>Blanco de Youden</b>	No existe componente de error sistemático constante		
<b>Test de veracidad</b>	$t_{cal} = 1.219 < t_{tab} = 2.110$ (P = 24.0 %)		
<b>Contenido de analito</b>	<b><i>0.23 mg t<sup>-1</sup> ; DER % (n = 5) = 12.6</i></b>		

Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto de nuevo que en todos los casos, *el método es veraz para los tres analitos detectados, para un nivel de significación del 5%*.

Los resultados obtenidos en el estudio de recuperación se recogen en la Tabla V.11, en la que se muestran los valores de P obtenidos al comparar los porcentajes de recuperación calculados con el 100%.

**Tabla V.11. Estudio del porcentaje de recuperación en el vino blanco (1)**

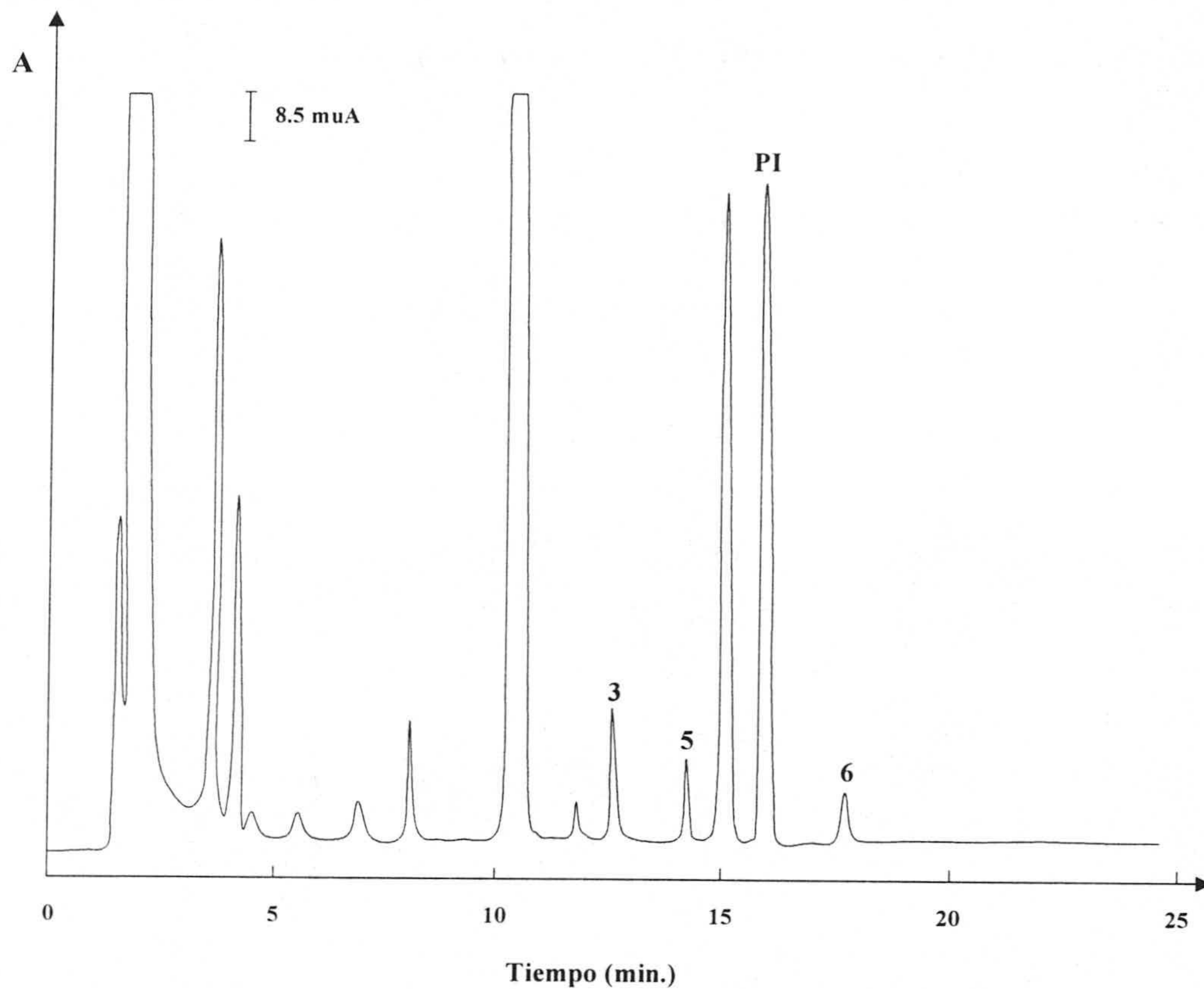
<b>Amina</b>	<b>C<sub>vino</sub><sup>1</sup></b>	<b>C<sub>añadido</sub></b>	<b>C<sub>encontrada</sub></b>	<b>% Rec</b>	<b>DER<sup>2</sup> (%)</b>	<b>P (%)</b>
Triptamina	----	0.70	0.68	96.6	16.4 (n = 6)	62.5
Feniletilamina	----	0.57	0.58	102.4	7.7 (n = 6)	49.6
Putrescina	1.62	1.75	1.75	101.3	3.9 (n = 6)	46.5
Cadaverina	----	1.16	1.16	96.7	11.2 (n = 6)	48.8
Histamina	1.35	1.23	1.23	101.0	11.0 (n = 6)	83.9
Tiramina	0.23	0.67	0.67	94.0	9.4 (n = 6)	15.6
Espermidina	----	0.77	0.77	94.1	12.2 (n = 6)	26.9
Espermina	----	0.67	0.67	110.6	11.8 (n = 6)	13.0

<sup>1</sup> Concentración expresada en mg·l<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> Entre paréntesis, el número de determinaciones.

Puede observarse, cómo para todos los analitos, se obtienen porcentajes de recuperación que no son significativamente diferentes al valor teórico del 100%, por lo que concluimos que *el método es veraz para la determinación de aminos biógenos en vinos blancos*.

En la Figura V.3, se muestra un cromatograma tipo correspondiente a la matriz analizada de vino blanco.



**Figura V.3. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en el vino blanco (1). 3: Putrescina; 5: Histamina; 6: Tiramina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

#### **V.1.4.2. Análisis de muestras de vino blanco**

Al igual que en los otros vinos, se procedió el análisis de cinco muestras de vino blanco, para comprobar la utilidad del método propuesto. Las áreas de pico para cada uno de los cromatogramas registrados se recogen en las Tablas A.45-A.49 y los resultados obtenidos del tratamiento estadístico las Tablas A.50-A.54. La Tabla V.12 recoge un resumen de los mismos, donde pueden observarse varios hechos:

- *Para este tipo de vinos solo se observa una interacción matriz/analito saturada, en el intervalo de volúmenes estudiados, para la putrescina en los vinos (2), (3) y (5) y para la histamina en el vino (4).*
- *La existencia de Blanco de Youden es menor en este tipo de vinos que en los claretes y tintos.*
- *En todos los casos, se observó que el método era veraz con un nivel de significación del 5%.*

**Tabla V.12. Resumen del análisis estadístico del análisis de aminas biógenas en muestras de vino blanco**

<i>Muestra</i>	<i>Amina</i>	<i>Efecto matriz</i>	<i>BY</i>	<i>¿Pendientes diferentes?</i>		<i>¿Resultado veraz?</i>
				<i>CP&amp;AP</i>	<i>AP<sub>1</sub>&amp;AP<sub>2</sub></i>	
<b>Vino (1)</b>	Putrescina	No	Sí	No	----	Sí (P = 77.1 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 27.0 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 24.0 %)
<b>Vino (2)</b>	Putrescina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 90.6 %)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 36.9 %)
	Histamina	No	No	No	----	Sí (P = 42.7 %)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 76.1 %)
<b>Vino (3)</b>	Putrescina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 91.9 %)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 43.1 %)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 22.0 %)
<b>Vino (4)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 54.7 %)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 62.7 %)
	Histamina	Sí	No	Sí	No	Sí (P = 98.1 %)
<b>Vino (5)</b>	Putrescina	Sí	Sí	Sí	No	Sí (P = 94.2 %)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 50.7 %)
<b>Vino (6)</b>	Putrescina	No	Sí	No	----	Sí (P = 64.8 %)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 9.5 %)
	Histamina	No	No	No	----	Sí (P = 49.1 %)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 13.8 %)

En la Tabla V.13, se muestran los contenidos de aminos biógenas en los vinos analizados, expresados como  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tabla V.13. Contenido de aminos biógenas en muestras de vino blanco**

	<u>Putrescina</u>	<u>Cadaverina</u>	<u>Histamina</u>	<u>Tiramina</u>
Vino (1)	1.62 (7.3) <sup>a</sup> <sub>7</sub>	No detectada	1.35 (5.5) <sub>7</sub>	0.23 (12.6) <sub>5</sub>
Vino (2)	12.61 (3.7) <sub>7</sub>	0.86 (5.0) <sub>6</sub>	2.85 (4.4) <sub>7</sub>	1.22 (7.8) <sub>6</sub>
Vino (3)	3.43 (1.7) <sub>7</sub>	0.70 (4.2) <sub>5</sub>	0.37 (11.2) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (4)	4.39 (5.7) <sub>6</sub>	1.16 (3.8) <sub>6</sub>	1.10 (9.8) <sub>6</sub>	No detectada
Vino (5)	2.34 (5.2) <sub>6</sub>	0.53 (4.7) <sub>7</sub>	No detectada	No detectada
Vino (6)	1.48 (7.9) <sub>6</sub>	0.70 (7.0) <sub>6</sub>	1.39 (6.7) <sub>6</sub>	1.44 (5.5) <sub>6</sub>

<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa en %, para el número de determinaciones indicado en el subíndice.

Finalmente, al comparar los resultados obtenidos para los tres tipos de vino analizados, Tablas V.5, V.9 y V.13, se puede observar que en general, los vinos tintos tienen un mayor contenido en aminos biógenas, y los blancos menor, lo cual está de acuerdo con los resultados encontrados en bibliografía [3,5,6].

## V.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS Y EL TIPO DE VINO

Algunas aminos biógenas, como espermidina y espermina, están presentes en bajas concentraciones en la uva y en el mosto, aunque la mayoría de ellas se producen durante y después del proceso de elaboración de los vinos. Básicamente, suelen generarse durante la etapa de fermentación, donde los principales factores que influyen en su formación son:

- *El pH.* A mayor pH se produce una mayor cantidad de aminos biógenas [7], por lo que los vinos blancos, que generalmente son más ácidos, presentan un menor contenido en aminos que los tintos.
- *La fermentación maloláctica.* Es más importante en los vinos tintos que en los blancos, por lo que los primeros contendrán mayor cantidad de aminos que los segundos, especialmente de putrescina, histamina y tiramina [4].

Teniendo en cuenta estos dos factores, el contenido en aminos biógenas debería de ser mayor en los vinos tintos que en los blancos, tal como hemos observado en el apartado anterior.

Además, se puede distinguir una tercera clase de vino, el clarete, que se produce a partir de uvas negras, o bien por mezcla de negras y blancas, cuyo zumo se fermenta sin hollejo, presentando propiedades químicas intermedias entre los tintos y blancos [8].

Por ello, con objeto de obtener la máxima información posible de estos analitos en relación a los vinos analizados en el apartado anterior, se emplea tanto el análisis univariante como multivariante (*reconocimiento de pautas*).



### **V.2.1. ANÁLISIS DE LOS DATOS**

Los 19 vinos analizados pertenecían a tres tipos de vino: tinto, denominado como T, clarete, C y blanco, B.

De las ocho aminas estudiadas, ni triptamina ni feniletilamina fueron detectadas en ninguna de las muestras analizadas, por lo que cada vino (objeto) estuvo descrito por seis aminas o variables (putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina y espermina).

La Tabla V.14 muestra la matriz de los datos, en la cual, las filas representan los vinos y las columnas sus contenidos medios en aminas biógenas.

En la Tabla V.15, que muestra los valores medios y la desviaciones estándar de cada amina biógena para los tres tipos de vino considerados, se puede observar, cómo de forma general, los vinos tintos contienen mayor cantidad de aminas biógenas que los claretes, y éstos a su vez más que los blancos, a excepción de la cadaverina, que presenta contenidos ligeramente superiores en los blancos. Además, la diferencia es mayor entre los tintos y claretes, que entre éstos y los blancos.

Tabla V.14. Contenido de aminas biógenas en los vinos de mesa analizados

Vino	Clase	Código	AMINA					
			Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina
(1)	Tinto	T1	13.67 <sup>1</sup>	1.88	3.21	2.55	Nd <sup>2</sup>	0.57
(2)	Tinto	T2	6.90	1.45	4.74	5.91	Nd	Nd
(3)	Tinto	T3	7.33	3.15	3.95	3.58	Nd	Nd
(4)	Tinto	T4	19.10	2.20	2.31	3.17	Nd	Nd
(5)	Tinto	T5	4.67	Nd	0.39	2.24	Nd	0.38
(6)	Tinto	T6	5.91	Nd	1.95	Nd	Nd	Nd
(1)	Clarete	C7	4.20	Nd	0.45	0.33	Nd	Nd
(2)	Clarete	C8	3.25	0.39	2.92	0.86	Nd	Nd
(3)	Clarete	C9	9.33	0.41	3.24	1.49	Nd	Nd
(4)	Clarete	C10	3.63	2.87	Nd	1.23	0.64	Nd
(5)	Clarete	C11	3.58	0.26	1.62	1.63	Nd	Nd
(6)	Clarete	C12	9.60	Nd	3.10	2.59	Nd	Nd
(7)	Clarete	C13	8.67	Nd	1.36	1.05	Nd	Nd
(1)	Blanco	B14	1.62	Nd	1.35	0.23	Nd	Nd
(2)	Blanco	B15	12.61	0.86	2.85	1.22	Nd	Nd
(3)	Blanco	B16	3.43	0.70	0.37	Nd	Nd	Nd
(4)	Blanco	B17	4.39	1.16	1.10	Nd	Nd	Nd
(5)	Blanco	B18	2.34	0.53	Nd	Nd	Nd	Nd
(6)	Blanco	B19	1.48	0.70	1.39	1.44	Nd	Nd

<sup>1</sup> Valor expresado como mg·l<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> No detectada.

Tabla V.15. Valores medios y desviación estándar para los vinos de mesa analizados

Amina biógena	Tintos (n = 6)		Claretes (n = 7)		Blancos (n = 6)	
	Media <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	Media	SD	Media	SD
Putrescina	9.60	5.61	6.04	2.98	4.31	4.21
Cadaverina	1.45	1.25	0.56	1.03	0.66	0.39
Histamina	2.76	1.55	1.81	1.31	1.17	0.99
Tiramina	2.91	1.92	1.31	0.71	0.48	0.67
Espermidina	----	----	0.09	0.24	----	----
Espermina	0.16	0.25	----	----	----	----

<sup>a</sup> Concentración expresada en mg·l<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Desviación estándar.

### V.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE

Antes de realizar un análisis multivariante de los datos, se estudiaron mediante un análisis univariante los contenidos de cada amina biógena, para comprobar si eran significativamente diferentes en función del tipo de vino considerado. Para ello, se aplicaron dos tests, uno paramétrico (ANOVA) y otro no paramétrico (Kruskall-Wallis).

Para aplicar el análisis de la varianza, se deben de cumplir tres hipótesis de partida:

- *Aleatoriedad*: El análisis de los vinos se realizó de manera independiente y aleatoria, por lo que esta hipótesis se asume.

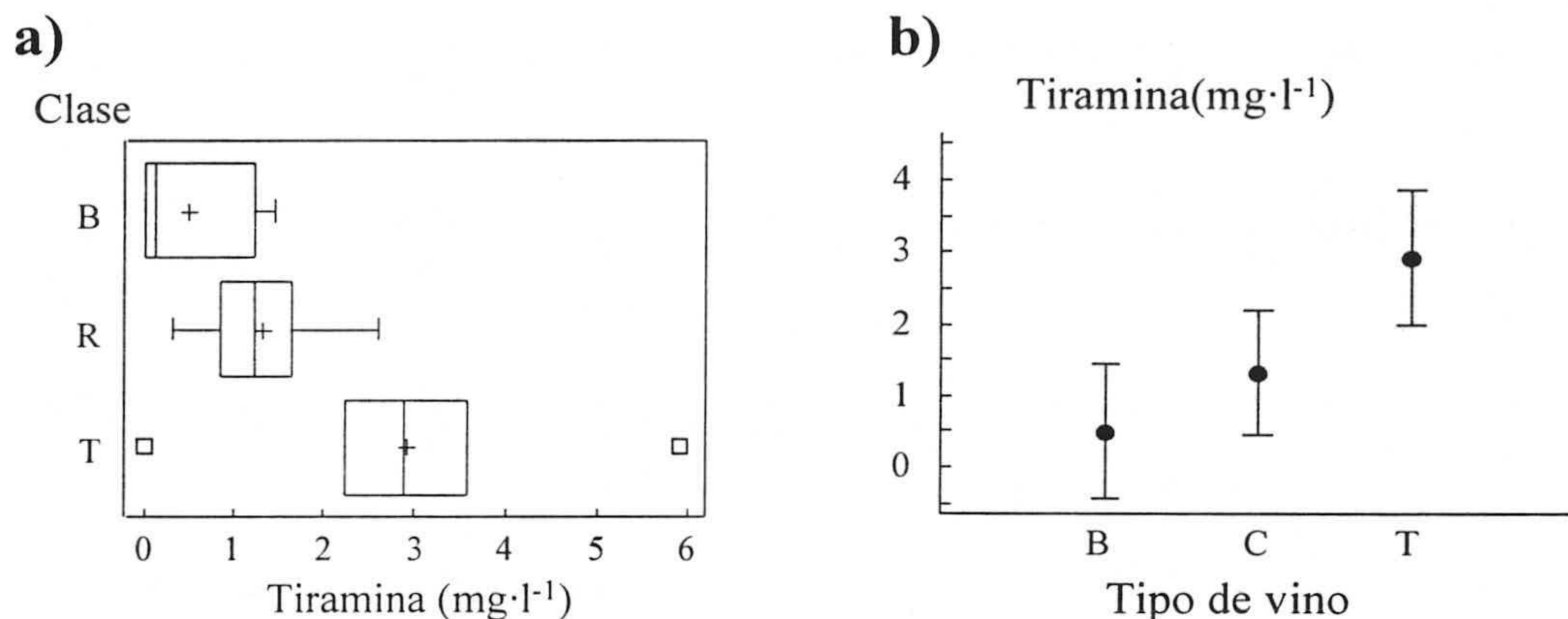
- *Homogeneidad de varianzas:* Para comprobarla, se utilizó el test de Bartlett. Para las seis aminas evaluadas, se obtuvieron valores de P superiores al 5 %, excepto para la tiramina, para la que el valor de P fue de 2.5 %. Sin embargo, esta ausencia de homocedasticidad no influye en el test F del ANOVA ya que el número de observaciones para cada tipo de vino es muy parecido [9].
- *Normalidad:* Aplicando el test para la normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se observa que los contenidos de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina en los vinos se ajustan a una distribución normal,  $P > 20 \%$ , pero no los contenidos para la espermidina y espermina ( $P < 5 \%$ ). Esta ausencia de normalidad puede explicarse atendiendo a que estas aminas se detectaron en un pequeño porcentaje de los vinos analizados. Sin embargo, esta falta de normalidad no es muy grave y se puede hablar de robustez del ANOVA frente a las desviaciones de la normalidad, al tener poca influencia en el test de la F y en las comparaciones entre medias [9].

En la Tabla V.16 se recogen los resultados obtenidos al realizar el análisis de la varianza para cada una de las aminas estudiadas, en función del tipo de vino (tinto, clarete y blanco).

**Tabla V.16. Análisis de la varianza**

<b>Amina</b>	<b>¿Factor significativo?</b>	<b>Test de Rangos Múltiples</b>
Putrescina	No (P = 12.9 %)	T = C = B
Cadaverina	No (P = 24.0 %)	T = C = B
Histamina	No (P = 13.9 %)	T = C = B
Tiramina	Sí (P = 1.0 %)	T = C & C = B
Espermidina	No (P = 44.9 %)	T = C = B
Espermina	No (P = 10.6 %)	T = C = B

Se observa cómo el contenido de aminas biógenas no depende del tipo de vino ( $P > 5\%$ ) excepto para la tiramina, para la que, el contenido es significativamente diferente en función de la clase de vino. Al realizar el test de rangos múltiples, se observa que esta significación se debe a la diferencia en el contenido entre los tintos y los blancos, ya que el contenido de tiramina en los claretes no difiere de los otros dos. En la Figura V.4, se observa como los contenidos más altos se obtienen para los vinos tintos, mientras que los blancos tienen menor cantidad, presentando los claretes un contenido más cercano a los blancos que a los tintos.



**Figura V.4. Representación gráfica del análisis de la varianza para la tiramina. a)** Diagrama en cajas múltiples de las cantidades; **b)** Valores medios.

Cuando se aplica el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis, para los contenidos de aminos, usando como factor el tipo de vino, se obtienen las mismas conclusiones que con el análisis de la varianza, siendo sólo significativo el tipo de vino para el contenido de tiramina ( $P = 2.4 \%$ ).

Se calculó el índice de Fisher [10] para establecer la capacidad discriminante de las variables una a una, obteniéndose que la tiramina presentaba el mayor poder discriminante, al corresponderle un índice superior a uno, mientras que las otras aminos, tienen un valor inferior a 0.5, indicando su bajo poder discriminante entre las tres clases de vino estudiadas.

Para finalizar este estudio univariante, se realizó un estudio de correlación entre las variables (contenido de aminos). Dado que algunas de las variables no se ajustaban a una distribución normal, se aplicó el test de correlación de Spearman [11], mostrándose en la

Tabla V.17 las variables más fuertemente correlacionadas.

**Tabla V.17. Coeficientes de correlación de Spearman**

<b>Variable</b>	<b><math>\rho^1</math></b>	<b>P (%)</b>
<i>Putrescina-Histamina</i>	0.579	0.94
<i>Putrescina-Tiramina</i>	0.548	1.51
<i>Histamina-Tiramina</i>	0.653	0.24

<sup>1</sup> Coeficiente de correlación de Spearman.

La correlación entre estas variables puede explicarse teniendo en cuenta la fermentación maloláctica, proceso en el cual, se generan principalmente estas tres aminas. Este hecho también justifica porqué la correlación entre las variables es positiva.

De este estudio univariante, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- *La tiramina podría utilizarse para discriminar entre los 3 clases de vino estudiados, ya que en función del tipo de vino, su contenido es diferente.*
- *La existencia de correlación entre las variables (aminas), se puede explicar atendiendo a su formación durante la fermentación maloláctica.*

### V.2.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

El análisis multivariante, y en concreto, el reconocimiento de pautas, permite:

- Agrupar los objetos en categorías de modo “natural”,
- Verificar asociaciones entre variables,
- Buscar una clasificación de los distintos objetos,

por lo que se decidió aplicarlo a la información obtenida en el apartado anterior.

Antes de la utilización de las técnicas multivariantes, suele ser conveniente realizar un pretratamiento de los datos. Sin embargo, en esta ocasión, se obtenían los mismos resultados utilizando los datos tratados (autoescalado) que sin tratar, por lo que se optó por esto último.

#### V.2.3.1. Análisis en componentes principales

El análisis en componentes principales (ACP) se empleó para obtener la estructura latente del conjunto de datos, así como las asociaciones entre las variables, entre los objetos (vinos), y entre las variables y los objetos. En la Tabla V.18 se indican los autovalores y el porcentaje de varianza explicada por cada una de las seis componentes principales obtenidas. Para seleccionar el número de componentes principales, CP, en el modelo, se utilizó el criterio del autovalor medio. Al tener un valor de uno, solo se seleccionaron las dos primeras componentes, explicando la primera un 41 % de la varianza total, mientras que la segunda



explica un 25 %.

**Tabla V.18. Autovalores y varianza explicada para los datos analizados**

<b>Componente</b>	<b>Autovalor</b>	<b>% Varianza<sub>explicada</sub></b>	<b>% Varianza<sub>acumulada</sub></b>
1	2.465	41.08	41.08
2	1.495	24.93	66.01
3	0.994	16.56	82.57
4	0.564	9.41	91.98
5	0.278	4.64	96.61
6	0.203	3.39	100.00

En la Tabla V.19 se indican los coeficientes de cada variable sobre las dos componentes principales seleccionadas, *loadings*, mientras que en la Tabla V.20 se muestran las puntuaciones de cada vino (*scores*) sobre cada CP.

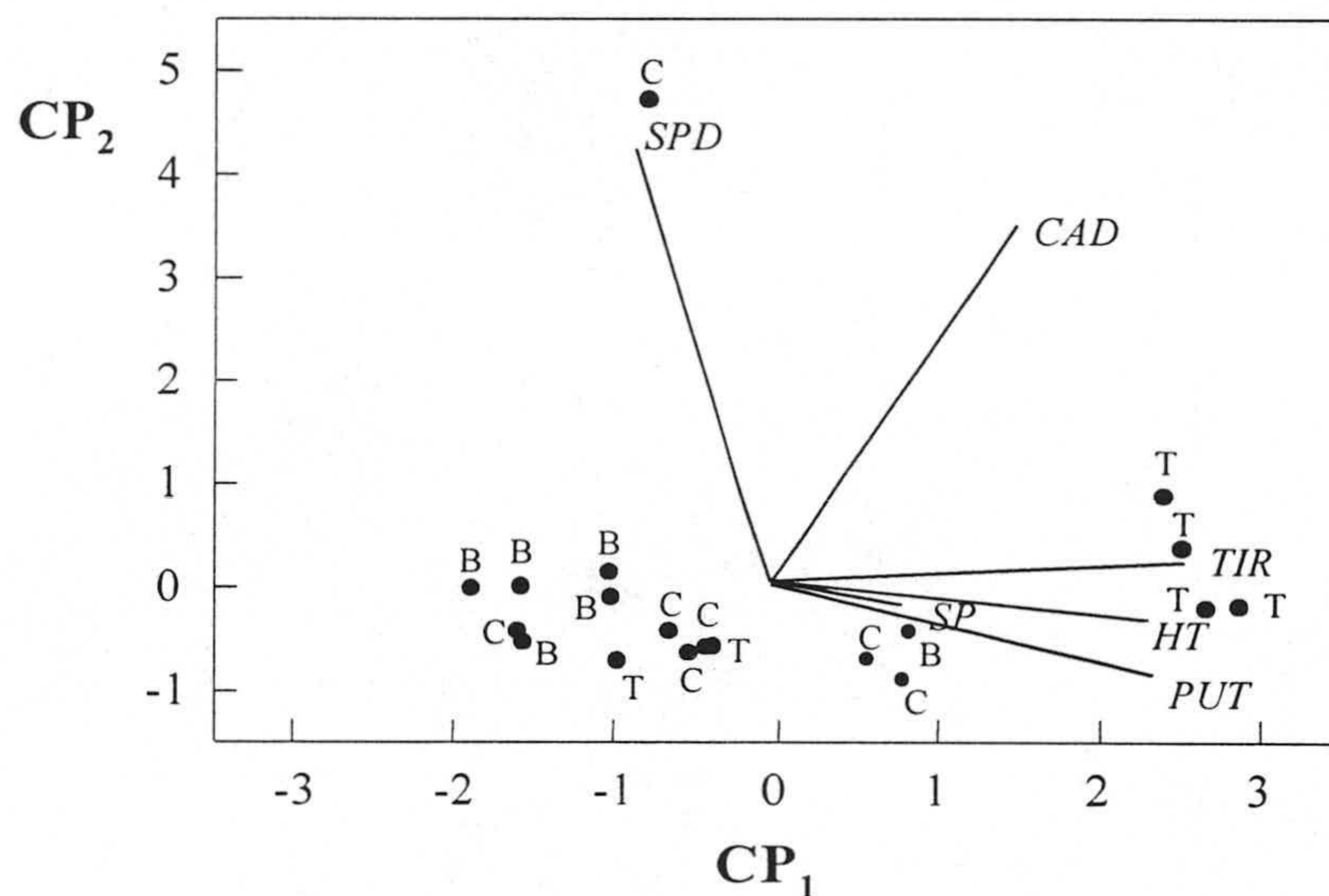
**Tabla V.19. Valores de las contribuciones obtenidas para cada una de las variables**

<b>Variable</b>	<b>CP<sub>1</sub></b>	<b>CP<sub>2</sub></b>
<i>Putrescina</i>	0.481	-0.080
<i>Cadaverina</i>	0.371	0.588
<i>Histamina</i>	0.527	-0.236
<i>Tiramina</i>	0.555	0.034
<i>Espermidina</i>	-0.079	0.766
<i>Espermina</i>	0.201	-0.066

Tabla V.20. Valores de las puntuaciones obtenidas para cada uno de los vinos analizados

<b>Muestra</b>	<b>CP<sub>1</sub></b>	<b>CP<sub>2</sub></b>
<i>Vino T1</i>	2.659	-0.125
<i>Vino T2</i>	2.848	-0.204
<i>Vino T3</i>	2.379	0.873
<i>Vino T4</i>	2.477	0.381
<i>Vino T5</i>	-0.401	-0.523
<i>Vino T6</i>	-0.993	-0.696
<i>Vino C7</i>	-1.618	-0.405
<i>Vino C8</i>	-0.445	-0.567
<i>Vino C9</i>	0.543	-0.700
<i>Vino C10</i>	-0.799	4.730
<i>Vino C11</i>	-0.672	-0.411
<i>Vino C12</i>	0.765	-0.898
<i>Vino C13</i>	-0.549	-0.621
<i>Vino B14</i>	-1.581	-0.515
<i>Vino B15</i>	0.804	-0.431
<i>Vino B16</i>	-1.589	0.027
<i>Vino B17</i>	-1.042	0.157
<i>Vino B18</i>	-1.905	0.009
<i>Vino B19</i>	-0.882	-0.081

La información recogida en ambas Tablas, se reúne en la Figura V.5, donde se representa conjuntamente las puntuaciones de los objetos y las contribuciones de las variables, a fin de facilitar la interpretación de la estructura latente en los resultados obtenidos.



**Figura V.5. Representación de las puntuaciones y contribuciones en función de las 2 componentes principales: *PUT*: Putrescina, *CAD*: Cadaverina; *HT*: Histamina; *TIR*: Tiramina; *SPD*: Espermidina; *SP*: Espermina.**

En dicha Figura se puede observar que:

- A la  $CP_1$  contribuye básicamente las aminas generadas durante la fermentación maloláctica, putrescina, histamina y tiramina, presentando el mayor poder discriminante entre los vinos, mientras que a  $CP_2$  contribuyen la cadaverina y espermidina.

- Los vinos tintos en general, presentan puntuaciones positivas para CP<sub>1</sub>, excepto T5 y T6, mientras que los blancos y los claretes, donde la fermentación maloláctica es menos importante, tienen valores negativos o próximos a cero, siendo más negativos para los blancos que para los claretes, a excepción de C7.
- Se puede observar asimismo, cómo los vinos con altas puntuaciones (tintos) están bien caracterizados por altos valores de putrescina, histamina y tiramina, mientras que los blancos, se distinguen por su bajo contenido en estas aminas.
- Dado que las proyecciones de putrescina, histamina y tiramina sobre CP<sub>1</sub> son similares, podemos afirmar que proporcionan el mismo tipo de información, y en este caso indicarían, la mayor (valores altos) o menor (valores bajos) importancia de la fermentación maloláctica en el proceso de elaboración del vino.
- En relación a CP<sub>2</sub>, solo un vino, C10, presenta altas puntuaciones, indicando su alto contenido en cadaverina, así como la detección de espermidina.

Por tanto, se puede concluir de este estudio que *las aminas con mayor poder discriminante son putrescina, histamina y tiramina de forma que podría establecerse una relación entre el tipo de vino y los contenidos de estas aminas biógenas, estrechamente relacionadas con la fermentación maloláctica.*

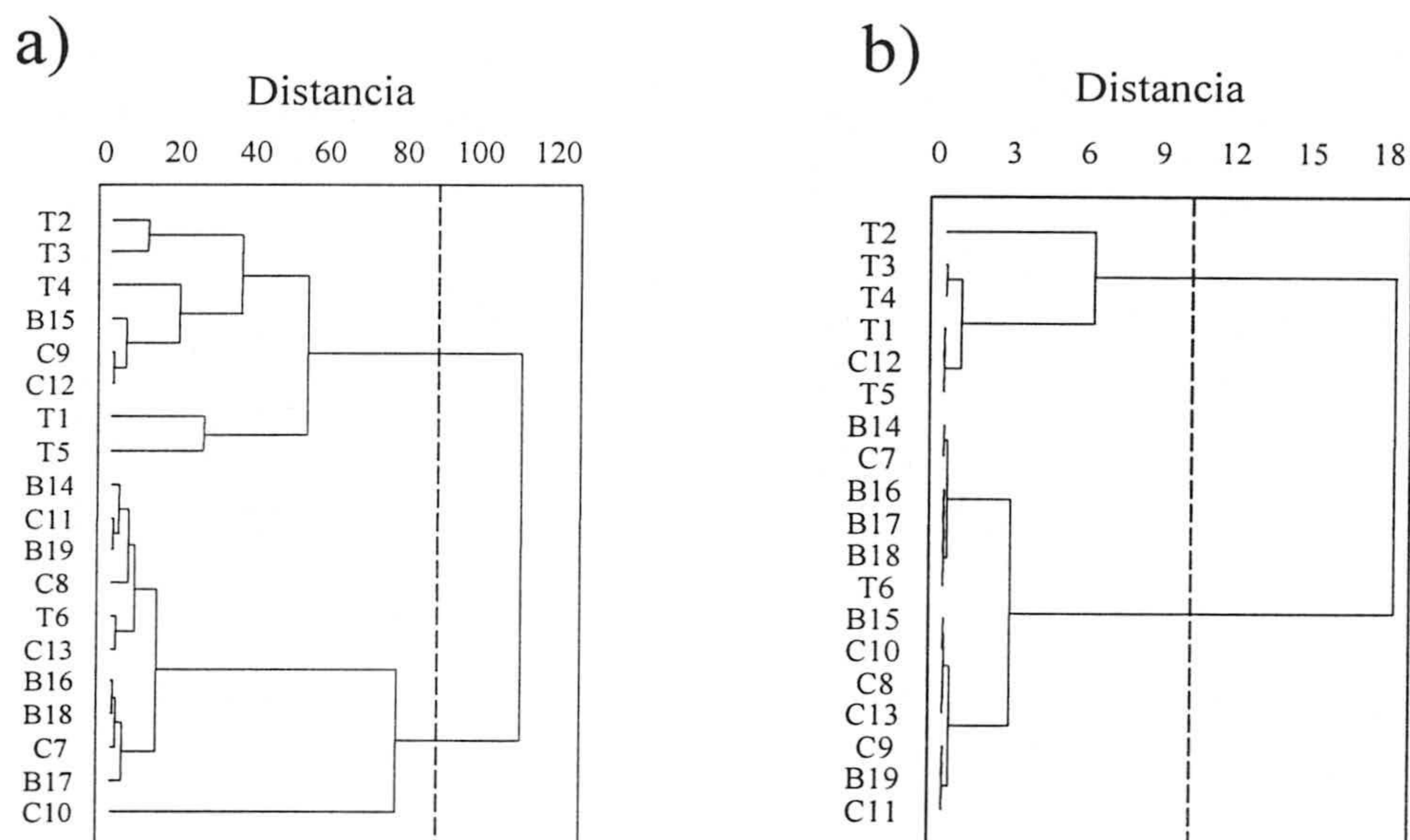
#### **V.2.3.2. Análisis de agrupaciones o clusters**

Se aplicó el análisis de agrupaciones para agrupar los objetos (vinos) basándose en las distancias entre las distintas muestras. Para ello, se aplicaron los métodos jerárquicos

aglomerativos, y como medida de la similaridad se utilizó la distancia euclídea al cuadrado. Como criterio para agrupar los distintos vinos, se empleó el método de Ward. En la Figura V.6 se observan los dendogramas obtenidos al utilizar todas las variables (Figura 6.a) y cuando se utiliza sólo la tiramina, (Figura 6.b), ya que era la que presentó un mayor poder discriminante cuando se realizó el análisis univariante.

Cuando se usan todas las variables, aparecen dos grupos. El primero contiene mayoritariamente a los vinos tintos, más B15 y C12, mientras que en el segundo se encuentran los claretes y los blancos, junto a un tinto, T6. En este primer dendograma, se aprecia cómo los vinos tintos tienden a separarse de las otras dos categorías, que a su vez, presentan un comportamiento similar.

Si sólo se utiliza como variable el contenido de tiramina, también se pueden distinguir dos grupos. El primero, contiene a los tintos, junto a un clarete, C12, y en el segundo, aparecen los blancos y los claretes junto a un tinto, T6. Este segundo grupo, a su vez, puede dividirse en dos, uno formado básicamente por vinos blancos y C7, y el otro por claretes más el vino B19.



**Figura V.6. Dendogramas obtenidos aplicando el método de Ward. a)** Usando todas las variables; **b)** utilizando solo la tiramina.

La existencia de vinos que no están bien agrupados, podría explicarse atendiendo a una fermentación maloláctica irregular. Así, si un vino tinto, T6, no se agrupa con los vinos de su clase, puede deberse a que en el proceso de elaboración del mismo, la fermentación maloláctica ha tenido poca importancia, por lo que su contenido en aminas es bajo, y por tanto tiende a agruparse con aquellos vinos, en los que la fermentación maloláctica es nula o prácticamente inexistente, como son los vinos blancos o claretes.

Por otro lado, el hecho de que haya vinos claretes o blancos que tampoco estén bien agrupados puede deberse a que han experimentado una fermentación maloláctica más acusada de la que cabría esperar para esta clase de vinos.

De este estudio, se pueden destacar dos aspectos relevantes:

- *Se pueden distinguir aquellos vinos en los que la fermentación maloláctica es más acusada (tintos) de los que es menos importante (blancos y claretes). Además, si solo se utiliza la tiramina como variable, los blancos y los claretes tienden a separarse en otros dos grupos.*
- *Los existencia de vinos que no están bien agrupados, podría explicarse atendiendo al distinto grado de fermentación maloláctica experimentado por el vino.*

### **V.2.3.3. Análisis discriminante lineal**

En esta fase de nuestro estudio, el objetivo de la investigación se centró en determinar si los contenidos en aminos biógenos de los vinos, predecían el tipo de vino al que pertenecía de cada una de las muestras analizadas. Dado que la variable dependiente (tipo de vino) era cualitativa y las variables (cantidad de amina biógena), cuantitativas, se aplicó el análisis discriminante lineal (ADL) [12]. En este sentido, un aspecto importante del ADL es la selección de las variables que deben de incluirse en el modelo de clasificación. Para ello, se aplicaron dos metodologías:

- Empleando todas las variables.
- Realizando un modelo de selección paso a paso hacia atrás.

En ambos modelos, se consideró que las probabilidades eran iguales para los tres grupos designados, suponiendo que cada grupo tenía la misma oportunidad de ocurrir, a pesar de que los tamaños de los grupos eran distintos.

**V.2.3.3.a. Análisis discriminante lineal utilizando todas las variables**

Las funciones de discriminación entre las categorías de los vinos son:

$$FD_1 = 1.332 - 0.027C_{\text{Putrescina}} - 0.618C_{\text{Cadaverina}} + 0.180C_{\text{Histamina}} - 0.562C_{\text{Tiramina}} + 3.940C_{\text{Espermidina}} - 4.298C_{\text{Espermina}} \quad (1)$$

$$FD_2 = -1.200 - 0.097C_{\text{Putrescina}} - 1.339C_{\text{Cadaverina}} + 0.472C_{\text{Histamina}} + 0.312C_{\text{Tiramina}} + 10.007C_{\text{Espermidina}} - 0.032C_{\text{Espermina}} \quad (2)$$

Como puede observarse en la Tabla V.21, se obtiene un 84 % de los casos correctamente clasificados.

**Tabla V.21. Matriz de clasificación de los vinos de mesa analizados**

Categoría	ADL		
	<i>Tinto</i>	<i>Rosado</i>	<i>Blanco</i>
Tinto (6)	5 (83.3) <sup>1</sup>	1	
Clarete (7)		6 (85.7)	1
Blanco (6)		1	5 (83.3)

<sup>1</sup> Porcentaje de casos correctamente clasificados.

En la Tabla V.22, que muestra la clasificación de cada uno de los vinos analizados, se observa cómo de los vinos tintos, uno está incorrectamente clasificado como clarete, lo mismo que le sucede a uno de los blancos. Los claretes, se clasifican correctamente todos, excepto uno, que se clasifica como blanco. Estos vinos incorrectamente clasificados, podrían explicarse, como se ha comentado con anterioridad, considerando el proceso de fermentación maloláctica experimentado por cada vino. Aquellos vinos con poca o nula

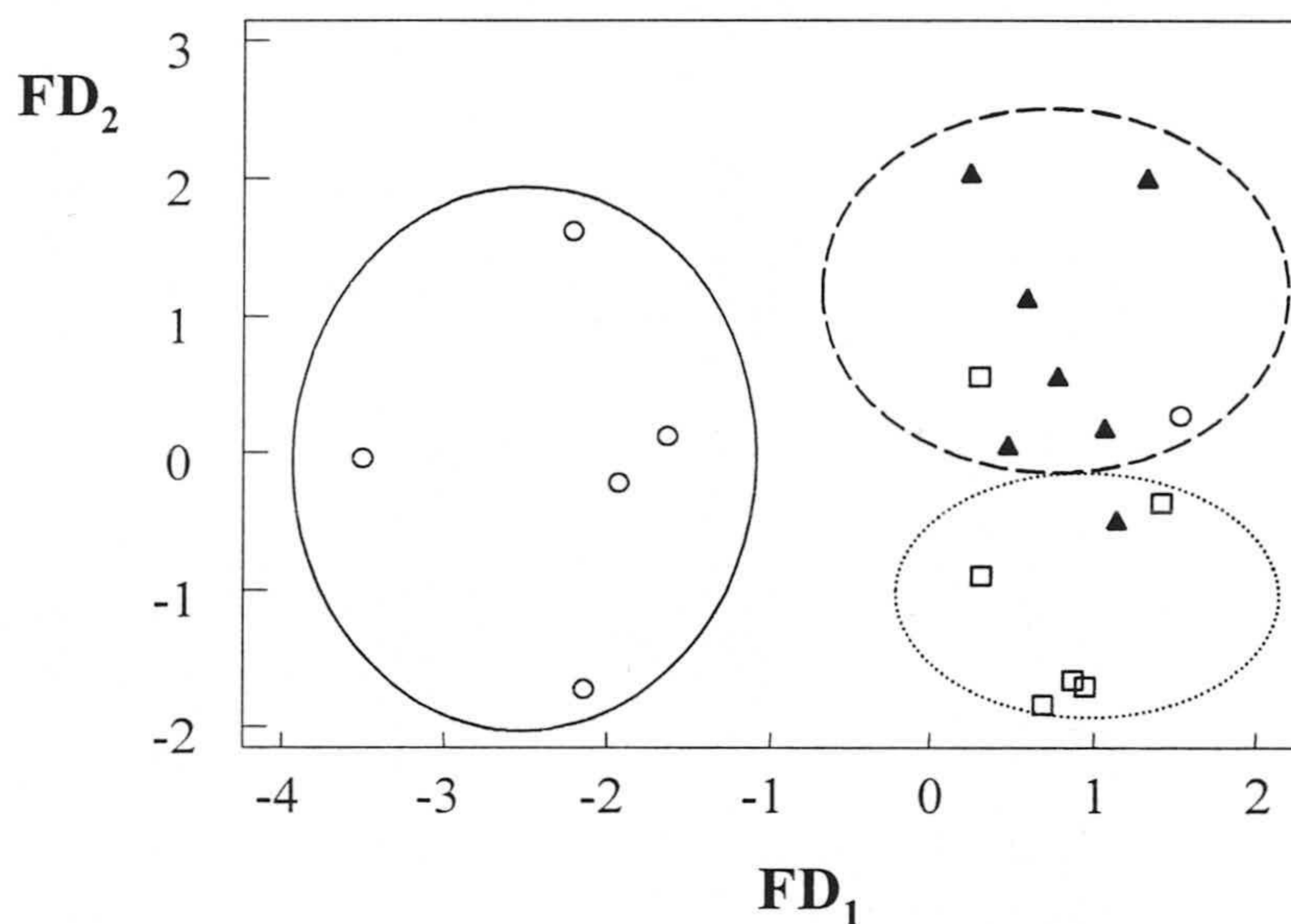


fermentación maloláctica, mayoritariamente los blancos y claretes, se clasificarán en estas categorías, aunque sean tintos, mientras que los vinos con una fermentación maloláctica importante, independientemente de su color, tinto, clarete o blanco, se clasificarán dentro de la categoría de los tintos.

**Tabla V.22. Clasificación de los vinos analizados**

<b>Muestra</b>	<b>Clase asignada</b>	<b>Clase real</b>
<i>Vino T1</i>	Tinto	Tinto
<i>Vino T2</i>	Tinto	Tinto
<i>Vino T3</i>	Tinto	Tinto
<i>Vino T4</i>	Tinto	Tinto
<i>Vino T5</i>	Tinto	Tinto
<i>Vino T6</i>	Clarete	Tinto
<i>Vino C7</i>	Blanco	Clarete
<i>Vino C8</i>	Clarete	Clarete
<i>Vino C9</i>	Clarete	Clarete
<i>Vino C10</i>	Clarete	Clarete
<i>Vino C11</i>	Clarete	Clarete
<i>Vino C12</i>	Clarete	Clarete
<i>Vino C13</i>	Clarete	Clarete
<i>Vino B14</i>	Blanco	Blanco
<i>Vino B15</i>	Clarete	Blanco
<i>Vino B16</i>	Blanco	Blanco
<i>Vino B17</i>	Blanco	Blanco
<i>Vino B18</i>	Blanco	Blanco
<i>Vino B19</i>	Blanco	Blanco

En la Figura V.7, se muestran los vinos analizados usando las funciones de discriminación en los ejes. Se puede observar cómo los vinos tintos, excepto uno, presentan valores negativos para  $FD_1$ , mientras que los claretes y los blancos tienen valores positivos. Además,  $FD_2$  permite distinguir entre los claretes (valores positivos) de los blancos (valores negativos).



**Figura V.7.** Representación de las funciones de discriminación encontradas para el contenido de las aminas en los vinos analizados: ○, Tintos, △, Claretes, y □, Blancos.

**V.2.3.3.b. Análisis discriminante lineal por paso a paso hacia atrás**

En este caso, sólo se incluyó en el modelo de clasificación la tiramina, mientras que el resto de las aminas son eliminadas, debido a su escasa capacidad discriminante. Por tanto, al permanecer sólo una variable en el modelo, sólo se obtiene una función de discriminación, a pesar de tener tres categorías en las que clasificar los objetos:

$$FD_1 = -1.274 + 0.812C_{\text{Tiramina}} \quad (3)$$

Como se puede observar en la Tabla V.23, la clasificación de los vinos es ligeramente peor, aumentando el número de vinos mal clasificados (Tabla V.24).

**Tabla V.23. Matriz de clasificación de los vinos de mesa analizados**

<b>Categoría</b>	<b>ADL por pasos</b>		
	<i>Tinto</i>	<i>Rosado</i>	<i>Blanco</i>
Tinto (6)	5 (83.3) <sup>1</sup>		1
Clarete (7)	1	4 (57.1)	2
Blanco (6)		2	4 (66.7)

<sup>1</sup> Porcentaje de casos correctamente clasificados.

Tabla V.24. Clasificación de los vinos analizados

Muestra	Clase asignada	Clase real	C <sub>tiramina</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )
<i>Vino T1</i>	Tinto	Tinto	2.55
<i>Vino T2</i>	Tinto	Tinto	5.91
<i>Vino T3</i>	Tinto	Tinto	3.58
<i>Vino T4</i>	Tinto	Tinto	3.17
<i>Vino T5</i>	Tinto	Tinto	2.24
<i>Vino T6</i>	Blanco	Tinto	No detectada
<i>Vino C7</i>	Blanco	Clarete	0.33
<i>Vino C8</i>	Blanco	Clarete	0.86
<i>Vino C9</i>	Clarete	Clarete	1.49
<i>Vino C10</i>	Clarete	Clarete	1.23
<i>Vino C11</i>	Clarete	Clarete	1.63
<i>Vino C12</i>	Tinto	Clarete	2.59
<i>Vino C13</i>	Clarete	Clarete	1.05
<i>Vino B14</i>	Blanco	Blanco	0.23
<i>Vino B15</i>	Clarete	Blanco	1.22
<i>Vino B16</i>	Blanco	Blanco	No detectada
<i>Vino B17</i>	Blanco	Blanco	No detectada
<i>Vino B18</i>	Blanco	Blanco	No detectada
<i>Vino B19</i>	Clarete	Blanco	1.44

Con esta metodología, al obtener sólo una variable dentro del modelo de clasificación, da lugar a una regla sencilla para determinar cuál será el contenido de tiramina para las tres clases de vino. Para ello, conocidos los centroides, se pueden obtener las puntuaciones de corte [12] entre las tres clases, y sustituyendo éstas en  $FD_1$ , se puede conocer entre que límites oscilarán los contenidos de tiramina para los tres tipos de vino (Tabla V.25).

**Tabla V.25. Valores límite de concentración de tiramina para cada clase de vino**

Tipo de vino	Centroide	Puntuación de corte	Valor límite ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
B	-0.879		$C_{\text{tiramina}} < 0.90$
C	-0.199	BC = -0.539	$0.90 < C_{\text{tiramina}} < 2.11$
T	1.111	CT = 0.456	$C_{\text{tiramina}} > 2.11$

Por tanto, de forma aproximada, los vinos blancos tenderán a tener una concentración de tiramina inferior a  $0.90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , para los tintos será mayor de 2.11, y los claretes tenderán a tener concentraciones entre estos dos valores, siempre que el proceso de fermentación maloláctica sea el que corresponda al tipo de vino considerado (baja o nula para blancos y claretes y alta para los tintos).

Así, en los vinos tintos, uno es clasificado como blanco, ya que en ese vino, T6, no se detectó la tiramina ( $C < 0.90$ ). En los blancos, dos de ellos se asignan a la categoría de claretes, B15 y B19, ya que su concentración era superior a este valor, 1.22 y 1.44 respectivamente, mientras que en los claretes aparecen tres casos incorrectamente clasificados. Así, dos de ellos, clasificados como blancos, poseen una concentración de tiramina inferior a  $0.90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , mientras que el tercero es considerado por el modelo como tinto ( $C_{\text{tiramina}} = 2.59 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

De este estudio, extraemos las siguientes conclusiones:

- *En general, se comprueba que los vinos con un menor contenido en aminas biógenas son los blancos, seguidos de los claretes, mientras que los tintos presentan un mayor contenido de estos componentes.*
- *Los vinos, en una primera división pueden separarse en “tintos” y “no tintos”. En los “no tintos”, se incluyen blancos y claretes, presentando estos últimos en general un comportamiento más cercano a los blancos que a los tintos.*
- *El contenido de las aminas generadas en la fermentación maloláctica, putrescina, histamina y tiramina, están correlacionadas entre sí.*
- *La tiramina, es la amina biógena que presenta un mayor poder discriminante ente los tres tipos de vino, pudiendo utilizarse para comprobar si la fermentación maloláctica se ha producido en condiciones “normales” para el tipo de vino considerado.*
- *Los vinos blancos suelen tener una concentración de tiramina inferior a  $0.9 \text{ mg}\cdot\text{t}^{-1}$ , mientras que los tintos presentan una concentración superior a 2.1, situándose el contenido de tiramina en los claretes entre 0.9 y  $2.1 \text{ mg}\cdot\text{t}^{-1}$ .*



## CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN

MALTA, MAÍZ Y CERVEZAS





## DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MALTA, MAÍZ Y CERVEZAS

Con objeto de estudiar la aplicabilidad del método cromatográfico a diferentes matrices, se procedió a la determinación de aminos biógenos en muestras de cerveza, analizando además muestras sólidas de materias primas relacionadas con su elaboración. En este último caso se optimizó la etapa de extracción sólido-líquido [1,2] necesario para obtener los analitos en disolución.

## **VI.1. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MUESTRAS SÓLIDAS: MALTA Y MAÍZ**

Las aminos biógenas no solo están presentes en productos fermentados, como vino, quesos, cervezas, etc..., sino que también están presentes en productos que no han experimentado ningún tipo de fermentación.

Este es el caso de las materias primas empleadas en el proceso de elaboración de la cerveza [3], como son la cebada, trigo, arroz o maíz. Dentro de éstos, destaca por su utilización en el proceso de elaboración de la cerveza, la malta, entendida como el producto de someter los granos de cebada a un proceso de germinación y posterior desecación y tostado [4], y el maíz, por lo que se consideró conveniente determinar el contenido de aminos en este tipo de muestras.

### **VI.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN SÓLIDO LÍQUIDO**

#### **VI.1.1.1. Selección del agente extractante**

Aunque los datos aparecidos en bibliografía [3,5] indican que el ácido más adecuado para la extracción de aminos estudiadas en este tipo de muestras es el ácido perclórico, se llevaron a cabo una serie de experiencias preliminares en los que además de éste se probó la viabilidad de la utilización del ácido clorhídrico como fase extractante.

Dado que la disolución madre de aminos biógenas contiene un 0.2 % (m/v) de ácido tiodipropiónico (TDPA) como agente antioxidante, se consideró oportuno adicionarlo a las dos fases extractantes ensayadas para estabilizar a las aminos en el extracto.

El estudio de la influencia del tipo de ácido se llevó a cabo de la siguiente forma:

En matraces de 100 ml se adicionaron:

- 2.5 gramos de muestra de malta.
- 0.17 ó 0.85 mg de histamina, que fueron homogeneizados convenientemente con la muestra.
- 25 ml de la fase extractante considerada (HCl o HClO<sub>4</sub>, 0.5 M con un 0.2 % (m/v) de TDPA).

A continuación se agitaron los matraces durante 15 minutos. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 r.p.m., eliminando el residuo sólido mediante filtración a través de un papel Whatman nº 40. Cuando fue necesario se enrasó a con la fase extractante a 25 ml.

Una vez filtrada a través de un filtro de 0.45 µm cada disolución resultante, se tomó 1ml y se enrasó a 10 ml con una disolución de HCl 0.1 con TDPA. En todos los casos se utilizó un volumen de 1.5 ml para la reacción de derivatización.

En la Tabla VI.1 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos, definidos por la IUPAC [6] como recuperación aparente y expresada como cociente entre la concentración experimental y la teórica, para cada uno de las experiencias.

Tabla VI.1. Resultados obtenidos para los dos ácidos obtenidos

Ácido	Ap <sup>1</sup>	C <sub>añadida</sub> (mg)	C <sub>encontrada</sub> (mg)	% Recuperación
HCl	216443	0.170	0.164	96.41
	916870	0.850	0.697	82.02
HClO <sub>4</sub>	201097	0.170	0.152	89.53
	929179	0.850	0.707	83.12

<sup>1</sup> Área de pico medida en unidades arbitrarias del integrador.

Se puede observar como no hay una gran diferencia entre los porcentajes de recuperación obtenidos para los dos ácidos ensayados.

Dado que las aminos se preparan y son estables en medio clorhídrico, *se decidió utilizar como fase extractante dicho ácido.*

#### **VI.1.1.2. Optimización de la concentración de agente extractante y del tiempo de extracción**

Seleccionada la fase extractante, y teniendo en cuenta que los dos factores que más pueden influir en la extracción sólido-líquido son la concentración de ácido y el tiempo de extracción, variables estrechamente relacionadas, se llevó a cabo la optimización simultánea de ambos mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta. Para ello, se utilizó un diseño compuesto central en estrella rotable, en la que cada factor se estudió a cinco niveles, variando la concentración de ácido entre 0.1 y 1.1 M y el tiempo de extracción entre 5.1 y 24.9 minutos.

En la aplicación de dicho diseño, se utilizó malta en la que se habían detectado putrescina y espermidina, y a la que se adicionaron 20  $\mu\text{g}$  de las aminas no detectadas por cada gramo de malta.

Para dicho estudio se empleó el siguiente procedimiento operatorio:

En matraces de 100 ml se adicionaron:

- 1.0 gramos de muestra de malta.
- 20  $\mu\text{g}$  de las aminas no detectadas, que fueron homogeneizados convenientemente con la muestra.
- 10 ml de la fase extractante considerada.

A continuación se agitaron los matraces durante el tiempo indicado en cada uno de los puntos experimentales del diseño. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 r.p.m., eliminando el residuo sólido mediante filtración a través de un papel Whatman n° 40. Cuando fue necesario se enrasó a con la fase extractante a 10 ml.

Una vez filtrada a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  cada disolución resultante, se tomó 1ml y se procedió a la reacción de derivatización.

En la Tabla VI.2 se muestran los valores experimentales obtenidos, y en la Tabla A.55 (ver anexo) se recoge la matriz del diseño.

Tabla VI.2. Resultados del área de pico obtenida para el diseño compuesto central

Amina	Experiencia									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Triptamina</i>	184591	208040	199945	228584	213247	199050	212132	238746	201293	195686
<i>Feniletilamina</i>	166473	191222	173228	184625	209946	152238	207865	188162	175156	193928
<i>Putrescina</i>	1195631	1137660	1075264	1176201	1182933	1179358	1068254	1195479	1171763	1126639
<i>Cadaverina</i>	484100	403781	470027	635319	615208	492425	344161	601583	625920	534962
<i>Histamina</i>	406333	381720	379393	403442	410800	402679	369968	400331	399543	400799
<i>Tiramina</i>	400188	350883	352544	400556	419821	388523	334602	409949	397517	403681
<i>Espermidina</i>	838179	751028	736098	841290	849239	813252	729666	866024	811011	794797
<i>Espermina</i>	292902	241024	215439	281730	293510	257613	205451	290055	272041	282914

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Del análisis gráfico de los residuales, se deduce que se cumplen las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia, necesarias para la verificación del modelo para cada una de las aminas estudiadas.

- Análisis de la varianza.

En la Tabla A.56 se indican los resultados obtenidos del análisis de la varianza para cada una de las aminas, mostrándose un resumen de los mismos en la Tabla VI.3.

Tabla VI.3. Efectos significativos en el diseño compuesto central

Amina	¿Efecto significativo?				
	$C_{\text{HCl}}$	$t_{\text{extracción}}$	$C_{\text{HCl}}t_{\text{extracción}}$	$C_{\text{HCl}}^2$	$t_{\text{extracción}}^2$
<i>Triptamina</i>			X	X	X
<i>Feniletilamina</i>		X	X		X
<i>Putrescina</i>	X			X	
<i>Cadaverina</i>	X	X		X	X
<i>Histamina</i>	X			X	
<i>Tiramina</i>	X			X	
<i>Espermidina</i>	X			X	
<i>Espermina</i>	X			X	

X: Efecto significativo para  $\alpha = 0.05$ .

Se puede observar como el efecto de la concentración de ácido sobre las diversas variables respuesta es mayor (efecto significativo) que el producido por el tiempo de extracción, tanto para los términos lineales como para los cuadráticos, excepto para la feniletilamina, para la que el área de pico está más afectada por esta segunda variable, cuyos efectos, lineal y cuadrático, son significativos. El término de interacción de estos dos factores solo es significativo para la triptamina y feniletilamina ( $P < 5\%$ ), mientras que para el resto de aminas, no lo es.

- Cálculo del óptimo.

Los coeficientes de las funciones cuadráticas (usando los valores sin codificar) que relacionan las variables respuesta seleccionadas para cada amina con los factores estudiados



se muestran en la Tabla A.57.

La aplicación del criterio de Lagrange (Tabla VI.4) sobre cada una de las funciones, indica la presencia de un máximo para todas las aminas, excepto para la feniletilamina, en la que para la zona estudiada, se obtiene un punto de silla. En relación a las mejores condiciones experimentales de la extracción de las aminas, se puede observar, que para la concentración de ácido clorhídrico, el valor óptimo oscila entre 0.56 y 1.10 M (el valor máximo de concentración ensayada), mientras que para el tiempo de extracción, los valores oscilan entre el mínimo, 5.1 minutos, y el máximo, 24.9.

**Tabla VI.4. Aplicación del criterio de Lagrange**

Amina	Criterio de Lagrange				Mejores condiciones experimentales	
	$\partial R_i^* / \partial C_{HCl}$	$\partial R_i / \partial t_{extracción}$	Hessiano	Óptimo	$C_{HCl}$ (M)	$t_{extracción}$ (min.)
<i>Triptamina</i>	-241476 < 0	-692 < 0	153133283 > 0	Máximo	0.56	15.4
<i>Feniletilamina</i>	127707 > 0	-432 < 0	-94535727 < 0	Punto silla	1.10	24.7
<i>Putrescina</i>	-666494 < 0	-104 < 0	43540652 > 0	Máximo	0.66	5.1
<i>Cadaverina</i>	-1461672 < 0	-1289 < 0	1840582074 > 0	Máximo	0.75	21.1
<i>Histamina</i>	-127568 < 0	-4 < 0	58026 > 0	Máximo	0.93	24.9
<i>Tiramina</i>	-291150 < 0	-256 < 0	71028038 > 0	Máximo	0.89	19.5
<i>Espermidina</i>	-709928 < 0	-791 < 0	554845091 > 0	Máximo	0.75	15.3
<i>Espermina</i>	-311206 < 0	-371 < 0	108422080 > 0	Máximo	0.89	16.9

\* Respuesta utilizada para cada amina.

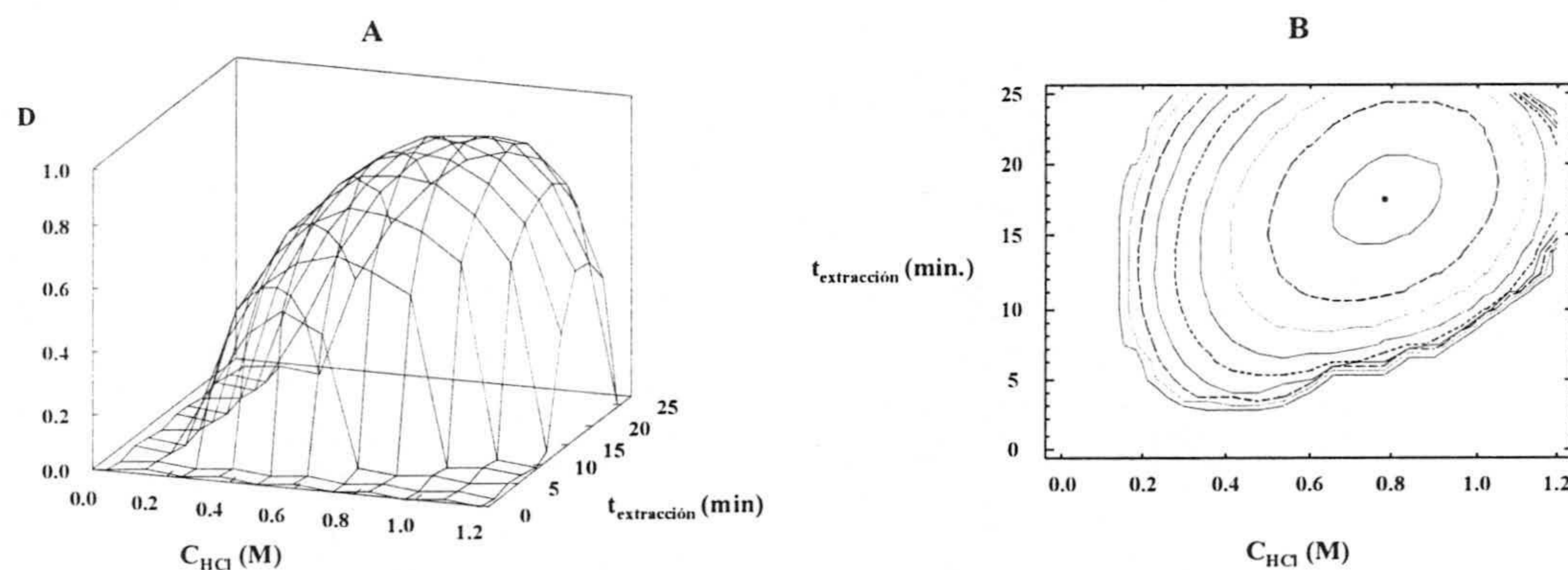
Se puede concluir que *del estudio individual de la variables respuesta de cada amina, no se puede obtener una conclusión definitiva sobre las mejores condiciones experimentales para la extracción de las aminas en la malta.*

Teniendo en cuenta que se necesita un compromiso entre las variables experimentales, se procedió a optimizar la función de conveniencia [7-9].

En la Figura VI.1 se muestra tanto la superficie de respuesta obtenida para esta función como las gráficas de contorno de dicha superficie, donde se puede observar una superficie “equiconveniente” para un rango de concentraciones de ácido clorhídrico comprendido entre 0.7 y 0.9 M y para un tiempo de extracción entre 15 y 20 minutos, presentando la función de conveniencia un valor óptimo para la extracción de aminos biógenos de:

$$C_{HCl} = 0.80 M$$

$$t_{extracción} = 17.6 \text{ minutos} \approx 18 \text{ minutos}$$



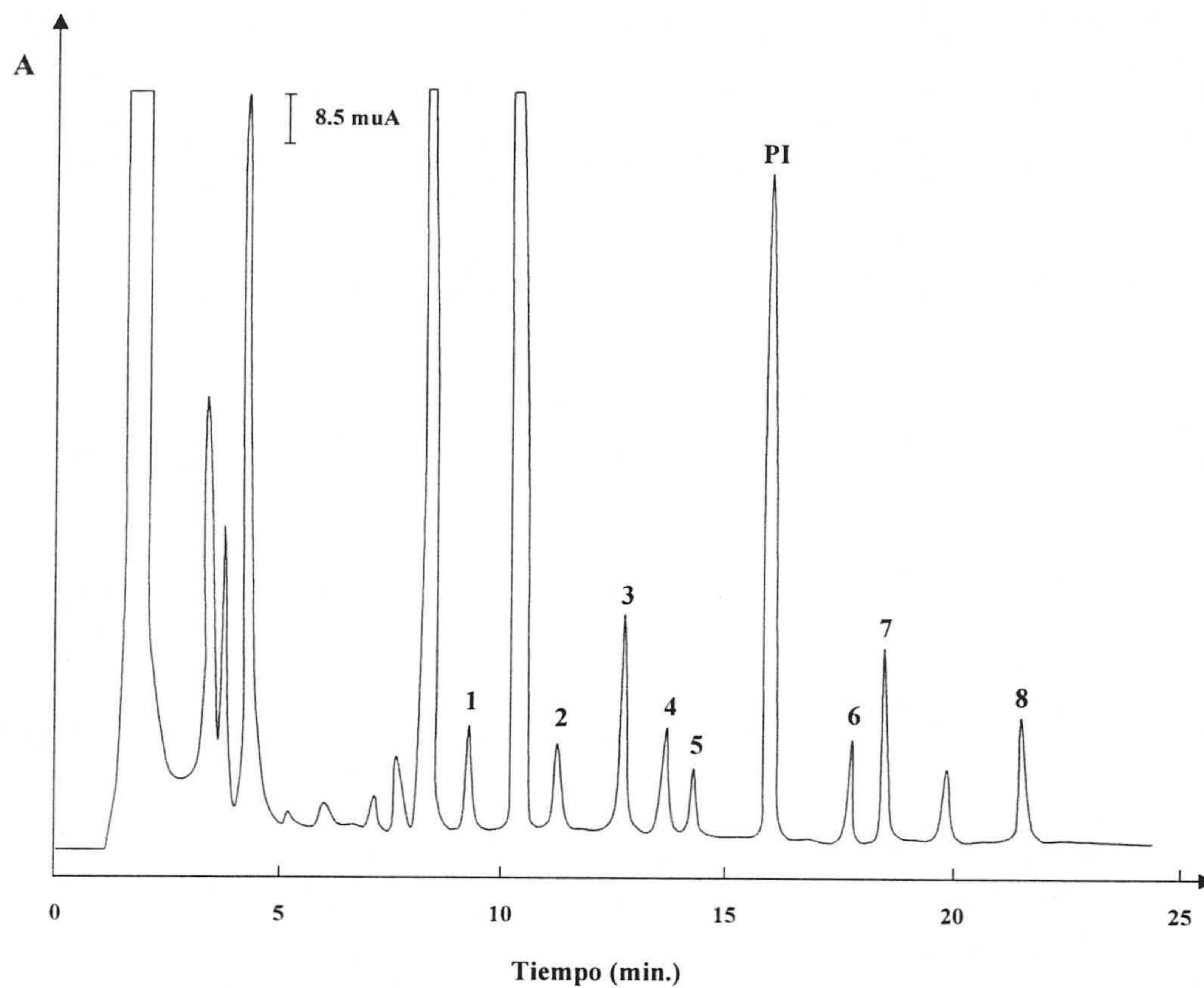
**Figura VI.1. Superficie de respuesta obtenida para la función de conveniencia. (A) Representación tridimensional; (B) Superficie de contorno.**

En estas condiciones, los valores área de pico para las ocho aminas son las indicadas en la Tabla VI.5.

**Tabla VI.5. Valores de área de pico obtenidas para el óptimo seleccionado**

<b>Amina</b>	<b>Ap (u.a.)</b>
<i>Triptamina</i>	227496
<i>Feniletilamina</i>	192629
<i>Putrescina</i>	1188740
<i>Cadaverina</i>	641820
<i>Histamina</i>	406582
<i>Tiramina</i>	416154
<i>Espermidina</i>	858869
<i>Espermina</i>	296483

En la Figura VI.2, se muestra un cromatograma del extracto derivatizado, donde puede observarse como los picos de las aminas aparecen bien resueltos.



**Figura VI.2. Cromatograma ilustrativo de las 8 aminas biógenas después del proceso de extracción. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina; PI: 1,7-diaminoheptano.**

### **VI.1.1.3. Estudio de la estabilidad del extracto**

Puesto que en bibliografía aparecen datos que indican que la estabilidad de las aminos en extracto ácido era variable [1,5], se realizó un estudio de la estabilidad del extracto ácido.

Para ello, se empleó el siguiente procedimiento operatorio:

En un matraz de 250 ml se adicionó:

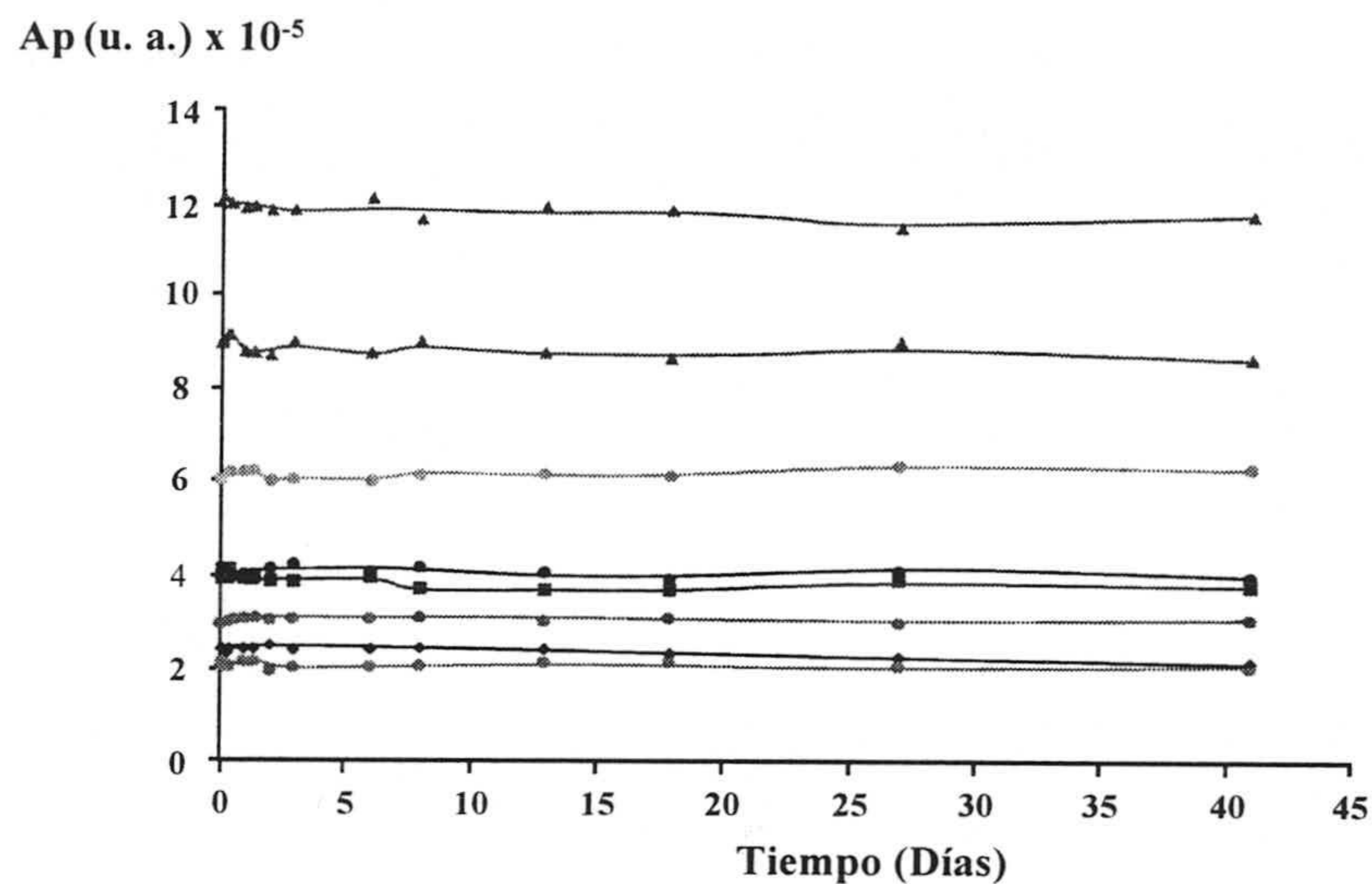
- 5.0 gramos de muestra de malta.
- 100 µg de las aminos no detectadas, que fueron homogeneizados convenientemente con la muestra.
- 50 ml de HCl 0.8 M con 0.2 (m/v) de TDPA.

A continuación se agitaron los matraces durante 18 minutos. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 r.p.m., eliminando el residuo sólido mediante filtración a través de un papel Whatman nº 40, enrasando a 50 ml con la fase extractante.

Una vez filtrada a través de un filtro de 0.45 µm cada disolución resultante, se tomó 1ml y se procedió a la reacción de derivatización. Entre cada experiencia, el extracto ácido se guardó en frasco topacio a -20 °C.

Para cada una de las experiencias realizadas, se midieron las áreas de pico de las aminos. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla A.58. La Figura VI.3 muestra la variación de las áreas de pico de los analitos en función del tiempo, donde puede observarse que la mayoría de las aminos son estables durante cuarenta días, excepto la triptamina, cuya

área de pico empieza a decrecer ligeramente a partir de dos semanas.



**Figura VI.3.** Variación del área de pico de los derivados dabsilados con el tiempo. (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (◐) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (●) Esperrina.

A la vista de los resultados se puede concluir que *las aminas biógenas son estables en el extracto ácido al menos durante dos semanas, pudiendo almacenarse durante 40 días, si no se requiere la cuantificación de la triptamina.*

### **VI.1.2. PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MALTA Y MUESTRAS SIMILARES**

Una vez estudiadas la influencia que las principales variables ejercen sobre la extracción de las aminos biógenas en muestras de malta, se concluye que en las siguientes condiciones se obtiene un extracto estable:

En un matraz de 250 ml se adicionó:

- 5.0 gramos de muestra de malta.
- 50 ml de HCl 0.8 M con 0.2 (m/v) de TDPA.

A continuación se agitaron los matraces durante 18 minutos. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 r.p.m., eliminando el residuo sólido mediante filtración a través de un papel Whatman n° 40, enrasando a 50 ml con la fase extractante.

Una vez filtrada a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  cada disolución resultante, se toma 1 ml para la reacción de derivatización. Si es necesario, se prepara antes una disolución intermedia con la disolución de HCl 0.1 M que contiene un 0.2% (m/v) de TDPA

### **VI.1.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO AL ANÁLISIS DE AMINAS BIÓGENAS EN MALTA Y MAÍZ**

#### **VI.1.3.1. Análisis de una muestra de malta**

Para este estudio, se utilizó una muestra de malta procedente de Castilla La Mancha. La determinación del contenido en aminos biógenos se realizó a partir de una disolución obtenida, al tratar 10.067 gramos de muestra homogénea de acuerdo con el procedimiento optimizado anteriormente y llevado a un volumen final de 100 ml.

Se prepararon dos disoluciones de trabajo, llevando 10 y 30 ml del extracto a un volumen final de 50 ml.

En la Tabla A.59 (ver anexo) se recogen las áreas de pico de los distintos analitos para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la determinación.

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se recogen en la Tabla A.60, mostrándose un resumen de los mismos en la Tabla VI.6.



**Tabla VI.6. Resumen del análisis estadístico del análisis de aminas biógenas en la muestra de malta**

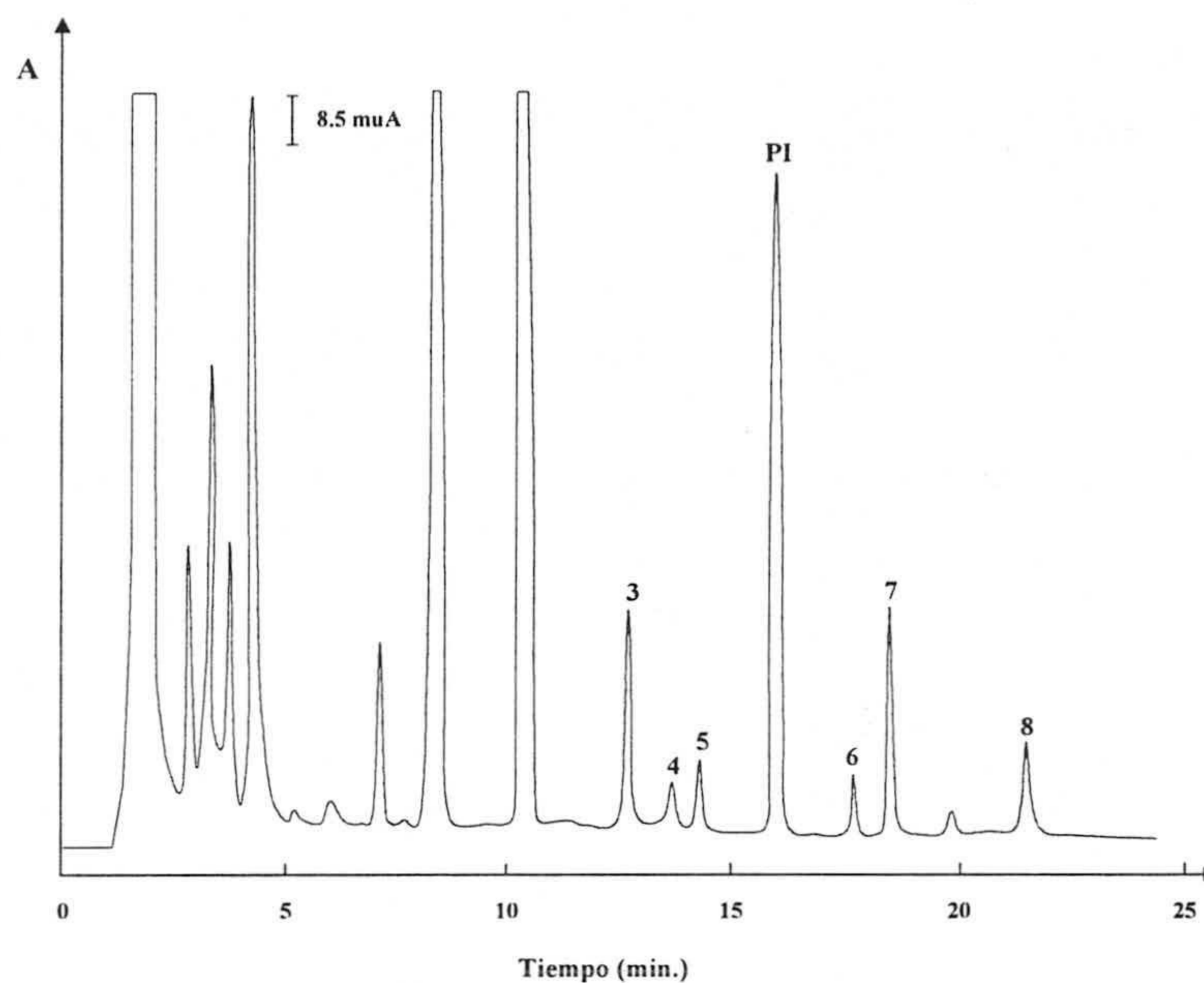
Amina	Efecto matriz	Blanco Youden	¿Resultado veraz?	Contenido ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
<i>Putrescina</i>	No	No	Sí (P = 31.7 %)	27.06 (1.4) <sup>1</sup>
<i>Cadaverina</i>	No	Sí	Sí (P = 79.9 %)	3.13 (4.4)
<i>Histamina</i>	No	Sí	Sí (P = 49.4 %)	2.46 (10.7)
<i>Tiramina</i>	No	No	Sí (P = 38.6 %)	3.18 (8.3)
<i>Espermidina</i>	No	No	Sí (P = 81.1 %)	42.57 (3.3)
<i>Espermina</i>	No	Sí	Sí (P = 81.8 %)	14.23 (4.6)

<sup>1</sup> Entre paréntesis, el valor de la desviación estándar relativa, en %, para seis determinaciones.

Se pueden observar varios hechos:

- *De las ocho aminas estudiadas, no se detectaron en la malta analizada, la triptamina y feniletilamina.*
- *En ninguna de las seis aminas detectadas, se observó una interacción matriz/analito, por lo que se concluyó que no había efecto matriz.*
- *Sin embargo, para tres de las aminas detectadas, cadaverina, histamina y espermina, se observó la existencia de Blanco de Youden, atribuible a un error sistemático de la matriz.*
- *En todos los casos, al comparar el contenido de analito calculado a partir del calibrado con patrones (CP) y con el calibrado con adición de patrón (AP), se observó que el método era veraz, con un nivel de significación del 5%.*
- *De las seis aminas detectadas, se observa que las que se encuentran en mayor cantidad en la malta, son la putrescina, espermidina y espermina, mientras que cadaverina, histamina y tiramina están en muy baja concentración, por lo que se suelen considerar a las tres primeras aminas como constituyentes “naturales” de la cerveza [10], debido a su alto contenido en malta.*

Finalmente, en la Figura VI.4, se muestra un cromatograma de la malta analizada.



**Figura VI.4. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en la malta. 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina. P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

### **VI.1.3.2. Análisis de una muestra de maíz**

La determinación del contenido en aminas biógenas en maíz se realizó a partir de una disolución obtenida, tratando 9.889 gramos de muestra homogénea de acuerdo con el procedimiento optimizado anteriormente y llevado a un volumen final de 100 ml.

Se preparó una disolución intermedia de trabajo, llevando 30 ml del extracto a un volumen final de 50 ml.

En la Tabla A.61 (ver anexo) se recogen las áreas de pico de los distintos analitos para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la determinación.

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se recogen en la Tabla A.62, mostrándose un resumen de los mismos en la Tabla VI.7.

**Tabla VI.7. Resumen del análisis estadístico del análisis de aminas biógenas en la muestra de maíz**

Amina	Efecto matriz	Blanco Youden	¿Resultado veraz?	Contenido ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )
<i>Putrescina</i>	No	No	Sí (P = 94.7 %)	1.47 (6.3) <sup>1</sup>
<i>Espermidina</i>	No	Sí	Sí (P = 80.3 %)	4.38 (2.5)
<i>Espermina</i>	No	No	Sí (P = 92.6 %)	3.44 (3.0)

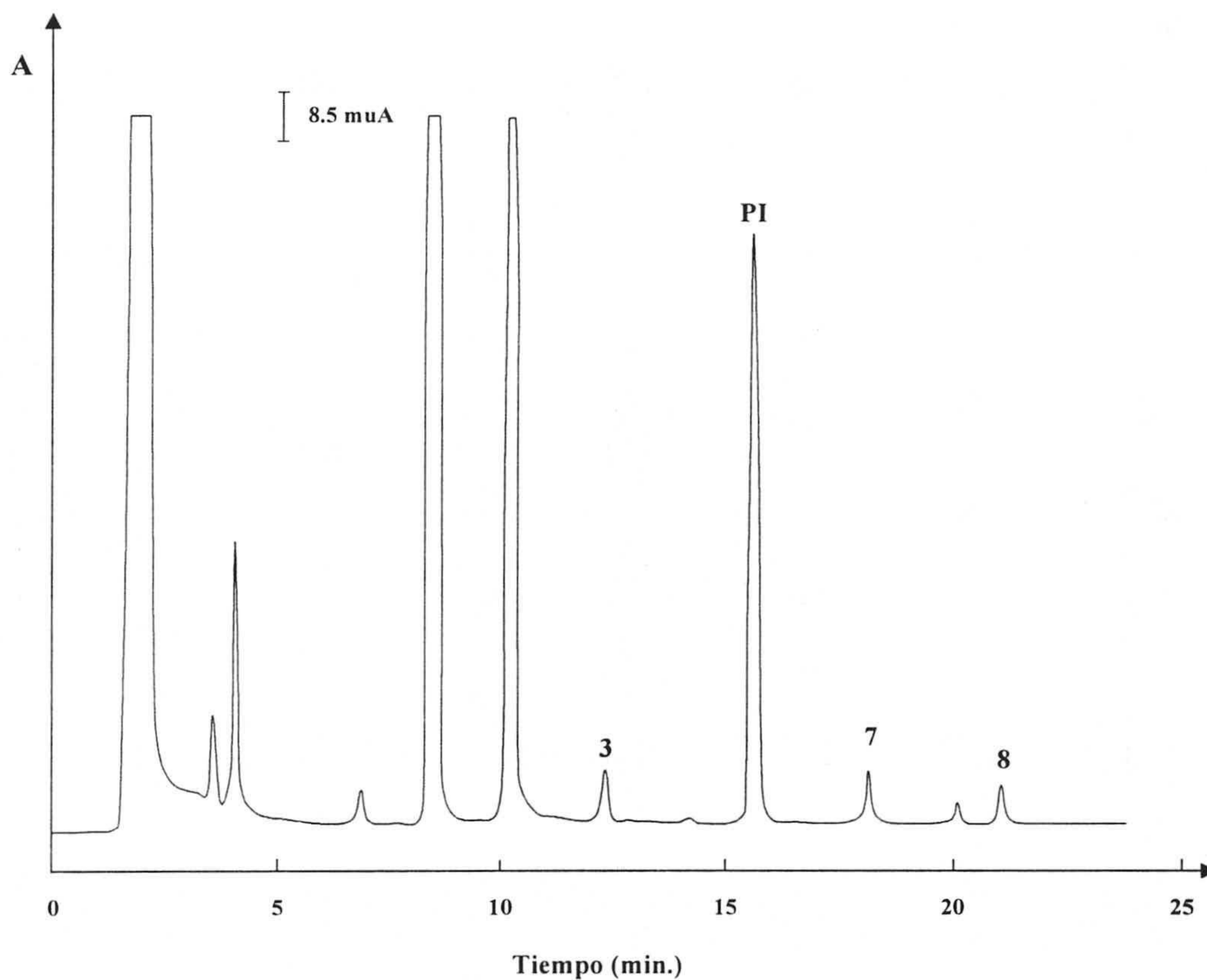
<sup>1</sup> Entre paréntesis, el valor de la desviación estándar relativa, en %, para seis determinaciones, salvo para la espermidina y espermina, para las que se utilizaron 5 determinaciones.

De los resultados obtenidos, se pueden señalar varios hechos significativos:

- *En la muestra de maíz, solo se detectaron tres de las ocho aminas estudiadas, como fueron putrescina, espermidina y espermina.*
- *En ninguna de las tres aminas detectadas, se observó una interacción matriz/analito, por lo que se concluyó que no había efecto matriz, y solo la espermidina presentaba Blanco de Youden, indicando para esta amina, la existencia de error sistemático a causa de la matriz de la malta.*
- *En todos los casos, al comparar el contenido de analito calculado a partir del calibrado con patrones (CP) y con el calibrado con adición de patrón (AP), se observó que el método era veraz para los analitos detectados en la malta, con un nivel de significación del 5%.*

- Si se comparan estos resultados con los obtenidos para la malta, se puede indicar, que el maíz presenta un menor número de aminos así como el contenido de las detectadas es menor.

Finalmente, en la Figura VI.5, se muestra un cromatograma de la malta analizada.



**Figura VI.5. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminos detectadas en maíz. 3: Putrescina; 7: Espermidina; 8: Espermina. P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

### **VI.1.3.3. Verificación de la validez de las matrices estudiadas para la determinación de aminas biógenas**

Con objeto de comprobar si la matriz de las muestras sólidas de malta y maíz permitía la determinación de las ocho aminas estudiadas en esta Memoria, se procedió a la adición de cantidades conocidas de ellas a las muestras anteriormente analizadas. A su vez, para establecer la interdependencia entre la matriz y los analitos, las adiciones se realizaron a tres niveles.

La evaluación de la matriz se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones de la IUPAC, [6], utilizando para ello lo que define como porcentaje de recuperación aparente, al utilizar para su cálculo las funciones de calibración simple o de adición de patrón. En este sentido, al llevarse a cabo un estudio de adiciones de analito y la correspondiente saturación del efecto interactivo matriz/analito, los resultados obtenidos pueden considerarse válidos.

#### **VI.1.3.3.a. Ensayo del porcentaje de recuperación en malta**

Para realizar el ensayo de recuperación, a cantidades de malta de aproximadamente 2.5 gramos, se les adicionaron tres cantidades diferentes de cada una de las aminas y se extrajeron siguiendo el procedimiento propuesto llevando a un volumen final de 25 ml. De esta disolución se preparó una disolución de trabajo intermedia, llevando 10 ml del extracto a un volumen final de 25 ml.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VI.8, donde se muestran los valores de P, al comparar los porcentajes de recuperación aparentes con el valor teórico del 100%.

Puede observarse, como para todas las aminas, se obtiene un porcentaje de recuperación superior al 90% para los tres niveles de concentración ensayados, y no siendo dicho valor estadísticamente diferente de 100 %.

Tabla VI.8. Estudio de recuperación en la muestra de malta

Amina	C <sub>malta</sub> <sup>1</sup>	C <sub>añadida</sub>	C <sub>encontrada</sub>	% Rec	DER <sup>2</sup> (%)	P(%)
Triptamina	----	4.80	4.38	<b>91.2</b>	7.7	16.3
		9.20	8.49	<b>92.3</b>	7.3	18.6
		18.00	16.56	<b>92.0</b>	3.7	5.6
Feniletilamina	----	6.00	6.60	<b>109.5</b>	14.5	40.8
		12.80	12.20	<b>95.3</b>	5.6	27.1
		18.00	16.67	<b>92.6</b>	3.7	6.4
Putrescina	27.06	8.00	35.00	<b>97.4</b>	4.3	39.9
		24.00	51.56	<b>101.5</b>	4.0	58.5
		40.00	65.99	<b>97.0</b>	2.6	17.5
Cadaverina	3.13	3.20	6.33	<b>97.8</b>	11.9	76.7
		6.80	9.39	<b>91.0</b>	6.9	13.0
		12.40	14.96	<b>94.8</b>	4.4	16.1
Histamina	2.46	3.20	5.77	<b>105.2</b>	13.6	59.1
		6.40	8.38	<b>93.4</b>	8.2	27.5
		11.20	13.90	<b>102.8</b>	6.93	57.1
Tiramina	3.18	4.00	7.10	<b>97.5</b>	12.7	76.0
		8.00	11.08	<b>98.5</b>	8.1	77.4
		12.00	14.19	<b>91.6</b>	6.9	14.5
Espermidina	42.57	20.80	61.45	<b>91.6</b>	5.9	11.3
		41.20	83.91	<b>100.8</b>	3.2	71.8
		61.60	98.62	<b>91.3</b>	9.2	21.4
Espermina	14.23	10.00	24.00	<b>96.0</b>	10.7	57.4
		20.00	33.33	<b>94.7</b>	3.2	9.4
		32.00	44.70	<b>94.7</b>	3.5	10.9

<sup>1</sup> Concentración expresada en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .

<sup>2</sup> Desviación estándar relativa para tres réplicas.

#### **VI.1.3.3.b. Ensayo del porcentaje de recuperación en maíz**

Para realizar el ensayo de recuperación, a cantidades de maíz de aproximadamente 2.5 gramos, se les adicionaron tres cantidades diferentes de cada una de las aminos y se extrajeron siguiendo el procedimiento propuesto llevando a un volumen final de 25 ml. De esta disolución se prepara una disolución intermedia de trabajo, llevando 10 ml del extracto a un volumen final de 20 ml.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VI.9, donde se recogen los valores de P, al comparar los porcentajes de recuperación obtenidos con el valor teórico del 100%.

Puede observarse, como para todas las aminos, se obtiene un porcentaje de recuperación superior al 90% para los tres niveles de concentración ensayados, y no siendo estadísticamente diferente al valor del 100 %.

A raíz de los resultados obtenidos en ambos estudios de recuperación, se puede afirmar que *la extracción sólido-líquido optimizada anteriormente, permite la extracción cuantitativa de aminos biógenas de muestras de malta y maíz y su posterior determinación cromatográfica.*

Tabla VI.9. Estudio de recuperación en la muestra de maíz

<b>Amina</b>	<b>C<sub>malta</sub><sup>1</sup></b>	<b>C<sub>añadida</sub></b>	<b>C<sub>encontrada</sub></b>	<b>% Rec</b>	<b>DER<sup>2</sup> (%)</b>	<b>P(%)</b>
Triptamina	----	6.17	5.92	<b>95.9</b>	9.8	53.3
		12.75	11.49	<b>90.1</b>	7.7	13.3
		19.33	17.57	<b>90.9</b>	5.4	8.4
Feniletilamina	----	5.76	5.05	<b>87.8</b>	11.2	16.4
		11.51	11.41	<b>99.1</b>	3.7	72.6
		18.09	17.11	<b>94.6</b>	3.2	9.1
Putrescina	1.47	3.70	5.23	<b>96.8</b>	7.7	53.5
		7.40	8.91	<b>98.2</b>	4.2	52.1
		11.92	13.57	<b>100.0</b>	4.4	99.2
Cadaverina	----	6.99	6.51	<b>93.2</b>	4.1	9.0
		14.80	13.91	<b>94.0</b>	3.1	6.9
		21.79	20.93	<b>96.0</b>	2.3	8.7
Histamina	----	6.58	6.32	<b>96.1</b>	4.4	25.5
		13.57	13.31	<b>98.1</b>	3.7	46.3
		20.56	20.74	<b>100.9</b>	2.7	64.1
Tiramina	----	5.35	4.90	<b>91.7</b>	7.3	16.6
		11.51	11.79	<b>102.4</b>	3.8	39.8
		21.79	20.26	<b>92.9</b>	3.9	7.9
Espermidina	4.38	5.76	10.16	<b>97.9</b>	6.8	64.7
		12.34	16.41	<b>96.4</b>	4.1	25.7
		21.38	25.24	<b>96.9</b>	3.0	20.4
Espermina	3.44	4.93	7.76	<b>90.7</b>	10.8	24.3
		9.46	12.82	<b>100.8</b>	7.0	86.9
		16.86	19.91	<b>98.6</b>	4.0	61.3

<sup>1</sup> Concentración expresada en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .<sup>2</sup> Desviación estándar relativa para tres réplicas.



## VI.2. DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN CERVEZAS

Aunque el consumo de cerveza en Europa sea similar o superior al de vino, se posee menos información sobre el contenido de aminos biógenos en esta bebida [3,10,11], existiendo una gran variación entre los valores de aminos en cervezas de distinta procedencia [12], pudiendo llegar a ser perjudiciales para la salud [13].

De esta forma, nos pareció oportuno, continuando con la aplicabilidad del método cromatográfico, proceder al análisis de cervezas de distinto tipo y procedencia.

Atendiendo a la legislación española [4], la **cerveza** se entiende como la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada, de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción.

Dentro de las diversas modalidades de cerveza, destaca por ser la de mayor consumo la *lager*, que se caracteriza por una fermentación baja, en la que la levadura se deposita, al final de la fermentación, en el fondo de la cuba de fermentación, y en el que la fermentación ha sido fría, destacando dentro de éstas el tipo *pilsen*, que posee un extracto primitivo alrededor del 11.5-12.5 % y un alcohol del 5 % en volumen. De esta forma, en general se suele asumir, que si solo se indica cerveza, se está refiriendo a una cerveza de este tipo.

Además, se pueden distinguir otros tipos de cerveza [4]:

- *Cerveza sin alcohol*. Se considera cerveza sin alcohol aquella cuya graduación alcohólica es inferior al 1 % en volumen.
- *Cerveza de bajo contenido en alcohol*. Son aquellas cervezas cuya graduación alcohólica está comprendida entre el 1 y 3 % en volumen.

- *Cerveza especial*. Se consideran cervezas especiales aquéllas cuyo extracto seco primitivo no es inferior al 13 % en masa.
- *Cerveza extra*. Se considera cerveza extra aquella cuyo extracto seco primitivo no sea inferior al 15 % en masa.

Puesto que estas muestras no son materiales de referencia, la veracidad del método analítico se comprobó aplicando la metodología de adición de patrón, en la que como se ha comentado con anterioridad, la veracidad del resultado analítico se comprueba mediante la comparación de los contenidos de analito encontrados empleando un calibrado simple y/o con adición de patrón.

Por otro lado, a las muestras de cerveza, no se les sometió a ningún tratamiento previo salvo desgasificarlas. Seguidamente, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . A continuación se tomó un volumen de la cerveza filtrada y se diluye con la disolución de HCl 0.1M con 0.2 % (m/v) de ácido 3,3'-tiodipropiónico, hasta 10 ml, tomando a continuación 1.5 ml para su derivatización.

### VI.2.1. RESULTADOS

Se analizaron ocho cervezas de diferente tipo y obtenidas de diferentes plantas cerveceras, abarcando los tipos de cerveza comentados y que son los de mayor aceptación. El área de pico para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen las determinaciones para las muestras, así como los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de dichos datos se reúnen en las Tablas A.63-A.86, mostrándose en la Tabla VI.10 un resumen de los mismos.

**Tabla VI.10. Resumen del análisis estadístico del análisis de aminas biógenas en las muestras de cerveza**

<i>Muestra</i>	<i>Amina</i>	<i>Efecto matriz</i>	<i>BY</i>	<i>¿Pendientes diferentes?</i>		<i>¿Resultado veraz?</i>
				<i>CP&amp;AP</i>	<i>AP<sub>1</sub>&amp;AP<sub>2</sub></i>	
<b>Cerveza (1)</b>	Triptamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 43.3%)
	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 23.0%)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 5.4%)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 5.8%)
	Tiramina	Sí	Sí	Sí	No	Sí (P = 72.9%)
<b>Cerveza (2)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 17.3%)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 71.6%)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 41.6%)
	Espermina	No	No	No	----	Sí (P = 50.1%)
<b>Cerveza (3)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 17.5%)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 85.7%)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 32.0%)
<b>Sin alcohol (1)</b>	Triptamina	No	No	No	----	Sí (P = 62.8%)
	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 50.4%)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 45.1%)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 35.5%)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 7.8%)
<b>Sin alcohol (2)</b>	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 65.7%)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 93.2%)
	Tiramina	No	No	No	----	Sí (P = 54.8%)
	Espermidina	No	No	No	----	Sí (P = 66.5%)

**Tabla VI.10. Resumen del análisis estadístico del análisis de aminas biógenas en las muestras de cerveza (Cont.)**

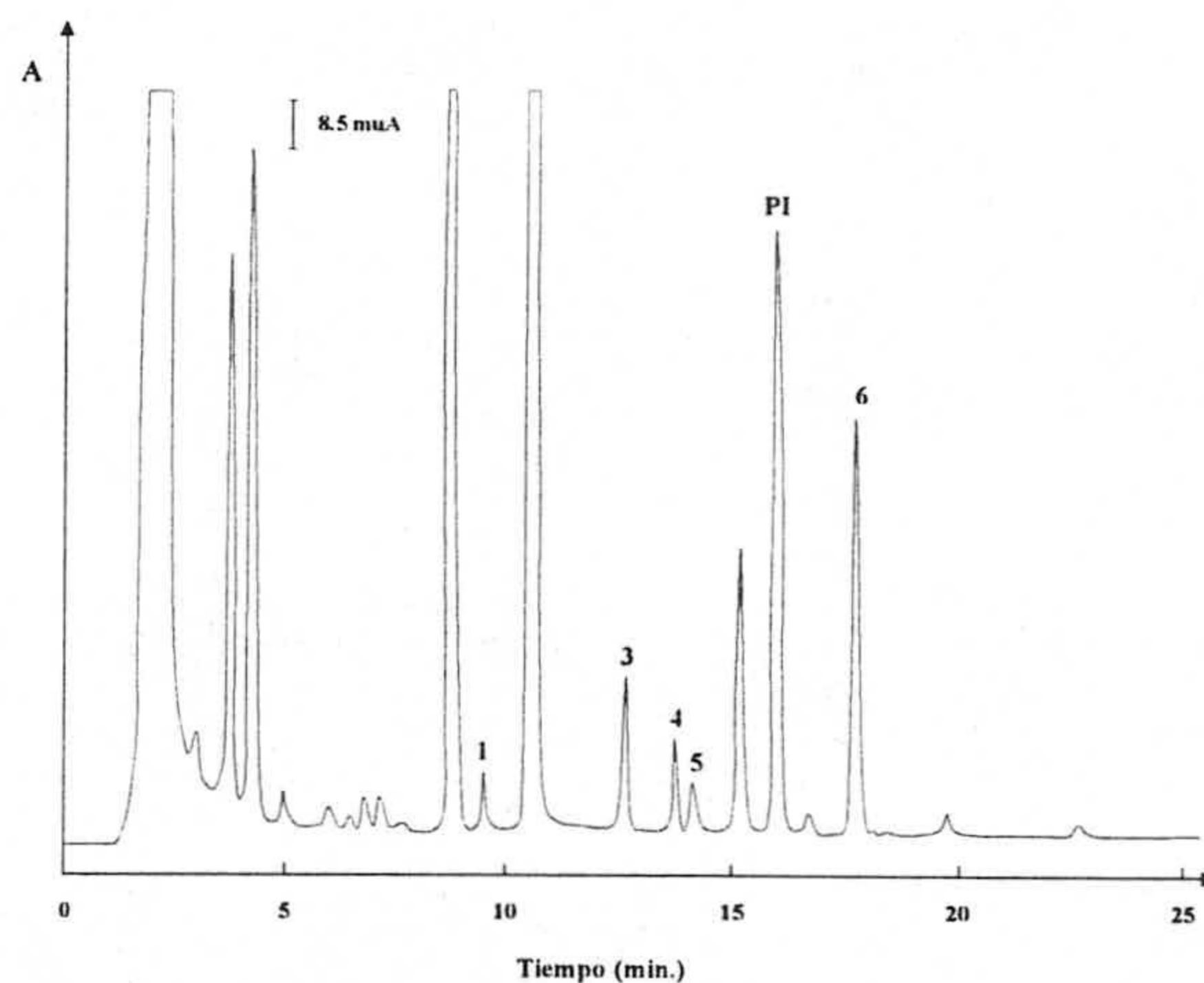
<i>Muestra</i>	<i>Amina</i>	<i>Efecto matriz</i>	<i>BY</i>	<i>¿Pendientes diferentes?</i>		<i>¿Resultado veraz?</i>
				<i>CP&amp;AP</i>	<i>AP<sub>1</sub>&amp;AP<sub>2</sub></i>	
<b>Bajo alcohol<sup>1</sup></b>	Triptamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 67.2%)
	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 58.3%)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 26.1%)
	Histamina	No	No	No	----	Sí (P = 7.6%)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 51.7%)
	Espermidina	No	No	No	----	Sí (P = 85.1%)
<b>Especial</b>	Triptamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 33.6%)
	Putrescina	No	Sí	No	----	Sí (P = 21.2%)
	Cadaverina	No	Sí	No	----	Sí (P = 11.0%)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 61.9%)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 43.1%)
<b>Extra</b>	Triptamina	No	No	No	----	Sí (P = 61.1%)
	Putrescina	No	No	No	----	Sí (P = 44.5%)
	Cadaverina	No	No	No	----	Sí (P = 12.7%)
	Histamina	No	Sí	No	----	Sí (P = 43.1%)
	Tiramina	No	Sí	No	----	Sí (P = 62.5%)
	Espermidina	No	No	No	----	Sí (P = 75.8%)

<sup>1</sup> Cerveza de bajo contenido en alcohol.

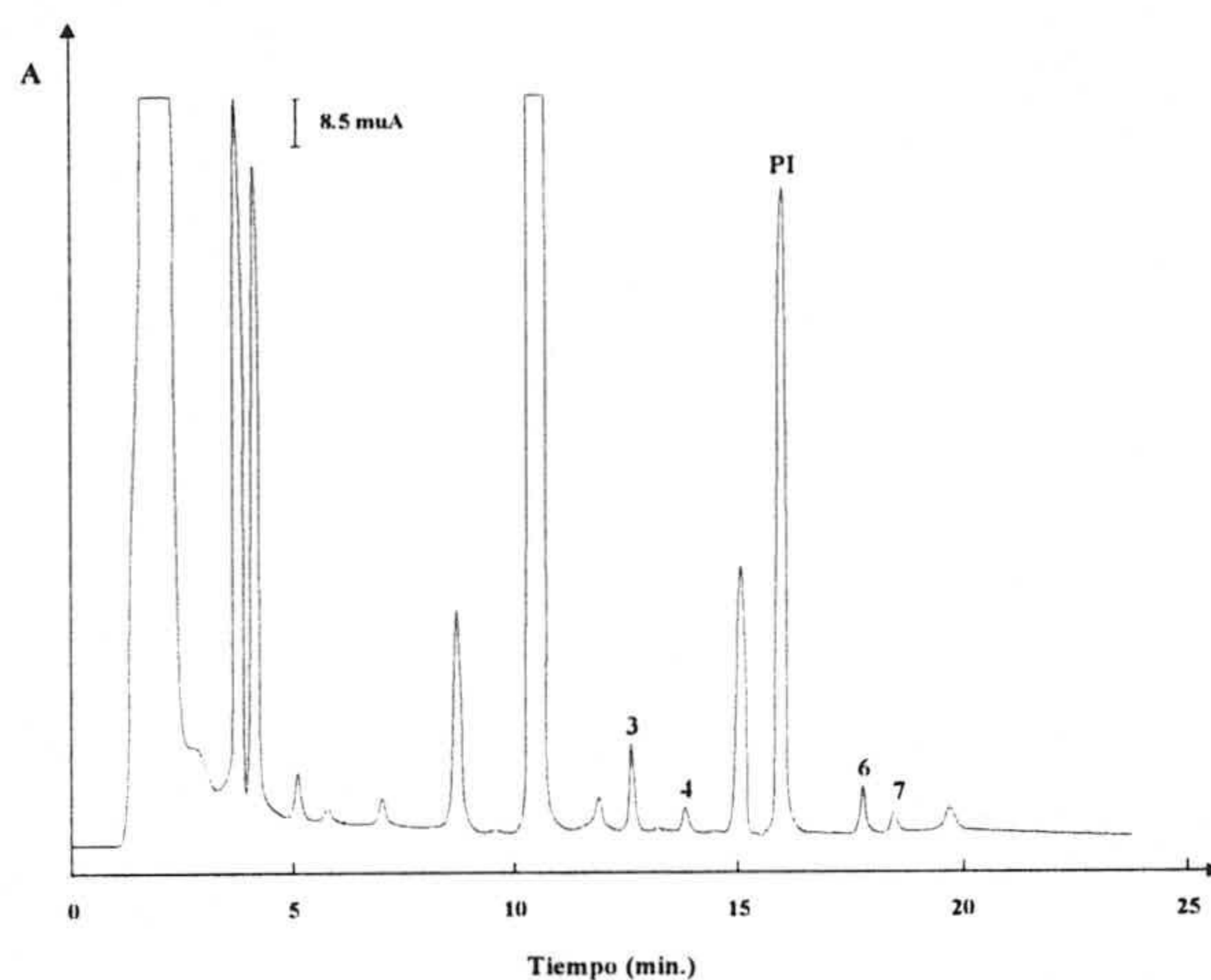
De la Tabla VI.10 se pueden observar varios hechos:

- Solo hay una interacción matriz/analito saturada en el intervalo de volúmenes estudiados para la tiramina en la cerveza (1). Para el resto de aminos y cervezas analizadas, no se detectó la presencia de esta interacción.
- En general, se observa la presencia Blanco de Youden, en aquellas cervezas que tienen un mayor extracto seco primitivo, mientras que aquellas con menor contenido alcohólico (menor extracto seco primitivo) o sin alcohol, la existencia de este error es menor.
- En todos los casos, se observó que el método era veraz para los analitos detectados en las muestras analizadas, con un nivel de significación del 5%.

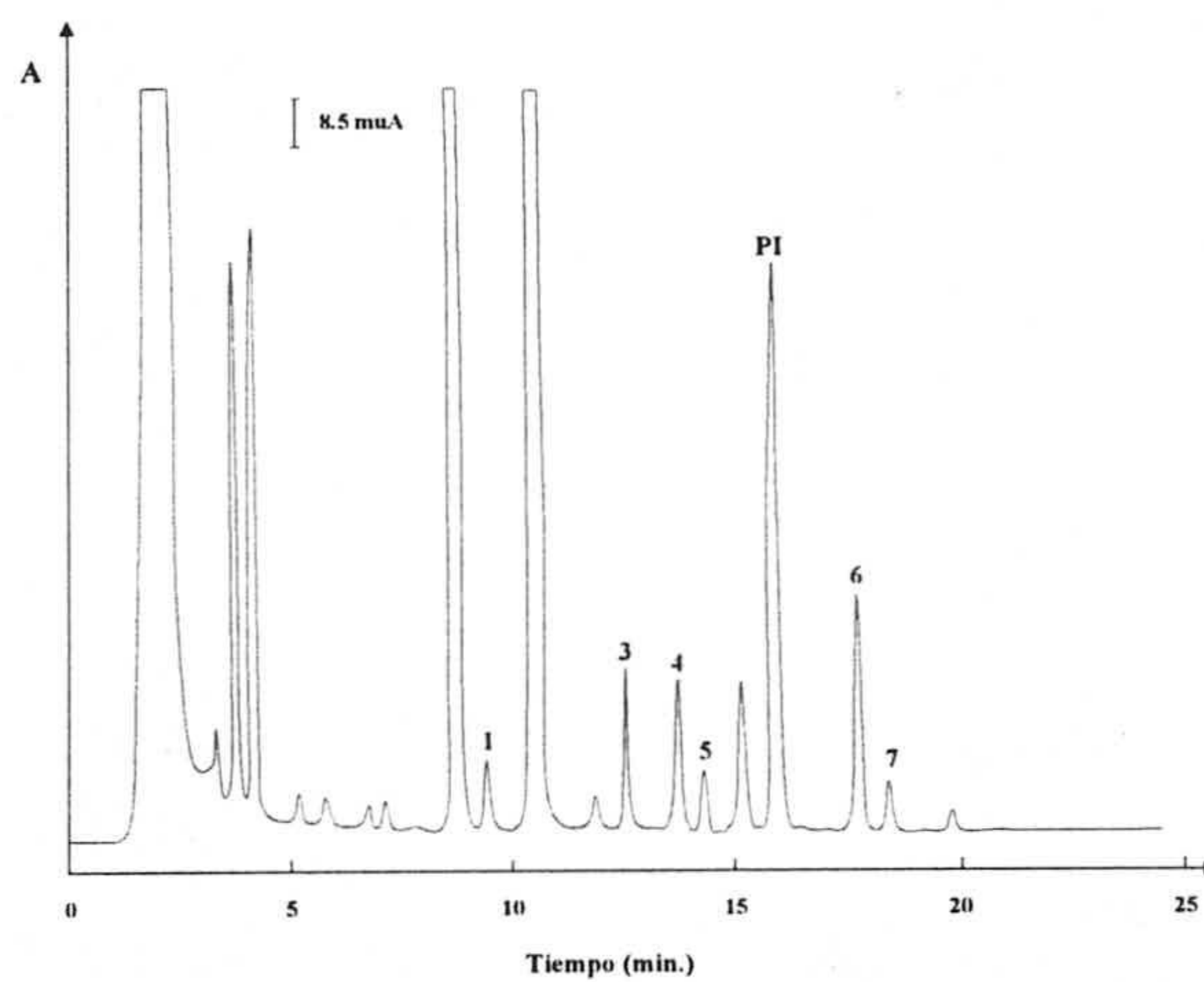
Las Figuras VI.6-VI.8, muestran cromatogramas de varias de las cervezas analizadas.



**Figura VI.6. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminos detectadas en la cerveza (1). 1: Triptamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**



**Figura VI.7. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en la cerveza sin alcohol (2). 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**



**Figura VI.8. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en la cerveza extra. 1: Triptamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

En la Tabla VI.11, se muestran los contenidos de aminas biógenas en las cervezas analizadas, expresados como  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tabla VI.11. Contenido de aminas biógenas en las muestras de cerveza**

	<i>Triptamina</i>	<i>Putrescina</i>	<i>Cadaverina</i>	<i>Histamina</i>	<i>Tiramina</i>	<i>Espermidina</i>	<i>Espermina</i>
<b>Cerveza (1)</b>	3.84 (5.5) <sup>b</sup> <sub>6</sub>	5.68 (1.0) <sub>6</sub>	8.41 (0.7) <sub>6</sub>	4.05 (2.0) <sub>6</sub>	20.39 (3.1) <sub>6</sub>	Nd <sup>c</sup>	Nd
<b>Cerveza (2)</b>	Nd	2.94 (1.3) <sub>6</sub>	0.47 (7.5) <sub>6</sub>	Nd	0.66 (8.4) <sub>6</sub>	Nd	0.33 (11.9) <sub>6</sub>
<b>Cerveza (3)</b>	Nd	2.64 (1.4) <sub>6</sub>	0.18 (7.8) <sub>5</sub>	Nd	0.74 (8.5) <sub>5</sub>	Nd	Nd
<b>Sin alcohol (1)</b>	0.82 (5.3) <sub>6</sub>	2.29 (1.1) <sub>6</sub>	1.26 (1.7) <sub>5</sub>	1.20 (5.3) <sub>6</sub>	3.97 (3.3) <sub>6</sub>	Nd	Nd
<b>Sin alcohol (2)</b>	Nd	1.44 (2.3) <sub>6</sub>	0.17 (10.4) <sub>5</sub>	Nd	0.26 (8.8) <sub>5</sub>	0.29 (6.2) <sub>6</sub>	Nd
<b>Bajo alcohol<sup>a</sup></b>	1.56 (4.0) <sub>6</sub>	5.07 (1.0) <sub>6</sub>	3.59 (1.5) <sub>6</sub>	1.49 (2.8) <sub>6</sub>	4.97 (2.8) <sub>6</sub>	0.33 (3.6) <sub>6</sub>	Nd
<b>Especial</b>	3.44 (4.1) <sub>6</sub>	6.25 (1.5) <sub>6</sub>	7.45 (1.6) <sub>6</sub>	4.82 (2.9) <sub>6</sub>	20.47 (1.7) <sub>5</sub>	Nd	Nd
<b>Extra</b>	5.03 (4.1) <sub>6</sub>	8.41 (1.1) <sub>6</sub>	13.2 (1.2) <sub>6</sub>	3.96 (2.8) <sub>6</sub>	31.69 (1.7) <sub>6</sub>	0.63 (4.1) <sub>6</sub>	Nd

<sup>a</sup> Cerveza de bajo contenido en alcohol.

<sup>b</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa en %, para el número de determinaciones indicado en el subíndice.

<sup>c</sup> No detectada.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto:

- *De las ocho aminas estudiadas, se han detectado en todas las cervezas analizadas la putrescina, cadaverina y tiramina, mientras que la feniletilamina no ha sido detectada en ninguna de las muestras.*
- *En las muestras analizadas, se pueden distinguir dos grandes grupos de cervezas. Uno está formado por la cerveza (2), (3) y sin alcohol (1), donde tanto el número de aminas detectadas como su contenido es sensiblemente menor que en el grupo formado por el resto de cervezas, cerveza (1), sin alcohol (1), de bajo contenido en alcohol, especial y extra. En este segundo grupo, se obtienen valores especialmente altos de cadaverina y tiramina. En*

relación a esta última, su alto contenido puede indicar la presencia de bacterias pertenecientes a la familia de los *Pediococcus* o *Micrococcus* [10,11,15,17] durante el proceso de fermentación, mientras que los bajos contenidos de esta amina en el primer grupo, indica la falta de contaminación por parte de estos microorganismos durante el proceso de elaboración.

- Fijando la atención en el segundo grupo de cervezas, se puede observar una tendencia de aumento del contenido de aminas biógenas con el grado alcohólico de la cerveza (Figura VI.9).

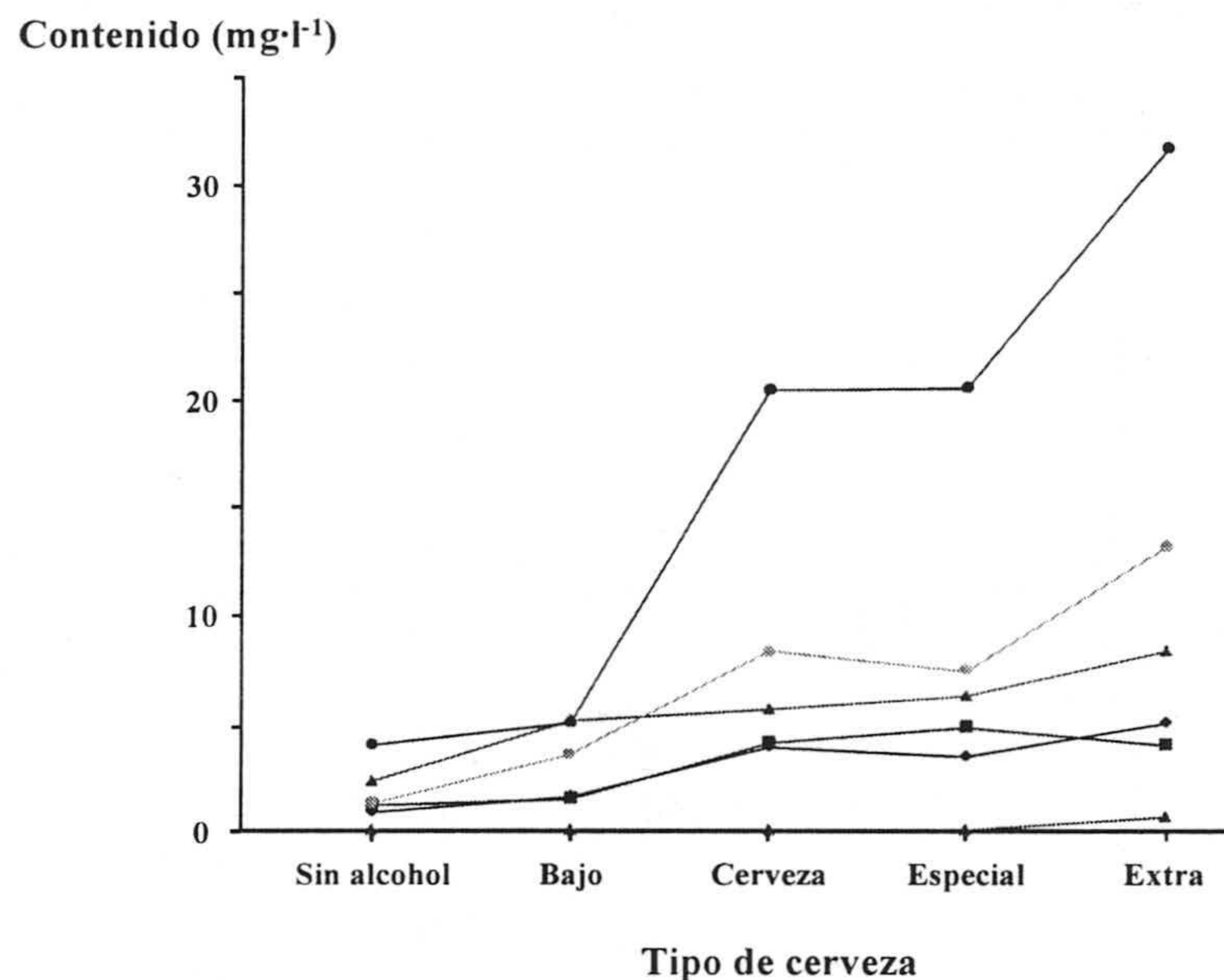


Figura VI.9. Variación del contenido de aminas biógenas en función del tipo de cerveza.

(◆) Triptamina; (▲) Putrescina; (●) Cadaverina; (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina.

Esto se puede deber a que para alcanzar dicho grado alcohólico el tiempo de fermentación es mayor, y puesto que si en este paso se suele producir la contaminación por bacterias, es lógico que a mayor "tiempo de contacto bacteriano", aumente el contenido de las aminas. Además, el proceso de dilución con agua que se produce después de la fermentación, es menor en la cerveza extra (mayor extracto seco primitivo y mayor contenido alcohólico) que en las de menor



*contenido alcohólico.*

### **VI.3. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA**

Finalmente se procedió al estudio de la variación del contenido de aminas biógenas durante el proceso de elaboración de la cerveza, llevado a cabo en dos plantas cerveceras distintas, A y B, utilizando las mismas materias primas.

El proceso de elaboración de la cerveza comienza desde la adquisición de las materias primas hasta la obtención de la cerveza embotellada, pudiendo distinguir varias etapas fundamentales:

- Germinación de la malta. El grano de cebada, seleccionado, limpio y humedecido, se extiende en una gran sala (cámara de germinación) acondicionada a 18-20 °C. Actualmente se utiliza el aparato Galland, formado por dos cilindros, uno metálico exterior y otro interior giratorio de tela metálica, al cual caen las semillas desde una tolva; por un eje interior sale una corriente de aire húmedo. El proceso dura de ocho a nueve días y se interrumpe con una corriente de aire a 25 °C que deseca los granos (malta verde), en los que se desarrollan dos enzimas: la peptosa, que transforma los albuminoides en peptonas solubles, y la diastasa.

- Maceración. Proceso de transformación del almidón en azúcar fermentable mediante la diastasa, que se realiza entre 60 y 70 °C y dura unas tres horas. El agua caliente se añade a las cubas, provistas de agitadores, en las que está la harina de malta. Hirviendo el líquido se detiene la acción enzimática, y las proteínas indeseables coagulan y precipitan. Se filtra en una cuba decantadora, denominada *lauter*, provista de doble fondo agujereado, o bien en filtros de prensa. El filtrado, llamado mosto, se hierve en grandes depósitos, en donde se adiciona la cantidad precisa de lúpulo, que da el aroma y el sabor amargo, actuando como antiséptico, impidiendo la alteración del mosto. A continuación se filtra, se enfría y aerea.

- Fermentación. Se inoculan levaduras en la llamada siembra o *pitching*, que se clasifican en:

- 1) altas, formadas por cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, que suben a la parte posterior del tanque de fermentación, cervezas “ale”. El proceso empieza alrededor de los 9 °C; la temperatura asciende unos grados en la fermentación tumultuosa, y finalmente desciende alrededor de 5 °C en el enfriamiento. Al cabo de unos días comienza la fermentación lenta, que dura de quince a veinte días, según la fábrica y el tipo de cerveza;

- 2) bajas, formadas por cultivos de *Saccharomyces Carlsbergensis*, que se depositan en la parte inferior, con temperaturas entre 15 y 20 °C, originando la cerveza de mayor consumo como es la de tipo “Lager”.

- Maduración. Se deja reposar el líquido en tanques especiales durante algún tiempo. Se adicionan agentes antioxidantes, como ácido sulfuroso o ácido ascórbico, para evitar el cambio de gusto. A veces se filtra con ayuda de agentes clarificantes.

- Envasado. Finalmente se adiciona el CO<sub>2</sub>, regulando su contenido en un tanque embotellador. Generalmente se pasteuriza en botellas, botes, cubas o barriles, antes de poder consumir la cerveza.

Como se ha comentado, ambas plantas utilizaban el mismo tipo de materias primas, que consistía en malta (cebada tras la germinación) y maíz.

Los contenidos de aminos biógenos en la malta y maíz fueron los encontrados en las Tablas VI.6 y VI. 7, y a partir de los cuales se obtuvo la cerveza tipo “lager” en ambas plantas.

Teniendo en cuenta que de forma general, para obtener 100 litros de cerveza, se utilizan 13 kg de malta y 6.5 de maíz, los contenidos de aminos biógenos en la cerveza, debido únicamente a su presencia en las materias primas deberían ser los obtenidos en la Tabla VI.12.

**Tabla VI.1. Contenidos de aminos biógenos en cerveza debido a la malta y maíz**

<b>Amina</b>	<b>C (µg·g<sup>-1</sup>) en malta</b>	<b>C (µg·g<sup>-1</sup>) en maíz</b>	<b>C<sub>estimada en cerveza</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>
<i>Triptamina</i>	No detectada	No detectada	----
<i>Feniletilamina</i>	No detectada	No detectada	----
<i>Putrescina</i>	27.06	1.47	3.62
<i>Cadaverina</i>	3.13	No detectada	0.41
<i>Histamina</i>	2.46	No detectada	0.32
<i>Tiramina</i>	3.18	No detectada	0.41
<i>Espermidina</i>	42.57	4.38	5.81
<i>Espermina</i>	14.23	3.44	2.07

A continuación se procedió al seguimiento de la malta y del maíz hasta la obtención de cerveza envasada, tomando cuatro puntos de control:

① Al final del proceso de maceración: Obtención del mosto.

El área de pico para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medida que componen las determinaciones para los mostos, así como los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de dichos datos se reúnen en las Tablas A.79-A.82 (ver anexo), mostrándose en la Tabla VI.13 un resumen de los mismos.

**Tabla VI.13. Contenido de aminas biógenas en el mosto**

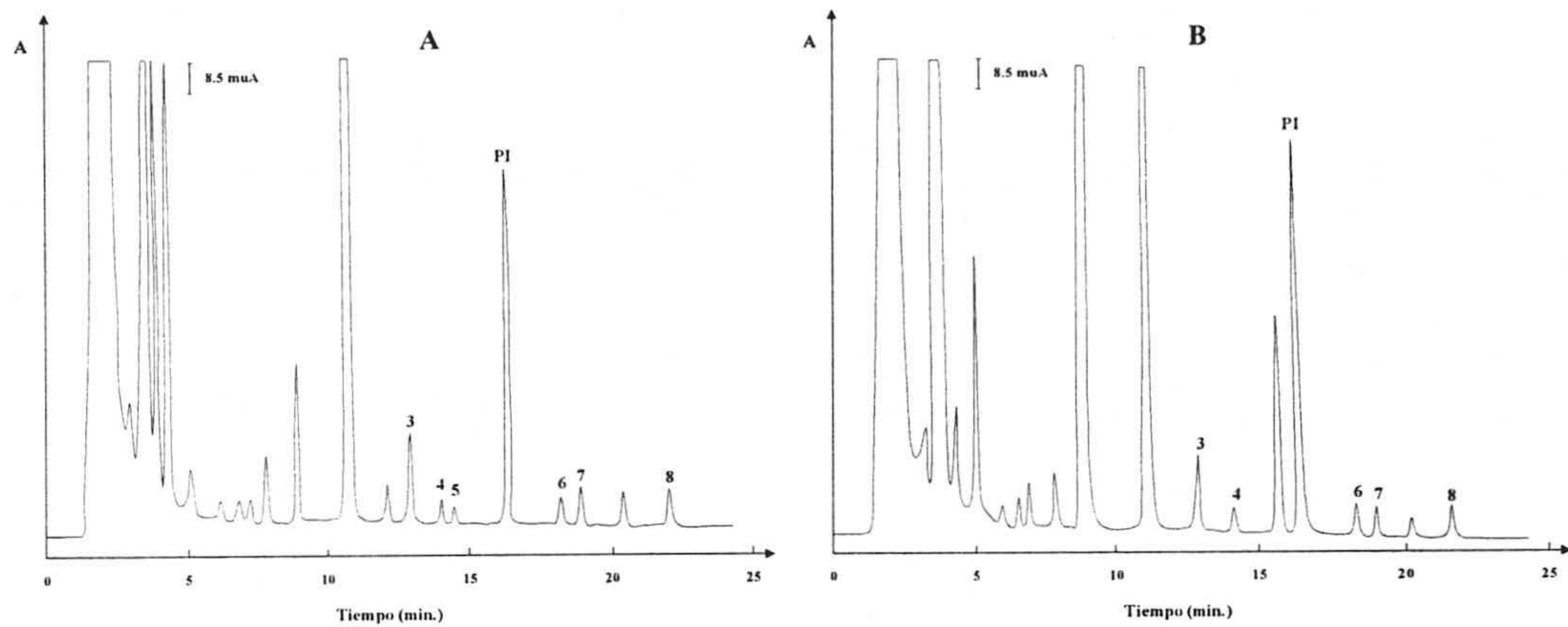
Amina	Contenido (mg·l <sup>-1</sup> )	
	Planta A	Planta B
<i>Triptamina</i>	No detectada	No detectada
<i>Feniletilamina</i>	No detectada	No detectada
<i>Putrescina</i>	3.67 (1.3) <sup>a</sup> <sub>6</sub>	3.39 (1.3) <sub>5</sub>
<i>Cadaverina</i>	0.23 (8.7) <sub>6</sub>	0.30 (8.1) <sub>6</sub>
<i>Histamina</i>	0.27 (6.3) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Tiramina</i>	0.49 (6.1) <sub>6</sub>	0.49 (7.8) <sub>5</sub>
<i>Espermidina</i>	1.15 (3.1) <sub>6</sub>	0.93 (3.6) <sub>5</sub>
<i>Espermina</i>	0.53 (4.2) <sub>6</sub>	0.49 (8.3) <sub>5</sub>

<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa expresada en %, para las determinaciones indicadas en el subíndice.

Al comparar los datos obtenidos de la Tabla VI.13 se pueden observar varios hechos:

- *Entre los dos mostos obtenidos en las dos plantas, no hay una gran diferencia entre los valores para cada una de las aminos.*
- *Si se comparan estos resultados con los estimados a partir de la materia prima, **malta y maíz** (Tabla VI.12), los contenidos de putrescina, cadaverina tiramina e histamina no varían sustancialmente, por lo que se podría indicar que el **proceso de maceración no produce cambios importantes en el contenido de estas aminos.***
- *Sin embargo, el contenido de **espermidina y espermina** sí cambia sustancialmente durante el proceso de maceración, disminuyendo su contenido en aproximadamente un 80 y 75 % respectivamente, debido probablemente a su **descomposición térmica**, puesto que el proceso de maceración se realiza entre 60 y 70 °C.*
- *Puesto que el contenido de las aminos no aumenta, sino que disminuye en ocasiones durante este paso, en el que se adiciona el lúpulo, éste, no introduce un cambio sustancial en el contenido de aminos.*

En la Figura VI.10 se muestran dos cromatogramas del mosto obtenido en las dos plantas, donde se puede observar que los picos de las correspondientes aminos detectadas están bien resueltos.



**Figura VI.10. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en el mosto: (a) Planta A; (b) Planta B. 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

② Finalizado el proceso de fermentación.

El área de pico para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medida que componen las determinaciones para los productos obtenidos tras el proceso de fermentación, así como los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de dichos datos se reúnen en las Tabla A.83-A.86, mostrándose en la Tabla VI.14 un resumen de los mismos.

Tabla VI.14. Contenido de aminas biógenas tras el proceso de fermentación

Amina	Contenido (mg·l <sup>-1</sup> )	
	Planta A	Planta B
<i>Triptamina</i>	2.65 (5.5) <sup>a</sup> <sub>6</sub>	No detectada
<i>Feniletilamina</i>	0.33 (5.4) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Putrescina</i>	9.16 (0.8) <sub>5</sub>	3.43 (0.9) <sub>6</sub>
<i>Cadaverina</i>	7.39 (1.8) <sub>5</sub>	0.27 (5.3) <sub>6</sub>
<i>Histamina</i>	8.49 (1.5) <sub>5</sub>	0.30 (6.3) <sub>6</sub>
<i>Tiramina</i>	30.54 (0.9) <sub>6</sub>	0.51 (6.2) <sub>6</sub>
<i>Espermidina</i>	0.51 (3.1) <sub>6</sub>	0.35 (3.5) <sub>6</sub>
<i>Espermina</i>	No detectada	No detectada

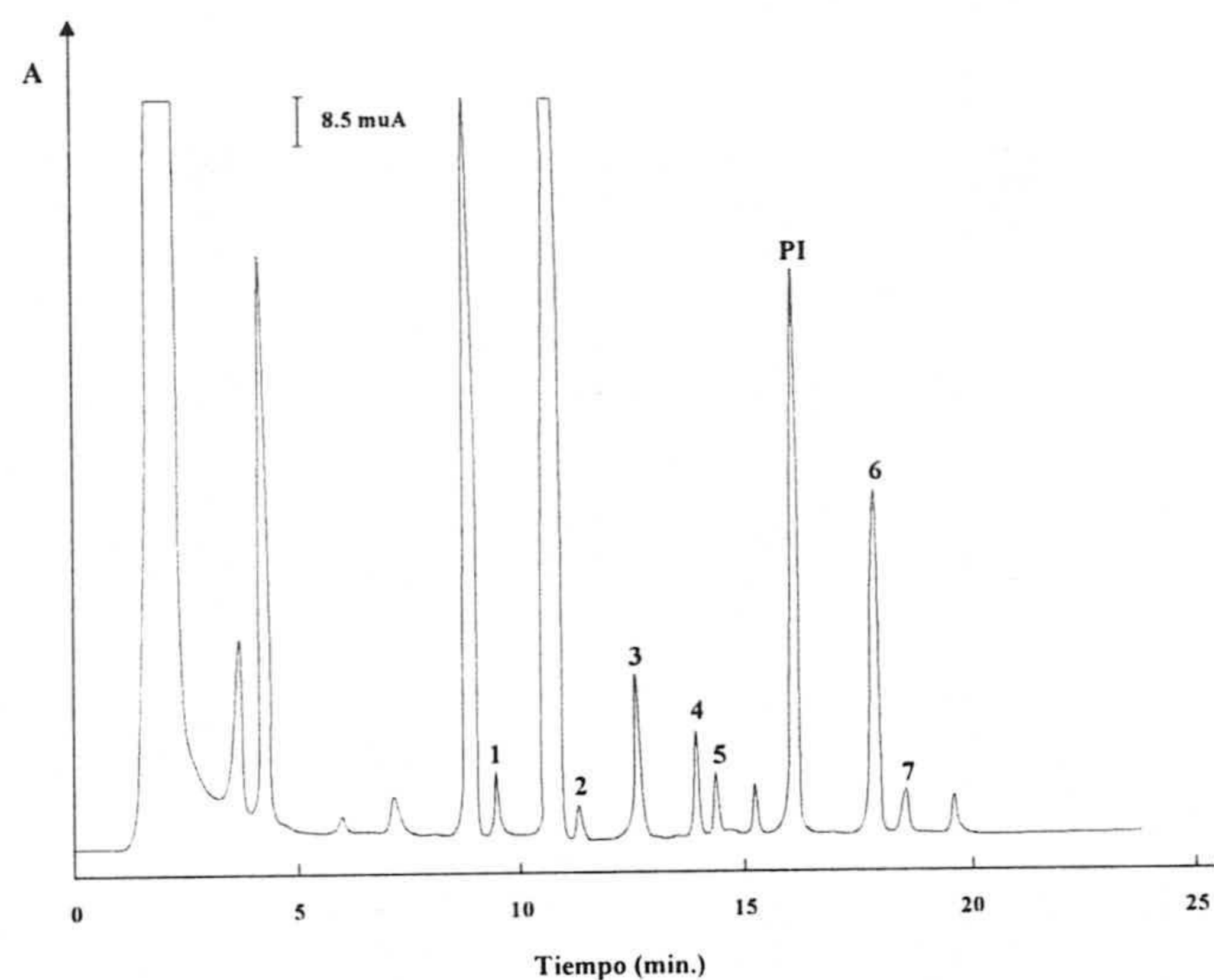
<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa expresada en %, para las determinaciones indicadas en el subíndice.

Se pueden observar varios hechos:

- *En la planta A, se observa un aumento del contenido en aminas biógenas en relación tanto a la planta B como el contenido obtenido en el mosto para dicha planta (Tabla VI.13). Así, no solo aumenta el contenido de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, sino que, triptamina y feniletilamina, que no se detectaban en el mosto, ahora sí se detectan.*
- *En relación a la planta B, se observa que el proceso de fermentación no introduce variaciones importantes en el contenido de aminas.*
- *Tanto el aumento del contenido de aminas en la planta A como la constancia en el contenido de aminas de la planta B, se debe a la contaminación o no de microorganismos en la levadura [10,15,16]. Así, en la planta A, se puede indicar la existencia de contaminación bacteriana de la levadura o de los tanques de fermentación, que origina la descarboxilación de los aminoácidos presentes, originando las aminas correspondientes.*

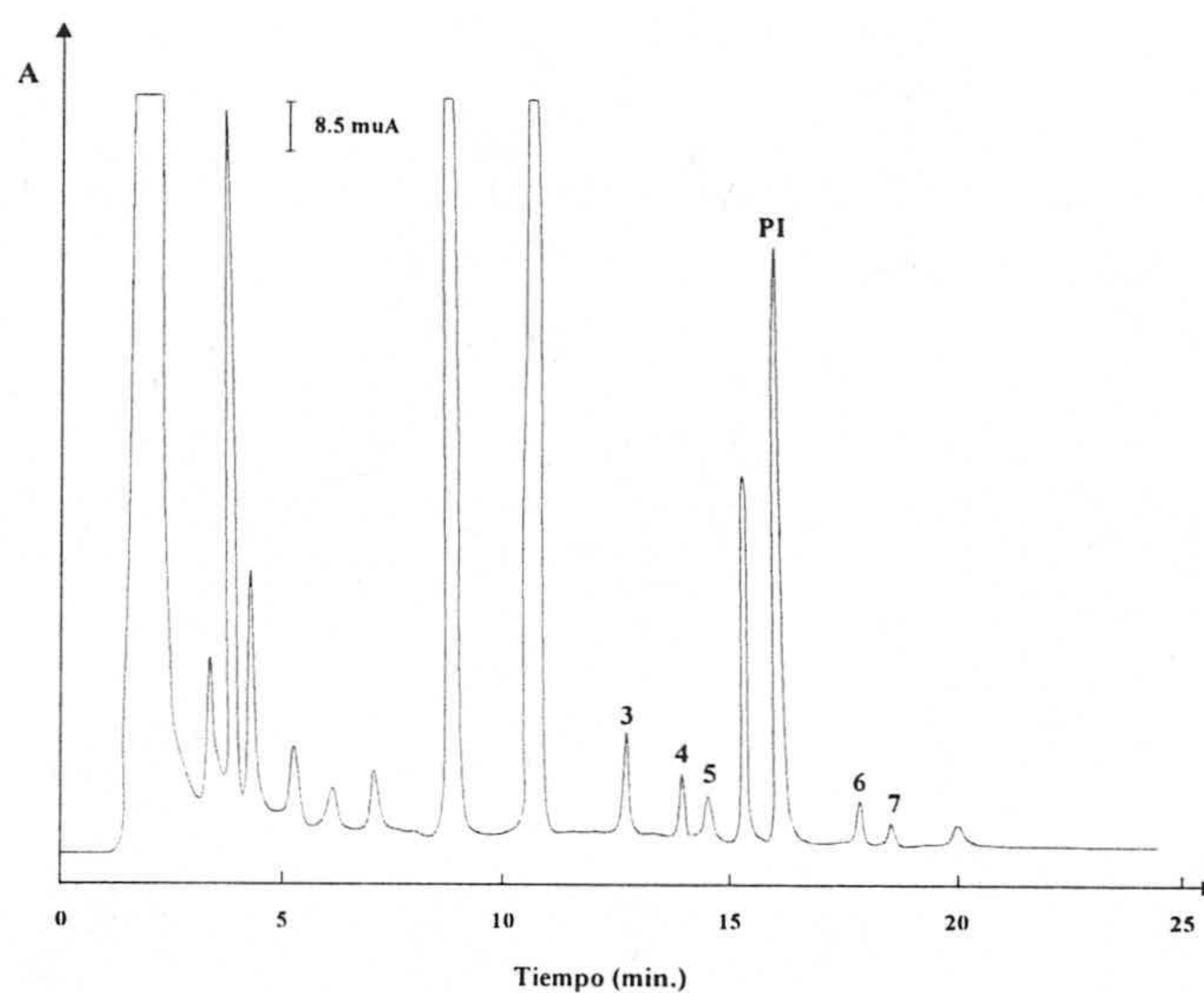
- *El valor de tiramina resulta especialmente alto, por lo que esta posible contaminación pueda deberse a *Pediococcus* [16].*
- *El valor relativamente alto encontrado para la triptamina, se debe en parte al gran contenido de tiramina [18].*
- *Finalmente indicar, que el contenido de espermidina y espermina, siguen disminuyendo, no detectándose en ninguna planta esta última amina.*

En las Figuras VI.11 y VI.12 se muestran los cromatogramas típicos de los fermentos en las dos plantas.



**Figura VI.11. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en el fermento de la Planta A. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**





**Figura VI.12. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en el fermento de la Planta B. 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

③ Al final del proceso de maduración.

El área de pico para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medida que componen las determinaciones para los productos obtenidos tras la maduración, así como los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de dichos datos se reúnen en las Tablas A.87-A.90, mostrándose en la Tabla VI.15 un resumen de los mismos.

Tabla VI.15. Contenido de aminas biógenas tras el proceso de maduración

Amina	Contenido (mg·l <sup>-1</sup> )	
	Planta A	Planta B
<i>Triptamina</i>	3.37 (5.0) <sup>a</sup> <sub>6</sub>	No detectada
<i>Feniletilamina</i>	0.34 (6.4) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Putrescina</i>	7.86 (1.0) <sub>6</sub>	3.36 (1.0) <sub>6</sub>
<i>Cadaverina</i>	7.24 (1.4) <sub>6</sub>	0.29 (8.6) <sub>6</sub>
<i>Histamina</i>	7.06 (1.4) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Tiramina</i>	27.65(1.8) <sub>6</sub>	0.48 (5.3) <sub>6</sub>
<i>Espermidina</i>	0.62 (2.5) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Espermina</i>	No detectada	No detectada

<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa expresada en %, para las determinaciones indicadas en el subíndice.

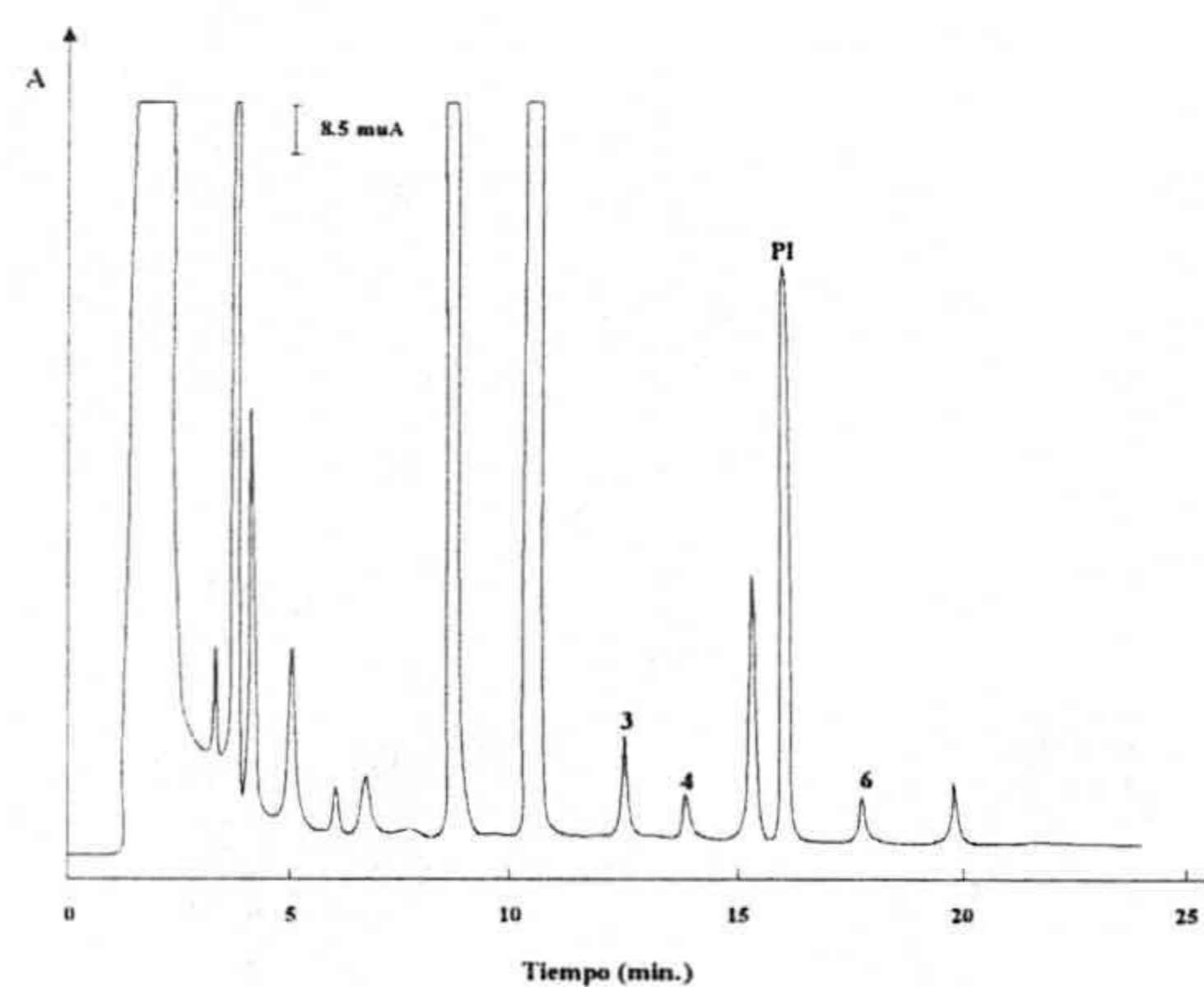
Finalizado el proceso de maduración, se observa una ligera disminución del contenido de putrescina, histamina y tiramina en la Planta A, similar al recogido en bibliografía [5]. Sin embargo, Kalač y col. [5], *atribuían el descenso de putrescina a la formación de espermidina y espermina (aminas no estudiadas en su trabajo), pero a la vista de los resultados obtenidos, debería descartarse esta posibilidad, pues la espermina no se detecta tras la maduración, y la espermidina no aumenta de manera considerable su contenido.*

Para la planta B, se observa que ni la histamina ni la espermidina se detectan tras el proceso de maduración.

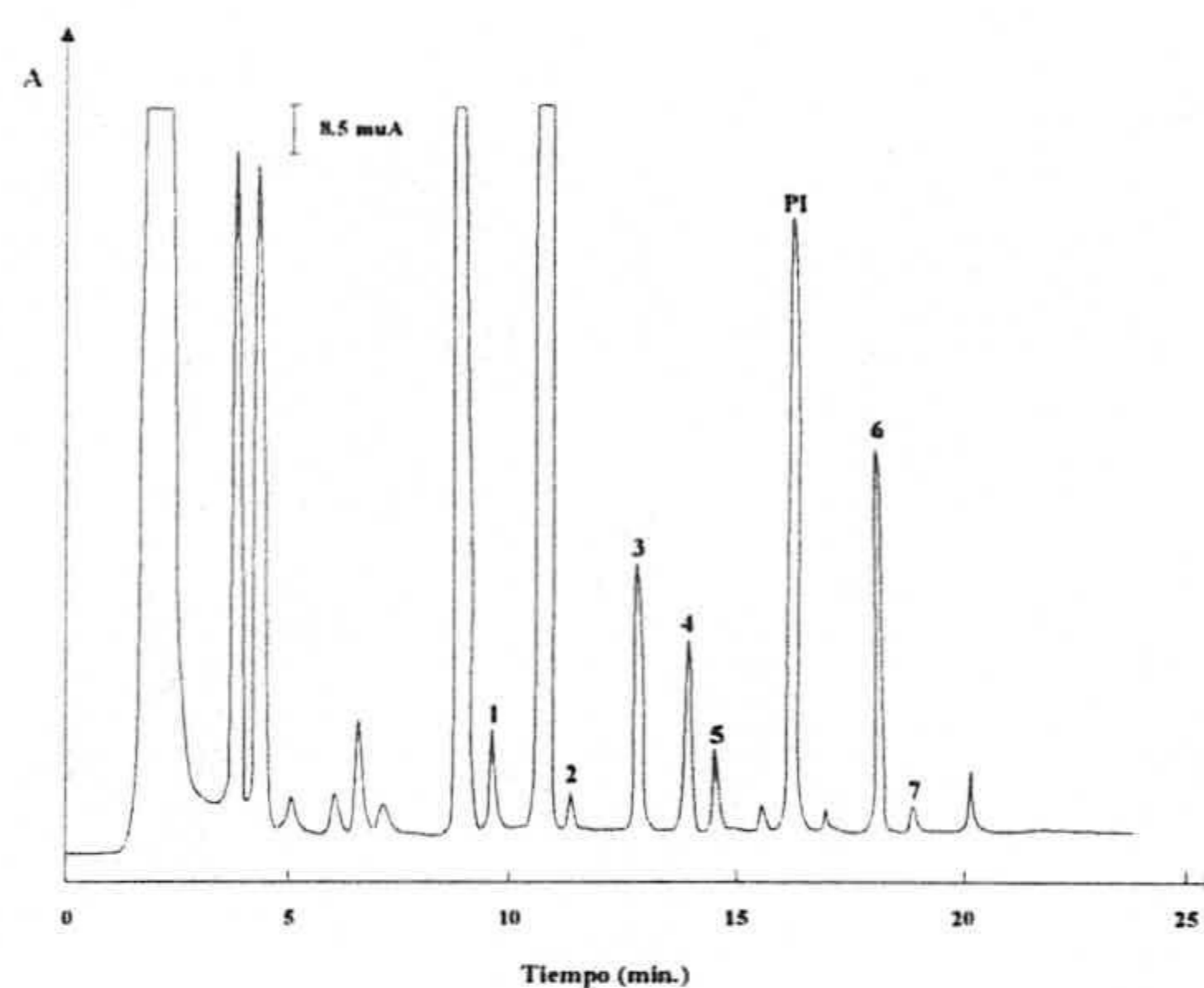
En general, se puede indicar, *que en el proceso de maduración, no se produce un cambio sustancial en el contenido de aminas biógenas, tendiendo a un ligero descenso en su contenido tras*

la fermentación.

En las Figuras VI.13 y VI.14 se muestran los cromatogramas típicos del producto obtenido tras el proceso de maduración de las dos plantas.



**Figura VI.13. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas tras la maduración en la Planta A. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**



**Figura VI.14. Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas tras la maduración en la Planta B. 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 6: Tiramina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

④ Cerveza "lager" envasada.

El área de pico para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medida que componen las determinaciones para las cervezas obtenidas en ambas plantas, así como los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de dichos datos se reúnen en las Tablas A.91-A.94, mostrándose en la Tabla VI.16 un resumen de los mismos.

**Tabla VI.16. Contenido de aminas biógenas en cerveza**

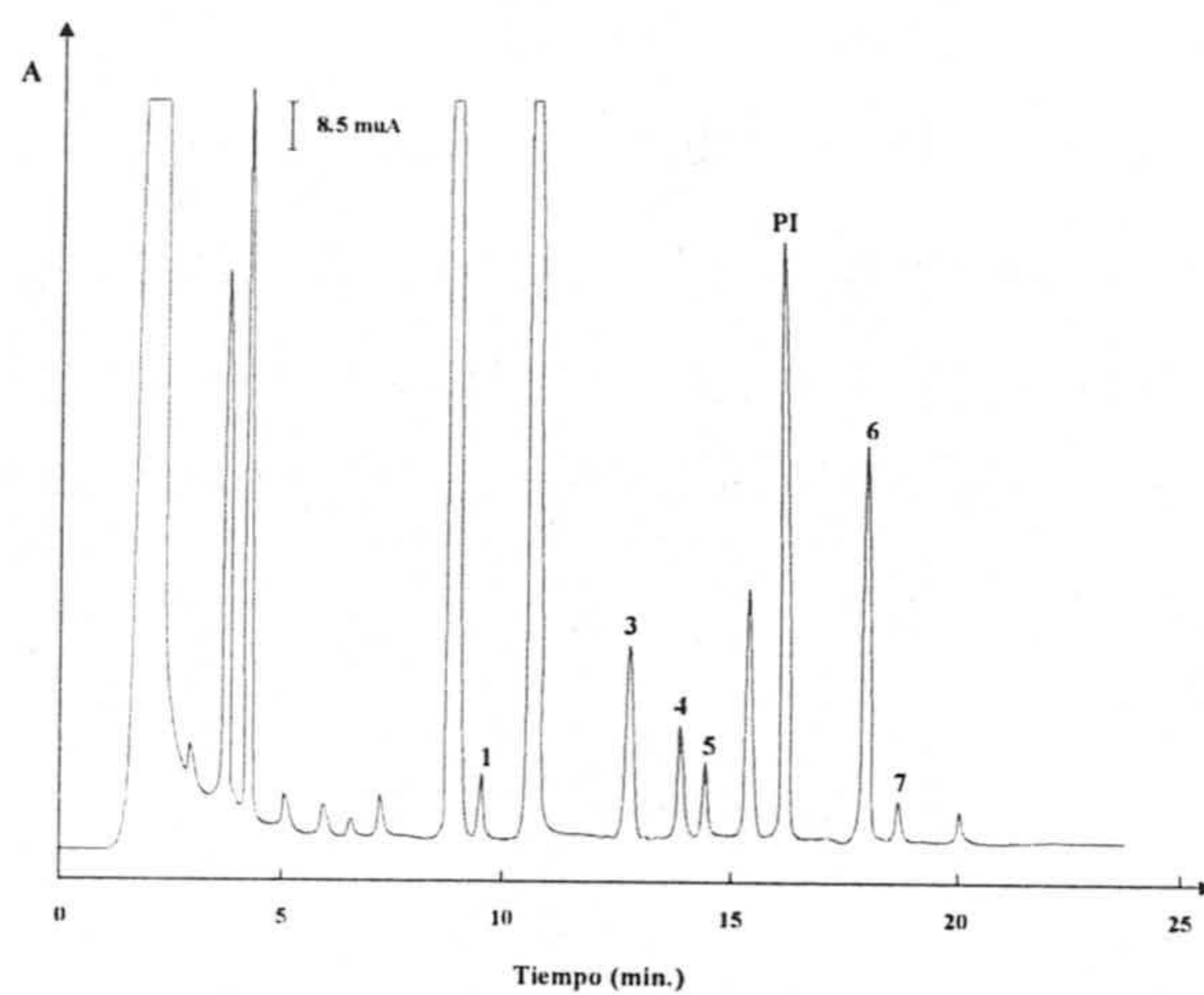
Amina	Contenido (mg·l <sup>-1</sup> )	
	Planta A	Planta B
<i>Triptamina</i>	3.46 (4.9) <sup>a</sup> <sub>6</sub>	No detectada
<i>Feniletilamina</i>	No detectada	No detectada
<i>Putrescina</i>	5.93 (1.1) <sub>6</sub>	2.86 (1.3) <sub>6</sub>
<i>Cadaverina</i>	5.87 (1.3) <sub>6</sub>	0.17 (9.8) <sub>5</sub>
<i>Histamina</i>	4.65 (2.2) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Tiramina</i>	24.57 (1.4) <sub>6</sub>	0.66 (5.5) <sub>6</sub>
<i>Espermidina</i>	0.32 (3.9) <sub>6</sub>	No detectada
<i>Espermina</i>	No detectada	No detectada

<sup>a</sup> Entre paréntesis se expresa la desviación estándar relativa expresada en %, para las determinaciones indicadas en el subíndice.

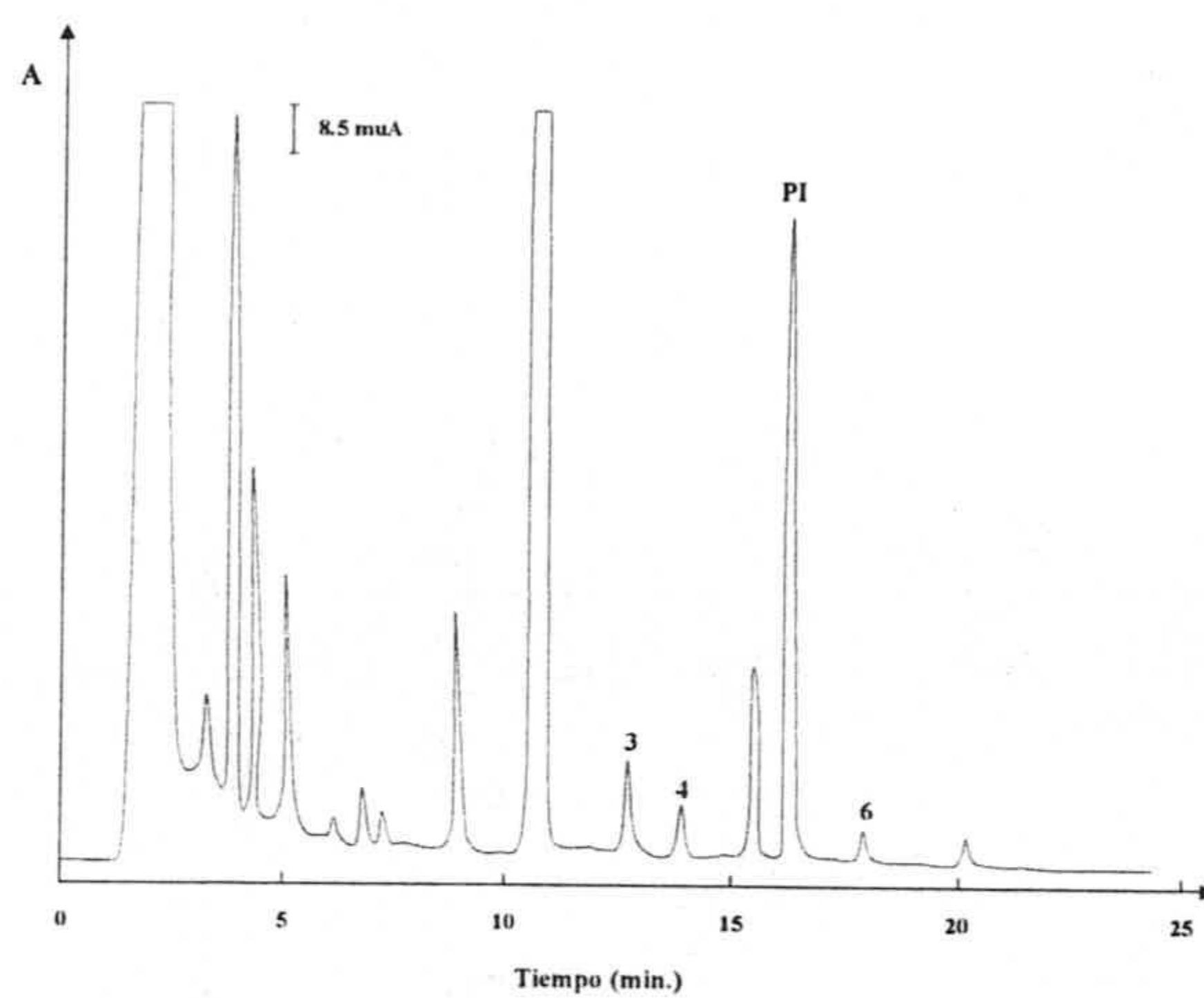
Finalizado todo el proceso, se puede observar una ligera disminución del contenido de aminas en la cerveza.

En las Figuras VI.15 y VI.16 se muestran los cromatogramas típicos de las dos

cervezas.

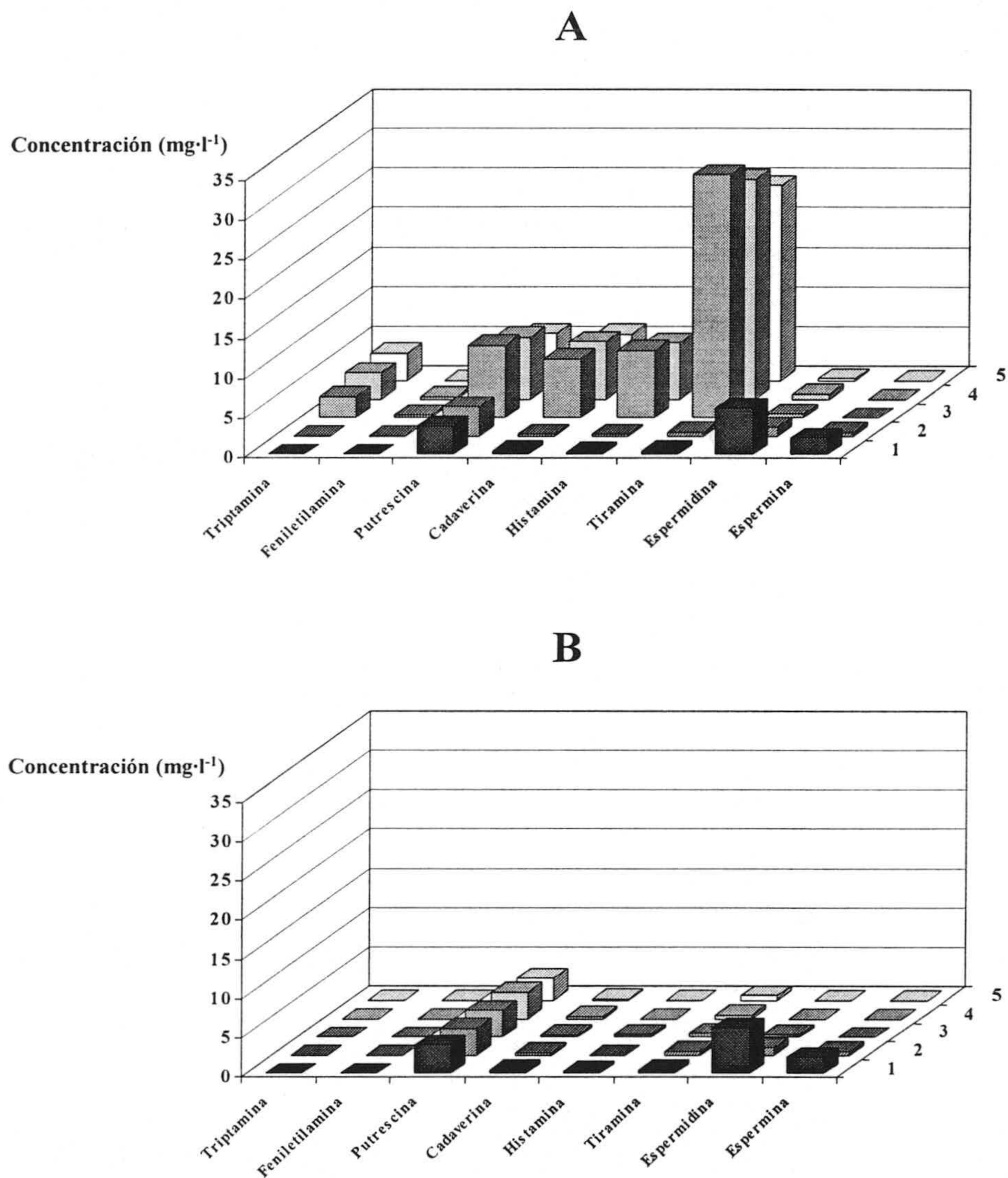


**Figura VI.15.** Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en la cerveza de la Planta A. 1: Triptamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.



**Figura VI.16.** Cromatograma de los derivados dabsilados de las aminas detectadas en la cerveza de la Planta B. 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 6: Tiramina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.

La variación del contenido de aminos biógenas durante el proceso de elaboración de la cerveza en su conjunto se recoge en la Figura VI.17.



**Figura VI.17.- Evolución del contenido de aminos biógenas durante el proceso de elaboración de la cerveza. (A) Planta A; (B) Planta B; 1: Materias primas; 2: Obtención del mosto; 3: Fermentación; 4: Maduración; 5: Cerveza.**

*Se puede observar, como de forma general, el proceso de fermentación es el paso crítico en la generación de aminos biógenos en las cervezas. Así, como sucede en la planta A, un aumento considerable de las aminos durante este paso, indica contaminación microbiana en la levadura o en los tanques de fermentación, mientras que si no se produce un aumento del contenido de aminos, Planta B, indicaría la falta de contaminación.*

*Sin embargo, los pasos de maduración, pasteurización y envasado, no inducen unos cambios significativos en el contenido de aminos biógenos en la cerveza, coincidiendo con los datos recogidos en bibliografía [5,18], por lo que en el producto final, cerveza, los contenidos de aminos biógenos serían similares a los obtenidos tras el proceso de fermentación, donde la contaminación de bacterias, contribuye a su formación.*

*Por esto, el contenido de aminos biógenos y en concreto de tiramina, podría ser considerado como indicador de las condiciones higiénicas en las que se ha desarrollado la elaboración de la cerveza [10].*

## CAPÍTULO VII

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MEMBRANA LÍQUIDA

SOPORTADA PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS

BIÓGENAS EN VINOS





## APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS

En este último capítulo se estudia la utilización de procedimientos alternativos de acondicionamiento de las muestras a la etapa de medida, aplicándolos a la determinación de aminos biógenos en vinos. La técnica separativa seleccionada ha sido la extracción en membrana líquida soportada (SLM) [1], persiguiendo dos objetivos básicos:

- ① Optimizar la composición de la membrana para la extracción de los analitos.
- ② Mostrar su aplicabilidad para el análisis de muestras reales.

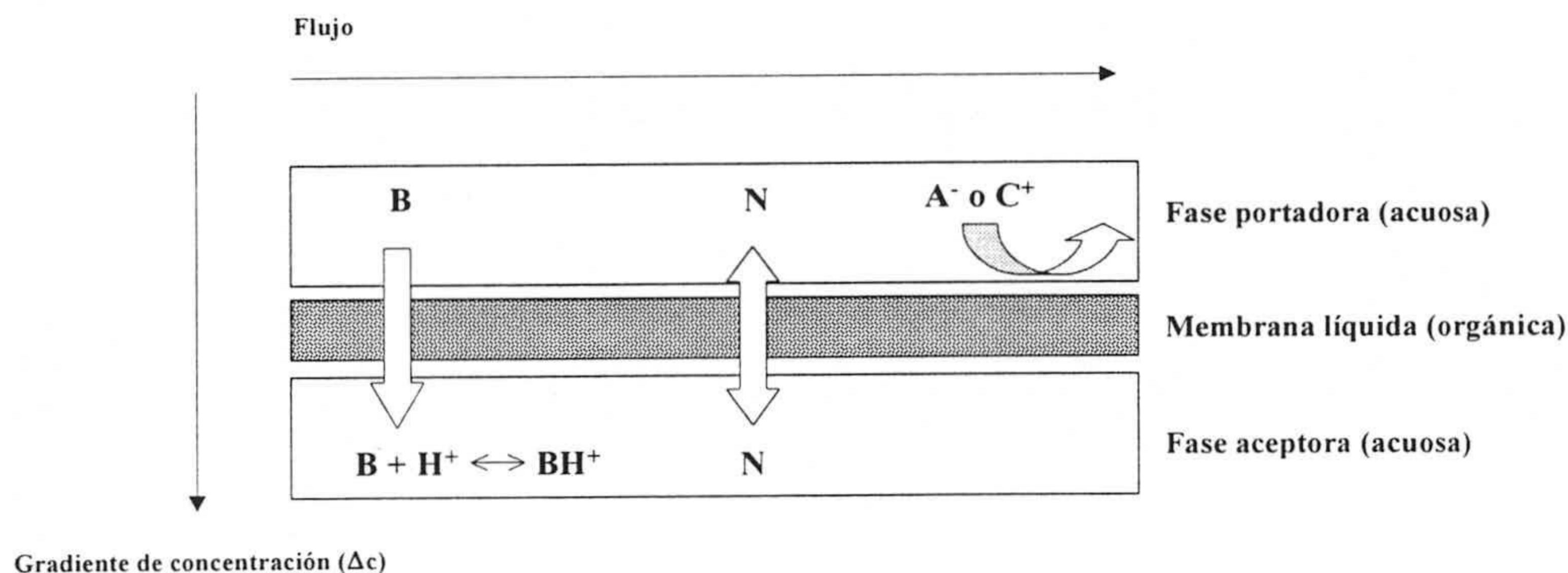
## VII.1. EXTRACCIÓN EN MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA

En la determinación de aminas biógenas, se suelen encontrar diversos problemas asociados con la complejidad de la matriz, la presencia de interferentes, y la existencia en la muestra de otras aminas biógenas que pueden interferir en la determinación de las aminas de interés.

El mayor obstáculo consiste por tanto en la eliminación de los errores sistemáticos que se pueden presentar durante la etapa de preparación de la muestra.

En los últimos 15 años, la extracción en membrana líquida soportada se ha mostrado como una alternativa eficaz a la extracción líquido-líquido y en fase sólida para la adecuación de la muestra a la etapa de medida [2], ya que combina la selectividad y la preconcentración de la extracción líquido-líquido, con la eficacia en la eliminación de los interferentes de los procesos de diálisis. Además, ofrece otras ventajas como el uso de volúmenes reducidos de disolventes orgánicos, bajas concentraciones de agentes extractantes y bajo costo [3].

Esta técnica se basa fundamentalmente en la utilización de un sistema de 3 fases, de las cuales, al menos una es orgánica, y que se encuentra inmovilizada en un polímero hidrófobo poroso, que actúa como soporte del disolvente orgánico, configurando lo que se denomina la **membrana líquida**. Esta última, tal y como se muestra en la Figura VII.1 separa a 2 fases acuosas: una denominada fase portadora o *donor*, que contiene a la muestra, y otra denominada fase aceptora o *acceptor* en la que se recogen las sustancias de interés.



**Figura VII.1. Configuración de un sistema de extracción en membrana líquida soportada.** Los iones (A<sup>-</sup> o C<sup>+</sup>) no se extraen, mientras que los compuestos neutros (N y B) sí.

Mediante la aplicación de un flujo determinado, los analitos se extraen desde la fase portadora al disolvente orgánico, seguido a continuación de una reextracción desde dicho disolvente orgánico a la fase aceptora, que generalmente suele permanecer estacionaria.

La correcta selección del pH de las fases portadora y aceptora, y de la elección del disolvente orgánico adecuado, permiten la extracción selectiva de los analitos de interés en una sola etapa.

Puesto que en definitiva, el sistema de fases empleado, implica la alternancia entre las fases acuosas y la fase orgánica, la extracción se lleva a cabo mediante la difusión de los analitos entre la fase portadora, la membrana y la fase aceptora. Para ello:

- El transporte de analitos entre la fase portadora y la membrana se dará siempre que éstos se encuentren como especies neutras (sin disociar o sin carga).

- Una vez difundido a través de la membrana a la fase aceptora, el analito debe ionizarse para permanecer en ella, puesto que si permaneciera en estado neutro, podría sufrir un proceso de difusión inverso y no permanecería en la fase aceptora.

Descrito de esta forma, la extracción en membrana líquida soportada podría considerarse como una combinación de dos extracciones líquido-líquido, i.e. analito (f. portadora) ↔ analito (membrana) y analito (membrana) ↔ analito (f. aceptora), y en un proceso de diálisis a través de los poros de la membrana producido o favorecido por un gradiente de concentración.

Dada la gran versatilidad de esta técnica, se ha aplicado para la extracción de un gran número de compuestos [4,5], como drogas [6], iones metálicos [7,8], triazinas [9,10], aminas [11-13], nicotina [14], cafeína [3], amino ácidos [15,16] y fructosa [17].

El parámetro más importante es la *eficacia de la extracción*,  $E$ , que se define como el cociente entre la cantidad de analito extraída en el aceptor y la cantidad total de analito que ha pasado a través de la unidad de membrana [18]:

$$E = \frac{n_A}{n_D} \quad (1)$$

donde:

$n_A$ : Cantidad de analito presente en el aceptor.

$n_D$ : Cantidad total de analito presente en la muestra.

Esta eficacia de la extracción, indica cuánta cantidad del analito presente en la muestra ha sido finalmente extraído en el aceptor, oscilando su valor entre 0 y 1,

dependiendo de variables tales como [19]:

- Solubilidad del analito.
- Cinética en la transferencia de masa en la fase portadora y en la membrana.
- Dimensiones del canal del “donor”.

La velocidad de transferencia de masa, y por tanto  $E$ , es proporcional al gradiente de concentración,  $\Delta c$ , desde el donador al aceptor a través de la membrana (ver Figura VII.1):

$$\Delta c = \alpha_D c_D - \alpha_A c_A \times \frac{K_A}{K_D} \quad (2)$$

donde:

$\alpha_i$ : Fracciones de los analitos presentes en la forma extraíble en el donador, D, o aceptor, A.

$c_i$ : Concentraciones de los analitos.

$K_i$ : Coeficientes de partición en ambos lados de la membrana.

Lógicamente,  $\alpha_A$  debe ser lo menor posible mientras que  $\alpha_D$  debe de presentar un valor cercano a la unidad. Sin embargo, la influencia del coeficiente de partición es ligeramente más compleja. Para valores extremos de  $K$ , cercanos a cero o muy elevados, la eficacia de la extracción es pequeña ya que, para el primer caso, el analito no se extrae en su totalidad, y la transferencia de masa está limitada por la difusión a través de la membrana, mientras que para el segundo (analitos hidrófobos), gran parte del analito se “quedaría” en la membrana y no se transportaría hacia el aceptor.

Lógicamente, para valores intermedios, se obtienen las eficacias de extracción superiores.

Otro parámetro muy empleado en la extracción en membrana líquida soportada, y que está muy relacionado con la eficacia de la extracción, es el factor de enriquecimiento, definido como:

$$E_e = E \times \frac{V_D}{V_A} \quad (3)$$

donde:

$V_D$ : Volumen de muestra.

$V_A$ : Volumen del aceptor.

## **VII.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA MEMBRANA**

Con objeto de poder aplicar la membrana líquida soportada para la extracción de aminas, en primer lugar se procedió a la estimación del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua,  $\log P$  (Tabla VII.1).

Recientemente [20] se ha encontrado, que para la extracción de los analitos en membrana líquida soportada, es necesario un valor de  $\log P$  comprendido entre 2 y 4, pudiendo llegar a extraerse compuestos con valores próximos a la unidad. En este caso, y a raíz de los resultados mostrados en la Tabla VII.1, solo triptamina y feniletilamina podrían extraerse de forma directa

Tabla VII.1. Valores de log P y pK<sub>a</sub> para las aminas biógenas en estudio

log P	pK <sub>a</sub>	Amina biógena
1.46 ± 0.19	9.90 ± 0.10	<i>Feniletilamina</i>
1.38 ± 0.22	10.57 ± 0.10	<i>Triptamina</i>
0.72 ± 0.21	9.86 ± 0.15	<i>Tiramina</i>
-0.49 ± 0.19	10.86 ± 0.10	<i>Cadaverina</i>
-0.72 ± 0.20	10.68 ± 0.10	<i>Putrescina</i>
-0.84 ± 0.25	10.15 ± 0.10	<i>Histamina</i>
-0.84 ± 0.31	10.53 ± 0.19	<i>Espermidina</i>
-0.96 ± 0.34	10.80 ± 0.19	<i>Espermina</i>

### VII.2.1. ESTUDIOS PRELIMINARES: EXTRACCIÓN DIRECTA

Con objeto de comprobar esta posibilidad, se planificaron varias experiencias para estudiar la eficacia de la extracción directa de las aminas biógenas. Las condiciones de trabajo seleccionadas fueron:

– *Composición de la membrana.* Los disolventes empleados para impregnar la membrana fueron di-n-hexiléter y 6-undecanona. Este último se utilizó, con objeto de comprobar si favorecía la extracción de las aminas más polares.

– *pH del donador.* De estudios teóricos [19] se conoce que el pH del “donador” debe ser superior al pK<sub>a</sub> de los analitos, para que éstos no estén cargados y puedan ser extraídos desde el “donador” a la membrana. Dado que el pK<sub>a</sub> de



las aminas está sobre 10 (Tabla VII.1), se seleccionó un valor de pH 14, empleando NaOH 1 M.

– *pH del aceptor*. En el aceptor, los analitos deben de encontrarse protonados, necesitándose un pH en el aceptor que suele ser como mínimo de 3 unidades inferior al  $pK_a$  de los analitos [19]. Dado que las aminas son estables en una disolución de HCl 0.1M, se eligió ésta como disolución aceptora.

– *Flujo del donador*. Se escogió un flujo del donador de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , con una relación 1:1 muestra:disolución de NaOH

– *Tiempo de extracción*. La mezcla muestra:NaOH se bombeó durante 20 minutos.

– *Otros factores*: Para facilitar la difusión de los analitos desde la membrana al aceptor, se fijó un *tiempo de equilibrado* de 10 minutos. Finalizado este período, la disolución de aceptor junto con los analitos se transfirió en un tubo graduado, desplazándolo con aceptor “fresco” a un *flujo de*  $0.2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , *durante 5 minutos*.

De dicha disolución extraída, se tomaron 0.75 ml, procediendo al proceso de derivatización y determinación cromatográfica optimizado en el Capítulo III.

En todas las experiencias realizadas se utilizó como muestra, una disolución que contenía  $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  de cada una de las aminas.

El dispositivo empleado se recoge en la Figura VII.2.

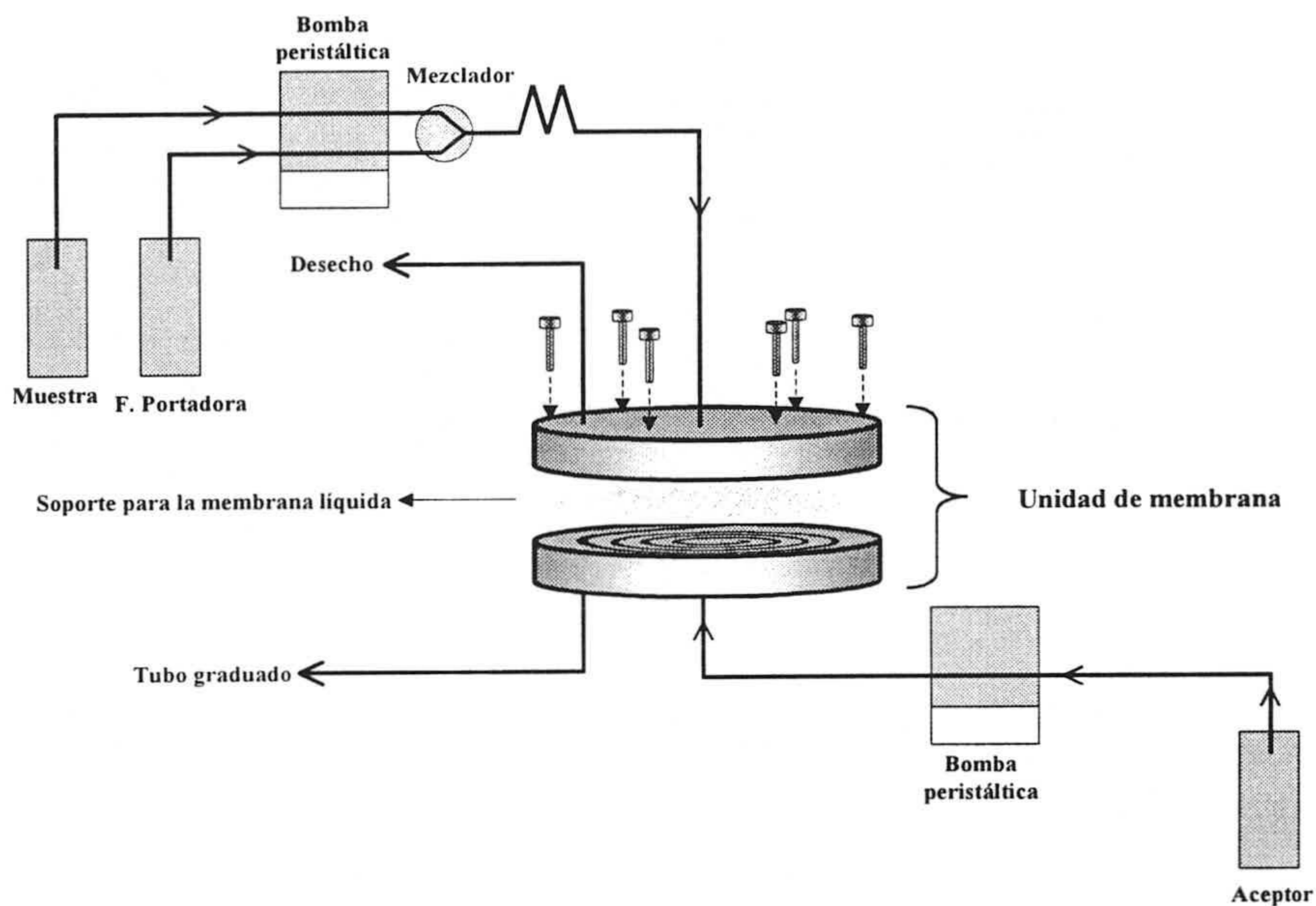


Figura VII.2. Dispositivo empleado para la extracción de aminas biógenas

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VII.2, en la que se puede observar *sólo triptamina y feniletilamina se pueden extraer de manera directa, mientras que para el resto, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina y espermina, debería de usarse otro sistema de extracción.*

Tabla VII.2. Eficacia de la extracción (%) obtenida para la extracción directa de las aminas biógenas

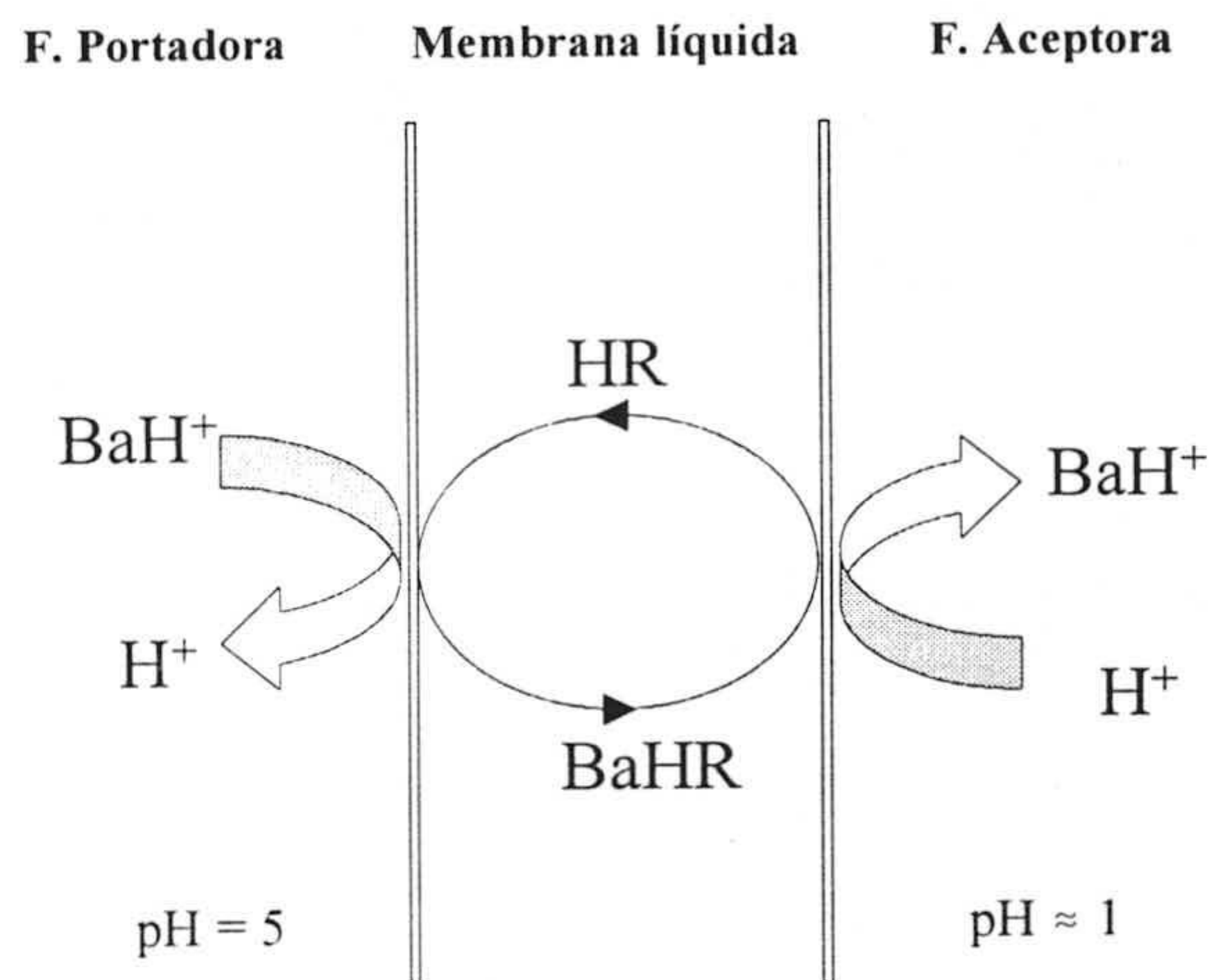
Amina	Di-n-hexiléter	6-undecanona
<i>Triptamina</i>	34.8 (9.7) <sup>1</sup>	47.0 (20.5)
<i>Feniletilamina</i>	65.1 (14.5)	40.9 (16.5)
<i>Putrescina</i>	No se extrae	No se extrae
<i>Cadaverina</i>	0.2 (67.1)	0.3 (89.6)
<i>Histamina</i>	1.6 (122.8)	No se extrae
<i>Tiramina</i>	No se extrae	5.3 (25.3)
<i>Espermidina</i>	3.1 (70.1)	6.0 (77.4)
<i>Espermina</i>	2.6 (109.9)	1.3 (104.3)

<sup>1</sup> Desviación estándar relativa (%) para tres réplicas.

## VII.2.2. EXTRACCIÓN DE LAS AMINAS BIÓGENAS MEDIANTE LA FORMACIÓN DE PARES IÓNICOS

Dado que la finalidad del estudio es la extracción de todas las aminas, y que la mayoría de ellas son tan polares que no es posible su extracción de forma directa, se recurrió a la extracción de las mismas mediante la formación de pares iónicos [4]. En este sentido, se escogió un portador aniónico, el ácido di-2-etilhexilfosfórico (ADEHF) como agente formador de pares, que reacciona en la interfase donador-membrana con las aminas biógenas protonadas ( $\text{pH}_{\text{donor}} < \text{pK}_a$ ), formando un par iónico y liberando un protón (Figura VII.3).

Cuando se utiliza ADEHF para la extracción de compuestos orgánicos como pares iónicos, los disolventes empleados en la membrana son tri-2-etilhexilfosfato, TEHF, o di-n-hexiléter, DHE [16]



**Figura VII.3. Mecanismo para la extracción de aminas biógenas (Ba) usando ADEHF (HR) como agente extractante**

En relación a las condiciones de trabajo utilizadas en este apartado, *el pH del aceptor, el flujo del donador, tiempo de equilibrado, flujo de aceptor y concentración de aminas biógenas*, se mantuvieron en los mismos valores que en el apartado anterior, modificando sólo la *composición de la membrana* y el *pH del donador*.

– *Composición de la membrana.* Para las experiencias posteriores, el disolvente empleado en la membrana se expresa como % (v/v) de TEHF en DHE. Así, 100% TEHF, indica que el disolvente usado en la membrana es exclusivamente TEHF, mientras que un valor de 0% señala que solo se utiliza DHE junto al portador (ADEHF). En todos los casos, la concentración de ADEHF se expresa como porcentaje en volumen en la mezcla de los disolventes.

-*pH del donador*. Dado que la transferencia de masa se debe a la existencia de un gradiente de protones entre el donador y el aceptor [16], se escogió un valor de pH igual a 5, obtenido a partir de una disolución tampón acético/acetato 1 M.

### **VII.2.2.1. Diseño de escrutinio**

En una primera experiencia, se decidió estudiar el efecto que produce la composición de la membrana sobre la eficacia de la extracción de las aminas. Para ello, se consideraron dos factores:

-Concentración de agente formador de pares iónicos (ADEHF). Para la realización del diseño se varió entre el 20 y 40 % (v/v) en el porcentaje de TEHF empleado. En general, concentraciones altas de ADEHF > 40 % (v/v) [7,16] producen una disminución en el proceso de extracción, debido a:

- a) la formación de complejos de asociación iónica de alto orden, originando un transporte de masa lento, y
- b) un aumento en la viscosidad de la membrana, provocando una disminución en los coeficientes de difusión,

-Disolvente. El porcentaje de TEHF en DHE se varió desde un 0% hasta un 100%.

Para el estudio de estos dos factores sobre la eficacia de la extracción, se realizó un diseño factorial,  $2^2$ , con tres puntos centrales, con objeto de estimar tanto el error puro como como la curvatura o no del modelo lineal propuesto (Tabla A.95).

Los valores de eficacia de la extracción para cada amina, se recogen en la Tabla VII.3.

Tabla VII.3. Valores de eficacia de la extracción para el diseño de escrutinio

Amina	Experiencia						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Triptamina</i>	32.1 <sup>1</sup>	3.7	21.4	21.3	2.9	61.8	21.3
<i>Feniletilamina</i>	30.4	1.4	18.2	22.1	3.5	48.3	21.8
<i>Putrescina</i>	31.7	8.9	20.3	20.4	2.8	14.0	17.6
<i>Cadaverina</i>	33.5	8.8	20.3	20.3	3.4	11.8	25.1
<i>Histamina</i>	30.2	5.0	23.3	23.5	1.9	20.6	21.2
<i>Tiramina</i>	26.8	3.4	12.8	12.8	22.2	33.0	13.4
<i>Espermidina</i>	37.6	3.8	21.7	20.8	15.7	27.4	22.1
<i>Espermina</i>	44.8	1.6	17.0	16.4	5.9	41.5	19.2

<sup>1</sup> Valor medio obtenido de 3 réplicas.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Del análisis gráfico de los residuales, se deduce que se cumplen las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia, necesarias para la verificación del modelo.

En la Tabla A.96 (ver anexo) se encuentran recogidos los resultados obtenidos del análisis de la varianza. La Tabla VII.4 muestra el valor de los efectos encontrados, así como la evidencia de curvatura.

Tabla VII.4. Resumen de los resultados obtenidos del diseño de escrutinio

Amina	Efecto <sup>1</sup>			¿Curvatura?
	% ADEHF	% TEHF	Interacción	
<i>Triptamina</i>	-2.92 (P = 0.00)	1.17 (P = 0.00)	-0.03 (P = 0.00)	Sí (P = 0.02)
<i>Feniletilamina</i>	-2.69 (P = 0.34)	0.76 (P = 6.64)	-0.02 (P = 4.30)	No (P = 91.65)
<i>Putrescina</i>	-2.89 (P = 0.88)	-0.83 (P = 6.90)	0.02 (P = 1.77)	No (P = 5.35)
<i>Cadaverina</i>	-3.02 (P = 2.62)	-0.98 (P = 9.65)	0.03 (P = 3.82)	No (P = 6.85)
<i>Histamina</i>	-2.83 (P = 0.35)	-0.45 (P = 13.31)	0.01 (P = 3.98)	Sí (P = 1.46)
<i>Tiramina</i>	-0.47 (P = 0.05)	0.62 (P = 0.37)	-0.02 (P = 0.10)	Sí (P = 0.13)
<i>Espermidina</i>	-2.19 (P = 0.08)	-0.17 (P = 0.33)	-0.00 (P = 31.58)	No (P = 49.18)
<i>Espermina</i>	-3.88 (P = 0.13)	-0.04 (P = 12.04)	-0.00 (P = 74.53)	Sí (P = 3.26)

<sup>1</sup> Entre paréntesis se coloca el porcentaje de valor de P obtenido.

A partir de ellos se puede observar:

a) La concentración de ADEHF es significativa para las ocho aminas, obteniéndose mejores resultados a concentraciones bajas de agente formador.

b) El disolvente empleado es un efecto significativo para la triptamina, tiramina y espermidina. Además, puede observarse que las aminas más apolares, triptamina, feniletilamina y tiramina, la eficacia de la extracción es mayor al utilizar solo TEHF como disolvente, mientras que para las más polares, (poliaminas y histamina), la extracción es más eficaz al emplear como disolvente DHE exclusivamente.

c) El término de interacción entre los dos factores estudiados, es significativo para para la mayoría de las aminas.

d) En relación a la curvatura del modelo, conviene indicar que para triptamina, histamina, tiramina y espermina, el modelo no es lineal (test de curvatura significativo) en la región explorada.

A raíz de este diseño, se puede concluir, que *la extracción de las aminas como pares iónicos esta favorecida cuando se utiliza una concentración baja de agente formador de pares, debiéndose de utilizar en función de la polaridad de las aminas, TEHF o DHE como disolvente.*

### VII.2.2.2. Diseño Doehlert

Con objeto de encontrar los valores óptimos para la composición de la membrana (% ADEHF y % TEHF) se aplicó un diseño Doehlert.

En función de los resultados obtenidos en el diseño de escrutinio, se seleccionó como punto central del diseño (Figura VII.4) un valor de ADEHF de 15 % y de TEHF del 50%.

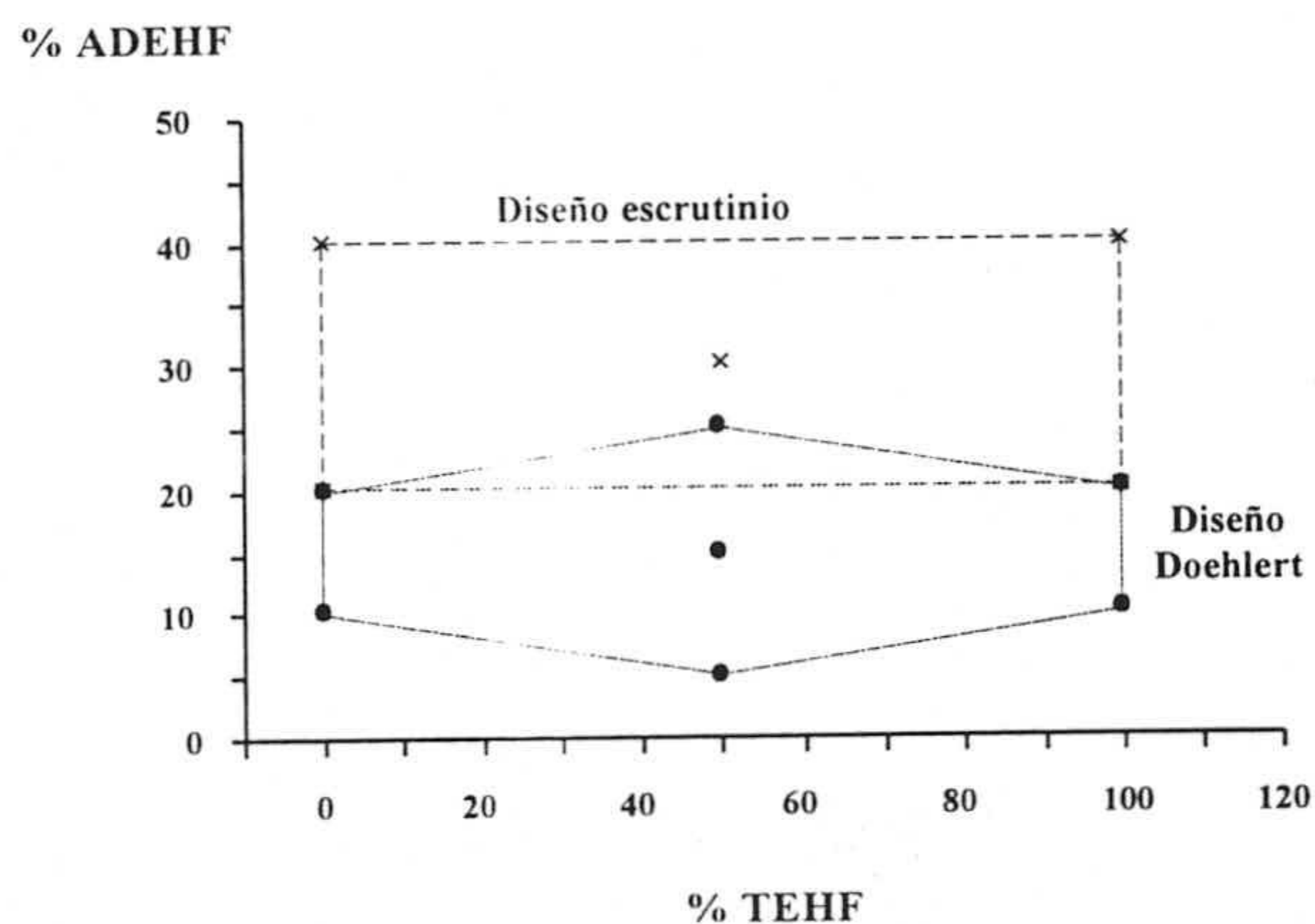


Figura VII.4. Representación conjunta de los diseños de escrutinio y Doehlert



Los resultados obtenidos a partir de la matriz del diseño utilizado (Tabla A.97) se recogen en la Tabla VII.5.

**Tabla VII.5. Valores de eficacia de la extracción para el diseño Doehlert**

Amina	Experiencia								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Triptamina</i>	32.1 <sup>1</sup>	61.8	73.4	67.8	61.4	40.2	51.1	70.3	51.3
<i>Feniletilamina</i>	30.4	48.3	49.4	51.4	44.0	41.6	46.1	49.0	43.0
<i>Putrescina</i>	31.7	14.0	12.1	17.0	1.2	18.0	27.1	14.0	5.9
<i>Cadaverina</i>	33.5	11.8	14.3	18.6	0.5	19.1	28.3	16.0	7.4
<i>Histamina</i>	30.2	20.7	19.4	22.4	5.7	27.3	32.2	21.6	9.2
<i>Tiramina</i>	26.8	33.0	31.9	29.5	22.7	31.6	24.2	31.3	27.5
<i>Espermidina</i>	37.6	27.4	26.9	30.5	3.2	36.5	36.0	29.1	9.0
<i>Espermina</i>	44.8	41.5	38.6	40.2	6.0	38.8	40.0	39.5	19.1

<sup>1</sup> Valor medio obtenido de 3 réplicas.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Del análisis gráfico de los residuales, se deduce que se cumplen las condiciones de normalidad, homocedasticidad e independencia, necesarias para la verificación del modelo.

- Análisis de la varianza.

En la Tabla A.98 se indican los resultados obtenidos del análisis de la varianza para cada una de las aminas, mostrándose un resumen de los mismos en la Tabla VII.6.

Tabla VII.6. Efectos significativos en el diseño Doehlert

Amina	¿Efecto significativo?				
	% ADEHF	% TEHF	%ADEHF%TEHF	%ADEHF <sup>2</sup>	% TEHF <sup>2</sup>
<i>Triptamina</i>	X	X	X	X	X
<i>Feniletilamina</i>		X	X	X	X
<i>Putrescina</i>	X	X			
<i>Cadaverina</i>	X	X			
<i>Histamina</i>	X	X			
<i>Tiramina</i>	X				
<i>Espermidina</i>	X	X	X	X	
<i>Espermina</i>	X	X	X	X	

X: Efecto significativo para  $\alpha = 0.05$ .

Se puede observar como en general, el porcentaje de agente formador de pares iónicos, ADEHF, es significativo para todas las aminas excepto para la feniletilamina. Lo mismo se puede decir de la composición del disolvente, en cuyo caso solo deja de ser significativo para la tiramina. El término de interacción, es significativo para la triptamina, feniletilamina, espermidina y espermina. En relación a los términos cuadráticos, el número de efectos significativos es menor en relación a los lineales.

- Cálculo del óptimo

Los coeficientes de las funciones cuadráticas que relacionan la eficacia de la extracción de cada amina con los factores estudiados se muestran en la Tabla VII.7.

**Tabla VII.7. Coeficientes de las funciones cuadráticas**

Amina	A*	Coeficiente				
		% ADEHF	% TEHF	%ADEHF%TEHF	%ADEHF <sup>2</sup>	% TEHF <sup>2</sup>
<i>Triptamina</i>	37.005	3.587	0.368	0.029	-0.197	-0.007
<i>Feniletilamina</i>	43.508	0.839	0.006	0.021	-0.071	-0.002
<i>Putrescina</i>	10.902	2.023	-0.506	0.003	-0.048	0.003
<i>Cadaverina</i>	5.542	2.777	-0.422	-0.001	-0.065	0.002
<i>Histamina</i>	18.847	1.592	-0.486	0.013	-0.046	0.001
<i>Tiramina</i>	13.557	1.429	0.089	0.003	-0.038	-0.001
<i>Espermidina</i>	9.858	3.289	-0.475	0.017	-0.090	-0.001
<i>Espermina</i>	-1.618	5.767	-0.433	0.018	-0.170	-0.001

\* Término independiente.

La aplicación del criterio de Lagrange (Tabla VII.8) sobre cada una de las funciones, indica la presencia de un máximo para las aminas más apolares, triptamina, feniletilamina y tiramina, entre unos valores de ADEHF del 13 al 22 % y de TEHF del 58 y 90 %. Para las aminas polares, se obtiene un punto de silla en el dominio experimental ensayado, consiguiendo los mejores porcentajes de eficacia de la extracción para una concentración de ADEHF entre el 17 y 21 % y cuando se utiliza como disolvente de la membrana, DHE, (0 % TEHF).

Tabla VII.8. Aplicación del criterio de Lagrange

Amina	Criterio de Lagrange				Mejores condiciones experimentales	
	$\partial\%E/\partial\%ADEHF$	$\partial\%E/\partial\%TEHF$	Hessiano	Óptimo	% ADEHF	% TEHF
<i>Triptamina</i>	-0.394 < 0	-0.014 < 0	0.0047 > 0	Máximo	13	58
<i>Feniletilamina</i>	-0.142 < 0	-0.004 < 0	0.0001 > 0	Máximo	16	70
<i>Putrescina</i>	-0.096 < 0	0.006 > 0	-0.0006 < 0	Punto silla	21	0
<i>Cadaverina</i>	-0.130 < 0	0.004 > 0	-0.0005 < 0	Punto silla	21	0
<i>Histamina</i>	-0.092 < 0	0.002 > 0	-0.0004 < 0	Punto silla	17	0
<i>Tiramina</i>	-0.076 < 0	-0.002 < 0	0.0001 > 0	Máximo	22	90
<i>Espermidina</i>	-0.179 < 0	0.001 > 0	-0.0004 < 0	Punto silla	18	0
<i>Espermina</i>	-0.340 < 0	0.001 > 0	-0.0006 < 0	Punto silla	17	0

Por tanto y desde un punto de vista meramente matemático, del estudio individual de la eficacia de la extracción no pueden obtenerse conclusiones definitivas sobre las mejores condiciones experimentales para extraer las ocho aminas biógenas.

Teniendo en cuenta que se necesita un compromiso entre las variables experimentales para la extracción conjunta de las ocho aminas, la eficacia de la extracción obtenida para cada una de las mismas se combinó en lo que se denomina función de conveniencia (*desirability function*), D, [21].

Para optimizar dicha función, se utilizaron 2 metodologías:

a) Método del simplex, mediante el algoritmo de Nelder-Mead.

b) Metodología de la Superficie de Respuesta.

a) Método del Simplex.

Cuando se usa una técnica de optimización no lineal como es el método del Simplex [22], el valor del óptimo presentó un valor de:

$$\% \text{ ADEHF} = 13.6$$

$$\% \text{ TEHF} = 6.7$$

Respecto a los valores óptimos obtenidos aplicando las 8 respuestas individuales, se puede observar como el porcentaje de agente formador de pares iónicos presenta un valor similar al del óptimo para la extracción de la triptamina, siendo ligeramente inferior al porcentaje obtenido para el resto de las aminas.

En relación al porcentaje de TEHF, es inferior al óptimo para la extracción de las aminas polares, pero sin embargo es ligeramente mayor que para las aminas apolares (0 % TEHF).

b) Metodología de la Superficie de Respuesta.

La aplicación de la metodología de la superficie de repuesta permite obtener una superficie de respuesta para la función de conveniencia, proporcionando un óptimo de:

$$\% \text{ ADEHF} = 16.5$$

$$\% \text{ TEHF} = 25.0$$

En relación al óptimo obtenido por la metodología anterior, puede observarse como

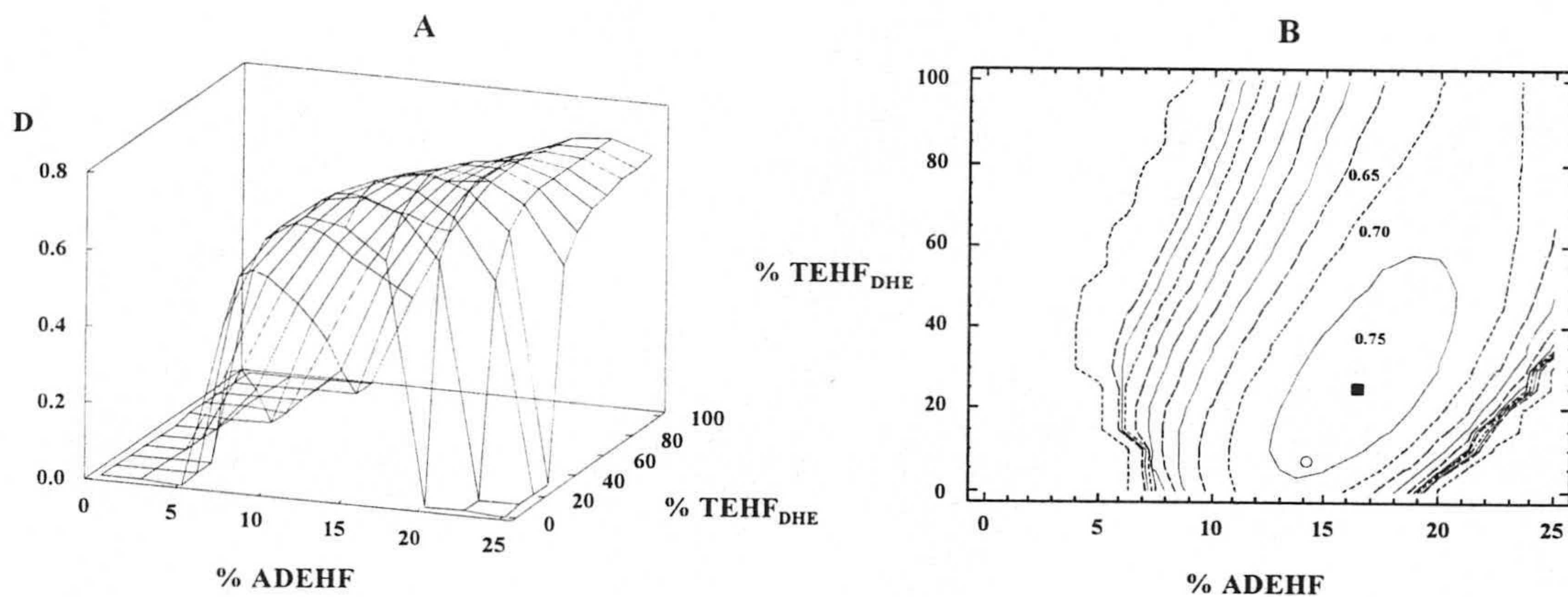
mientras que el % ADEHF es ligeramente superior, hay una mayor variación en el porcentaje de TEHF, pasando de 6.7 % (óptimo del simplex) al 25 %. Si se comparan los valores de eficacia de la extracción para los 2 óptimos obtenidos, Tabla VII.9, se puede observar como las aminas polares, que en general presentan eficacias de la extracción menores, se extraen mejor empleando el óptimo del Simplex, mientras que para las aminas apolares, se obtienen mejores resultados usando el óptimo obtenido al utilizar la metodología de superficie de respuesta.

**Tabla VII.9. Porcentajes de eficacia de la extracción para los dos óptimos obtenidos**

<b>Amina</b>	<b>Eficacia de la extracción (%)</b>			
	<i>13.6% ADEHF</i>	<i>6.7% TEHF</i>	<i>16.5% ADEHF</i>	<i>25.0% TEHF</i>
<i>Triptamina</i>		55.0		59.8
<i>Feniletilamina</i>		43.8		45.2
<i>Putrescina</i>		26.4		21.7
<i>Cadaverina</i>		28.2		24.1
<i>Histamina</i>		29.9		26.7
<i>Tiramina</i>		26.7		29.7
<i>Espermidina</i>		36.3		35.0
<i>Espermina</i>		43.7		44.0

En la Figura VII.5 se muestran los contornos de la superficie de respuesta aplicando la metodología de la superficie de respuesta, donde se puede observar una superficie “equiconveniente” óptima para un rango de concentraciones de ADEHF comprendido entre el 13 y el 20 % y de TEHF de 5 al 55 %, pudiendo destacar varios hechos significativos:

- En relación al agente formador de pares iónicos, ADEHF, el rango de concentraciones es muy estrecho, y entre los cuales se encuentran los valores de los dos óptimos obtenidos con anterioridad.
- El rango de % de TEHF es mayor, manteniendo constante el valor de D. Observando los diseños individuales, se puede indicar que, a mayores % TEHF, se mejora la extracción de las aminas apolares, en detrimento de las polares, mientras que a menores porcentajes de TEHF sucede lo contrario. Por tanto, dentro de esta superficie “equiconveniente” se puede seleccionar las mejores condiciones, para un valor constante de D, mejorando la extracción de unas aminas en relación en otras.



**Figura V.5. Superficie de respuesta obtenida para la función de conveniencia. (A)** Representación tridimensional; **(B)** Superficie de contorno: (■) valor óptimo obtenido usando la metodología de superficie de respuesta y (○) óptimo obtenido usando la metodología del simplex.

Dado que las aminas polares presentan una mayor dificultad para su extracción, se decidió seleccionar como las condiciones óptimas de trabajo, las obtenidas por el método del simplex, puesto que el porcentaje de TEHF era lo suficientemente bajo como para extraer las aminas apolares, 7 %, sin perjudicar la extracción de las polares, y el porcentaje de agente formador de pares iónicos era adecuado para la extracción de los dos tipos de aminas.

$$\% \text{ ADEHF} = 14 \%$$

$$\% \text{ TEHF} = 7 \%$$

Con objeto de verificar que el proceso de optimización de la composición de la membrana había finalizado, se compararon las eficacias de la extracción obtenidas para la composición de la membrana seleccionada con las predichas por el modelo (Tabla VII.10), observándose una total concordancia entre dichos valores.

**Tabla VII.10. Verificación del proceso de optimización**

Amina	Eficacia de la extracción (%)		
	Predicha	Experimental	DER (%) <sup>1</sup>
Triptamina	53.6	52.8	5.3
Feniletilamina	43.0	46.0	7.4
Putrescina	26.3	25.2	9.0
Cadaverina	29.4	28.2	4.4
Histamina	30.3	32.1	6.0
Tiramina	27.3	25.8	11.5
Espermidina	37.3	37.0	8.1
Espermina	45.3	43.6	7.7

<sup>1</sup> Desviación estándar relativa para tres réplicas.

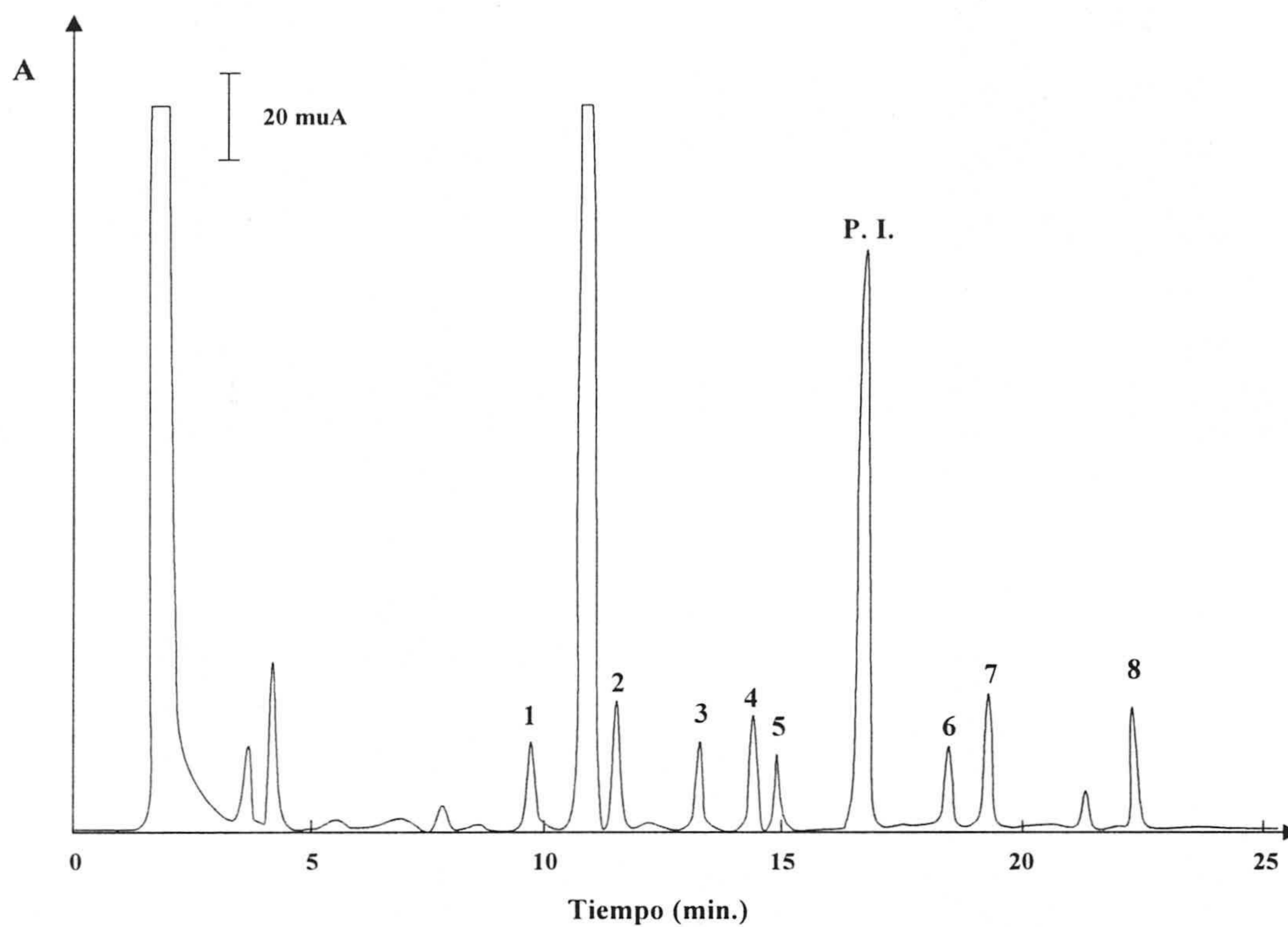


### **VII.3. MÉTODO PROPUESTO PARA LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN MEMBRANA LÍQUIDA SOPORTADA**

Una vez estudiada la composición de la membrana óptima para la extracción de aminas biógenas, se concluye que con el siguiente procedimiento se produce una extracción repetible:

La membrana líquida se prepara impregnando el soporte con una solución al 14 % (v/v) de ácido di-2-etilhexilfosfórico en una mezcla de disolventes formada por 93 % (v/v) de di-n-hexiléter y 7 % (v/v) de tri-2-etilhexilfosfato. Después de colocar la membrana entre los bloques de politetrafluoroetileno, se hace pasar por los canales del aceptor y donador agua, para eliminar el exceso de disolvente orgánico en la superficie de la membrana. A continuación, la disolución de aminas y de tampón (1 Molar acético/acetato, pH = 5) se bombean a través de la membrana (relación muestra:tampón 1:1) con ayuda de una bomba peristáltica, a un flujo de  $1.0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , durante 20 minutos. Seguidamente, y para facilitar la difusión de los analitos desde la membrana hasta el aceptor, se deja en reposo el sistema durante 10 minutos. Pasados estos diez minutos, la disolución de aceptor (0.1 M de HCl), que contiene a los analitos, se transfiere a un tubo de vidrio graduado, bombeando disolución "fresca" de aceptor a un flujo de  $0.2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  durante 5 minutos. Finalmente, el canal correspondiente al aceptor, se lava con 20 ml de HCl 0.1 M, antes de realizar una nueva extracción. Del extracto recogido se toma 0.75 ml y se derivatiza y determina cromatográficamente, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo III.

En la Figura VII.6 se muestra un cromatograma típico de una disolución de aminas, a las que se le aplicó el método propuesto.



**Figura VII.6. Cromatograma ilustrativo de las 8 aminas biógenas después del proceso de extracción. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

## **VII.4. APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN A MUESTRAS DE VINOS**

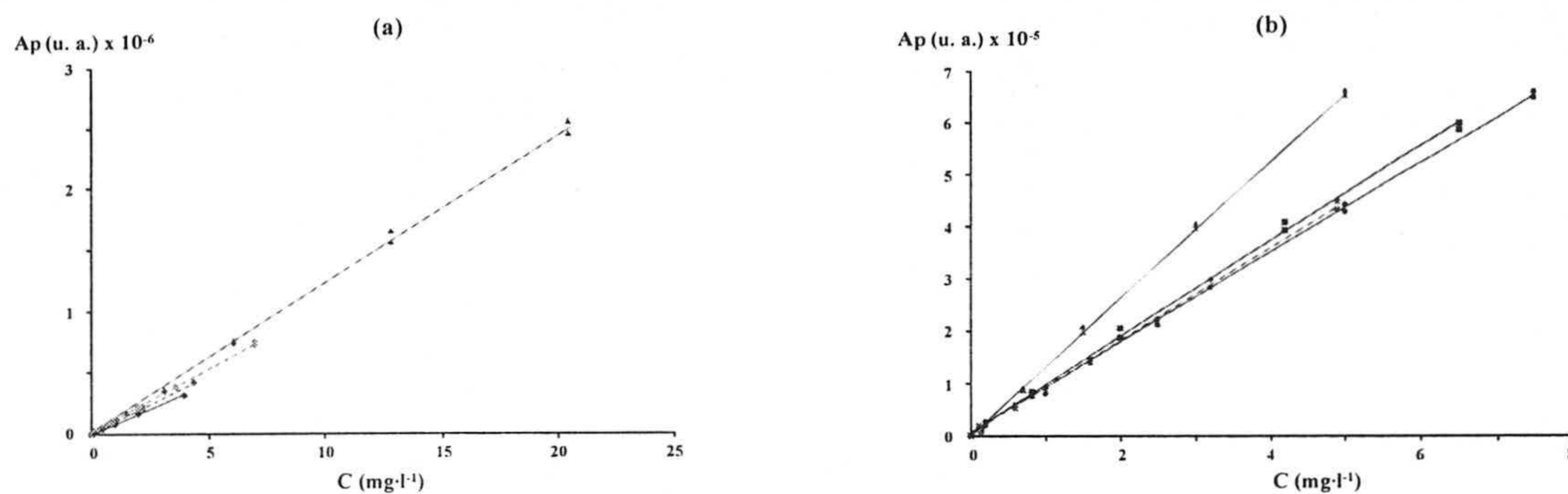
### **VII.4.1. ESTUDIO DE LA LINEALIDAD DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN**

Para determinar la linealidad del proceso de extracción en membrana, se llevo a cabo una experiencia de calibrado, utilizando para ello un rango de concentraciones de aminas biógenas en la disolución a extraer mostrado en la Tabla VII.11. En todos los casos se prepararon dos réplicas experimentales, extrayendo e inyectando los patrones en un orden aleatorio. La señal instrumental seleccionada fue el área de pico.

**Tabla VII.11. Rango de concentraciones ensayados**

<u>Amina</u>	<u>Intervalo (mg·l<sup>-1</sup>)</u>
Triptamina	0.10-4.00
Feniletilamina	0.12-4.40
Purtescina	0.20-20.40
Cadaverina	0.15-7.00
Histamina	0.15-6.50
Tiramina	0.20-7.50
Espermidina	0.13-5.00
Espermina	0.12-4.90

Los resultados obtenidos en el análisis de los cromatogramas se representan en lay Figura VII.7 y se recogen en la Tabla A.99.



**Figura VII.7. Calibrados con patrones.** (a) (◆) Triptamina; (●) Feniletilamina; (▲) Putrescina; (⊙) Cadaverina; (b) (■) Histamina; (●) Tiramina; (▲) Espermidina; (⊙) Espermina.

Para la verificación del cumplimiento de las hipótesis establecidas de aleatoriedad, normalidad y homogeneidad de varianzas, se procedió a un análisis gráfico de los residuales, mediante las representaciones de éstos frente a los valores experimentales de la concentración, para cada analito y señal estudiada, así como a la realización de los test de Kolmogorov-Smirnov y de Cochran, comentados en el Capítulo I.

De la observación de las representaciones gráficas de los residuales y de la aplicación de los tests indicados, *se verificó el cumplimiento de las hipótesis de aleatoriedad, normalidad y homocedasticidad necesarias para la aplicación del modelo.*

En la Tabla VII.12 se muestran los principales parámetros estadísticos para las funciones de calibración obtenidas.

**Tabla VII.12. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados**

	<b>a</b>	<b>s<sub>a</sub></b>	<b>b (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>s<sub>b</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>s<sub>RC</sub></b>	<b>r<sup>2</sup> (%)</b>	<b>P<sub>fallo ajuste</sub> (%)</b>
<i>Triptamina</i>	6717	2588	76578	1316	6106	99.73	53.51
<i>Feniletilamina</i>	4966	2027	91026	938	4797	99.91	82.23
<i>Putrescina</i>	-6613	12723	123682	1293	33219	99.88	83.57
<i>Cadaverina</i>	4475	3485	103840	1000	8115	99.92	87.93
<i>Histamina</i>	5322	4420	91389	1290	10100	99.82	31.07
<i>Tiramina</i>	1235	2628	86795	655	5919	99.95	93.08
<i>Espermidina</i>	-160	2502	132351	968	5701	99.95	64.22
<i>Espermina</i>	2115	2825	89349	1087	6418	99.87	96.12

- Parámetros de calidad del método.

Los parámetros de calidad del método, establecidos según los procedimientos descritos en el Capítulo I, se recogen en la Tabla VII.13.

Tabla VII.13. Parámetros de calidad del método analítico

AMINA	Parámetro de calidad					
	Linealidad	$L_D$ (mg·l <sup>-1</sup> )	$L_Q$ (mg·l <sup>-1</sup> )	$S_{\text{calibrado}}$ (l·mg <sup>-1</sup> )	$R_{\text{analítica}}$ (mg·l <sup>-1</sup> )	DER (%) <sup>1</sup>
Triptamina	98.28	0.195	0.464	76578	0.080	6.32
Feniletilamina	99.00	0.125	0.298	94026	0.051	3.69
Putrescina	98.95	0.631	1.502	123682	0.269	6.62
Cadaverina	99.04	0.192	0.457	103840	0.078	3.12
Histamina	98.59	0.271	0.645	91389	0.111	4.47
Tiramina	99.24	0.168	0.400	86795	0.068	2.21
Espermidina	99.27	0.106	0.252	132351	0.043	2.30
Espermina	98.78	0.176	0.419	89349	0.072	3.61

<sup>1</sup> Desviación estándar relativa (%) a una concentración correspondiente a la mitad del calibrado.

#### VII.4.2. APLICACIÓN A LA EXTRACCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN VINOS

Con objeto de estudiar la aplicabilidad del proceso de extracción en membrana líquida soportada, se determinó el contenido de aminas biógenas en vinos, seleccionando tres tipos: Tinto, Clarete y Blanco.

El procedimiento seguido fue:

- Aplicando el método optimizado en el Capítulo III, aplicando la metodología de adición de patrón y obteniendo los resultados mostrados en la Tabla A.100.

- Paralelamente, se llevó a cabo el procedimiento de extracción, tras el cual, se aplicó el método cromatográfico optimizado

- Con objeto de mostrar la aplicabilidad del nuevo método para la determinación de todas las aminas estudiadas, se procedió a adicionar a las muestras una cantidad conocida

de aquellas aminos no detectadas en los vinos para cuantificarlas una vez sometidas las muestras al procedimiento de extracción.

En todos los casos, se realizaron tres réplicas para cada vino.

Los resultados obtenidos en cada caso se recogen en la Tabla VII.14, donde puede observarse que la aplicación de ambos métodos conducen a los mismos resultados. Este hecho permite concluir que **la aplicación de la extracción en membrana líquida soportada puede utilizarse para la extracción de aminos biógenas en vinos.**

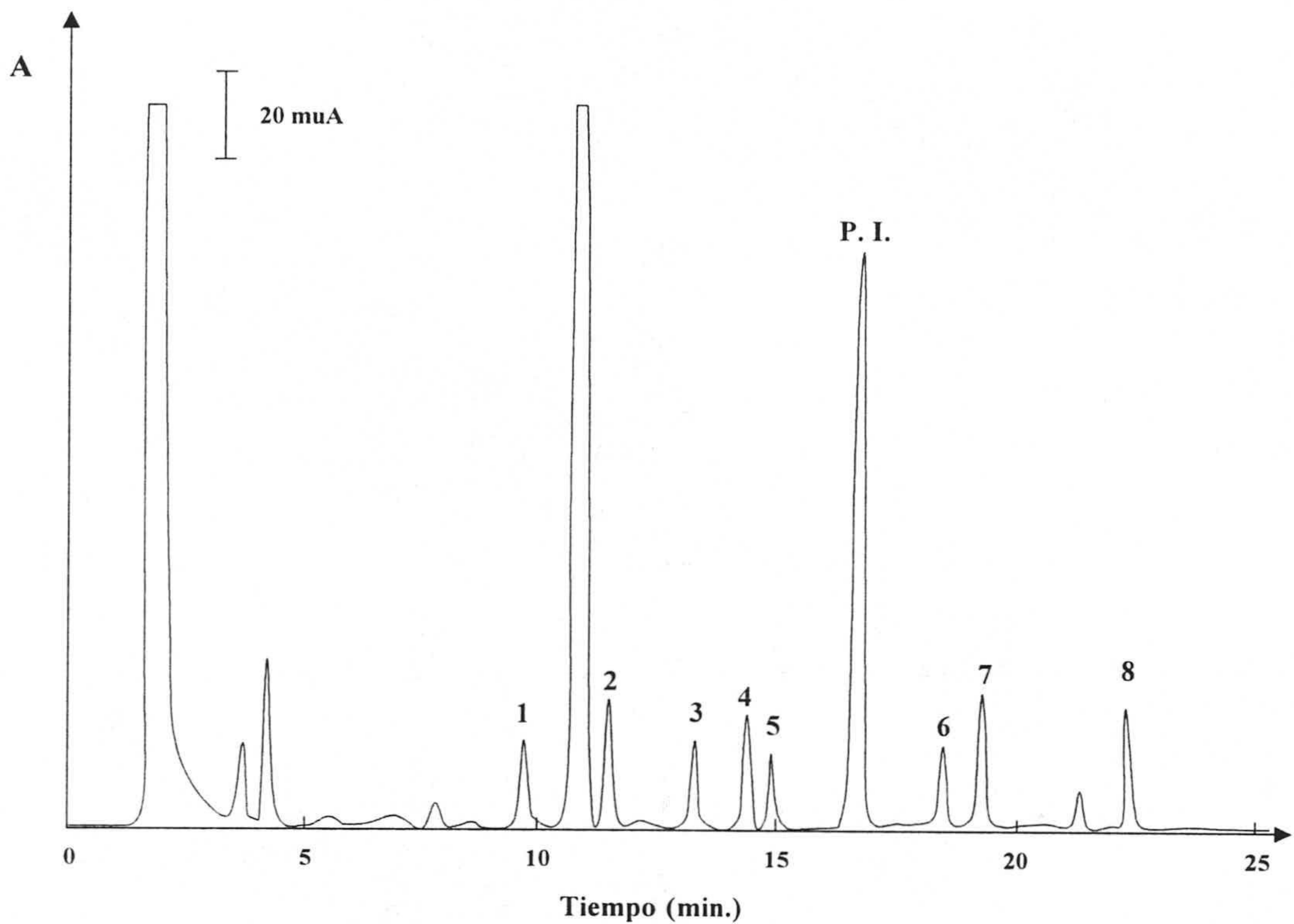
Tabla VII.14. Contenido de aminas en los vinos analizados

Vino	Amina	Encontrado sin SLM (mg·l <sup>-1</sup> )	Añadido (mg·l <sup>-1</sup> )	Encontrado con SLM (mg·l <sup>-1</sup> )
Tinto	Triptamina		1.00	0.99 (4.2) <sup>1</sup>
	Feniletilamina	0.50		0.55 (8.6)
	Putrescina	7.08		7.03 (3.3)
	Cadaverina		1.00	0.98 (11.7)
	Histamina	4.06		4.07 (3.0)
	Tiramina	2.35		2.20 (8.2)
	Espermidina		1.00	1.00 (5.8)
	Espermina		1.00	0.99 (5.2)
Clarete	Triptamina		1.00	0.98 (6.7)
	Feniletilamina		1.00	1.04 (6.2)
	Putrescina	4.78		4.58 (2.8)
	Cadaverina		1.00	0.97 (4.9)
	Histamina	2.31		2.19 (5.1)
	Tiramina	0.80		0.76 (6.4)
	Espermidina	0.72		0.75 (7.0)
	Espermina		1.00	1.00 (4.6)
Blanco	Triptamina		1.00	0.97 (7.6)
	Feniletilamina		1.00	0.98 (6.7)
	Putrescina	2.83		2.62 (5.5)
	Cadaverina		1.00	1.03 (3.7)
	Histamina	1.49		1.46 (7.9)
	Tiramina		1.00	0.97 (4.5)
	Espermidina		1.00	1.01 (7.3)
	Espermina		1.00	0.97 (7.0)

<sup>1</sup> Entre paréntesis, desviación estándar relativa para tres determinaciones.



Finalmente, la Figura VII.8 muestra un cromatograma a la muestra de vino sometido al proceso de extracción más la adición de las aminas biógenas no detectadas.



**Figura VII.8. Cromatograma del vino tinto sometido al proceso de extracción en membrana. 1: Triptamina; 2: Feniletilamina; 3: Putrescina; 4: Cadaverina; 5: Histamina; 6: Tiramina; 7: Espermidina; 8: Espermina; P.I.: 1,7-diaminoheptano.**

## CONCLUSIONES



El trabajo desarrollado a lo largo de esta Memoria ha conducido a las siguientes conclusiones:

- 1.- La falta de repetibilidad y reproducibilidad obtenida en la determinación cromatográfica de aminas biógenas previa derivatización con cloruro de dabsilo, es debida a la no idoneidad de las condiciones experimentales, lo que nos llevó a la reoptimización de las variables implicadas en el proceso de derivatización y separación cromatográfica.

La aplicación de la Metodología de la Superficie de Respuesta, utilizando los diseños Doehlert, nos ha permitido obtener, con un pequeño número de experimentos, los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso de derivatización.

Asimismo, se han modificado las variables cromatográficas que afectan a la resolución del cromatograma, obteniendo al final del proceso de optimización un valor superior a 1.5.

- 2.- La redefinición del concepto de efecto desde un punto de vista químico-analítico, ha permitido una interpretación geométrica del estudio de robustez, pudiendo utilizar los coeficientes de regresión si se emplea la Regresión Lineal Múltiple, así como un análisis gráfico del mismo.

- 3.- El estudio de robustez realizado sobre las variables implicadas en la separación cromatográfica de aminas biógenas como derivados dabsilados, indica que la resolución, altura y área de pico no se ven afectadas por ligeras modificaciones de estas variables, mientras que es recomendable utilizar la retención relativa sin ajustar como parámetro de identificación, al ser más robusto que el tiempo de retención.

- 4.- Se propone un nuevo método de determinación de aminas biógenas cuya utilidad se ha puesto de manifiesto al aplicarlo a muestras de distintas naturaleza, como vinos, cervezas y muestras sólidas relacionadas, al obtenerse resultados satisfactorios. En relación a estas últimas, mediante la utilización del diseño experimental, se ha optimizado el proceso de extracción sólido-líquido, obteniendo en las condiciones óptimas porcentajes de recuperación estadísticamente iguales al 100 %, al ensayar tres niveles distintos.
- 5.- La utilización de los métodos multivariantes de análisis de datos, como análisis en componentes principales, análisis de agrupaciones y análisis discriminante lineal ha posibilitado el uso de las aminas biógenas como descriptores químicos durante el proceso de elaboración del vino. Durante dicho estudio se obtiene que la tiramina es la que presenta un mayor poder discriminante, permitiendo determinar la extensión de la fermentación maloláctica durante el proceso de elaboración de los vinos, tinto, clarete y blanco.
- 6.- El seguimiento del proceso de elaboración de las cervezas en dos plantas distintas, nos ha permitido observar que la fermentación es la etapa crítica que determina el contenido final de aminas biógenas en el producto a consumir, debido a la presencia de contaminantes en las levaduras empleadas en dicho proceso o a una falta de limpieza en el material utilizado. Por otro lado, ni la maceración, maduración y pasteurización afectan en el contenido final de aminas en la cerveza.
- 7.- La extracción de aminas biógenas como pares iónicos en membrana líquida soportada puede ser utilizada como una interesante alternativa a la extracción en fase sólida y a la extracción líquido-líquido, en el análisis de matrices de distinta naturaleza.

- 8.- La utilización de una función de conveniencia ha permitido obtener las condiciones experimentales óptimas tanto para la extracción de las ocho aminos biogenas en el estudio de matrices sólidas aplicando una extracción sólido-líquido, como para la composición de la membrana al utilizar la extracción en membrana líquida soportada.





## BILIOGRAFÍA





**INTRODUCCIÓN**

- [1] M. H. Silla-Santos, *Int. J. Food Microbiol.*, **29** (1996) 213.
- [2] C. W. Tabor, H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, **53** (1980) 749.
- [3] A. R. Shalaby, *Food Research Int.*, **29** (1996), 675.
- [4] K. R. Kim, M. J. Paik, J. H. Kim, S. W. Dong, D. H. Jeong, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15** (1997) 1309.
- [5] G. J. Soleas, M. Carey, D. M. Goldberg, *Food Chem.*, **64** (1999) 49.
- [6] S. L. Mietz, E. Karmas, *J. AOAC Int.*, **61** (1978) 139.
- [7] R. D. Slocum, H. E. Flores, A. W. Galston, L. H. Weinstein, *Plant Phys.*, **89** (1989) 512.
- [8] S. Bover Cid, W. H. Holzapfel, *Int. J. Food Microbiol.*, **53** (1999) 33.
- [9] G. J. Flick, M. P. Oria, L. Douglas, *J. Food Sci.*, **66** (2001) S-1088.
- [10] D. F. Hwang, S. H. Chang, C. Y. Shiua, T. J. Chai, *J. Chromatogr. B*, **693** (1997) 23.
- [11] E. I. López-Sabater, J. J. Rodríguez-Jerez, M. Hernández-Herrero, M. T. Mora-Ventura, *Int. J. Food Microbiol.*, **28** (1996) 411.
- [12] J. E. Stratton, R. W. Hutkins, S. L. Taylor, *J. Food Prot.*, **54** (1991) 460.
- [13] B. W. Straub, M. Kicherer, S. M. Schilcher, W. P. Hammes, *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **201** (1995) 79.
- [14] S. Vale, B. A. Glória, *Food Chem.*, **63** (1998) 343.
- [15] S. Bover-Cid, M. Hugas, M. Izquierdo-Pulido, M. C. Vidal-Carou, *J. Food Prot.*, **63** (2000) 237.
- [16] A. Lanvoud-Funel, *Antonie van Leeuwenhoek*, **76** (1999) 317.
- [17] A. Lanvoud-Funel, *FEMS Microbiol. Lett.*, **199** (2001) 9.
- [18] M. Izquierdo-Pulido, A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou, *Food Chem.*, **70** (2000) 329.
- [19] I. Virkajärvi, T. Vauhkonen, E. Storgårds, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **59** (2001) 63.
- [20] J. Kirschbaum, K. Rebscher, H. Brückner, *J. Chromatogr. A*, **881** (2000) 517.
- [21] N. Sayem-el-Daher, R. E. Simard, J. Fillion, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **17** (1984) 319.
- [22] S. L. Taylor, M. W. Speckhard, *J. Food Prot.*, **47** (1984) 508.
- [23] A. Halász, A. Baráth, L. Simon-Sarkadi,

- W. Holzapfel, *Trends Food Sci. Technol.*, **5** (1994) 42.
- [24] J. M. Mesas, M. T. Alegre, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **2** (1999) 174.
- [25] O. Busto, J. Guasch, F. Borrull, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **30** (1996) 85.
- [26] B. ten Brink, C. Damink, H. M. L. J. Joosten, J. H. J. Huis int't Veld, *Int. J. Food Microbiol.*, **11** (1990) 73.
- [27] S. Bover-Cid, M. Izquierdo-Pulido, M. C. Vidal-Carou, *Meat Science*, **57** (2001) 215.
- [28] M. T. Veciana-Nogues, T. Hernández-Jover, A. Mariné-Font, M. C. Vidal Carou, *J. AOAC Int.*, **78** (1995) 1045.
- [29] G. C. Yen, C. L. Hsieh, *J. Food Sci.*, **56** (1991) 158.
- [30] S. C. Su, S. S. Chou, P. C. Chang, D. F. Hwang, *J. Chromatogr. B*, **749** (2000) 163.
- [31] R. Jeya-Shakila, T. S. Vasundhara, K. V. Kumudavally, *Food Chem.*, **75** (2001) 255.
- [32] K. Outinen, P. Vuorela, R. Hinkkanen, R. Hiltunen, H. Vuorela, *Planta Med.*, **61** (1995) 259.
- [33] R. M. Linares, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González-Díaz, *J. Chromatogr. A*, **808** (1998) 87.
- [34] A. Sass-Kiss, E. Szerdahelyi, G. Hajós, *Chromatographia*, **51** (2000) S-317.
- [35] M. L. Izquierdo-Pulido, M.C. Vidal-Carou, A. Mariné-Font, *J. AOAC Int.*, **76** (1993) 1027.
- [36] P. Kalač, V. Hlavatá, M. Křízek, *Food Chem.*, **58** (1997) 209.
- [37] R. M. Linares, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, *Analyst*, **123** (1998) 725.
- [38] A. Kovács, L. Simon-Sarkadi, K. Ganzler, *J. Chromatogr. A*, **836** (1999) 305.
- [39] W. J. Hurst, P. B. Toomey, *Analyst*, **106** (1981) 394.
- [40] S. Bardócz, G. Grant, D. S. Brow, A. Ralph, A. Pusztai, *J. Nutr. Biochem.*, **4** (1993) 66.
- [41] H. M. L. G. Joosten, C. Olieman, *J. Chromatogr.*, **356** (1986) 311.
- [42] A. Aygün, E. Schneider, R. Scheuer, E. Usleber, M. Gareis, E. Märtilbauer, *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999) 1961.
- [43] S. Moret, R. Bortolomeazzi, G. Lercker, *J. Chromatogr.*, **591** (1992) 175.
- [44] M. Arlorio, J. D. Coïsson, A. Martelli, *Chromatographia*, **48** (1998) 763.
- [45] P. Kalač, J. Špička, M. Křízek, Š. Steidlová, T. Pelikánová, *Food Chem.*, **67** (1999) 275.
- [46] K. D. H. Chin, P. E. Koehler, *J. Food Sci.*, **48** (1983) 1826.
- [47] R. Maijala, E. Nurmi, A. Fischer, *Meat Science*, **39** (1995) 9.
- [48] S. Eerola, R. Hinkkanen, E. Lindfors, T. Hirvi, *J. AOAC Int.*, **76** (1993) 575.
- [49] A. R. Shalaby, *J. Sci. Food Agric.*, **62** (1993) 291.

- [50] A. R. Shalaby, *Food Chem.*, **49** (1994) 305.
- [51] G. Tarantola, *Atti Accad. Ital. Vite Vino*, **6** (1954) 146.
- [52] J. O. Fernandes, M. A. Ferreira, *J. Chromatogr. A*, **886** (2000) 183.
- [53] L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, **803** (1998) 249.
- [54] O. Busto, Y. Valero, J. Guasch, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 571.
- [55] M. Íñiguez-Crespo, B. Vázquez-Lasa, *Am. J. Enol. Vitic.*, **45** (1994) 460.
- [56] O. Busto, J. Guach, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **737** (1996) 205.
- [57] J. O. Fernandes, M. A. Ferreira, *Chromatographia*, **52** (2000) 77.
- [58] C. Tricard, J. M. Cazabeil, M. H. Salagoity, *Analisis M.*, **19** (1991) M53.
- [59] T. Bauza, A. Blaise, F. Daumas, J. C. Cabanis, *J. Chromatogr. A*, **707** (1995) 373.
- [60] M. Arlorio, J. D. Coisson, A. Martelli, *Chromatographia*, **48** (1998) 763.
- [61] H. Walther, U. P. Schlunegger, F. Friedli, *Biomed. Environ. Mass Spectr.*, **14** (1987) 229.
- [62] M. Izquierdo-Pulido, S. Albalá-Hurtado, A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **203** (1996) 507.
- [63] R. M., J. H. Ayala, A. M. Alfonso, V. González, *Analyst*, **123** (1998) 725.
- [64] S. Buiatti, O. Boschelle, M. Mozzon, F. Battistutta, *Food Chem.*, **52** (1995) 199.
- [65] S. Gorinstein, M. Zemser, F. Vargas-Albores, J. L. Ochoa, O. Paredes-López, Ch. Scheler, J. Salnikow, O. Martín-Belloso, S. Trakhtenberg, *Food Chem.*, **67** (1999) 71.
- [66] J. A. Zee, R. E. Simard, M. Desmarais, *J. Inst. Can. Food Sci. Technol.*, **14** (1981) 119.
- [67] S. Yamamoto, H. Itano, H. Kataoka, M. Makita, *J. Agric. Food Chem.*, **30** (1982) 435.
- [68] B. Pfundstein, A. R. Tricker, E. Theobald, B. Spiegelharder, R. Preussmann, *Fd. Chem. Toxic.*, **60** (1991) 733.
- [69] M. J. R. Nout, *Food Res. Int.*, **27** (1994) 291.
- [70] R. Battaglia, D. Frölich, *J. High Resol. Chr. & Chr. Comm.*, **2** (1978) 100.
- [71] Directiva de la CEE (1991) 91/439/CEE, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* **L268**, 15-34.
- [72] *Real Decreto 1443/92 (1993)*, Boletín Oficial del Estado, N°: 11, 808-820.
- [73] K. B. Male, J. H. T. Luong, *J. Chromatogr. A*, **926** (2001) 309.
- [74] L. Lehane, J. Olley, *Int. J. Food Microbiol.*, **58** (2000) 1.
- [75] P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto, M. L. Riekkola, *Z. Lebensm Unters Forsch.*, **194** (1992) 434.
- [76] M. C. Gutiérrez, S. Rubio, A. Gómez-Hens, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **59** (1987) 769.

- [77] Y. Yano, N. Kataho, M. Watanabe, T. Nakamura, Y. Asano, *Food Chem.*, **54** (1995) 155.
- [78] B. V. Sarada, T. N. Rao, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 1632.
- [79] M. Nicolescu, C. Nistor, I. Frébort, P. Pec, B. Mattiasson, E. Csöregi, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 1591.
- [80] B. Mopper, C. J. Sciacchitano, *J. AOAC Int.*, **77** (1994) 881.
- [81] C. S. Ough, C. E. Daudt, E. A. Crowell, *J. Agric. Food Chem.*, **29** (1981) 938.
- [82] J. W. Suh, S. H. Lee, B. C. Chung, J. Park, *J. Chromatogr. B*, **688** (1997) 179.
- [83] J. A. Zee, R. E. Simard, K. L'Hereox, J. Tremblay, *Am. J. Enol. Vitic.*, **34** (1983) 6.
- [84] D. L. Ingles, J. F. Back, D. Gallimore, R. Tindale, J. L. Shaw, *J. Sci. Food Agric.*, **36** (1985) 402.
- [85] M. C. Gennaro, C. Abrigo, *Chromatographia*, **31** (1991) 381.
- [86] O. O. Lasekan, W. O. Lasekan, *Food Chem.*, **69** (2000) 267.
- [87] C. Buteau, C. L. Duitschaever, G. C. Ashton, *J. Chromatogr.*, **284** (1984) 201.
- [88] E. Solón, J. Paz, J. Wilson, *J. Chromatogr.*, **398** (1987) 381.
- [89] O. Busto, M. Mestres, J. Guasch, F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 404.
- [90] O. Busto, M. Miracle, J. Guasch, F. Borrull, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **20** (1997) 743.
- [91] O. Busto, M. Miracle, J. Guasch, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **757** (1997) 311.
- [92] S. Moret, L. S. Conte, *J. Chromatogr. A*, **729** (1996) 363.
- [93] A. Bockhardt, I. Krause, H. Klostermeyer, *Z. Lebensm Unters Forsch*, **203** (1996) 65.
- [94] M. Křizek, *Arch. Anim. Nutr.*, **1** (1991) 97.
- [95] S. L. Taylor, E. R. Lieber, M. Leatherwood, *J. Food Sci.*, **43** (1978) 247.
- [96] K. Takeba, T. Maruyama, M. Matsumoto, H. Nakazawa, *J. Chromatogr.*, **504** (1990) 441.
- [97] P. E. Koehler, R. R. Eitenmiller, *J. Food Sci.*, **43** (1978) 1245.
- [98] F. V. Carlucci, E. Karmas, *J. AOAC Int.*, **71** (1988) 564.
- [99] A. N. Spinelli, L. Lakritz, A. E. Wassermann, *J. Agric. Food Chem.*, **22** (1974) 926.
- [100] M. Koller, *Clin. Chem.*, **34** (1988) 947.
- [101] J. Odink, H. Sandman, W. H. P. Schreurs, *J. Chromatogr.*, **377** (1986) 145.
- [102] G. Grossi, A. Bargossi, R. Battistoni, A. Lippi, G. Sprovieri, *J. Chromatogr.*, **465** (1989) 113.
- [103] M. Picard, D. Olichon, J. Gombert, *J. Chromatogr.*, **341** (1985) 297.
- [104] A. H. Anton, D. F. Sayre, *J. Pharmacol.*

- Exp. Ther., 138 (1962) 360.
- [105] R. J. Olson, J. B. Justice Jr., *Anal. Chem.*, **65** (1993) 1017.
- [106] F.C. Cheng, L. L. Yang, F. M. Chang, L. G. Chia, J. S. Kuo, *J. Chromatogr.*, **582** (1992) 19.
- [107] H. Inoue, A. Mizutani, *Anal. Biochem.*, **56** (1973) 408.
- [108] M. A. Smith, P. J. Davies, *Plant Physiol.*, **78** (1985) 89.
- [109] T. A. Smith, S. J. Croker, R. S. T. Loeffler, *Phytochemistry*, **25** (1986) 683.
- [110] F. Feth, K. G. Wagner, *Physiol. Plant.*, **75** (1989) 71.
- [111] B. Rodríguez-Garay, G. C. Phillips, G. D. Kuehn, *Plant Physiol.*, **89** (1989) 525.
- [112] G. Pearce, P. A. Marchand, K. Griswold, N. G. Lewis, C. A. Ryan, *Phytochemistry*, **47** (1998) 659.
- [113] R. Minocha, W. C. Shortle, S. L. Long, S. C. Minocha, *J. Plant Growth Regul.*, **13** (1994) 187.
- [114] A. F. Tiburcio, R. Kaur-Sawhney, R. G. Ingersell, A. W. Galston, *Physiol. Plant.*, **78** (1985) 323.
- [115] A. Havelange, P. Lejeune, A. Bernier, R. Kaur-Sawhney, A. W. Galston, *Physiol. Plant.*, **96** (1996) 59.
- [116] D. Serafini-Fracassini, S. Del Duca, S. Beninati, *Phytochemistry*, **40** (1995) 355.
- [117] P. Torrigiani, A. L. Rabiti, L. Betti, F. Marani, M. Brizzi, N. Bagni, A. Canova, *J. Virol. Methods*, **53** (1995) 157.
- [118] A. Bouchereau, P. Ghénot, F. Larher, *J. Chromatogr. B*, **747** (2000) 49.
- [119] O. Busto, J. Guasch, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **718** (1995) 309.
- [120] V. Frattini, C. Lionetti, *J. Chromatogr. A*, **809** (1998) 214.
- [121] D. Hornero-Méndez, A. Garrido-Fernández, *Analyst*, **119** (1994) 2037.
- [122] O. Vandenabeele, L. Garrelly, M. Ghelfenstein, A. Commeyras, L. Mion, *J. Chromatogr. A*, **795** (1998) 239.
- [123] J. C. Hoekstra, D. C. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, **390** (1999) 45.
- [124] R. Pineda, A. D. Knapp, J. C. Hoekstra, D. C. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, **449** (2001) 111.
- [125] R. Draisci, L. Giannetti, P. Boria, L. Lucentini, L. Palleschi, S. Cavalli, *J. Chromatogr. A*, **798** (1998) 109.
- [126] K. Naguib, A. M. Ayesh, A. R. Shalaby, *J. Agric. Food Chem.*, **43** (1995) 134.
- [127] A. R. Shalaby, *Food Chem.*, **65** (1999) 117.
- [128] F. Muskiet, B. Dorhout, G. van den Berg, J. Hessels, *J. Chromatogr. B*, **667** (1995) 189.
- [129] H. Kataoka, *J. Chromatogr. A*, **733** (1996) 19.
- [130] Z. Chen, J. Wu, G. B. Baker, M. Parent,

- N. J. Dovichi, *J. Chromatogr. A*, **914** (2001) 293.
- [131] U. Butehorn, U. Pyell, *J. Chromatogr. A*, **792** (1997) 157.
- [132] L. Arce, A. S. Carretero, A. Ríos, C. Cruces, A. Fernández, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, **816** (1998) 243.
- [133] M. Křizek, T. Pelikanova, *J. Chromatogr. A*, **815** (1998) 243.
- [134] W. Marusak, *HRC-J High Resolut. Chromatogr.*, **22** (1999) 126.
- [135] M. Y. Khuhawar, A. A. Memon, P. D. Jaipal, M. I. Bhangar, *J. Chromatogr. B*, **723** (1999) 17.
- [136] P. Malle, M. Vallé, S. Bouquelet, *J. AOAC Int.*, **79** (1996) 43.
- [137] K. Outinen, V. M. Lehtola, H. Vuorela, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15** (1997) 819.
- [138] R. M. Linares, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, *Anal. Letters*, **31** (1998) 475.
- [139] S. Suzuki, K. Kobayashi, K. Noda, T. Suzuki, K. Takama, *J. Chromatogr.*, **508** (1990) 225.
- [140] B. Straub, M. Schollenberger, M. Kicherer, B. Luckas, W. P. Hammes, *Z. Lebensm Unters Forsch*, **197** (1993) 230.
- [141] J. K. Lin, J. Y. Chang, *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1634.
- [142] J. K. Lin, C. C. Lai, *Anal. Chem.*, **52** (1980) 630.
- [143] W. J. Hurst, *J. Liq. Chromatogr.*, **13** (1990) 1.
- [144] I. Krause, A. Bockhardt, H. Neckermann, T. Henle, H. Klostermeyer, *J. Chromatogr. A*, **715** (1995) 67.
- [145] M. A. Castillo, R. C. Castells, *J. Chromatogr. A*, **921** (2001) 121.
- [146] F. Bellagamba, V. M. Moretti, T. Mentasti, A. Albertini, U. Luzzana, F. Valfrè, *J. Chromatogr. A*, **791** (1997) 79.
- [147] B. Börkqvist, *J. Chromatogr.*, **204** (1981) 109.
- [148] M. Calull, R. M. Marcé, J. Fabregas, F. Borrull, *Chromatographia*, **31** (1991) 133.
- [149] K. Samejima, *J. Chromatogr.*, **96** (1974) 250.
- [150] Y. O. You, H. T. Sun, W. J. Lao, Q. Y. Ou, *Anal. Chim. Acta*, **382** (1999) 51.
- [151] O. Al-Dirbashi, N. Kuroda, K. Nakashima, *Anal. Chim. Acta*, **365** (1998) 169.
- [152] J. Kirschbaum, I. Busch, H. Bruckner, *Chromatographia*, **45** (1997) 263.
- [153] J. Kirschbaum, A. Meier, H. Bruckner, *Chromatographia*, **49** (1999) 117.
- [154] J. Carbonell, J. L. Navarro, *Planta*, **178** (1989) 482.
- [155] J. L. Corbin, B. H. Marsh, G. A. Peters, *Plant Physiol.*, **90** (1989) 434.
- [156] O. Busto, M. Miracle, J. Guasch, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **757** (1997) 311.

- [157] J. Vendrell, F. X. Avilés, *J. Chromatogr.*, **356** (1986) 420.
- [158] J. Y. Chang, R. Knecht, D. G. Braun, *Methods in Enzimol.*, **91** (1983) 41.
- [159] R. Knecht, J. Y. Chang, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2375.

## CAPÍTULO I

- [1] S. Wold, M. Sjöström, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, **44** (1998) 3.
- [2] ISO 8402, *Quality Management and Quality Assurance Vocabulary*, International Standards Organization, Ginebra, 1994.
- [3] EURACHEM 1998. *A focus for analytical chemistry in Europe. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. LCG, Teddington.
- [4] A. M. García-Campaña, *Validación intralaboratorio de procedimientos analíticos*, Jornadas: Los laboratorios de análisis bajo el nuevo enfoque. Seminario I: La enseñanza de la cualimetría, Granada, 1999.
- [5] A. M. García-Campaña, J. M. Bosque-Sendra, L. Cuadros-Rodríguez, E. Almansa-López, *Biomed. Chromatogr.*, **14** (2000) 27.
- [6] ISO 5725-1. *Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part I: General Principles and Definitions*, International Standards Organization, Ginebra, 1994.
- [7] M. Valcárcel, A. Ríos, *Quim. Anal.*, **19** (2000) 95.
- [8] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D. L. Massart, R. D. McDowall, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17** (1998) 193.
- [9] M. Jimidar, B. Bourguignon, D. L. Massart, *J. Chromatogr. A*, **740** (1996) 109.
- [10] R. Cela, *Avances en Quimiometría Práctica*, Cap. 9. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Public. e Intercambio Científico, 1994.
- [11] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, F. Kaufman, *Chemometrics: a Textbook*, Cap. XVIII, 293-304. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1988.
- [12] P. W. Araujo, R. Brereton, *Trends Anal. Chem.*, **15** (1996) 63.
- [13] L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez,



- M. Román-Ceba, *Talanta*, **44** (1997) 75-83.
- [14] D. C. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos*, Introducción, 1-11. Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1991.
- [15] J. C. Miller, J. N. Miller, *Estadística para Química Analítica*, Cap. VII, 168-170. Addison-Wesley Iberoamericana, S. A., Wilmington, Delaware, 1993.
- [16] A. S. Olansky, S. N. Deming, *Anal. Chim. Acta*, **83** (1976) 241-249.
- [17] A. Delacroix, C. Porte, *Analisis*, **24** (1996) 22.
- [18] P. W. Araujo, R. Brereton, *Trend, Anal. Chem.*, **15** (1996) 26.
- [19] D. C. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos*, Cap. XI, 299-345. Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1991.
- [20] A. Gustavo-González, D. González-Arjona, *Anal. Chim. Acta*, **298** (1994) 65.
- [21] D. C. Doehlert, *Appl. Stat.*, **19** (1970) 231.
- [22] Y. Hu, D. L. Massart, *J. Chromatogr.*, **485** (1989) 311.
- [23] B. Bourguignon, F. Marcenac, H. R. Keller, P. F. de Aguiar, D. L. Massart, *J. Chromatogr. A*, **628** (1993) 171.
- [24] P. Gratterer, G. Cruciani, *Analyst*, **124** (1999) 1683.
- [25] D. Gázquez, M. Sánchez-Viñas, M. G. Bagur, G. García, *J. Anal. At. Spectrom.*, **13** (1998) 105.
- [26] P. W. Araujo, M. J. Gómez, Z. A. de Benzo, C. Castillo, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **16** (1992) 203.
- [27] Z. Benzo, P. Araujo, A. Sierraalta, F. Ruetter, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 1107.
- [28] A. Gustavo-González, D. González-Arjona, *Talanta*, **49** (1999) 433.
- [29] J. M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros-Rodríguez, M. F. Molina-Molina, *Anal. Proc.*, **32** (1995) 375.
- [30] D. C. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos*, Cap. XVI, 467-509. Grupo Editorial Iberoamericana, México, 1991
- [31] S. Furlanetto, S. Pinzauti, P. Gratterer, E. La Porta, G. Calzeroni, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15** (1997) 1585.
- [32] C. D. Stalikas, G. A. Pilidis, *J. Chromatogr. A*, **872** (2000) 215.
- [33] A. M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, A. Lupiañez-González, F. Alés-Barrero, M. Román-Ceba, *Anal. Chim. Acta*, **348** (1997) 237.
- [34] P. Gratterer, G. Cruciani, *Analyst*, **124** (1999) 1683.
- [35] M. Camino, M. G. Bagur, M. Sánchez-Viñas, D. Gázquez, R. Romero, *J. Anal. At. Spectrom.*, **16** (2001) 639.
- [36] S. Goga-Remont, S. Heinisch, J. L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 13.
- [37] P. F. de Aguiar, Y. VanderHeyden, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, **348** (1997) 223.

- [38] Y. Guillaume, C. Ginchard, *J. Chromatogr. A*, **727** (1996) 93.
- [39] M. T. Morales, R. Aparicio, *Anal. Chim. Acta*, **282** (1993) 423.
- [40] R. Gotti, S. Furlanetto, V. Andrisano, V. Cavrini, S. Pinzauti, *J. Chromatogr. A*, **875** (2000) 411.
- [41] Y. Vander Heyden, K. de Braekeleer, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, J. de Beer, D. L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **20** (1999) 875.
- [42] H. Fabre, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14** (1996) 1125.
- [43] Y. Vander Heyden, A. Hijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24** (2001) 723.
- [44] L. Cuadros-Rodríguez, R. Blanc-García, A. M. García-Campaña, J. M. Bosque-Sendra, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **41** (1998) 57.
- [45] J. M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros-Rodríguez, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **365** (1999) 480.
- [46] R. Romero, D. Gázquez, M. Sánchez-Viñas, L. Cuadros-Rodríguez, M. G. Bagur, *LC-GC N. Am.*, **20/1** (2002) 72.
- [47] Y. Vander Heyden, F. Questier, D. L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17** (1998) 153.
- [48] Y. Vander Heyden, K. Luipaert, C. Hartmann, D. L. Massart, J. Hoogmartens, J. de Beer, *Anal. Chim. Acta*, **312** (1995) 245.
- [49] A. Nijhuis, H. C. M. van der Knaap, S. de Jong, B. G. M. Vandeginste, *Anal. Chim. Acta*, **391** (1999) 187.
- [50] M. Jimidar, N. Niemeijer, R. Peeters, J. Hoogmartens, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18** (1998) 479.
- [51] Y. Vander Heyden, C. Hartmann, D. L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, *Anal. Chim. Acta*, **316** (1995) 15.
- [52] J. A. van Leewen, B. G. M. Vandeginste, G. Kateman, M. Mulholland, A. Cleland, *Anal. Chim. Acta*, **228** (1990) 145.
- [53] Y. Vander Heyden, F. Questier, D. L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18** (1998) 43.
- [54] Y. Vander Heyden, S. Kuttatharmmakul, J. Smeyers-Verbeke, D. L. Massart, *Anal. Chem.*, **72** (2000) 2869.
- [55] Y. Vander Heyden, A. Bourgeois, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, **347** (1997) 369.
- [56] M. Valcárcel, *Principios de Química Analítica*, Cap. III, 149-150. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 1999.
- [57] Analytical Methods Committee, *Analyst*, **119** (1994) 2363.
- [58] R. Boqué, F. X. Rius, *Avances en Quimiometría Práctica*, Cap. 4. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Public. e Intercambio Científico, 1994.
- [59] Ph. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B.

- Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martín, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M. C. Laparra, M. Laurentie, J. C. Nivet, *Anal. Chim. Acta*, **391** (1999) 135.
- [60] Statgraphics Plus 4.1 for Windows, Statistical Graphics System by Statistical Graphics Corporation, STSC Inc., Rockville, MD, (1999) (<http://www.statgraphics.com>).
- [61] W. Penninckx, C. Hartmann, D. L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, *J. Anal. At. Spectrom.*, **11** (1996) 237.
- [62] L. Cuadros-Rodríguez, A. González-Casado, A. M. García-Campaña, J. L. Vilchez, *Chromatographia*, **47** (1998) 550.
- [63] M. Mulholland, D. B. Hubert, *J. Chromatogr. A*, **762** (1997) 73.
- [64] K. Robards, P. R. Haddad, P. E. Jackson, *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*, Academic Press, Londres, 1994.
- [65] *Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press, Londres, 1995.
- [66] O. Busto, J. Guasch, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **737** (1996) 205.
- [67] M. G. Bagur, D. Gázquez, M. Sánchez-Viñas, *Analisis*, **24** (1996) 374.
- [68] L. Cuadros-Rodríguez, A. M. García-Campaña, J. M. Bosque-Sendra, *Anal. Lett.*, **29** (1996) 1231.
- [69] L. Cuadros-Rodríguez, A. M. García-Campaña, C. Jiménez-Linares, M. Román-Ceba, *Anal. Lett.*, **26** (1993) 1243.
- [70] J. M. Green, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 305-A.
- [71] P. Bruce, P. Minkinen, M. L. Riekkola, *Mikrochim. Acta*, **128** (1998) 93.
- [72] L. A. Currie, *Pure & Appl. Chem.*, **67** (1995) 1699.
- [73] L. A. Currie, *Anal. Chim. Acta*, **391** (1999) 127.
- [74] M. A. Castillo, R. C. Castells, *J. Chromatogr. A*, **921** (2001) 121.
- [75] C. A. Clayton, J. W. Hines, P. D. Elkins, *Anal. Chem.*, **59** (1987) 2506.
- [76] M. C. Ortíz, L. A. Sarabia, *Avances en Quimiometría Práctica*, Cap. 5. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Public. e Intercambio Científico, 1994.
- [77] J. D. Ingle, Jr, *J. Chem. Ed.*, **51** (1974) 100.
- [78] ISO 8466-1, *International Standard. Water quality-calibration and evaluation of Analytical Methods and estimation of performance characteristics. Part I: Statistical evaluation of the linear calibration function*. International Standards Organization, Ginebra, 1990
- [79] B. A. Persson, J. Vessman, *Trends Anal. Chem.*, **17** (1998) 117.
- [80] M. Valcárcel, A. Gómez-Hens, S. Rubio, *Trends Anal. Chem.*, **20** (2001) 386.

- [10] M. Valcárcel, *Principios de Química Analítica*, Cap. II, 70-77. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 1999.
- [82] C. Hartmann, D. L. Massart, R. D. McDowall, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12** (1994) 1337.
- [83] W. Horwitz, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 67A.
- [84] Analytical Methods Committee, *Analyst*, **120** (1995) 29.
- [85] *International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM)*, International Standards Organization, Ginebra, 1993.
- [86] G. Venkatesh-Iyengar, R. Wayne-Wolf, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **352** (1995) 35.
- [87] R. C. Castells, M. A. Castillo, *Anal. Chim. Acta*, **423** (2000) 179.
- [88] F. Torrades, J. García, M. Castellví, *Analyst*, **120** (1995) 2417.
- [89] R. Ferrús, F. Torrades, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 1281.
- [90] J. M. Bosque-Sendra, L. Cuadros-Rodríguez, A. M. García-Campaña, *Recent Res. Devel. in Pure & Applied Anal. Chem.*, **1** (1998) 115.
- [91] J. F. Tyson, *Analyst*, **109** (1984) 313.
- [92] L. Cuadros-Rodríguez, A. M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, C. Jiménez-Linares, M. Román, *J. AOAC Int.*, **78** (1995) 795.
- [93] M. Thompson, *Analyst*, **107** (1982) 1169.
- [94] M. G. Bagur, D. Gázquez, M. Sánchez-Viñas, *J. Chromatogr. A*, **730** (1996) 241.
- [95] A. M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez, J. Aybar-Muñoz, F. Alés-Barrero, *J. AOAC Int.*, **80** (1997) 657.
- [96] S. Pérez-Magariño, I. Revilla, E. Izcara, M. L. González-San José, *Química Analítica*, **18** (1999) 133.
- [97] M. J. Martín, F. Pablos, A. G. González, *Anal. Chim. Acta*, **320** (1996) 191.
- [98] M. C. Ortiz, J. A. Sáez, J. López-Palacios, *Analyst*, **118** (1993) 801.
- [99] M. Ortiz, L. Sarabia, *Avances en Quimiometría Práctica*, Cap. 7. Santiago de Compostela University Press. Santiago de Compostela, 1994.
- [100] R. Todeschini, *Introduzione alla Chemiometria*, Cap. III, 37-60. EdiSES s.r.l., Napolés, 1998.
- [101] J. F. Hair, R. E. Anderson, R. L. Tatham, W. C. Clark, *Análisis Multivariante*, Cap. V, 249-344. Prentice Hall Iberia, Madrid, 1999.

CAPÍTULO III

- [1] J.K. Lin, J.Y. Chang, *Anal. Chem.*, **47** (1975) 1634.
- [2] J.Y. Chang, R. Knecht, D. G. Braun, *Methods Enzymol.*, **91** (1983) 41.
- [3] R. Knecht, J. Y. Chang, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2375.
- [4] E. H. J. M. Jansen, R. H. van den Berg, R. Both-Miedema, L. Doorn, *J. Chromatogr.*, **553**,(1991) 123.
- [5] I. Krause, A. Bockhardt, H. Neckermann, T. Henle, H. Klostermeyer, *J. Chromatogr. A*, **715** (1995) 67.
- [6] J. K. Lin, C. C. Lai, *Anal. Chem.*, **52** (1980) 630.
- [7] A. Bockhardt, I. Krause, H. Klostermeyer, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **203** (1996) 65.
- [8] R. M. Marce, M. Callul, J. C. Olucha, F. Borrull, F. X. Rius, *Anal. Chim. Acta*, **242** (1991) 25.
- [9] M. T. Morales, R. Aparicio, *Anal. Chim. Acta*, **282** (1993) 423.
- [10] D. Gázquez, M. Sánchez-Viñas, M. G. Bagur, G. García, *J. Anal. At. Spectrom.*, **13** (1998) 105.
- [11] D. H. Doehlert, *Appl. Stat.*, **19** (1970) 231.
- [12] P. Gratteri, G. Cruciani, *Analyst*, **124** (1999) 1683.
- [13] A. Gustavo-González, D. González-Arjona, *Anal. Chim. Acta*, **298** (1994) 65.
- [14] Z. Benzo, P. Araujo, A. Sierraalta, F. Ruelle, *Anal. Chem.*, **65**, (1993) 1107.
- [15] L.R. Snyder, J. L. Glajch, J. J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, John-Wiley & Sons, Nueva York, 1988.
- [16] J. M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros-Rodríguez, M. F. Molina-Molina, *Analytical Proceedings Including Analytical Communications*, **32** (1995) 375.
- [17] M. Nechar, M. F. Molina-Molina, L. Cuadros-Rodríguez, J. M. Bosque-Sendra, *Anal. Chim. Acta*, **316** (1995) 185.

## CAPÍTULO IV

- [1] A. Bockhardt, I. Krause, H. Klostermeyer, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **203** (1996) 65.
- [2] D. Hornero-Méndez, A. Garrido-Fernández, *Analyst*, **119** (1994) 2037.
- [3] S. Buiatti, O. Boschelle, M. Mozzon, F. Battistutta, *Food Chem.*, **52** (1995) 199.
- [4] L. M. B. C. Álvares-Ribeiro, A. A. S. C. Machado, *Anal. Chim. Acta*, **355** (1997) 195.
- [5] Y. Vander Heyden, C. Hartmann, D. L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, *Anal. Chim. Acta*, **316** (1995) 15.
- [6] H. Fabre, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14** (1996) 1125.
- [7] Y. Vander Heyden, F. Questier, D. L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17** (1998) 153.
- [8] M. G. Bagur, D. Gázquez, M. Sánchez-Viñas, *Analisis*, **24** (1996) 374.
- [9] L. A. Currie, *Pure & App. Chem.*, **67** (1995) 1699.
- [10] C. Hartmann, D. L. Massart, R. D. McDowall, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **12** (1994) 1337.

## CAPÍTULO V

- [1] D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, *Recommendations for the use of the term "Recovery" in Analytical Procedures*, International Union of Pure and Applied Chemistry, Draft, 2001.
- [2] P. Bruce, P. Minkinen, M. L. Riekkola, *Mikrochim. Acta*, **128** (1998) 93.
- [3] G. J. Soleas, M. Carey, D. M. Goldberg, *Food Chem.*, **64** (1999) 49.
- [4] A. Lonvaud-Funel, *FEMS Microbiol. Letters*, **199** (2001) 9.
- [5] O. Busto, J. Guasch, F. Borrull, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **30** (1996) 85.
- [6] L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, **803** (1998) 249.

- [7] E. Soufleros, M. L. Barrios, A. Bertrand, *Am. J. Enol. Vitic.*, **49** (1998) 266.
- [8] M. E. Meléndez, M. C. Ortíz, M. S. Sánchez, L. A. Sarabia, M. Íñiguez, *Química Analítica*, **18** (1998) 119.
- [9] J. E. Ollero, J. García, A. M. Lara, A. Martínez, C. Rodríguez, H. M. Ramos, *Diseño y Análisis estadístico de experimentos*, Cap. I, 11-41. Grupo Editorial Universitario, Granada, 1997.
- [10] M. Forina, R. Leardi, C. Armanino, S. Lanteri, *PARVUS. An Extendable Package of Programs for Data Exploration, Classification and Correlation*, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- [11] J. C. Miller, J. N. Miller, *Estadística para Química Analítica*, Cap. VI, 122-145. Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, 1993.
- [12] J. F. Hair Jr., R. E. Anderson, R. L. Tatham, W. C. Clark, *Análisis Multivariante, Análisis Multivariante*, Cap. V, 249-344. Prentice Hall Iberia, Madrid, 1999.

## CAPÍTULO VI

- [1] S. Moret, R. Bortolomeazzi, G. Lercker, *J. Chromatogr.*, **591** (1992) 175.
- [2] S. Moret, L. S. Conte, *J. Chromatogr. A*, **729** (1996) 363.
- [3] M. L. Izquierdo-Pulido, M. C. Vidal-Carou, A. Mariné-Font, *J. AOAC Int.*, **76** (1993) 1027.
- [4] *Real Decreto 53/1995*, Boletín Oficial del Estado, N°: 14. 4271-4274.
- [5] P. Kalač, V. Hlavatá, M. Křízek, *Food Chem.*, **58** (1997) 209.
- [6] D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, *Recommendations for the use of the term "Recovery" in Analytical Procedures*, International Union of Pure and Applied Chemistry, Draft, 2001.
- [7] R. Gotti, S. Furlanetto, V. Andrisano, V. Cavrini, S. Pinzauti, *J. Chromatogr. A*, **875** (2000) 411.
- [8] M. Camino, M. G. Bagur, M. Sánchez-Viñas, D. Gázquez, R. Romero, *J. Anal. At. Spectrom.*, **16** (2001) 638.
- [9] S. Goga-Remont, S. Heinisch, J. L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 13.
- [10] M. Izquierdo-Pulido, S. Albalá-Hurtado, A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou, Z.

- Lebensm. Unters Forsch*, **203** (1996) 507.
- [11] J. E. Stratton, R. W. Hutkins, S. L. Taylor, *J. Food Prot.*, **54** (1991) 460.
- [12] S. Buiatti, O. Boschelle, M. Mozzon, F. Battistutta, *Food Chem.*, **52** (1995) 199.
- [13] J. A. Zee, R. E. Simard, M. Desmarais, *J. Inst. Can. Food Sci. Technol.*, **14** (1981) 119.
- [14] B. W. Straub, M. Kicherer, S. M. Schilcher, W. P. Hammes, *Z. Lebensm. Unters Forsch*, **201** (1995) 79.
- [15] S. Gorinstein, M. Zemser, F. Vargas-Albores, J. L. Ochoa, O. Paredes-López, Ch. Scheler, J. Salnikow, O. Martín-Belloso, S. Trakhtenberg, *Food Chem.*, **67** (1999) 71.
- [16] M. Izquierdo-Pulido, A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou, *Food Chem.*, **70** (2000) 329.
- [17] M. Izquierdo-Pulido, A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou, *J. Food Sci.*, **59** (1994) 1104.
- [18] M. Izquierdo-Pulido, M. C. Vidal-Carou, A. Mariné-Font, *Food Chem.*, **42** (1991) 231.

## CAPÍTULO VII

- [1] J. Å. Jönsson, L. Mathiasson, *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 318.
- [2] J. Å. Jönsson, L. Mathiasson, *J. Separation Science*, **24** (2001) 495.
- [3] E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, L. G. Danielsson, F. Ingman, *Laboratory Automation and Information Management*, **34** (1999) 131.
- [4] J. Å. Jönsson, L. Mathiasson, *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 325.
- [5] C. García-Pinto, M. E. Fernández-Laespada, J. L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, *Laboratory Automation and Information Management*, **34** (1999) 115.
- [6] J. Å. Jönsson, M. Andersson, C. Melander, J. Norberg, E. Thordason, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A*, **870** (2000) 151.
- [7] D. Djane, K. Ndung'u, F. Malcus, G. Johansson, L. Mathiasson, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **358** (1997) 822.
- [8] J. Marty, M. Persin, J. Sarrazin, *J. Membrane Sci.*, **137** (1997) 211.
- [9] N. Megersa, J. Å. Jönsson, *Analyst*, **123** (1998) 225.
- [10] N. Megersa, L. Chimuka, T. Solomon, J. Å. Jönsson, *J. Separation Science*, **24** (2001) 567.
- [11] G. Audunsson, *Anal. Chem.*, **58** (1986)



- 2714.
- [12] G. Audunsson, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 1340.
- [13] B. Lindegård, J.Å. Jönsson, L. Mathiasson, *J. Chromatogr.* **573** (1992) 191.
- [14] E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, L. G. Danielsson, F. Ingman, *Anal. Chim. Acta*, **387** (1999) 155.
- [15] P. Wiczorek, J. Å. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chim. Acta*, **337** (1997) 183.
- [16] P. Wiczorek, J. Å. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chim. Acta*, **346** (1997) 191.
- [17] M. Di Luccio, B. D. Smith, T. Kida, C. P. Borges, T. L. M. Alves, J. Membrane Sci., **174** (2000) 217.
- [18] Y. Shen, J.Å. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 946.
- [19] J. Å. Jönsson, P. Lövkvist, G. Audunsson, G. Nilvé, *Anal. Chim. Acta*, **277** (1993) 9.
- [20] L. Chimuka, L. Mathiasson, J. Å. Jönsson, *Anal. Chim. Acta*, **416** (2000) 77.
- [21] M. Camino, M. G. Bagur, M. Sánchez-Viñas, D. Gázquez, R. Romero, *J. Anal. At. Spectrom.*, **16** (2001) 638.
- [22] J. A. Palasota, I. Leonidou, J. M. Palasota, H. L. Chang, S. N. Deming, *Anal. Chim. Acta*, **270** (1992) 101.