

Determinación de aminas biógenas en cervezas que se expenden en la ciudad de Maracaibo-Venezuela

María Camacho¹, Gabriel Torres², Pedro Izquierdo³, Betty Benitez⁴,
María Allara⁵ y Euclimar Céspedes⁶

¹Profesora asociado de la Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Departamento de Morfofisiopatología. Universidad del Zulia. E-mail: mcarolca@gmail.com.
²Profesor asociado de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Bioquímica. Universidad del Zulia. ³Profesor Titular de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Bioquímica. Universidad del Zulia. ⁴Profesor asociado de la Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Departamento de Morfofisiopatología. Universidad del Zulia. ⁵Profesor asociado de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Bioquímica. Universidad del Zulia. ⁶MgSc. en Tecnología de los Alimentos.

Resumen

Las aminas biógenas son producidas en las cervezas por microorganismos capaces de desarrollarse en condiciones de pH bajo y de oxígeno disuelto reducido, que caracterizan estas bebidas alcohólicas. El objetivo de esta investigación fue determinar la concentración de aminas biógenas en diferentes tipos y marcas de cervezas que se elaboran y expenden en Venezuela. Se seleccionaron cervezas embotelladas tipo Light y Pilsen, de tres plantas procesadoras (A, B y C). Se analizaron 36 muestras (6 por planta y tipo), y se determinó la concentración de aminas biógenas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Sólo dos aminas fueron detectadas: Histamina, presente en un 83,3% de las muestras analizadas, mientras que Triptamina se encontró en un 94,4% de estas. En las Plantas B y C se detectó una frecuencia de 100% de Histamina y Triptamina para los tipos Light y Pilsen, mientras que la Planta A presentó 50% de Histamina y 83,3% de Triptamina. La Planta "A" reveló la menor concentración de Histamina correspondiente a 7,766 partes por millón (ppm), la Planta "B" mostró la mayor concentración de Histamina (25,678 ppm) y Triptamina (22,508 ppm), mientras que la concentración de Triptamina (18,198 ppm) fue menor en la Planta "C". No se observaron diferencias significativas en cuanto a la concentración de Histamina y Triptamina para los tipos Light y Pilsen. Se concluyó que el contenido de Histamina y Triptamina excedieron los límites reportados por la literatura para bebidas alcohólicas (2 ppm), lo cual pudiera ocasionar problemas de salud en el consumidor.

Palabra clave: Cerveza, aminas biógenas, cromatografía líquida de alta resolución.

The Detection of Biogenic Amines in Beer Sold in Maracaibo City, Venezuela

Abstract

Biogenic amines are produced in beer by bacteria able to resist low pH and reduced dissolved oxygen conditions, characteristic of these alcoholic beverages. The objective of this study was to determine concentrations of biogenic amines in different types and brands of beer manufactured and sold in Venezuela. Bottled beer of the Light and Pilsen types was selected from three different breweries (A, B and C). A total of 36 samples were analyzed (6 samples for each type and brand) to determine biogenic amines using high-resolution liquid chromatography. Only two kinds of amines were detected: histamine was present in 83.3% of the samples analyzed and tryptamine was found in 94.4%. In breweries B and C, a 100% frequency of histamine and tryptamine was detected in Light and Pilsen beer, while brewery A showed 50% for histamine and 83.3% for tryptamine. Brewery A showed the lowest concentration of histamine, 7.766 parts per million (ppm); brewery B showed the highest concentrations of histamine (25.678 ppm) and tryptamine (22.508 ppm), while brewery C showed the lowest concentration of tryptamine (18.198 ppm). No significant differences were observed between histamine and tryptamine concentrations for Light and Pilsen beer types. It was concluded that histamine and tryptamine levels exceed the limits reported by literature on alcoholic beverages (2 ppm), which may cause health problems for the consumers.

Key words: Beer, biogenic amines, high-resolution liquid chromatography.

Introducción

Las cervezas han sido comúnmente reportadas como riesgo de salud debido al contenido de aminas biógenas que éstas presentan. Estas sustancias se derivan de la descarboxilación de aminoácidos o por la transaminación de aldehídos por aminoacil transaminasas, siendo constituyentes normales de muchos alimentos y bebidas y han sido encontradas en vinos, cervezas, pescados y productos cárnicos como resultado de los procesos de degradación y fermentación enzimático. Su presencia en altas cantidades en alimentos se encuentra asociada con su deterioro. Sin embargo, concentraciones bajas de aminas biógenas son esenciales para muchas funciones fisiológicas, no obstante, a altas concentraciones puede causar algunos efectos dañinos tales como hipo e hipertensión, náuseas, palpitaciones cardíacas, intoxicación renal y en casos más severos hemorragia intracraneal y muerte [8, 14].

Existen varios factores que influyen en el contenido de aminas en cerveza, como son la variedad de la cebada y condiciones de germinación, adición de bromato potásico, procedimientos de secado-tostado de malta, porcentaje de harinas complementarias, concentración de lúpulo y mosto, así como procedimiento de empaste y desarrollo bacteriano [1].

Bajo condiciones normales en humanos las aminas biógenas absorbidas del alimento son rápidamente desintoxicadas por la acción de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) o diamino oxidasa (DAO), pero en el caso de personas alérgicas o tratadas con algún inhibidor de MAO, como el etanol, el proceso de desintoxicación es afectado y las aminas se acumulan en el organismo [6, 7].

Por otra parte, se ha reportado que el etanol puede potenciar el efecto de la histamina debido a que facilita la difusión de las aminas a través de la pared del estómago e interfiere en la degradación de histamina [5]. Esto podría explicar que el límite de histamina en alimentos es de 100

partes por millón (ppm) [15], mientras que en bebidas alcohólicas se ha sugerido un límite de 2 ppm [9].

El consumo de cerveza en Venezuela es similar al alto consumo de vinos en Europa, por lo que algunos autores señalan que es importante controlar y monitorear el contenido de estas aminas en estas bebidas, ya que pueden aumentar los problemas de salud pública [4]. Por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar la concentración de aminas biógenas en diferentes tipos y marcas de cervezas que se elaboran y expenden en Venezuela.

Materiales y Métodos

Muestreo

Se seleccionaron muestras de dos tipos de cervezas embotelladas: Light y Pilsen, obtenidas de tres plantas procesadoras del país, denominadas planta A, planta B y planta C, adquiridas en supermercados, licorerías y abastos ubicados en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Las cervezas fueron recolectadas de diferentes lotes de producción entre los meses de Octubre 2002 a Marzo 2003. Para el estudio se utilizaron un total de 36 muestras a razón de 6 por planta y tipo de cerveza, y se analizaron por triplicado para determinar la concentración de aminas biógenas.

Determinación de las Aminas Biógenas

Extracción de las aminas biógenas

Fue realizada siguiendo la metodología de Moret *et al* [17]. Un volumen de 10 mL de cerveza fue desgasificado por ultrasonificación, adicionando 10 mL de una mezcla de *n*-butanol y cloroformo 1:1 (v/v). La misma fue colocada en un mezclador Lab-Line® por 30 minutos, y transferida posteriormente a un embudo de decantación. A 1 mL de la fase orgánica se le adicionaron 2 gotas de HCl 1M, aforándose a 10 mL con acetonitrilo.

Formación de Derivados Fluorescentes

De la muestra anteriormente extraída se midió 1 mL, al cual fueron adicionados 200 L de una solución de NaOH 2N y 300 L de un buffer de NaHCO₃ saturado. Seguidamente se agregaron 2 mL de una solución de cloruro de dansilo en acetona (1 mg/mL) y la mezcla fue llevada a baño maría a 40°C por 45 minutos.

Posteriormente se removió el cloruro de dansilo residual adicionando 100 L de amoniaco puro. A los 30 minutos ésta mezcla fue ajustada a un volumen de 5 mL con acetonitrilo y se centrifugó por 5 minutos a 2,500 rpm en una centrífuga modelo Dynac marca Clay Adams®. De este derivado se inyectaron 20 L en el HPLC.

Se preparó un estándar de aminas de 40 ppm, disuelto en ácido perclórico 0,4 M. La derivatización de los estándares se realizó de la misma forma que las muestras.

Especificaciones del Equipo de Cromatografía

Se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Shimadzu®, constituido por una válvula de inyección automática, un sistema controlador SCL-6B, dos bombas LC-6A, una columna de fase reversa RP-18 Lichrospher Merck®, de 12,5 cm de longitud por 4,5 mm de diámetro interno colocada a temperatura ambiente, un detector UV-VIS SPD-10A, λ 254 nm y 0,08 AUFS. Para el análisis de los datos fue utilizado el software cromatográfico Class VP.

La fase móvil A estuvo integrada por Acetato de Amonio 0,1 M, y acetonitrilo (50:50) y la fase móvil B sólo por acetonitrilo. Se usó un programa de elución lineal con gradiente, donde la fase móvil A estuvo en un porcentaje de 80% los primeros 19 min, de 19 a 22 min en un 20% y de 22 a 32 min en 80%, con una tasa de flujo de 0,7 mL/min. [6].

Cuantificación de Aminas Biógenas

Para determinar la concentración de aminas biógenas en la muestras, se comparó el tiempo de retención de cada muestra y del estándar de referencia para obtener el área, efectuando el cálculo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CM = AM / Astd \times Cstd \times Fd$$

donde:

CM = Concentración de la muestra, expresada en ppm

Am = Área de la muestra

Cstd = Concentración del estándar, expresada en ppm

Astd = Área del estándar

Fd = Factor de dilución (5×10^4)

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete SAS. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) a partir de un diseño experimental totalmente al azar, con la finalidad de determinar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, con una significancia de 0,05 [19].

Modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + T_j + (PT)_{ij} + i_{jk}$$

donde

Y_{ijk} = variable respuesta (aminas)

T_j = efecto de tratamiento (tipo de cerveza)

i_{jk} = error experimental

P = plantas Cerveceras

Resultados y Discusión

De las ocho aminas investigadas histamina, triptamina, tiramina, cadaverina, espermidina, putrescina, feniletamina y espermina solo histamina y triptamina fueron detectadas por el HPLC en las muestras de cerveza analizadas, tanto para los tipos Light como Pilsen. Diversos investigadores han reportado en cervezas principalmente la presencia de histamina y tiramina [2], sin embargo Cortacero et al.; [3] y Cortacero et al. [4], detectaron histamina, triptamina, putrescina, cadaverina y tiramina en diferentes tipos de cervezas.

La Tabla 1, señala el porcentaje de histamina y triptamina en las 36 muestras analizadas. La histamina estuvo presente en 30 de las muestras estudiadas, correspondiendo al 83,3% del total de las mismas, con una concentración promedio de 19,20 ppm. Esta concentración se considera elevada si se compara con los reportes de Izquierdo-Pulido et al. [10], en cervezas españolas, en donde se detectaron concentraciones de 0,30-4,90 ppm. Por otra parte estas aminas exceden los límites reportados por Halász et al., [9] y Loret et al., [15], como tóxicos para bebidas alcohólicas a concentraciones superiores a 2 ppm.

La triptamina estuvo presente en 34 del total de las muestras analizadas, lo que corresponde a un 94,4%, con una concentración promedio de 20,87 ppm, estas concentraciones de aminas obtenidas en estos tipos de bebidas fueron mayores a las encontradas por Izquierdo-Pulido et al., [11], Buiatti *et al.*, [1], y Gloria *et al.*, [7] quienes analizaron muestras de cervezas para los tipos Light y Pilsen, cuya concentración promedio fueron menores de 2 ppm.

Las aminas biógenas en cervezas podrían estar relacionadas con la contaminación bacteriana (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) del producto durante su elaboración y almacenamiento; se ha señalado que existe una relación entre el contenido de aminas biógenas y los defectos higiénicos en la elaboración de alimentos, y su posible rol como indicador de una deficiente calidad de la materia prima [16].

La Tabla 2, muestra las medias y significancia de la concentración de las variables histamina y triptamina para las tres plantas de cervezas estudiadas. La concentración de histamina varió entre 7,77 en la Planta A y 25,68 en la Planta B. El análisis estadístico señaló que en las cervezas de la Planta A se detectaron concentraciones significativamente inferiores ($p < 0,05$) con relación a las Plantas B y C. Estos resultados podrían estar relacionados principalmente con las condiciones de trabajo de cada planta de elaboración, bien sea en el proceso de

Tabla 1. Concentración de aminas biógenas en cervezas

Aminas Biógenas	̄ ppm*	%
Histamina	19,20	83,30
Triptamina	20,87	94,4

n = 36.

* Valores promedio expresados en mg/L

Tabla 2. Concentración* media de histamina y triptamina por efecto de plantas cerveceras.

Planta	Histamina	Triptamina
A	7,77 a	21,91 a
B	25,68 b	22,51 a
C	24,18 b	18,20 a

Medias seguidas de letras distintas en una misma columna, son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

* Valores promedio expresados en ppm.

fermentación o por contaminación producida por levaduras, o a otros factores tales como calidad de la materia prima (malta o cebada) [1].

Las concentraciones de triptamina variaron entre 18,20 ppm para la Planta C y 22,51 ppm para la Planta A. No se encontraron diferencias significativas para la concentración de esta amina. Los resultados obtenidos para triptamina difieren con los reportados por Kalac et al., [13], cuyo rango promedio de triptamina para cerveza fue de 0,56-1,65 ppm. Igualmente Buiatti *et al.*, [1], reportaron una concentración de triptamina de 0,1-2,6 ppm en cervezas alcohólicas. La presencia y concentración de esta amina se encuentra asociada igualmente a condiciones sanitarias, actividad de la levadura, contaminación microbiana durante la elaboración de la cerveza [12], e igualmente al proceso de fermentación [13, 14, 15].

La Tabla 3, muestra las medias y significancia para la variable histamina y triptamina por efecto de tipo (Light y Pilsen). No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de histamina para el tipo Light (19,01 ppm) y para el Pilsen (19,40 ppm), lo que sugiere que la concentración de esta amina es igual para ambos tipos, indicando quizás un proceso de elaboración similar en la que influye el proceso de fermentación y de los aminoácidos que puedan estar presentes en el mosto cervecero [12].

Las concentraciones de histamina obtenidas para el efecto tipo fueron superiores a las comparadas con Kalac et al., [13], quienes señalan concentraciones hasta 1,19

mg/L en la cervezas tipo Light y 0,59 mg/L en las cervezas tipo Pilsen, a diferencia de los resultados reportados por Zee y col [20] quienes encontraron en cervezas Europeas y Canadienses un rango de 4,50-7,27 mg/L en los mismos tipos de cervezas.

En ambos tipos de cervezas (Light y Pilsen) la concentración de histamina encontrada supera los 6 mg/L. Esta concentración puede ser un factor predisponente a la aparición de dolores de cabeza, hipotensión y otros efectos tóxicos si son ingeridas en cantidades mayores de 10mg/L [15].

La Tabla 4, muestra la media y significancia para las variables histamina y triptamina por efecto de planta y tipo. La planta A para los tipos Light y Pilsen presentó la menor concentración de histamina (4,62 y 10,91 ppm), respectivamente no detectándose diferencias significativas entre ellas, pero, sí con relación a las plantas B y C, las cuales presentaron los valores más elevados de histamina. Las plantas A y B no mostraron diferencias significativas entre sus tipos de cervezas, mientras que la planta C presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tipos Light y Pilsen (28,55 y 19,81 ppm). La variabilidad en la concentración de histamina por efecto planta-tipo, puede deberse al hecho de que las muestras incluyeron diferentes marcas así como diferentes lotes de la misma marca [14]. Esto está basado en el hecho de que el coeficiente de variación fue alto $CV = 32,11\%$. Resultados similares a los reportados por Gloria y col. [7], en donde la concentración de histamina presentó considerables variaciones en los diferentes tipos de cervezas brasileras analizados ($CV = 73\%$, $CV = 58\%$ y $CV = 41\%$) para los tipos Light y Pilsen.

En relación con la media y significancia para la variable Triptamina por efecto de tipos de cerveza (Tabla 3), no se observaron diferencias significativas para la concentración de triptamina para los tipos Light y Pilsen (18,82 y 22,92 ppm) respectivamente, a pesar que se ha reportado que la concentración de triptamina depende del tipo de cerveza, además del proceso de elaboración de la cerveza, malteado, triturado y fermentación [9].

Durante el proceso de malteado se ha detectado triptamina en concentraciones superiores a 3,5 ppm. Igualmente durante el proceso de fermentación con concentraciones de 3,00 -4,40 ppm [15].

La existencia de estas aminas en las cervezas analizadas se debe, posiblemente a la presencia de bacterias ácido lácticas en el proceso de fermentación. Durante el proceso de elaboración, las condiciones anaeróbicas pueden ser óptimas para la síntesis de enzimas descarboxilasas por bacterias ácido lácticas *Lactobacillus* y *Micrococcus spp.* [11].

Tabla 3. Concentración* media de histamina y triptamina por efecto de tipos de cerveza.

Tipo	Histamina	Triptamina
Light	19,01	18,82
Pilsen	19,40	22,92

Medias seguidas de letras distintas en una misma columna, son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

*Valores promedio expresados en ppm.

Tabla 4. Concentración* media de histamina y triptamina por efecto de plantas y tipos de cervezas

Planta	Tipo	Histamina	Triptamina
A	Light	4,62 ^a	23,13 ^a
	Pilsen	10,91 ^a	20,68 ^a
B	Light	23,88 ^{bc}	16,41 ^a
	Pilsen	27,48 ^c	28,61 ^a
C	Light	28,54 ^c	16,93 ^a
	Pilsen	19,81 ^b	19,47 ^a

Medias seguidas de letras distintas en una misma columna, son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

*Valores promedio expresados en ppm.

Conclusiones

De las ocho aminas biógenas investigadas sólo dos aminas, Histamina y Triptamina fueron detectadas en las muestras de cervezas analizadas.

La Histamina estuvo presente en el 83,3 % del total de muestras de cerveza analizadas, mientras que Triptamina estuvo en el 94,4 %.

De las tres plantas cerveceras estudiadas, la Planta A, fue significativamente diferente a las otras dos, ya que la cerveza producida presentó la menor concentración de Histamina.

La concentración de Histamina y Triptamina presente en la cerveza excedió los límites máximos reportados por la literatura lo cual podría afectar la salud del consumidor de existir un elevado consumo de cerveza.

Recomendaciones

Determinar la capacidad que tienen los microorganismos utilizados como cultivos iniciadores en la producción de Aminas Biógenas.

Aplicar buenas prácticas de manufactura e incluir procesos de control de calidad desde la obtención de la materia prima y durante el proceso de elaboración de la cerveza.

Establecer límites de concentración para Aminas Biógenas en Cervezas Venezolanas.

Determinar los microorganismos implicados en la producción de aminas biógenas en cervezas.

Agradecimiento

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ), por el aporte de los equipos utilizados y financiamiento de la investigación.

Referencias Bibliográficas

- [1] BUIATTI, S.; BOSCHELLE, O.; MOZZON, M.; BATTISTUTTA, F. 1995. Determination of Biogenic Amines in Alcoholic and Non-Alcoholic Beers by HPLC. **Food Chem.** 52:199-202.
- [2] CORTACERO, S, SEGURA, A; CRUCES, C; HERNAINZ, M AND FERNANDEZ, A. 2003a. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **Trac-Trends in Analytical Chemistry.** 22:440-455.
- [3] CORTACERO, S, SEGURA, A; CRUCES, C; HERNAINZ, M AND FERNANDEZ, A. 2003b. Análisis multicomponente de los constituyentes en muestras de cervezas usando electroforesis capilar zonal con detección mediante un detector de diodos. **Cerveza y Malta.** 160:41-44.
- [4] CORTACERO, S; ARRAEZ, D; SEGURA, A; AND FERNANDEZ, A. 2007. Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser -induced fluorescence detection. **Food Chemistry.**100:383-389.
- [5] DEL CAMPO, G.; LAVADO, M.; DUEÑAS; M.; IRASTORZA; A. 2000. Producción de histamina por algunas bacterias lácticas aisladas a partir de cidras. **Food Sci. Tech. Int.** 6 (2): 117-121.
- [6] EEROLA, S.; HINKKANEN, R.; LINDFORS, E.; HIRVI, T. 1993 Liquid Chromatography Determination of Biogenic Amines in Dry Sausages. **J. AOAC Int.** 76 (3): 575-577.
- [7] GLORIA, M.; IZQUIERDO-PULIDO, M. 1999. Biogenic Amines in Brazilian Beers. **J. Food Composition and Analysis.** 12:129-136.
- [8] GROTHEER, D AND STOCKEMER, J. 2001. Food induced histaminosis in Europe- Study on occurrence and symptoms. **Archive for Lebensmittel Hygiene.** 52:129-131.
- [9] HALÁSZ, A.; BARÁTH A.; SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. 1999. The biogenic Amine Content of Beer; the Effect of Barley, Malting and Brewing on Amine Concentration. **Lebensm Usters Forsch A.** 208: 418-423.
- [10] IZQUIERDO-PULIDO, M.; HERNÁNDEZ-JOVER, T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. 1996. Biogenic Amines in European Beers. **J. Agric. Food Chem.** 44: 3159-3163.
- [11] IZQUIERDO-PULIDO, M.; CARCELLER-ROSA, J.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.1997. Determination of Biogenic Amines in Beers. **Food Prot.** 60: 831.
- [12] IZQUIERDO-PULIDO, M; CARCELLER-ROSA, J; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. 1997. Biogenic amine changes related to lactic acid bacteria during brewing. **Journal of Food Protection.** 60:1-7.
- [13] KALAC, P; HLAVATA, V.; KRIZCK, M. 1997. Concentrations of Five Biogenic Amines in Czech Beers and Factors Affecting their Formation. **Food Chem.** 53: 209-214.
- [14] KALAC, J; SAVEL, M; KRIZEK, T; PELIKANNOVA AND PROKOPOVA, M. 2002. Biogenic amine formation in bothed beer. **Food Chemistry.**79:431-434.
- [15] LORET, S; DELOYER, P; AND DANDRIFOSSE, G. 2005. Levels of biogenic amines, as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. **Food Chemistry.** 89:519-525.
- [16] MARINE FONT, ABEL. 2005. Les amines biogenes en Aliments Historia I Recerca en el Mare de les ciencias de L'Alimenticio. Se ISBN 84-7283-788-2 Sección de Ciencias Biologique II.
- [17] MORET, S.; BORTOLOMEAZZI, R.; LERCKER, G. 1991. Improvement of Extraction Procedure for Biogenic Amines in Foods and their High-performance Liquid Chromatography Determination. **J. Chrom.** 591: 175-80.
- [18] SLOMKOWSKA, A AND WOJCIECH, A. 2002. Biogenic Amine profile of the most popular polish beers. **European Food Research and technology.**215:5.
- [19] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). 1985. User 's guide. SAS. Version 5. Cary, North Caroline. USA. pp. 494.
- [20] ZEE, J.; SIMARD, R.; DESMARAIS, M. 1981 Biogenic Amines in Canadian, American and European Beers. **J. Can. Inst. Food Sci. Tech.** 14(2), 119-22.