



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de métodos para la determinación de componentes minoritarios en bebidas alcohólicas fermentadas, mediante diferentes técnicas analíticas y herramientas quimiométricas

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

Mónica Palomino Vasco

2021



TESIS DOCTORAL

Desarrollo de métodos para la determinación de componentes minoritarios en bebidas alcohólicas fermentadas, mediante diferentes técnicas analíticas y herramientas quimiométricas

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos

Mónica Palomino Vasco

2021

Conformidad de las directoras:

María Isabel
Rodríguez Cáceres

Nielene
Mora Díez

María Isabel
Acedo Valenzuela

AGRADECIMIENTOS

- Junta de Extremadura. Consejería de Economía e Infraestructuras. Ayudas para la financiación de contratos predoctorales para la formación de doctores en los centros públicos de I+D pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación en el ejercicio 2017. Decreto 45/2016, de 12 de abril. DOE 95 de 19 de mayo de 2017. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. **PD16033**.
- Junta de Extremadura. Ayuda a Grupos de Investigación. Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Decreto 114/2010, de 14 de mayo. DOE 250, de 30 de diciembre de 2010. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. **GR10033 – Grupo de Investigación FQM003 (ANAYCO)**.
- Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto de investigación. Resolución de 1 de agosto de 2014, de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación. BOE 192, de 8 de agosto de 2014. **CTQ2014-52309-P**.
- Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto de investigación. Resolución de 8 de junio de 2017, de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación. BOE 140, de 13 de junio de 2017. **CTQ2017-82496-P**.
- Junta de Extremadura. Ayuda a Grupos de Investigación. Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Decreto 279/2014, de 30 de diciembre. DOE 6, de 12 de enero de 2015. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. **GR15090 – Grupo de Investigación FQM003 (ANAYCO)**.
- Junta de Extremadura. Ayuda a Grupos de Investigación. Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Decreto 14/2018, de 6 de febrero. DOE 78, de 24 de abril de 2019. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. **GR18041 – Grupo de Investigación FQM003 (ANAYCO)**.
- Junta de Extremadura. Proyecto de investigación. Consejería de Economía e Infraestructuras. Decreto 68/2016, de 31 de mayo de 2016. DOE 107, de 6 de junio de 2016. Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. **IB16058**.

ÍNDICE

RESUMEN	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	9
1. BEBIDAS ALCOHÓLICAS FERMENTADAS: VINO Y CERVEZA	11
1.1 El vino	11
1.1.1 Importancia socio-económica del vino	15
1.2 La cerveza	17
1.2.1 Importancia socio-económica de la cerveza	19
2. ANALITOS EN ESTUDIO	21
2.1 Compuestos dicarbonílicos: glioxal y metilglioxal	21
2.1.1 Antecedentes bibliográficos de la determinación de compuestos dicarbonílicos	24
2.2 Aminas biógenas	38
2.2.1 Antecedentes bibliográficos de la determinación de aminas biógenas	42
2.3 Aminoácidos	59
2.3.1 Antecedentes bibliográficos de la determinación de aminoácidos	63
3. HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS EMPLEADAS	70
3.1 Comprobación de la bondad de los modelos predictivos	73
3.2 Algoritmos empleados con fines clasificatorios	74
3.2.1 Análisis de Componentes Principales	74
3.2.2 Análisis Clúster	76
3.2.3 Análisis Discriminante	76

3.3 Algoritmos empleados con fines cuantitativos	77
3.3.1 PARAFAC	77
3.3.2 MCR-ALS	78
3.3.3 U-PLS/RBL	79
3.3.4 Redes Neuronales Artificiales	81
4. REFERENCIAS	84
CAPÍTULO II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
CAPÍTULO III. CONCLUSIONES	141
CAPÍTULO IV. PUBLICACIONES	145
ARTÍCULO 1. Novel HPLC-Fluorescence methodology for the determination of methylglyoxal and glyoxal. Application to the analysis of monovarietal wines “Ribera del Guadiana”	147
ARTÍCULO 2. Dispersive liquid-liquid microextraction for a rapid determination of glyoxal in alcoholic beverages	149
ARTÍCULO 3. Biogenic amines profile in red wines regarding aging and storage conditions	151
ARTÍCULO 4. Automated chromatographic method with fluorescent detection to determine biogenic amines and amino acids. Application to craft beer brewing process	153
ARTÍCULO 5. Exploring the potential of combining chemometric approaches to model non-linear multi-way data with quantitative purposes – A case study	155
ARTÍCULO 6. Monitoring winemaking process using tyrosine influence in the excitation-emission matrices of wine	157
ANEXO I. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	159



RESUMEN



El propósito de esta Tesis ha sido el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de diferentes compuestos minoritarios (en concreto, compuestos dicarbonílicos, aminas biógenas y aminoácidos) en bebidas alcohólicas fermentadas, mediante el empleo de diferentes técnicas analíticas y herramientas quimiométricas.

La presente memoria se divide en cuatro capítulos. En la Introducción se describen las características principales de las matrices analizadas (vino y cerveza) y sus respectivos procesos de elaboración, así como su importancia socio-económica, desde nivel mundial a nivel autonómico. Por otro lado, se detallan las características de cada uno de los grupos de analitos analizados, así como su influencia en la calidad del vino y la cerveza y sus posibles efectos en la salud de los consumidores. Además, se realiza una revisión de los métodos analíticos desarrollados para su determinación en matrices alimentarias. Debido al gran volumen de trabajos existentes, la revisión se centra en los métodos empleados en la última década. Finalmente, se explican brevemente algunos conceptos básicos de la calibración multivariante y se describen conceptualmente los diferentes algoritmos quimiométricos empleados durante el desarrollo de la Tesis. Más adelante, en la sección de Resultados y Discusión, se resumen los resultados de los estudios realizados durante el trabajo experimental; y el capítulo de Conclusiones recoge los logros más destacados. Por último, en el capítulo de Publicaciones se incluyen las seis publicaciones que han surgido del trabajo experimental de esta Tesis.

En el Artículo 1 se propuso un nuevo reactivo derivatizante para la determinación de glioxal y metilglioxal, optimizándose las condiciones de reacción. Además, se optimizó su separación cromatográfica y se aplicó a diferentes muestras de vino de Extremadura. En el Artículo 2, con vistas a mejorar este método, se pretendía realizar una extracción previa de los analitos mediante la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva. Sin embargo, durante la realización de los estudios de reproducibilidad se comprobó que, en ciertas condiciones, la reacción de derivatización ocurría de forma simultánea a la extracción, aunque de forma selectiva para el glioxal. Así, se optimizaron las condiciones de la reacción/extracción simultánea y se determinaron las concentraciones de glioxal presentes en muestras de vino y cerveza.

En el Artículo 3 se optimizaron las condiciones para la separación cromatográfica de ocho aminas biógenas y su posterior determinación en diferentes muestras de vino, tras su correspondiente derivatización para poder ser determinadas mediante fluorescencia. Además, se realizó un estudio sobre la evolución del perfil de estos analitos en vinos con diferente grado de envejecimiento, almacenados bajo distintas condiciones. La aplicación de algoritmos quimiométricos permitió la clasificación de las muestras según su grado de envejecimiento, así

como en base a las diferentes condiciones de almacenamiento. En el Artículo 4 se procedió a intentar mejorar el método desarrollado mediante la puesta a punto de una reacción de derivatización online en el mismo equipo cromatográfico, obteniendo de esta forma un método totalmente automatizado. Además, se incluyeron como analitos los aminoácidos precursores de las aminas biógenas determinadas en el Artículo 3, teniendo finalmente un total de diecisiete analitos. Las condiciones cromatográficas tuvieron que ser ajustadas para optimizar la separación de los mismos, consiguiendo finalmente un método en el que la derivatización y separación de los analitos se realizaba en 30 minutos. El método se aplicó a muestras de cerveza recogidas durante el proceso de elaboración.

En el Artículo 5 se optimizaron las condiciones para la determinación voltamperométrica de histamina, en presencia de su aminoácido precursor histidina, en muestras acuosas a diferentes valores de pH y concentración, para obtener una matriz de datos. Debido a la alta falta de linealidad de los datos obtenidos, se realizó un exhaustivo estudio de los datos obtenidos, corrigiendo, en primer lugar, la falta de bilinealidad. La aplicación de MCR-ALS permitió evaluar el comportamiento empírico de los datos y comprobar que al menos existían dos modelos de regresión en los mismos. Después, se aplicaron diferentes herramientas quimiométricas (U-PLS/RBL y U-PCA/RBL-RBF) hasta conseguir una correcta predicción de las concentraciones del analito en las muestras de validación. De esta forma se puso en valor la importancia de la evaluación de los datos obtenidos antes de seleccionar la herramienta quimiométrica adecuada para su resolución. La calidad científica de este estudio quedó corroborada por la elección del mismo como portada de la prestigiosa revista *Analytica Chimica Acta*, en su volumen 1141 (02/01/2021).

Finalmente, en el Artículo 6 se procedió a desarrollar una nueva metodología para la monitorización del proceso de vinificación. Para ello, tras emplear el método desarrollado en el Artículo 4 al análisis de muestras de vino recogidas durante el proceso de vinificación, se realizó un Análisis de Componentes Principales para determinar la principal fuente de varianza de los datos. Tras comprobar que se trataba de la tirosina, y gracias a su fluorescencia nativa, se optimizaron las condiciones para su determinación en las muestras anteriormente analizadas cromatográficamente mediante la obtención de sus correspondientes matrices de excitación-emisión. La aplicación de PARAFAC permitió la cuantificación de tirosina en las muestras. Los cambios en la concentración de la misma permitieron ver el inicio y el final del proceso de fermentación maloláctica, por lo que su determinación mediante la obtención de matrices de excitación-emisión podría emplearse como un método más sencillo y barato para monitorizar el proceso de vinificación.



OBJETIVOS



El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y optimización de nuevos métodos analíticos para la determinación de compuestos minoritarios (en concreto, compuestos dicarbonílicos, aminas biógenas y aminoácidos) en muestras de bebidas alcohólicas fermentadas. Estos métodos se han desarrollado mediante el empleo de diferentes técnicas analíticas (cromatografía de líquidos de alta resolución, voltamperometría y fluorescencia molecular) y el uso de diferentes herramientas quimiométricas (tanto con fines de clasificación como de cuantificación). De esta forma se ha evaluado la presencia y concentración de estos analitos en productos principalmente extremeños, avalando así la calidad de los mismos.

De forma más concreta, los objetivos específicos han sido:

1. Estudiar las propiedades de los analitos y su reaccionabilidad con diferentes agentes derivatizantes, para desarrollar y optimizar nuevos métodos analíticos para su determinación, procurando minimizar al máximo el tratamiento de muestra.
2. Determinar los analitos en estudio en muestras de bebidas alcohólicas fermentadas, fundamentalmente extremeñas, mediante los métodos desarrollados en anteriormente. Monitorizar la variación de la concentración de los mismos durante el proceso de elaboración de la bebida fermentada y/o su almacenamiento.
3. Desarrollar nuevos métodos analíticos que hagan uso de la fluorescencia molecular o de las propiedades electroquímicas de los analitos para su determinación.
4. Aplicar diferentes algoritmos quimiométricos a los datos obtenidos mediante los métodos anteriormente desarrollados, con el fin de cuantificar las concentraciones de los analitos en las mismas, o bien con fines clasificatorios.



CAPÍTULO I

Introducción



1. BEBIDAS ALCOHÓLICAS FERMENTADAS: VINO Y CERVEZA

Tanto el vino como la cerveza son bebidas alcohólicas fermentadas que han existido desde la antigüedad, donde tenían un papel fundamental en el día a día, e incluso se empleaban en tratamientos para distintas dolencias [1]. Ambas bebidas se preparan a partir de materias primas que contienen azúcares: uvas en el caso del vino, y malta en el caso de la cerveza. La fermentación puede originarse tanto por la presencia natural de ciertos microorganismos, como por la adición de los mismos. Dicho proceso de fermentación genera diferentes compuestos que aportan a estas bebidas nuevos aromas, sabores, texturas y beneficios nutricionales [2].

1.1. El vino

Según la definición de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), el vino es la bebida obtenida tras la fermentación parcial o completa de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva. El tipo, calidad y color de las uvas empleadas afectará al vino obtenido [3].

Los factores más influyentes en la calidad y en las características de un vino son la variedad de uva empleada, las condiciones climáticas (tanto de la situación del viñedo en general, como de la añada en particular), las características del suelo, el nivel de madurez de los frutos al realizar la vendimia y, por último, las prácticas de elaboración que se utilicen. Todos estos factores afectan tanto a la composición de la uva como a los metabolitos que se extraen de las mismas [4–6].

La clasificación de los vinos se realiza en base a su color y su forma de elaboración. Las condiciones de temperatura y tiempos en cada proceso varían según el tipo de vino y de la especialidad que se esté preparando [1,2,4,5,7–10].

- Vinos blancos: proceden de uvas blancas o de uvas tintas con pulpa no coloreada. Se elaboran por la fermentación alcohólica del zumo de uva clarificado, sin las partes sólidas de la uva o del racimo (fermentación en virgen). El resultado es un vino de coloración pálida, con sabores y olores principalmente afrutados, y suaves al paladar.
- Vinos rosados: se elaboran a partir de mosto de uvas tintas en el que el contacto con los hollejos ha sido corto, por lo que los compuestos coloreados se extraen de forma parcial. Después, la fermentación se realiza en virgen, como en los vinos blancos. Se obtienen vinos ligeramente coloreados, con baja astringencia y que siguen manteniendo los atributos de frescor característicos de los vinos blancos.

- **Vinos tintos:** proceden del mosto de uvas tintas que han sido maceradas en presencia de sus hollejos y pepitas para la extracción de los compuestos responsables del color y otras sustancias que afectarán a las características organolépticas del vino resultante. Se obtienen vinos coloreados rojizos y más densos que los blancos por la cantidad de compuestos en disolución. Tienen un sabor astringente y sus aromas ya no son tan afrutados.

En la Figura 1 se muestra el proceso de vinificación. Como se puede observar, este depende del tipo de vino a elaborar, aunque existen algunas etapas comunes.

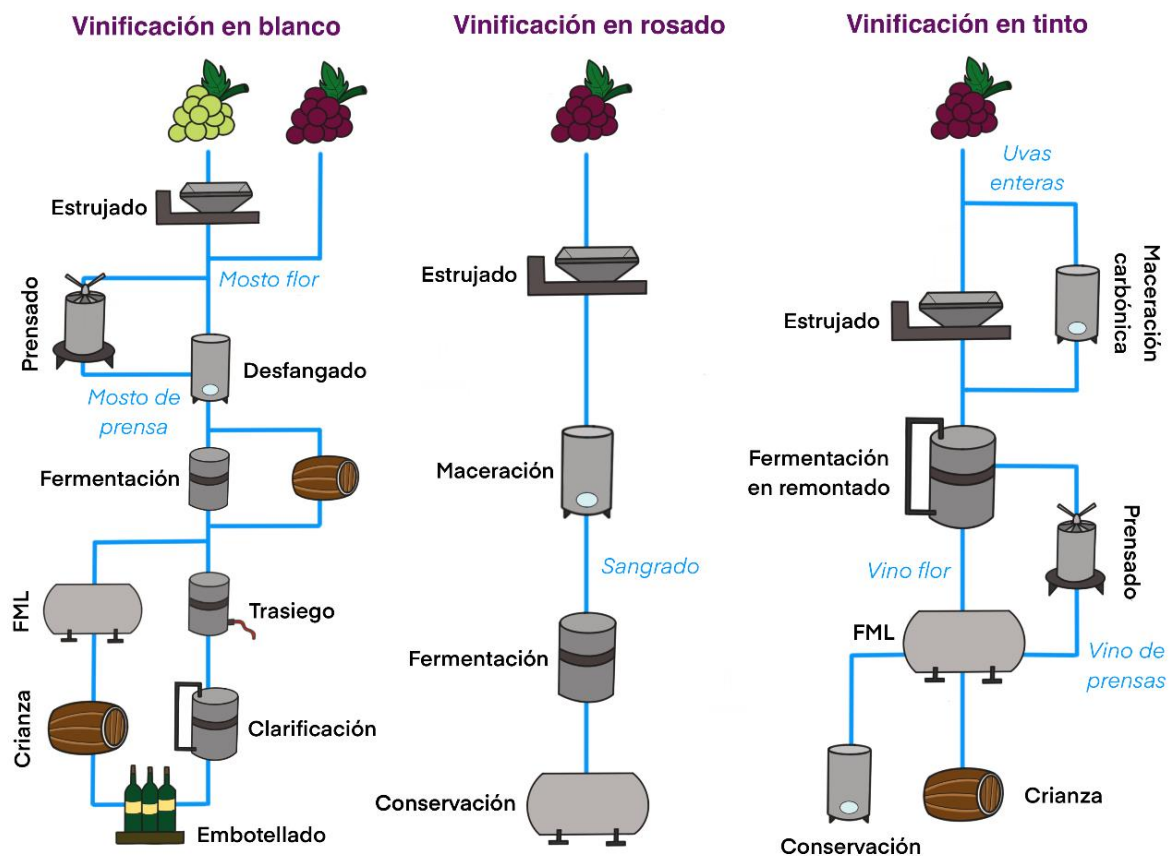


Figura 1. Diagrama de flujo de los procesos de vinificación en blanco, rosado y tinto.

En general, la vinificación comienza con la selección de las uvas en base a su estado, tamaño y color, proceso que puede realizarse de forma manual y/o automática. La calidad físico-química de las uvas seleccionadas se asegura mediante diferentes pruebas (comprobación de acidez, cantidad de sólidos solubles, contenido fenólico, etc). Después, las uvas pasan a ser despalilladas y trituradas para obtener el zumo. Durante el despalillado se elimina todo el material que no es fruto (racimos, tallos y hojas).

Tras el triturado, el zumo se mantiene un tiempo en presencia de los hollejos. Dependiendo del tiempo, la temperatura y las características de cada tipo de uva, los compuestos que se extraen durante este proceso varían. En el caso de vinos blancos, la maceración es reducida al mínimo, ya que, como se ha indicado anteriormente, interesa mantener sus características afrutadas y su coloración pálida. En los vinos rosados, la maceración es corta y se realiza en condiciones anaerobias, limitando la extracción de taninos y antocianos y su oxidación. Se obtiene una coloración rosada, pero sin aumentar la astringencia y manteniendo los atributos de frescor característicos de los vinos blancos. Por último, los vinos tintos suelen extender el tiempo de maceración, para aumentar la extracción de antocianinas y otros flavonoides, y para estabilizar el color. Durante este proceso los compuestos presentes interactúan entre sí, influyendo en las características organolépticas del vino final.

Una vez macerado o no, el mosto se separa de los hollejos y restos sólidos mediante el empleo de prensas. Las diferentes fracciones obtenidas tienen diferentes características: las primeras fracciones son más claras y turbias, mientras que las últimas son más pigmentadas y presentan mayor concentración de taninos. El exceso de sólidos suspendidos se elimina mediante la clarificación.

Después, el vino sufre el proceso más relevante de la vinificación: la fermentación alcohólica. Durante este proceso, las levaduras (normalmente *Saccharomyces cerevisiae*) transforman la glucosa del mosto en alcohol y dióxido de carbono para obtener energía. Durante este proceso también se consumen otros compuestos (como aminoácidos o minerales) y se generan metabolitos secundarios como, por ejemplo, ésteres, aldehídos o ácidos orgánicos. A pesar de las bajas concentraciones de muchos de ellos, su presencia es de gran importancia para la calidad organoléptica del vino, ya que afectan a la formación y estabilización del flavor.

La fermentación alcohólica puede producirse de forma espontánea debido a las levaduras presentes en el mosto (ya que las levaduras se encuentran de forma natural en el suelo de los viñedos y en la piel de las uvas), o de forma controlada mediante inoculación. Las fermentaciones espontáneas ayudan a acentuar los atributos varietales, pero, generalmente, y debido a la diversidad de especies presentes y al desconocimiento de la cantidad, calidad y estado de las levaduras procedentes del mosto, suele preferirse la segunda opción. De esta forma el bodeguero puede realizar una fermentación más controlada, en la que se disminuye la actividad microbiana y la oxidación del mosto. Así, se obtienen unos atributos de flavor y de calidad predecibles mediante el empleo de la cepa de levadura preferida, que poseerá sus propiedades, modo de reproducción y forma de transformar el azúcar características. En

cualquier caso, la fermentación alcohólica termina cuando prácticamente todo el azúcar presente en el mosto ha sido convertido en etanol y tan solo queda una pequeña cantidad de azúcar sin transformar, denominado azúcar residual. La vigilancia de la fermentación es crucial, y se realiza mediante el control de la densidad (relacionada con la concentración de azúcar en el mosto) y la temperatura (para asegurar la supervivencia de las levaduras).

Tras esta fermentación, los vinos tintos y algunos blancos sufren una segunda: la fermentación maloláctica. Durante este proceso, las bacterias ácido-lácticas, principalmente *Oenococcus oeni* (debido a su mayor tolerancia al alcohol, a las bajas temperaturas y a la presencia de dióxido de azufre frente al resto de bacterias ácido-lácticas), transforman el ácido málico (dicarboxílico) en ácido láctico (monocarboxílico). Así, se reduce la acidez del vino, obteniéndose un sabor menos agresivo y más suave al paladar. Además, se aumenta la estabilidad microbiana y se modifican los atributos sensoriales. Estas modificaciones están afectadas por la temperatura, el pH, los compuestos químicos presentes según la variedad de uva y a la cepa de bacterias empleada.

Por último, se procede a la maduración y clarificación del vino, para obtener un vino terminado y estable antes de su embotellado. Dependiendo del tipo de vino, se procederá a su comercialización o a su envejecimiento en bodega [1,2,4,5,7,8,10]. En base a dicho envejecimiento se diferencian diferentes elaboraciones. A continuación, se describen los tipos de elaboraciones analizados a lo largo de esta memoria, según las características detalladas por la DO “Ribera del Guadiana” [11]. Hay que tener en cuenta que el tiempo de envejecimiento comienza a computar a partir del 1 de octubre correspondiente a cada vendimia:

- Vinos jóvenes: vinos que no han pasado tiempo en bodega. Están indicados para ser consumidos durante los 12 – 18 meses siguientes a su elaboración.
- Vinos roble: vinos tintos que han sufrido un proceso de envejecimiento de 90 días, de los que al menos 60 deberán haber sido en bodegas de madera de roble, con una capacidad máxima de 600 litros.
- Vinos crianza: vinos que han sufrido un envejecimiento de al menos 6 meses en bodegas de madera de roble, con una capacidad máxima de 330 litros. En el caso de los vinos blancos, el periodo de envejecimiento total no podrá ser inferior a 18 meses; mientras que, en el caso de los tintos, el envejecimiento total debe ser de un mínimo de 24 meses.

1.1.1. Importancia socio-económica del vino

El vino es un producto con una gran importancia socio-económica en el mundo [1,6,12]. En particular, Europa posee casi el 50% de la superficie total de viñedos, y dentro de ella, España posee la mayor extensión de superficie dedicada a este cultivo (aproximadamente el 26%), seguida por Francia e Italia [13]. Este hecho se debe a las condiciones climáticas del sur de Europa, que son las idóneas para el crecimiento de las vides [1,12]. Respecto a la producción, Europa genera casi el 67% del vino mundial, siendo el 23% del mismo de origen español [13].

En Extremadura, el cultivo de vides para producir vino goza de gran importancia, tanto por extensión de cultivo como por su valor socio-económico. En 2018, Extremadura fue la segunda comunidad con mayor extensión de cultivo dedicado a la viticultura, con un total de 83763 hectáreas [14]. Respecto a la producción, en la campaña 2019/2020, Extremadura fue la tercera comunidad con mayor producción (8%), solo superada por Castilla-La Mancha (54%) y Cataluña (9%) [15].

La historia del cultivo de la vid en Extremadura se remonta a la antigüedad, habiéndose encontrado varios vestigios históricos a lo largo de los siglos, entre los que destaca el tratado más antiguo de viticultura (1520, Monasterio de Guadalupe, Cáceres). Sin embargo, hasta el siglo XIX los vinos extremeños no empezaron a ser reconocidos fuera de la comunidad. A lo largo del siguiente siglo, la superficie de cultivo dedicada al viñedo sufrió muchas modificaciones, ya que se sucedieron varias plagas y se pusieron en marcha algunos programas que favorecían el abandono del cultivo. Sin embargo, con el paso del tiempo, la viticultura fue ganando importancia, y hacia finales del siglo XX se inició un proceso de reestructuración tanto de viñedos como de la industria, ampliando el número de variedades de uvas empleadas, así como la superficie y las zonas de cultivo. Desde el gobierno europeo se establecieron ciertas reglamentaciones y normativas con el objetivo de fomentar una producción eficiente de vinos de calidad, lo que provocó una remodelación de la viticultura extremeña. Como fruto de este hecho nació un movimiento cooperativo que cambió el concepto de bodega e introdujo nuevas técnicas enológicas, apostando por la calidad frente a la cantidad.

Como consecuencia de esta mejora de los vinos, se crearon diferentes sellos para proteger los productos obtenidos y ayudar a los productores con su distribución y comercialización. De ellos, los más importantes son la Indicación Geográfica Protegida (IGP) “Vino de la Tierra de Extremadura” y la Denominación de Origen (DO) “Ribera del Guadiana” (que representan un 14% y 2.5% de la producción total de vino en 2015 en España, respectivamente) [16,17].

- IGP “Vino de la Tierra de Extremadura”. Fue aprobada en 1999 por la Junta de Extremadura. Este sello pretende poner en valor aquellos vinos elaborados íntegramente con uvas producidas en la región, con objeto de ayudar a los productores a certificar la calidad de sus vinos, y a los consumidores a identificarlos [18]. En la Figura 2 se muestra su sello.



Figura 2. Sello de la IGP “Vino de la Tierra de Extremadura”.

- DO “Ribera del Guadiana”. Se creó en 1996 con el objetivo de defender el sector vinícola en Extremadura, agrupando seis subzonas de producción (Cañamero, Montánchez, Matanegra, Ribera Alta y Ribera Baja del Guadiana y Tierra de Barros). Bajo este sello (Figura 3) se agrupan diferentes bodegas que comercializan vinos con cualidades diferenciales correspondientes al medio natural, así como a su elaboración y crianza. Además, la DO está acreditada por ENAC como [11]:
 - Entidad Certificadora de Vinos de Calidad según la Norma 17065 (2013).
 - Laboratorio de Ensayo Organoléptico UNE (2015).



Figura 3. Sello de la DO “Ribera del Guadiana”.

Para poder ampararse bajo estos sellos, las bodegas deben cumplir los diferentes requisitos que se detallan en los correspondientes pliegos de condiciones. En ellos, se definen las características que deben cumplir los diferentes tipos de vino, tanto analíticas (grado alcohólico, acidez total o cantidad total de sulfuroso, por ejemplo) como organolépticas (tonalidad, aroma o persistencia, entre otras). Además, también se describen las prácticas enológicas permitidas para la obtención y envejecimiento de cada tipo de vino. Las características del embotellado, cierre y etiquetado de las botellas también están reguladas en ambos pliegos.

1.2. La cerveza

La cerveza es la bebida obtenida tras la fermentación alcohólica de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otras fuentes de almidón, al que se adiciona lúpulo y/o derivados, y se le somete a un proceso de cocción. Como resultado de este proceso, los azúcares presentes son transformados en etanol y dióxido de carbono por los microorganismos presentes [2].

Las materias primas necesarias para elaborar cerveza son, por tanto, malta de cebada, agua, lúpulo y levadura. Estos ingredientes son los más empleados y, por ejemplo, en Alemania, son los únicos permitidos a sus productores, siguiendo la ley de la pureza bávara o *Reinheitsgebot*, que data de 1516. En otros países, España incluido, los productores tienen cierta flexibilidad para incluir ligeras modificaciones en la lista de ingredientes (por ejemplo, uso de otras fuentes de almidón como trigo o maíz, o adición de saborizantes como granos de café) o en los pasos del proceso de elaboración, de forma que puedan obtener cervezas con características diferenciales [1,19,20].

Las etapas básicas del proceso de elaboración de la cerveza son [19–21] (Figura 4):

- Elaboración de la malta o malteado. Se denomina malta a los granos de cereal germinados y tostados de forma controlada. Durante su elaboración se activan las enzimas presentes en los granos de cereal y se hidroliza el almidón. Los granos de cereal (normalmente, cebada) se limpian y se colocan en silos para ser germinados de forma controlada. Para ello, se humedece el grano (aproximadamente hasta un 45% de humedad) y se mantiene un tiempo establecido a temperatura controlada. Después, comienza la germinación, que dura varios días, también a temperatura controlada. Esta malta germinada o verde se seca y se torrefacta. La temperatura empleada y grado de torrefacción afectará al color de la malta, lo que repercutirá en el color y en el sabor de la bebida final.
- Obtención del mosto. Una vez obtenida la malta, esta se muele y se extrae con agua, durante un tiempo y a una temperatura controlada, obteniéndose el llamado mosto dulce, donde se encuentran los azúcares procedentes del almidón y los compuestos nitrogenados solubles. El mosto dulce es filtrado y se le adiciona el lúpulo y los otros posibles saborizantes para comenzar la cocción. Durante este proceso se consigue la esterilización del mosto, la coagulación de las proteínas y la evaporación de los aromas

indeseables. Igualmente, se van generando ciertos compuestos responsables del sabor y el aroma. Tras la misma, el mosto cocido es clarificado, enfriado y aireado.

- **Fermentación y maduración.** La levadura es inoculada para transformar los azúcares ya libres en etanol y dióxido de carbono, generándose simultáneamente otros compuestos que contribuyen al aroma y sabor de la cerveza. La “cerveza verde” obtenida tras este proceso necesita una etapa de maduración para estabilizar su sabor y aroma y decantar los precipitados antes de ser apta para el consumo. Después, se ajusta la carbonatación, se envasa y almacena.

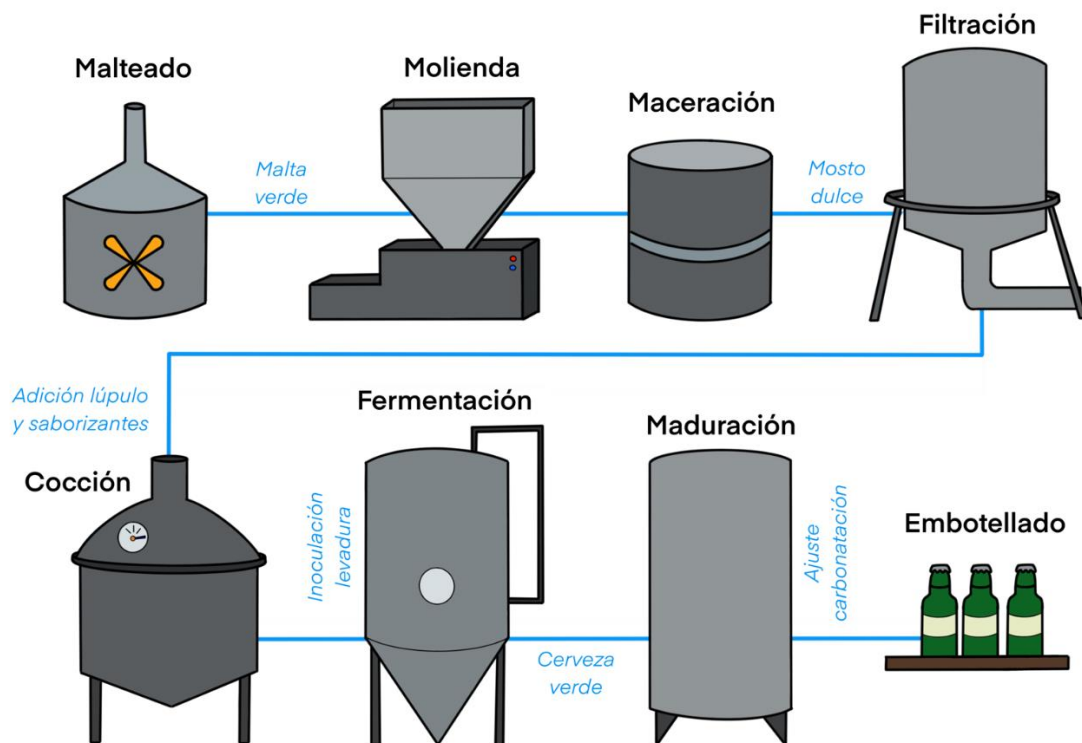


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la cerveza.

La clasificación de las cervezas se realiza en base al tipo de fermentación que sufren. Existen decenas de tipos diferentes de cervezas, pero los más importantes son [1,21,22]:

- **Cervezas tipo *lager* o de fermentación baja.** Se trata de la familia de cervezas más consumida a nivel mundial. La palabra *lager* significa almacenaje, y hace referencia a que este tipo de cervezas se maduran a baja temperatura tras la fermentación. Además, durante el proceso fermentativo, la temperatura también es baja (6 – 15°C). Las levaduras empleadas suelen ser híbridos de *Saccharomyces*, y tienden a precipitar en el fondo del mosto. Se diferencian dos tipos principales: *pale* (fabricadas con maltas claras

y aromatizadas con lúpulo) y *dark* (fabricadas con maltas oscuras, a veces ligeramente dulces, y más fuertes que las *pale*). En general, las cervezas *lager* enfatizan el sabor de las materias primas, teniendo un olor dulzón procedente de la malta y un sabor fresco correspondiente al lúpulo.

- Cervezas tipo *ale* o de fermentación alta. Cervezas fermentadas a temperaturas más altas (15 – 24°C) que las cervezas tipo *lager*. La levadura empleada es normalmente *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta en la superficie del mosto y genera espuma. El sabor de las cervezas *ale* es afrutado, ya que predominan los ésteres y otros compuestos secundarios de flavor y aroma. Dentro de este grupo se encuadran muchos subtipos: *pale*, *bitter* (más amargas), *brown* (amargas, con un toque dulce y color intenso) o *stout* (las más oscuras), entre otros.
- Cervezas tipo *lambic* o de fermentación espontánea. Proceden de Bruselas y se caracterizan por su sabor ácido y poco amargo, debido al empleo de lúpulos envejecidos.

1.2.1. Importancia socio-económica de la cerveza

La cerveza es la bebida fermentada más antigua, y se trata de la bebida alcohólica más importante a nivel mundial, siendo la tercera bebida más popular, solo por detrás del agua y el té [2].

Europa es el segundo productor de cerveza en el mundo, con un total de más de 405 millones de hectolitros producidos en 2018. Dentro de Europa, la elaboración de cerveza está más extendida en los países del norte, debido a que sus condiciones climáticas más frías han impedido el desarrollo de la viticultura. Aun así, España es un país muy cervecero, siendo el cuarto productor a nivel europeo en 2017, y el séptimo país a nivel europeo en número de cervecerías en 2018. Respecto al consumo, España ocupa el segundo puesto dentro de los países europeos. Además, desde el año 2013, se ha ido produciendo un aumento progresivo tanto del volumen de cerveza producida como del número de fábricas y empresas dedicadas a su elaboración [1,23–25].

La Asociación de Cerveceros de España divide al país en cuatro zonas diferentes. Extremadura forma parte de dos de ellas: Badajoz pertenece a la zona 3 (zona sur), mientras que Cáceres pertenece a la zona 4 (zona centro). En su informe de 2019, ambas zonas encabezaban

las ventas a nivel nacional, sumando un 45.3% de las ventas totales, lo que da a entender la importancia de esta bebida en dichas zonas [26].

Sin embargo, a pesar de la notable implantación de la cerveza en el mercado, no existen sellos que diferencien la calidad de la cerveza, ya que a esta bebida le afecta más el proceso de elaboración que el origen de sus ingredientes. A pesar de ello, se recogen en el Código de la Cerveza las principales disposiciones sobre este aspecto, que son especialmente importantes en el subsector de la cerveza artesanal [27].

No existe una definición única para la cerveza artesanal ni especificaciones de las condiciones en las que debe producirse para que sea así considerada, ya que varían en cada país. En España, el Boletín Oficial del Estado la define como aquella cerveza cuyo proceso de elaboración sigue la norma de calidad, y se produce completamente en la misma instalación, bajo la dirección de un maestro cervecero o artesano con experiencia demostrable, y primando el factor humano sobre el mecánico, obteniéndose así un resultado final individualizado, no producido en grandes series y que sigue la legislación aplicable en materia de artesanía [27]. Sin embargo, esta definición es muy amplia y no establece la producción total que pueden obtener las empresas ni la independencia de grandes grupos cerveceros, como sí que lo hace la legislación de otros países. Por ello, en 2014 se fundó la AECAI (Asociación Española de Cerveceros Artesanos Independientes), con los objetivos de definir y regular el sector de la cerveza artesana, así como promocionar la calidad, cultura y variedad de la misma, defendiendo los intereses comunes del sector. Las empresas miembros de esta asociación pueden incluir el sello de la misma (Figura 5) en sus etiquetas, establecimientos y webs, con el objetivo de que el consumidor sea consciente de la garantía de fabricación artesanal e independencia de los grandes grupos industriales y transnacionales [28]. En el caso de Extremadura, 5 de las 7 empresas cerveceras de la Comunidad están asociadas a la AECAI, lo cual demuestra la importancia que se le da en la región a la cerveza artesana [26].



Figura 5. Sello de la Asociación Española de Cerveceros Artesanos Independientes.

2. ANALITOS EN ESTUDIO

Tanto el vino como la cerveza son matrices muy complejas en las que existen una gran cantidad de compuestos. Entre estos compuestos hay algunos que pueden llegar a afectar de forma negativa tanto a los atributos sensoriales como a la salud de los consumidores, y pueden proceder tanto de las materias primas como formarse durante las diferentes etapas del proceso de elaboración [29]. Además, no siempre se trata de compuestos mayoritarios, sino que pueden encontrarse en bajas concentraciones, como es el caso de los analitos en estudio en esta memoria: compuestos dicarbonílicos (en concreto, glioxal y metilglioxal), aminas biógenas y aminoácidos.

2.1. Compuestos dicarbonílicos: glioxal y metilglioxal

Los compuestos α -dicarbonílicos son una familia de compuestos orgánicos que presentan dos grupos carbonilo en posición alfa. Su presencia en matrices alimentarias, especialmente en productos fermentados como vino y cerveza, ha sido ampliamente estudiada [30–34], ya que se relacionan con una gran diversidad de descriptores olfativos, tales como vainilla, mantequilla, patata, frutas cítricas o aceite rancio, entre otros. Además, aunque su concentración es normalmente baja, pueden llegar a afectar (de forma generalmente desagradable) al sabor, debido a su bajo umbral de detección [32,33,35,36]. Sin embargo, pequeñas concentraciones de los mismos también pueden ayudar a mejorar las características de los productos, debido a la generación de compuestos coloreados [34].

Glioxal (GL) y metilglioxal (MGL) son los representantes más pequeños de este grupo de compuestos. Debido a sus características estructurales (Figura 6), se tratan de compuestos de bajo peso molecular y con alta polaridad [37]. Son compuestos muy reactivos que se forman de manera endógena en muchas reacciones, tanto enzimáticas como no enzimáticas. Además, también pueden ser producidos durante los procesos de fermentación. Por ejemplo, en el caso del vino, *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni* los sintetizan durante los procesos de fermentación alcohólica y maloláctica, respectivamente [30,38–41]. Su concentración en vinos dulces puede alcanzar hasta los 20 mg/L, mientras que en cervezas puede llegar hasta 1 mg/L [39].

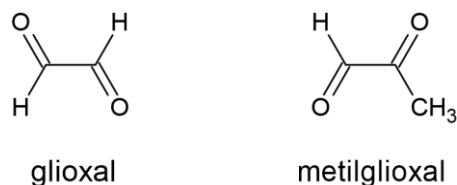


Figura 6. Estructuras químicas de glioxal (GL) y metilglioxal (MGL).

Respecto a su presencia en el vino, los compuestos dicarbonílicos aparecen en todos los tipos de vino, pero especialmente en los tintos tras el proceso de fermentación maloláctica [38–40]. Su concentración no solo varía durante esta etapa, sino también durante el proceso de maduración [30]. De entre ellos, tanto glioxal como metilglioxal forman parte de los compuestos dicarbonílicos más comúnmente encontrados [40,42]. Su importancia en enología se debe a su impacto sensorial (mediante el aumento de la complejidad del aroma), su reactividad con otros compuestos y sus posibles efectos microbiológicos [38,40,41,43]. Además de los procesos fermentativos, los compuestos dicarbonílicos pueden formarse por otras reacciones como la peroxidación de lípidos, la glicólisis, la reacción de Maillard o la degradación de Strecker [30–32,44,45]. Aunque su contribución en el vino fresco es apenas perceptible, estas reacciones pueden ocurrir durante el almacenamiento, llegando a generar una cantidad de compuestos dicarbonílicos que podría deteriorar el vino. Por otro lado, la cuantificación de ciertos compuestos dicarbonílicos puede emplearse para comprobar si los procesos fermentativos se han completado y si lo han hecho de forma adecuada [32,38].

En la cerveza, los compuestos dicarbonílicos pueden proceder tanto de las materias primas (aunque no se conoce cuál es exactamente su prevalencia en la malta) como de precursores que aparezcan en éstas y los generen durante las distintas etapas del proceso de elaboración, como el malteado, la cocción, la fermentación o la maceración [36,46]. Al igual que en los vinos, también pueden proceder de otros procesos aparte del fermentativo, como la reacción de Maillard. Esta reacción es especialmente importante en cerveza ya que se relaciona directamente con su calidad organoléptica (color, sabor y olor), y puede provocar diferentes cambios durante los procesos de almacenaje y transporte, representando uno de los mayores problemas de la postproducción, ya que estas reacciones de degradación, aunque se favorecen con incrementos de temperatura, también pueden originarse en condiciones suaves. Por otro lado, los compuestos dicarbonílicos también están relacionados con la degradación de los azúcares, que también inducen el deterioro del sabor de las cervezas [40,47–50].

Por último, la presencia de estos compuestos es también importante en vino y cerveza debido a su posible reacción con el dióxido de azufre liberado durante los procesos de fermentación, dando lugar a aductos que pueden llegar a degradarse con el paso del tiempo, resultando en un importante deterioro de las características sensoriales del producto [36]. Además, algunos autores han sugerido que algunos de estos aductos pueden influir en el desarrollo de olores a rancio [35].

En lo que respecta a la formación endógena de los compuestos dicarbonílicos, esta ocurre en condiciones fisiológicas y como respuesta a diferentes alteraciones en el metabolismo celular (diabetes, hiperglucemias, lipólisis, etc), así como por la ineficiencia de los sistemas que lidian con ellos. Aunque el cuerpo humano tiene mecanismos para combatir estos compuestos, la ingesta de compuestos carbonílicos en la dieta puede tener efectos adversos. El glioxal presenta citotoxicidad en concentraciones entre 1 – 10 mM, dando lugar a alteraciones celulares relacionadas con la inhibición de ADN o la cadena respiratoria. Por otro lado, el metilglioxal, aunque inocuo a bajas concentraciones, en concentraciones superiores a 1 mM ha demostrado inducir respuesta inflamatoria, y hasta apoptosis, en cierto tipo de células, además de ser tóxico para las bacterias, pudiendo modificar el balance de la microflora intestinal o afectar la fisiología de células eucariotas. El metilglioxal es uno de los responsables de la intolerancia a la lactosa y el síndrome de colon irritable. La citotoxicidad de estos compuestos depende en gran medida de la digestión, y aunque no suelen alcanzarse concentraciones tóxicas con la comida, es importante conocer su presencia y sus efectos [39,42].

Además, debido a su alta reactividad, glioxal y metilglioxal pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, induciendo mutaciones y produciendo ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés "*Reactive Oxigene Species*"), RCS (especies reactivas de carbono, por sus siglas en inglés "*Reactive Carbonyl Species*") y AGEs (productos de glicación avanzada, por sus siglas en inglés "*Advanced Glycation End products*"). ROS y RCS reaccionan con diferentes componentes celulares dando lugar finalmente a AGEs, que se relacionan con el deterioro de tejidos y el fallo orgánico. Además, los AGEs son conocidos por contribuir al desarrollo de la diabetes, por promover el estrés oxidativo y por causar cambios morfológicos y funcionales irreversibles en diferentes estructuras biológicas, así como por provocar cambios en los sistemas de defensa antioxidante y afectar a las rutas metabólicas, teniendo una gran importancia en enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, como Parkinson o Alzheimer [31,38,39,41,44,51]. Por su parte, el metilglioxal también funciona como un inhibidor del

crecimiento celular, especialmente de aquellas células con un rápido crecimiento, por lo que algunos autores consideran que podría llegar a emplearse como un agente anticancerígeno [31].

2.1.1. Antecedentes bibliográficos de la determinación de compuestos dicarbonílicos

Debido al gran volumen de artículos publicados, la revisión bibliográfica de los métodos empleados para la determinación de GL y MGL se ha centrado en la última década. La revisión se ha enfocado en aquellos métodos en los que GL y/o MGL son los analitos a determinar, obviando aquellos en los que los mismos se emplean para la determinación de otros compuestos o para comprobar el efecto de otros compuestos sobre la actividad antimicrobiana, antibacteriana, antiglicación o antioxidación. Además, a pesar de que estos analitos también están presentes en muestras medioambientales y biológicas, la búsqueda se ha dirigido a muestras alimentarias, teniendo en cuenta el interés agroalimentario de esta Tesis Doctoral.

Técnicas separativas

En general, casi todos los métodos empleados para la determinación de GL y/o MGL en muestras alimentarias emplean técnicas separativas, principalmente cromatográficas, y, en concreto, cromatografía líquida.

- *Cromatografía de líquidos*

La cromatografía de líquidos (LC, por sus siglas en inglés "*Liquid Chromatography*") es la técnica preferida para la determinación de GL y/o MGL en muestras alimentarias, tanto en modalidad normal (HPLC, cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés "*High Performance Liquid Chromatography*") como en modalidad de ultra-alta resolución (UPLC, cromatografía líquida de ultra-alta resolución, por sus siglas en inglés "*Ultra-high Performance Liquid Chromatography*"). Los métodos encontrados se resumen en la Tabla 1.

Como se puede comprobar, los detectores más empleados son el detector de arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés "*Diode Array Detector*") y el detector de masas (MS, por sus siglas en inglés "*Mass Spectrometry*"), aunque existen algunos métodos que emplean detección fluorescente (FD, por sus siglas en inglés "*Fluorescence Detector*"). Las columnas empleadas son apolares (normalmente C18), y las fases móviles suelen ser mezclas binarias de

MeOH o ACN con ácidos diluidos (principalmente ácido fórmico) o tampones (normalmente acetato o fosfato). Es común que la fase orgánica esté también acidificada. Generalmente, la elución se realiza en gradiente, aunque varios métodos emplean la elución isocrática.

Respecto al tratamiento necesario para la determinación de los analitos, éstos tuvieron que ser siempre derivatizados para mejorar sus propiedades de detección, ya que, debido a su estructura, no presentan absorción a longitudes de onda adecuadas ni fluorescencia nativa. El reactivo derivatizante por defecto es *o*-fenilendiamina (OPD), que se ha empleado en más del 80% de los métodos encontrados. A pesar de ello, se han empleado una gran variedad de derivatizantes como, por ejemplo, 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina (TRI), sulfato de 5,6-diamino-2,4-hidroxipirimidina (DPP) o 1,2-diaminobenceno (1,2-DAB). Todos estos reactivos derivatizantes poseen una característica común y es que poseen en su estructura dos grupos amino contiguos.

Por último, las matrices analizadas son muy dispares, encontrándose, por ejemplo, muestras de miel y siropes, así como cacao, galletas, frutas y snacks. También se han analizado muestras de vino, cerveza, café, zumos y leche. Por último, también hay varios métodos que han determinado las concentraciones de GL y MGL en diferentes sistemas modelos (formulaciones con características similares o procesadas de la misma forma que distintos alimentos) y tras la digestión *in vitro* de varios alimentos.

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL y MGL	Galletas	HPLC-DAD Isocrático	ACEC18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) HAc aq. (0.5%):MeOH (40:60)	OPD	[52]
MGL	Miel	HPLC-MS Gradiente	Thermo Electron Hypersil Gold (50 x 2.1 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.15%) B: ACN	OPD	[53]
		HPLC-DAD Gradiente	Phenomenex C18 (150 x 4.6 mm; 3 µm) A: HAc aq. (0.15%) B: ACN		

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL, MGL y otro	Varios alimentos y bebidas	HPLC-DAD Isocrático	Zorbax 300 SB-C18 (150 x 4.6 mm) MeOH:H ₂ O:ACN (42:56:2)	NPDA	[54]
MGL	Café	HPLC-DAD Isocrático	Nova-Pak C18 Tampón fosfato (50 mM; pH 4.5):ACN:H ₂ O (8:14:78)	OPD	[55]
GL, MGL y otro	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Phenomenex Luna C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.1%) B: MeOH	OPD	[56]
MGL	Patatas fritas	HPLC-DAD Isocrático	Shimadzu C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) MeOH:H ₂ O (68:32)	OPD	[57]
MGL y otro	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Eurospher 100 RP18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.075%) B: MeOH:A (80:20)	OPD	[58]
GL, MGL y otros	Varios alimentos	HPLC- DAD/MS Gradiente	Prontosil 60 Phenyl (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.075%) B: MeOH:A (80:20)	OPD	[59]
GL, MGL y otros	Sirope de maíz	HPLC- DAD/MS Gradiente	Acquity UPLC BEH (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: Formiato de amonio (5 mM, pH 3.0) B: MeOH	OPD	[60]
MGL	Miel	HPLC-DAD Gradiente	LiChroCART 125-4 Purospher RP-18 (5 µm) A: HAc aq. (0.1%) B: MeOH	OPD	[61]
MGL	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Synergi Fusion (75 x 4.6 mm; 4 µm) A: H ₂ O:ACN (70:30) B: ACN	PFBHA	[62]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL, MGL y otro	Agua (post digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: HAc aq. (0.1%)	OPD	[63]
GL, MGL y otros	Vinagre balsámico	HPLC- DAD/MS Gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: HFo aq. (0.1%)	OPD	[39]
GL, MGL y otros	Leche	HPLC-MS Gradiente	Acquity UPLC BEH (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: Acetato de amonio (1 mM; pH 5) B: MeOH	OPD	[64]
GL, MGL y otros	Bebidas	HPLC-DAD Gradiente	Nucleosil EC (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: MeOH	OPD	[65]
GL, MGL y otro	Vinagre balsámico (pre y post digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Gemini C18 (150 x 2.1 mm; 5 µm) A: HFo aq. (0.1%) B: MeOH	1,2-DAB	[66]
MGL y otros	Vino, té negro y salsa de soja	HPLC-DAD Isocrático	Gemini C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) ACN:Tampón acetato (0.02 M) (50:50)	OPD	[31]
MGL y otros	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Synergi Fusion (75 x 4.6 mm; 4 µm) A: H ₂ O:ACN (70:30) B: ACN	PFBHA	[67]
GL, MGL y otro	Sirope de agave	HPLC-FD Gradiente	Kinetex C18 (150 x 3 mm; 2.6 µm) A: H ₂ O B: ACN C: HAc 0.8% (TEA 0.6%; pH 4.3)	4-MPD	[68]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL, MGL y otros	Vino	HPLC-FD Gradiente	Poroshell 120 A: H ₃ PO ₄ (pH 3.2): MeOH (95:5) B: MeOH	DDP	[69]
GL, MGL y otros	Comida de bebés	HPLC-MS Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFO) B: MeOH (1% HFO)	OPD	[70]
GL y MGL	Masa frita	HPLC-DAD Isocrático	C18 Inertsil ODS-SP (250 x 4.6 mm; 5 µm) HAc aq. (0.5%):MeOH (40:60)	OPD	[71]
GL, MGL y otro	Miel	HPLC- DAD/MS Gradiente	Zorbax SB-C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: MeOH (0.15% HAc) B: MeOH (0.03% HAc)	OPD	[72]
GL, MGL y otros	Café y salsa de soja (pre y post digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Gemini C18 (150 x 2.1 mm; 5 µm) A: HFO aq. (0.1%) B: MeOH	1,2-DAB	[73]
GL, MGL y otros	Cerveza	HPLC-MS Isocrático	Eurospher-100 C18 (250 x 20 mm; 10 µm) H ₂ O:[H ₂ O:MeOH; 70:30] (65:35) (HFBA 0.6 mL/L)	OPD	[48]
GL y MGL	Salsa de pescado	HPLC-FD Isocrático	Zorbax XDB-C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) Tampón citrato (pH 6):ACN (99:1)	DDP	[74]
GL, MGL y otros	Miel	HPLC- DAD/MS Gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 x 4.6 mm; 1.8 µm) A: HFO aq. (1%) + ACN (2%) B: ACN	OPD DDP TRI	[75]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
MGL	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Bio-Rad Bio-Sil ODS-5S (250 x 4 mm) A: HAc aq. (0.15%) B: MeOH:A (80:20)	OPD	[76]
GL, MGL y otros	Galletas (tras digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[77]
GL y MGL	Galletas	HPLC-DAD Isocrático	ACEC18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) HAc aq. (0.5%):MeOH (40:60)	OPD	[78]
GL, MGL y otro	Cacao	HPLC-MS Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[79]
GL, MGL y otro	Avellanas	HPLC-MS Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[80]
GL, MGL y otros	Aceite de pescado	HPLC-MS Gradiente	Zorbax 300SB-C18 (50 x 1 mm; 1.8 µm) A: H ₂ O (0.1% HFo) B: ACN (0.1% HFo)	DNPH	[81]
GL, MGL y otro	Galletas	HPLC-DAD Gradiente	Kinetex-Phenyl-Hexyl (100 x 2.6 mm; 4.6 µm) A: HAc (5 mL/L) B: MeOH	OPD	[82]
MGL	Sistema modelo glucosa- aminoácidos	HPLC-DAD Gradiente	Waters Atlantis T3 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: MeOH B: H ₂ O	OPD	[83]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
MGL	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Thermo Hypersil Gold C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.1%) B: MeOH	OPD	[84]
GL, MGL y otros	Abulón (molusco)	HPLC-DAD Gradiente	SunFire TM (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: MeOH B: H ₂ O	OPD	[85]
GL y MGL	Pasta	HPLC- DAD/MS Gradiente	Prontosil 60 Phenyl (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.075%) B: MeOH:A (80:20)	OPD	[86]
GL, MGL y otro	Galletas	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax SB-Aq (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.1%) B: MeOH	OPD	[87]
GL y MGL	Sistema modelo glicación DPPE (varios alimentos)	HPLC-MS Isocrático	Venusil ASB C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) H ₂ O:MeOH (85:15)	OPD	[88]
GL, MGL y otros	Zumo de manzana	UPCL-MS Gradiente	Cortects UPLC C18+ (50 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: H ₂ O (0.1 % HFO) B: MeOH (0.1% HFO)	OPD	[89]
MGL	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Eurospher 100 RP18 (250 x 4.6 mm; 5 mm) A: HAc aq. (0.075%) B: MeOH:A (80:20)	OPD	[90]
GL, MGL y otros	Varios alimentos	HPLC-DAD Gradiente	Shim-pack VP-ODS (250 x 4.6 mm; 4.6 µm) A: MeOH B: HAc aq. (1%)	DQB	[91]
GL, MGL y otros	Avellana	HPLC-MS Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFO) B: MeOH (1% HFO)	OPD	[92]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL	Vino y brócoli (post digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[93]
MGL y otro	Leche fermentada	HPLC-MS Gradiente	Polar-RP 80A (150 x 2 mm; 4 µm) A: HFo aq. (1%) B: MeOH	OPD	[94]
GL y MGL	Té negro	HPLC-MS Gradiente	Waters X-Bridge C18 (50 x 2.1 mm; 3.5 µm) A: MeOH B: HFo aq. (0.1%)	OPD	[95]
GL y MGL	Semillas de camelia	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax SB-Aq (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.1%) B: MeOH	OPD	[96]
GL, MGL y otros	Zumo de naranja	UPCL-MS Gradiente	Cortects UPLC C18+ (50 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: H ₂ O (0.1% HFo) B: MeOH (0.1% HFo)	OPD	[97]
GL, MGL y otro	Sistema modelo de azúcares y lípidos	HPLC-MS Gradiente	Zorbax SB-Aq C18 (100 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (0.1% HFo) B: MeOH (0.1% HFo)	OPD	[98]
GL, MGL y otros	Leche	HPLC- DAD/MS Gradiente	Waters BEH Phenyl (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: HFo aq. (0.2%) B: MeOH	OPD	[99]
GL y MGL	Sistema modelo de carbohidratos	UPLC-DAD Gradiente	Acquity UPLC BEH (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: HFo aq. (0.2%) B: MeOH	OPD	[100]
GL, MGL y otro	Fruta seca y semillas	UPLC-MS Gradiente	Accucore C18 (100 x 2.1 mm; 2.6 µm) A: H ₂ O (0.1% HFo) B: ACN (0.1% HFo)	OPD	[101]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL y MGL	Snacks, galletas y cereales	HPLC-DAD Isocrático	Inertsil ODS-3 (250 x 4.6 mm; 5 µm) MeOH:H ₂ O:ACN (42:56:2)	NPDA	[102]
MGL	Varios alimentos (tras digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Merck Purospher Star RP-18e A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[103]
GL, MGL y otros	Pan	HPLC-MS Gradiente	Merck Purospher Star (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[104]
GL, MGL y otros	Zumos, purés y concentrados de frutas y frutas secas	UPLC-MS Gradiente	Acquity UPLC BEH C18 A: H ₂ O (1% HFo) B: ACN (1% HFo)	OPD	[105]
GL, MGL y otros	Zumos de fruta	HPLC-MS Gradiente	Merck Purospher Star (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (1% HFo) B: MeOH (1% HFo)	OPD	[106]
GL, MGL y otros	Café	UPLC-MS Isocrático	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) H ₂ O:ACN (0.1% HFo) (90:10)	OPD	[107]
GL, MGL y otros	Cerveza y malta	HPLC- DAD/MS Gradiente	Prontosil 60 Phenyl (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: HAc aq. (0.075%) B: MeOH:A (80:20)	OPD	[46]
GL, MGL y otros	Leche	HPLC- DAD/MS Gradiente	Waters BEH Phenyl (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: HFo aq. (0.2%) B: MeOH	OPD	[108]
GL y MGL	Varios alimentos con alto contenido de azúcar	HPLC-DAD Isocrático	Inertsil ODS-3 MeOH:H ₂ O:ACN (42:56:2)	NPDA	[109]

Tabla 1. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
GL, MGL y otros	Sistema modelo de ribosa y glicina	HPLC- DAD/MS Gradiente	SunFire C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (0.1% HFo) B: MeOH (0.1% HFo)	OPD	[110]
GL, MGL y otros	Sistema modelo con alto contenido de azúcar	HPLC-MS Gradiente	Polar-RP 80A (150 x 2 mm; 4 µm) A: MeOH B: HFo aq. (0.1%)	OPD	[111]
GL, MGL y otro	Agua (tras digestión)	HPLC-DAD Gradiente	Phenomenex Kinetex C18 (75 mm; 2.6 µ) A: HAc aq. (0.1%) B: MeOH	OPD	[112]
MGL y otros	Miel	HPLC-DAD Gradiente	Hypersil Gold C18 (100 x 2.1 mm; 1.9 µm) A: HFo aq. (0.1%) B: ACN	PFBHA	[113]
GL y MGL	Salsas chinas	HPLC-DAD Gradiente	Phenomenex C18 (25 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: HAc aq. (0.3%)	OPD	[114]
GL, MGL y otro	Varios alimentos	UPLC-MS Gradiente	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: HFo (5 mM) B: ACN	OPD	[115]
GL y MGL	Sistema modelo de glucosa y cisteína	HPLC-DAD Gradiente	SunFire TM (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: MeOH	OPD	[116]
GL y MGL	Cacao	UPLC-MS Gradiente	Kinetex EVO C18 (150 x 2.1 mm; 2.6 µm) A: H ₂ O (0.1% HFo) B: MeOH (0.1% HFo)	OPD	[117]
GL, MGL y otros	Sistema modelo glucosa + ácido glutámico	HPLC-MS Gradiente	XBP C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O (0.5% HFo) B: MeOH (0.5% HFo)	OPD	[118]

- *Cromatografía de gases*

Los métodos que emplean cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés “*Gas Chromatography*”) se encuentran resumidos en la Tabla 2. Como se puede observar, son bastantes menos que por cromatografía de líquidos, y en general emplean detección de MS, aunque algunos detectan a los analitos mediante NPD (detector de nitrógeno/fósforo, por sus siglas en inglés “*Nitrogen Phosphorus Detector*”) o FID (detector de ionización de llama, por sus siglas en inglés “*Flame Ionization Detector*”). La elución de los analitos se realiza siempre utilizando un gradiente de temperatura, donde el gas portador suele ser helio, excepto un método que emplea nitrógeno [119]. En la mayoría de los métodos la fase estacionaria consiste en una columna de 30 m, con un diámetro interno de 0.25 μm .

Al igual que en el caso de la cromatografía líquida, los analitos necesitan un proceso de derivatización para mejorar las características para su determinación, con objeto de aumentar su estabilidad y disminuir su polaridad. Sin embargo, en el caso de la cromatografía de gases no parece haber un reactivo derivatizante predilecto. Entre los reactivos más empleados se encuentran OPD, 1,2-DAB o *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA), entre otros.

Por último, y de nuevo igual que en el caso de la cromatografía líquida, las muestras sobre las que se han aplicado estos métodos son muy variadas, siendo miel, alimentos fermentados, bebidas alcohólicas o conservas vegetales algunas de ellas.

Tabla 2. *Métodos de determinación de glioxal y metilglioxal mediante cromatografía de gases. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.*

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Gas portador	Derivatizante	Ref.
MGL	Miel	GC-NPD Gradiente	BPX-50 (30 m x 0.25 mm; 0.25 μm) Helio	1,2-DAB	[120]
GL, MGL y otros	Azúcar y sistemas de reacción de Maillard	GC-MS Gradiente	DB-WAX (30 m x 0.25 mm; 0.25 μm) Helio	OPD	[121]
GL, MGL y otros	Agua de bebida	GC-MS Gradiente	HP-5MS (30 m x 0.25 mm; 0.25 μm) Helio	PFBHA	[122]

Tabla 2. Métodos de determinación de glicoxal y metilglicoxal mediante cromatografía de gases. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Gas portador	Derivatizante	Ref.
GL, MGL y diacetilo	Bebidas alcohólicas	GC-NPD Gradiente	DB WAX (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm) Helio	OPD	[34]
GL, MGL y otros	Conservas vegetales	GC-MS Gradiente	HP-5MS (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm) Helio	PFBHA	[123]
GL y MGL	Varias bebidas (refrescos, zumos y tés)	GC-FID Gradiente	HP-5MS (30 m x 0.32 mm; 0.25 µm) Nitrógeno	1,2-DAB	[119]
GL, MGL y diacetilo	Queso	GC-MS Gradiente	RTx-5MS (30 m x 0.25 mm; 0.5 µm) Helio	1,2-DAB	[124]
GL, MGL y diacetilo	Jengibre rojo	GC-MS Gradiente	DB-WAX (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm) Helio	OPD	[125]
MGL	Miel	GC-MS Gradiente	BD-5MS (60 m x 0.32 mm; 1 µm) Helio	Sin derivatizar	[126]
GL y MGL	Bebidas alcohólicas y alimentos fermentados	GC-MS Gradiente	HP-InnoWax (60 m x 0.25 mm; 0.25 µm) Helio	TFEH	[127]
MGL y otros	Café	GC-NPD Gradiente	DB-WAX (30 m x 0.25 mm; 0.25 µm) Helio	OPD	[128]

- *Electroforesis capilar*

Los métodos que emplean electroforesis capilar (CE, por sus siglas en inglés “*Capillary Electrophoresis*”) para la determinación de GL y MGL en alimentos son muy escasos. Así, se puede citar a Baños y Silva [129] que emplearon la técnica de CZE (electroforesis capilar de zona, por sus siglas en inglés “*Capillary Zone Electrophoresis*”) con detección fluorescente inducida por láser (LIF, por sus siglas en inglés “*Laser Induced Fluorescence*”) para la determinación de varios aldehídos de bajo peso molecular (entre ellos GL y MGL) en aguas de bebida. Para ello, se procedió a la derivatización pre-columna de los analitos con fluoresceína 5-tiosemicarbazida. Con este método se obtuvieron LODs entre 0.15 – 0.35 µg/L, y valores de RSD que oscilaban entre el 5.2 y el 8.3%. Durante la aplicación a muestras reales de agua embotellada las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 99.1 y el 103.5%. Por otro lado, se ha encontrado un segundo método propuesto por Mirza y col. [30] que emplearon la técnica de MEKC (cromatografía micelar electrocinética, por sus siglas en inglés “*Micellar ElectroKinetic Chromatography*”) para la determinación de GL, MGL y otros compuestos en diferentes bebidas y alimentos tras la derivatización de los mismos con meso-estilbendiamina. La aplicación del método a muestras reales permitió la detección de concentraciones de analitos del orden de µg/mL, con buenos valores de RSD (entre 1.1 y 3.9%). Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 96.3 y el 98.5%.

Técnicas no separativas

En general, se han encontrado pocas referencias de métodos analíticos que empleen técnicas no separativas para la determinación de GL y MGL en matrices alimentarias. Estas se diferencian en técnicas electroquímicas y técnicas espectroscópicas.

- *Técnicas electroquímicas*

Se han encontrado tres métodos que emplean técnicas electroquímicas para la determinación de MGL en diferentes matrices alimentarias. En ninguno de estos métodos se ha determinado GL ni otros analitos dicarbonílicos. En el primer método, el grupo de Chatterjee y Chen [38] determinó MGL en vino y cerveza mediante el empleo de un electrodo de carbono vitrificado (GCE, por sus siglas en inglés “*Glassy Carbon Electrode*”), cuya superficie fue modificada por electrodeposición de nanopartículas de platino sobre nanotubos de carbono. Se empleó la modalidad de onda cuadrada, y se obtuvo un LOD de 2.8 nM y recuperaciones entre

el 95.04 y el 104.74%. Más adelante, en 2017, Alagappan y col. [130] fabricaron un biosensor con interfaz de óxido de vanadio (V) y glutatión para la determinación de MGL en muestras de arroz. Se empleó la modalidad de voltamperometría cíclica, obteniéndose dos picos de reducción bien definidos. El LOD obtenido fue de 2 nM, y el tiempo de respuesta fue inferior a 18 segundos. Por último, Jayaprakasan y col. [131] fabricaron un biosensor con interfaz de nanopartículas de óxido de zinc y enzima glioxalasa-1 sobre superficie de platino para la determinación de MGL en muestras de carne de pollo. Se empleó la modalidad de voltamperometría cíclica, y se obtuvieron recuperaciones entre el 99.3 y el 101.5%. La vida útil del biosensor es de 18 días.

- *Técnicas espectroscópicas*

Por último, se resumen los métodos encontrados que emplean técnicas espectroscópicas para la determinación de compuestos dicarbonílicos. Se han encontrado dos métodos que determinan MGL en muestras de miel mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). En el primero de ellos [53] obtuvieron los espectros de ^1H -RMN de las muestras de miel, obteniéndose la concentración de MGL total (formas mono- y di-hidratadas). Estos resultados se compararon con los obtenidos mediante cromatografía líquida, con detección ultravioleta y masas, obteniéndose valores similares, pero normalmente siempre menores en el caso de RMN frente a los métodos cromatográficos. Por otra parte, en el segundo método [132] también se obtuvo la concentración de MGL total, junto con la de otros compuestos aromáticos. Además, se estudió su posible capacidad antibacteriana.

Por otra parte, el grupo de Sultanbawa y col. [76] también determinó MGL y la actividad anti-bacteriana en miel, empleando la técnica de IR (espectroscopía de infrarrojos). Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos mediante cromatografía líquida, obteniendo una correlación aceptable entre ambas técnicas ($R^2 = 0.75$). Así, los autores sugieren que el empleo de IR puede llegar a ser una herramienta de predicción valiosa para la determinación de MGL en mieles.

2.2. Aminas biógenas

Las aminas biógenas (ABs) son bases nitrogenadas de bajo peso molecular en las que los hidrógenos amoniacales han sido reemplazados o sustituidos por radicales aromáticos o alifáticos, que se forman por la acción de organismos vivos. En la Figura 7 se muestran las estructuras de las ocho ABs analizadas en esta memoria. Las ABs se presentan de forma endógena en las plantas y se encuentran en frutas frescas y vegetales. Además, también pueden formarse durante diferentes procesos metabólicos, y se encuentran principalmente en aquellos alimentos que han pasado por algún proceso fermentativo. Su contenido total en vino y cerveza es muy variable, y puede oscilar entre niveles traza y 130 mg/L. Esta variabilidad está causada por varios factores que afectan directamente a la formación de las ABs, o indirectamente a las concentraciones de sus aminoácidos precursores. De entre todos ellos, los factores con más influencia son las materias primas empleadas, la concentración de compuestos nitrogenados en el mosto y las prácticas de elaboración llevadas a cabo [6,29,133–138].

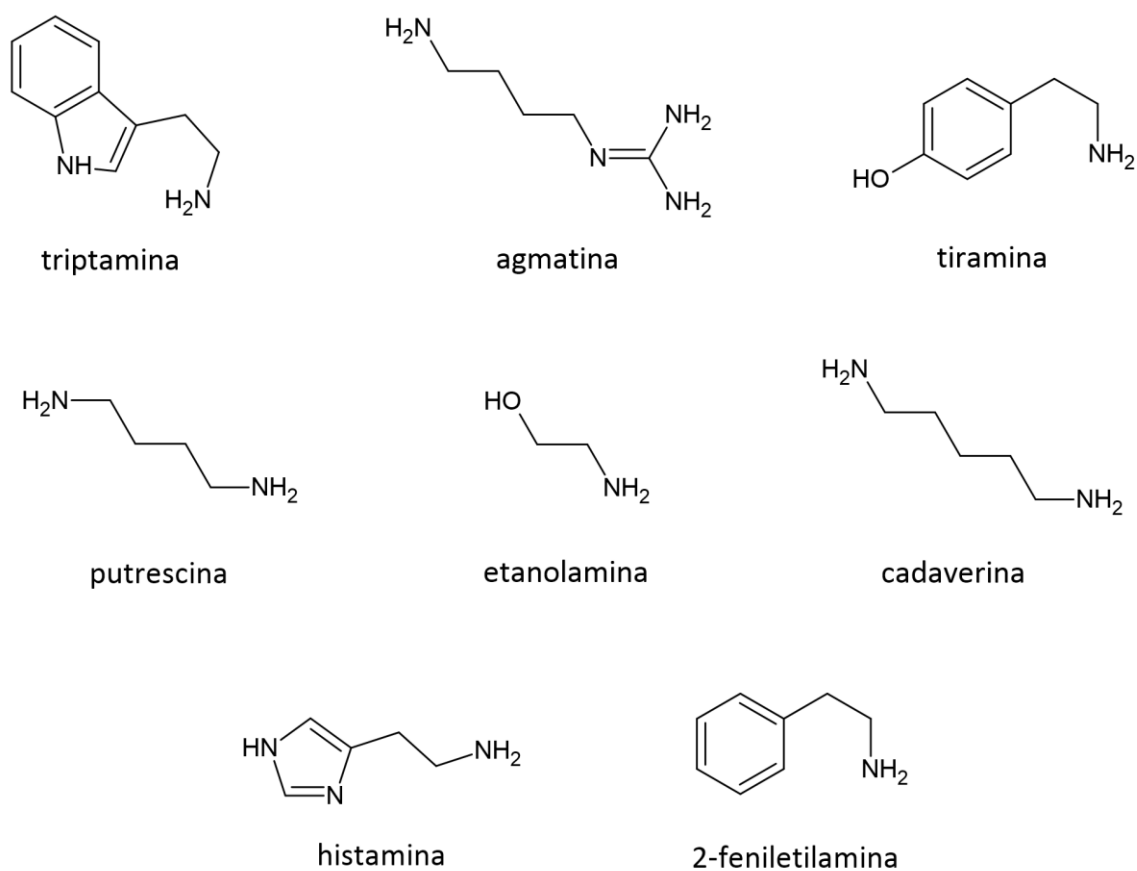


Figura 7. Estructuras químicas de las ocho aminas biógenas determinadas en esta memoria.

Respecto a las materias primas, las uvas frescas presentan pequeñas cantidades de ABs que ayudan a su correcto funcionamiento fisiológico. Su concentración y perfil dependen de la variedad de uva, el grado de madurez, el tipo de suelo, la fertilización empleada y las condiciones climáticas. Además, el estrés en las viñas también puede afectar al contenido de ABs en el mosto. En el caso de la cerveza, las ABs pueden provenir de la malta, el lúpulo o las levaduras empleadas. Teniendo en cuenta que los niveles de ABs en lúpulo y levaduras son muy bajos, puede decirse que la malta es su fuente más importante, principalmente de agmatina y putrescina. Su concentración depende del grado de germinación de la malta, la temperatura usada para su tostado y la variedad de cebada empleada.

La elección de las materias primas en ambos procesos también afecta a la concentración de compuestos nitrogenados en el mosto correspondiente. Teniendo en cuenta que los aminoácidos son un porcentaje muy importante de los compuestos nitrogenados totales, y que son los precursores directos de las ABs, su concentración y variedad en las materias primas tiene una repercusión directa en el perfil de ABs de la bebida final. Los factores que afectan a la concentración de aminoácidos en el mosto se describirán en el *Apartado 2.3*.

Por último, pero no menos importante, las prácticas de elaboración tienen una gran influencia en el perfil final de ABs. En el caso del vino, el empleo de unas u otras técnicas vitivinícolas puede ayudar a aumentar o reducir la concentración de ABs. Tanto un aumento del tiempo de maceración con los hollejos como el envejecimiento en presencia de lías genera un aumento en su concentración (razón por la que los vinos rosados y, especialmente tintos, presentan mayor concentración de ABs que los vinos blancos). La pérdida de acidez (con el correspondiente incremento de microorganismos presentes) o una baja cantidad de ácido sulfuroso también favorecen la presencia de ABs. Por el contrario, el empleo de bentonita o de tratamientos térmicos tienden a reducir su concentración. Así mismo, mantener unas correctas medidas de higiene durante todo el proceso previene la presencia de microorganismos indeseables que puedan aumentar la concentración de ABs. La OIV, en su Código de Buenas Prácticas de Viticultura, recoge los procedimientos de elaboración conocidos para reducir el contenido de ABs [139].

A pesar de que, como se ha descrito, las ABs pueden generarse a lo largo de todo el proceso de vinificación, las fermentaciones son los momentos más importantes. En el caso de la fermentación alcohólica, se ha comprobado que las levaduras que intervienen podrían ser causantes, en parte, del aumento de concentración de ABs en el vino. Este aumento depende del tipo de levadura empleado, así como de la cepa dentro de la misma especie. Así pues, es

importante un correcto manejo de las levaduras durante este proceso [29]. Por otro lado, la fermentación maloláctica es considerada la ruta principal para la producción de ABs [6]. Durante este proceso, como se ha comentado en el *Apartado 1.1*, las bacterias ácido-lácticas convierten el ácido málico en ácido láctico. Sin embargo, durante este proceso fermentativo otros sustratos pueden ser metabolizados, como es el caso de los aminoácidos, dando lugar a ABs. Aunque no está del todo claro cuáles pueden ser las funciones fisiológicas que llevan a las bacterias a descarboxilar los aminoácidos, se cree que este proceso puede ayudar a controlar el estrés osmótico y oxidativo. Además, parece que la acumulación de ABs ayuda la supervivencia de las bacterias en el medio ácido del vino. Es importante destacar que la habilidad de las bacterias ácido-lácticas para producir aminas depende de la cepa empleada, y no es una característica de la especie como tal [29,133,134]. Por otro lado, la propia autólisis de las levaduras también puede aumentar la concentración de aminas [135].

En el caso de la elaboración de cerveza, las prácticas de elaboración también influyen en la concentración de ABs. Las ABs procedentes de las materias primas tienden a disminuir durante el proceso de molido y extracción, mientras que el resto de ABs aumentan su concentración durante el proceso fermentativo. Como en el caso del vino, este proceso es la principal fuente de ABs. El tipo de fermentación afecta a los niveles y al perfil de ABs, siendo las cervezas de baja fermentación o *lager* las que poseen menores cantidades de ABs, mientras que las cervezas de alta fermentación o *ale* y las de fermentación espontánea o *lambic* suelen tener mayor concentración de ABs, debido a que poseen una mayor cantidad de microorganismos descarboxilantes. Además, es importante destacar que, de nuevo, los diferentes tipos de levaduras empleadas, así como sus distintas cepas, afectan al perfil de ABs formadas, lo cual puede explicar las diferencias en el perfil de ABs en cervezas del mismo tipo, pero procedentes de distintas cervecerías. Por otro lado, las ABs también pueden formarse durante las segundas fermentaciones que se producen una vez embotellada la cerveza, aunque este problema se suele solucionar mediante el uso de la pasteurización [137]. En la bebida final, los niveles de ABs, especialmente de histamina y tiramina, suelen ser similares a aquellos encontrados en vinos tintos, con concentraciones de hasta 3.2 y 7.4 mg/L, respectivamente [140].

Por último, las ABs también pueden proceder de contaminaciones microbiológicas indeseables que se produzcan durante el proceso de elaboración en la cervecería. Por ejemplo, la tiramina en cerveza está muy relacionada con la presencia de *Pediococcus* spp., por lo que altas concentraciones de esta amina pueden indicar un problema de contaminación por parte

de este microorganismo. Así pues, unas correctas prácticas de elaboración son esenciales para asegurar la calidad sanitaria en este tipo de bebida [137].

Las ABs son necesarias para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, ya que juegan un papel importante en la actividad cerebral, en la regulación de la temperatura corporal, la acidez del estómago y la respuesta inmunitaria, así como en el crecimiento y la diferenciación celular. Además, funcionan como precursores de diferentes hormonas, alcaloides, ácidos nucleicos y proteínas. Aunque las células son capaces de sintetizarlas, la principal fuente de ABs es la dieta. En condiciones fisiológicas normales, las ABs procedentes de la dieta son absorbidas por el sistema gastrointestinal y rápidamente metabolizadas por diferentes enzimas, principalmente monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO). Sin embargo, cuando estas rutas catabólicas son genéticamente deficientes o están inhibidas por la ingesta de medicamentos (por ejemplo, antidepresivos o medicamentos para el tratamiento del dolor o de las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson), o si se ingiere una gran cantidad de ABs, el sistema de desintoxicación no es capaz de eliminarlas y pueden producirse diferentes efectos adversos. Por otro lado, la actividad de MAO y DAO también puede verse reducida por el consumo de alcohol y por la presencia de acetaldehído, ya que comparten la misma ruta de metabolización, por lo que la presencia de ABs en bebidas alcohólicas a elevadas concentraciones puede entrañar peligro [29,133].

Los problemas de salud que pueden provocar las ABs son muy variados, y algunos de los síntomas asociados a su ingesta varían desde migraña, náuseas, enrojecimiento y picor de la piel, falta de aire y taquicardia, cuando se han ingerido pequeñas dosis; hasta vómitos, constricción bronquial, hiper o hipotensión, fallo renal y vascular, shock anafiláctico, hemorragia cerebral e incluso la muerte, cuando la cantidad ingerida ha sido muy alta, o la persona tiene alguna de las características nombradas anteriormente que aumenten su sensibilidad [29,135].

La histamina, la AB más estudiada, es conocida por causar migrañas, bajadas de la presión arterial, palpitaciones, vómitos y diarrea. Estos síntomas ocurren especialmente en pacientes con intolerancia a la histamina, que presentan una reducción genética (a veces total) de la cantidad normal de DAO. Tiramina, triptamina y 2-feniletilamina poseen efectos vasoconstrictores y provocan el aumento de la presión arterial. Por su parte, putrescina y cadaverina no son tóxicas por sí mismas, pero afectan al correcto funcionamiento de MAO y DAO. Por último, las aminas secundarias pueden reaccionar con el ácido nitroso y sus sales y formar nitrosaminas, compuestos conocidos por su capacidad carcinogénica, mutagénica y teratogénica [29,133].

A pesar de conocer los posibles problemas de salud relacionados con la ingestión de ABs, establecer los límites toxicológicos es muy difícil ya que su toxicidad depende del tipo de AB, de la matriz en la que se presentan, de si están siendo ingeridas simultáneamente con otros productos que puedan interaccionar con ellas, y de la eficiencia de los mecanismos de desintoxicación de cada individuo particular. Normalmente se considera 10 mg/L como el límite máximo de ABs seguro para los consumidores, aunque algunos autores han encontrado efectos secundarios peligrosos en la salud humana con concentraciones tan bajas como 3 mg/L [6,29].

Debido a ello, tanto la industria del vino como la de la cerveza intentan mantener las concentraciones de ABs al mínimo, para evitar estas posibles complicaciones de salud, así como posibles problemas de deterioro o pérdidas organolépticas. En el mundo vitivinícola, aunque no se ha establecido una legislación que regule su concentración, algunos países han establecido límites máximos para la concentración de histamina, con concentraciones que varían entre 2 hasta 10 mg/L. Por otro lado, algunos autores han sugerido el establecimiento de un sistema regulador (similar al de los sulfitos) que señale el contenido de ABs en el vino o especifique su ausencia, para proteger a los consumidores sensibles [29]. Por su parte, en la industria cervecera existe el llamado Índice de Aminas Biógenas (BAI, por sus siglas en inglés "*Biogenic Amine Index*"), definido por Loret y col. en 2005, que, teniendo en cuenta las concentraciones de las diferentes ABs y su presencia o no en las materias primas, da información sobre la calidad microbiológica de la cerveza. Según este índice, aquellas cervezas con un BAI inferior a 1.0 presentan una alta calidad microbiológica, las que poseen un índice entre 1.0 y 10.0 pueden haber sufrido algún tipo de contaminación, y aquellas con un BAI superior a 10.0 muestran que las condiciones en las que se han producido eran muy deficientes en términos de higiene, por lo que pueden llegar a ser peligrosas para los consumidores [138].

2.2.1. Antecedentes bibliográficos de la determinación de aminas biógenas

La determinación de ABs en matrices alimentarias es de gran importancia debido a diferentes razones, principalmente a su potencial toxicidad, a su relación con el crecimiento bacteriano en los alimentos y a la posibilidad de emplear su contenido como índice de calidad, ya sea de materias primas, productos intermedios o terminados, o durante la monitorización de procesos fermentativos y de control [136,141,142]. La importancia de este grupo de analitos está remarcada por un gran número de métodos desarrollados para su determinación, así como por la existencia de varios artículos de revisión que han resumido las características principales

de dichas metodologías. Así, para resumir las características de los métodos que determinan ABs en muestras alimentarias, se ha realizado un resumen de estos artículos de revisión, cuyo contenido se resume en la Tabla 3. Además, también se ha empleado la información de una revisión sobre la importancia de los agentes derivatizantes en los métodos cromatográficos para la determinación de ABs en alimentos y bebidas [141]. Sin embargo, como el último artículo de revisión data de 2018 [136], se ha completado esta información con la revisión de los artículos publicados entre esa fecha hasta la actualidad.

Tabla 3. Artículos de revisión sobre la determinación de aminos biógenas en matrices alimentarias encontrados desde 2010.

Contenido del artículo de revisión	Fechas	Ref.
Determinación de ABs en alimentos y bebidas	2010 – 2018	[136]
Avances y limpieza en el análisis de ABs en alimentos	Hasta 2016	[142]
Últimas tendencias en la determinación de ABs en bebidas fermentadas	Hasta 2016	[143]

De los artículos de revisión se puede extraer que el análisis de ABs en matrices alimentarias es complicado, debido a la variedad y complejidad de sus estructuras, a sus concentraciones variables y normalmente bajas, a su alta polaridad y a la presencia de múltiples interferentes. Por esta razón, normalmente es necesario un pre-tratamiento de las muestras, que puede incluir pasos de limpieza, extracción y/o pre-concentración de los analitos [136,141–143]. Este paso puede llegar a ser uno de los puntos críticos de la determinación, ya que afecta a las recuperaciones [136], por lo que se intenta mejorar lo máximo posible y reducir o evitar siempre y cuando sea posible.

En este sentido, aquellas muestras líquidas sin proteínas (como son las bebidas alcohólicas fermentadas) normalmente solo necesitan un paso previo de dilución (“*dilute and shoot*”), lo que permite retener los analitos lo máximo posible, de forma simple y rápida. El mayor desafío de esta técnica reside en encontrar el equilibrio entre la reducción del efecto matriz y la máxima sensibilidad posible. En muestras más complejas es común encontrarse pre-tratamientos que incluyen varios pasos, como la extracción sólido-líquido (una de las técnicas más empleadas en matrices alimentarias). Sin embargo, se está intentando que sean procesos rápidos y respetuosos con el medio ambiente, por ejemplo, mediante el empleo de versiones miniaturizadas de los procesos de extracción tradicionales como DLLME (micro-extracción líquido-líquido dispersiva, por sus siglas en inglés “*Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction*”),

MSPD (dispersión de matriz en fase sólida, por sus siglas en inglés “*Matrix Solid Phase Dispersion*”) o SPME (micro-extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés “*Solid Phase Micro-Extraction*”). En el caso del vino y la cerveza es también bastante común el empleo de PVPP (polivinilpolipirrolidona) para la eliminación de posibles interferentes, como son los polifenoles y otros compuestos relacionados, muy presentes en bebidas fermentadas. El empleo de este reactivo es sencillo, rápido y de bajo coste, ya que se necesita una baja cantidad del mismo, y permite la obtención de una buena sensibilidad y precisión, por lo que está de acuerdo con las premisas de la química verde [143–145].

Tras el pre-tratamiento de las muestras, y debido a que las ABs presentan una alta polaridad, una baja volatilidad y no presentan grupos cromóforos o fluoróforos, suele ser imprescindible un paso de derivatización, incluso en el caso de la detección mediante MS [136,141–143,145]. Los reactivos derivatizantes empleados son muy variados, pero los dos más usados son el cloruro de dansilo (Dns-Cl) y el *o*-ftalaldehído (OPA). El Dns-Cl genera derivados estables que pueden ser determinados mediante fotometría o fluorescencia. Su principal desventaja es que se trata de un reactivo inespecífico que puede reaccionar con más compuestos (fenoles y alcoholes alifáticos), además de que la reacción de derivatización suele ser larga y necesitar la aplicación de temperatura. Por su parte, el OPA da lugar a una reacción mucho más rápida que se produce a temperatura ambiente y presenta una alta sensibilidad. Sin embargo, solo reacciona con aminas primarias y sus derivados son más inestables, por lo que normalmente es necesario el empleo de otros reactivos (normalmente 2-mercaptoetanol) para ayudar a estabilizarlos [136,141,143,144].

Técnicas separativas

Respecto a las técnicas empleadas para la determinación de ABs en matrices alimentarias, las técnicas separativas son las más empleadas, principalmente, LC y CE.

- *Cromatografía líquida*

Para la determinación de ABs mediante LC se suele trabajar en fase reversa, empleando fases móviles basadas en mezclas de ACN y agua, con presencia de tampones o aditivos que mejoren las características de los analitos, con detectores fotométricos o de fluorescencia (siendo más sensibles los segundos). Los detectores de MS también se han empleado, aunque no suelen ser la opción preferida ya que los detectores de DAD y FD son más baratos y rápidos

y generan resultados aceptables. Aun así, se trata de detectores de gran utilidad ya que permiten obtener información sobre la estructura de los compuestos [136,141–145]. El empleo de LC para la determinación de ABs está avalado por la Comisión Europea y la OIV [146,147].

En la Tabla 4 se resumen los métodos encontrados desde 2018 hasta la actualidad que emplean LC para la determinación de ABs en matrices alimentarias. Su larga extensión confirma tanto la importancia de la determinación de dichos analitos como la preferencia por esta técnica.

Al igual que en los métodos revisados anteriormente, la fase estacionaria empleada en estos métodos suele ser una columna C18, y la fase móvil, una combinación de ACN y/o MeOH con diferentes fases acuosas, normalmente agua, ácidos diluidos o diferentes tampones (principalmente, acetato de sodio o de amonio).

La derivatización es necesaria en la gran mayoría de los métodos, aunque unos pocos métodos obvian este paso y determinan las ABs directamente, ya sea mediante MS, o mediante sus espectros de absorción. El derivatizante por excelencia en estos últimos años ha sido el Dns-Cl, aunque también se han empleado, entre otros, el cloruro de benzoilo (Bnz-Cl) y OPA.

Las matrices que han sido analizadas son muy variadas, habiendo tanto diferentes productos fermentados como vino, cerveza, queso y productos tradicionales asiáticos, como pescado, carne, alimentos en conserva, frutas, etc.

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
5 ABs	Tarhana	HPLC-DAD Gradiente	ACE C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (0.05 M; pH 8):MeOH (60:40) B: MeOH	Bnz-Cl	[148]
5 ABs	Pepinillos	HPLC-DAD Gradiente	ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm) A: [Tampón TRIS (0.1 M):HAc (0.1 M):H ₂ O (2:1:2)]:ACN:H ₂ O (3:55:42) B: ACN:H ₂ O (90:10) + 2 mL tampón	Dns-Cl	[149]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
6 ABs	Fruta de jurubeba	UPLC-DAD Gradiente	ACE 5 C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: ACN:H ₂ O (50:50)	Dns-Cl	[150]
6 ABs	Vino y pescado	HPLC-DAD Gradiente	Shimadzu C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: H ₂ O	Dns-Cl	[151]
8 ABs	Soja fermentada	HPLC-DAD Gradiente	C18 Pyramid (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN:acetato de amonio (0.01 M; 0.1% HAc) (90:10) B: ACN:acetato de amonio (0.01 M; 0.1% HAc) (10:90)	Dns-Cl	[152]
8 ABs	Queso	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[153]
9 ABs	Yuca	HPLC-FD Gradiente	Novapak C18 (300 x 3.9 mm; 4 µm) A: Acetato de sodio (0.2 M) + octanosulfonato de sodio (15 mM); pH 4.9 B: ACN	OPA	[154]
10 ABs	Carne	UPLC-FD Gradiente	UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[155]
HIM	Pescado y productos relacionados	HPLC-DAD Gradiente	Kromasil C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[156]
4 ABs	Vinos blancos y tintos	HPLC-DAD Gradiente	Supelco C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[157]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
7 ABs	Carne de ternera cruda	HPLC-DAD Gradiente	Spherisorb ODS2 (100 x 4.6 mm; 4 µm) A: Acetato de amonio (100 mM) B: ACN	Bnz-Cl	[158]
7 ABs	Pescado y alimentos fermentados	HPLC-FD Gradiente	Develosil XG-C30M-5 (75 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN:H ₂ O (65:35) B: ACN:H ₂ O (75:25)	Dns-Cl	[159]
6 ABs	Pescado	HPLC-FD Gradiente	Kromasil 100-5-C18 (250 x 4.6 mm) A: ACN B: H ₂ O	Dns-Cl	[160]
7 ABs	Pescado	HPLC-MS Gradiente	Water Acquity BEH RM8 A: H ₂ O (0.05% TFA) B: ACN (0.05% TFA)	Sin derivatizar	[161]
8 ABs	Tofu encurtido	HPLC-DAD Gradiente	Eclipse XBD-C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[162]
8 ABs	Salchichas	HPLC-DAD Gradiente	Eclipse XBD-C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[163]
10 ABs	Salsa de soja	HPLC-DAD Gradiente	ODS-3 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.005 M) B: ACN	Dns-Cl	[164]
9 ABs	Coliflor, cebolla y alcaravea	HPLC-DAD Gradiente	ACE 3C-18 (150 x 4.6 mm) A: ACN B: H ₂ O	Bnz-Cl	[165]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
3 ABs	Pescado	HPLC-DAD Gradiente	Capcell Pak C18 MG S5 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[166]
12 ABs	Vino	HPLC-DAD Gradiente	C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tetraborato de sodio (5 mM; pH 8) B: MeOH	Bnz-Cl	[167]
6 ABs	Pescado	HPLC-DAD Gradiente	Li Chrome CART 250-4 C18 (250 x 4 mm; 5 µm) A: ACN B: H ₂ O	Bnz-Cl	[168]
6 ABs	Masa idli (lenteja fermentada y arroz)	HPLC-DAD Isocrático	Spherisorb ODS2 (250 x 4.5 mm; 5 µm) ACN:H ₂ O (70:30)	Dns-Cl	[169]
9 ABs	Atún	HPLC-FD Gradiente	Kinetex EVO-C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[170]
9 ABs	Pasta de soja	HPLC-DAD Gradiente	C18 (250 x 4.6 mm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[171]
5 ABs	Vino de arroz	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: Tampón acetato (0.1 M; pH 6.2)	CNBF	[172]
8 ABs	Pescado	HPLC-DAD Gradiente	Spherisob ODS (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio B: ACN	Dns-Cl	[173]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
7 ABs	Vinos chinos	UPLC-MS Gradiente	Eclipse Plus C18 (100 x 2.1 mm; 1.8 µm) A: H ₂ O (HFO 0.1%) B: ACN (HFO 0.1%)	Sin derivatizar	[174]
6 ABs	Pescado	UPLC-MS Isocrático	Luna HILIC (150 x 3 mm; 3 µm) A: Acetato de amonio (5 mM) B: MeOH (0.32:0.08; mL/min)	Sin derivatizar	[175]
8 ABs	Salchicha fermentada ahumada	HPLC-DAD Gradiente	RP-18 (125 x 4 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[176]
8 ABs	Miel y productos derivados	HPLC-DAD Gradiente	Discovery HS C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio B: ACN	Dns-Cl	[177]
8 ABs	Alimentos de origen animal	HPLC-DAD Gradiente	LiChrospher C18 (250 x 4 mm; 5 µm) A: ACN B: Acetato de amonio (0.1 M)	Dns-Cl	[178]
8 ABs	Alimentos procedentes del cerdo	HPLC-DAD Gradiente	Thermoscientific RP18 (250 x 0.5 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[179]
7 ABs	Carne de camello	HPLC-DAD Gradiente	Spherisorb ODS2 (150 x 4.6 mm; 3 µm) A: ACN B: Tampón fosfato (0.01 M; pH 7) C: H ₂ O	Dns-Cl	[180]
4 ABs	Filetes de tilapia	HPLC-DAD Isocrático	RP C18 H ₂ O:ACN (35:65)	Dns-Cl	[181]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
3 ABs	Anchoas	HPLC-DAD Gradiente	Lichrospher100 RP18 (125 x 4.6 mm; 5 µm) A: MeOH B: H ₂ O	Bnz-Cl	[182]
6 ABs	Cerveza y leche	HPLC-DAD Gradiente	Shimadzu C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[183]
HIM	Pescado	UPLC-DAD Isocrático	Supelcosil LC-ABZ (150 x 4.6 mm; 5 µm) Tampón fosfato (pH 6.9):ACN (85:15)	Sin derivatizar	[184] [185]
5 ABs	Yogurt de leche de cabra	HPLC-DAD Gradiente	Kromasil C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Bnz-Cl	[186]
7 ABs y otras aminas	Varios alimentos	HPLC- DAD/FD Gradiente	Phenomenex Gemini C18 (150 x 4.6 mm; 3 µm) A: ACN B: Acetato de amonio (0.01 M)	Dns-Cl	[187]
8 ABs	Pescado	HPLC-FD Gradiente	Grace Smart C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN C: H ₂ O	Dns-Cl	[188]
7 ABs	Salchichas fermentadas	UPLC-DAD Gradiente	Eclipse XDB-C18 (50 x 4.6 mm; 1.8 µm) A: ACN B: H ₂ O	Dns-Cl	[189]
6 ABs	Cordero	UPLC-MS Gradiente	Gold HILIC (50 x 2.1 x 1.9 µm) A: H ₂ O (0.1% HFO; 4 mM formiato de amonio) B: ACN (0.1% HFO; 4 mM formiato de amonio)	Sin derivatizar	[190]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
5 ABs	Trigo	HPLC-DAD Gradiente	ODS Hypersil (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: H ₂ O	Bnz-Cl	[191]
2 ABs	Pescado	HPLC-DAD Gradiente	Cosmosil 5C18-PAQ (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón fosfato (0.05 M; pH 6.8) B: ACN	Dns-Cl	[192]
8 ABs	Pasta de judías	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB-C18 A: Acetato de amonio (0.01 M) B: ACN	Bnz-Cl	[193]
8 ABs	Salsa de soja	HPLC-DAD Gradiente	Venusil MP C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN:Acetato de amonio (0.01 M; 0.1% HAc) (90:10) B: ACN:Acetato de amonio (0.01 M; 0.1% HAc) (10:90)	Dns-Cl	[194]
7 ABs	Varios alimentos	HPLC-DAD Gradiente	Chromolith Monolithic RP-18e (100 x 4.6 mm) A: MeOH B: H ₂ O	Dns-Cl	[195]
17 ABs	Cerveza	UPLC-MS Gradiente	Kinetex C8 (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: H ₂ O (0.1 % HFO) B: ACN (0.1% HFO)	Cloruro de tosilo	[196]
8 ABs	Salami	HPLC-DAD Gradiente	C18 Gemini (250 x 3 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: MeOH:ACN (70:30)	Dns-Cl	[197]
HIM	Pescado	HPLC-DAD Gradiente	C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón fosfato (pH 6.9):MeOH (85:15) B: Tampón fosfato (pH 6.9):ACN (85:15)	Sin derivatizar	[198]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
5 ABs	Pescado	HPLC- DAD/FD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: H ₂ O B: ACN	Cloruro de pireno sulfonilo	[199]
8 ABs	Pescado seco	HPLC-DAD Gradiente	C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[200]
10 ABs	Queso	HPLC- FD/MS Gradiente	Gemini C18 (150 x 4.6 mm; 3 µm) A: ACN B: Tampón acetato (10 mM; pH 4.8)	Dns-Cl	[201]
8 ABs	Pasta fermentada de gambas	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax SB-C18 (150 x 4.6 mm) A: H ₂ O B: ACN	Dns-Cl	[202]
4 ABs	Pescado	HPLC-DAD Gradiente	Venusil XBP C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN:acetato de amonio (0.1 M) (9:1) B: ACN:acetato de amonio (0.1 M) (1:9)	Dns-Cl	[203]
7 ABs	Salchichas fermentadas	HPLC-MS Gradiente	Purospher STAR RP-18 (100 x 2.1 mm; 2 µm) A: Acetato de amonio (10 mM) B: ACN (0.1% Hfo)	Sin derivatizar	[204]
9 ABs	Pasta de soja fermentada	HPLC-DAD Gradiente	C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[205]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
6 ABs	Pescado fermentado	HPLC-DAD Gradiente	Simmetry C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: Acetato de amonio (10%)	Dns-Cl	[206]
4 ABs	Carne de caballo	HPLC-MS Gradiente	Acquity UPLC HSS T3 (100 x 2.1 mm; 1.8 µm) A: H ₂ O B: MeOH	Sin derivatizar	[207]
HIM y TYM	Judías negras fermentadas	UPLC-DAD Gradiente	Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm; 1.8 µm) A: ACN (100%) B: ACN (50%)	Dns-Cl	[208]
6 ABs	Calamar	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Extend C18 (150 x 4.6 mm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[209]
3 ABs	Cacao	HPLC-FD Gradiente	Novapak C18 (300 x 3.9 mm; 4 µm) A: Acetato de sodio (0.3 mM; pH 4.9) B: ACN	OPA	[210]
5 ABs	Salmón	HPLC-DAD Gradiente	Spherisorb ODS2 (125 x 4 mm; 5 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[211]
4 ABs	Leche y queso	HPLC-DAD Isocrático	Spherisorb ODS2 (150 x 4.6 mm; 5 µm) ACN:H ₂ O (80:20)	Dns-Cl	[212]
8 ABs	Queso	HPLC-DAD Gradiente	Nova-pak C18 (150 x 3.9 mm; 4 µm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[213]

Tabla 4. Métodos de determinación de ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
8 ABs	Pasta de gamba	HPLC-DAD Gradiente	Wondasil C18 (250 x 4.6 mm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[214]
8 ABs	Sidra	UPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse Plus C18 (50 x 3 mm; 1.8 µm) A: ACN B: ACN:H ₂ O (50:50)	Dns-Cl	[215]
7 ABs	Atún	UPLC-FD Gradiente	Acquity UPLC BEH C18 (150 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: H ₃ PO ₄ (0.1%) B: ACN C: MeOH	Dns-Cl	[216]
5 ABs	Pollo	HPLC-FD Gradiente	Shimpack ISC-07/51504 Na (50 x 2.1 mm) A: Citrato de sodio (0.6 M)/ácido bórico (0.1 M; pH 10) B: ACN	OPA	[217]
9 ABs	Vino tinto	HPLC-MS Gradiente	C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: MeOH (HFBA 10 mM) B: H ₂ O (HFBA 10 mM)	Sin derivatizar	[218]
5 ABs	Condimento de legumbres	HPLC-DAD Gradiente	ACE C18 (250 x 4.6 mm) A: Acetato de amonio (0.1 M) B: ACN	Dns-Cl	[219]

- *Cromatografía de gases*

La GC ha sido poco empleada para la determinación de ABs en matrices alimentarias, y normalmente se ha utilizado MS como sistema de detección. A pesar de ello, y como se ha indicado anteriormente, el paso de derivatización suele ser necesario para mejorar las características de volatilidad y polaridad de los analitos [136,143].

Desde 2018 hasta la actualidad, la GC tampoco ha sido muy explorada y solo se han encontrado tres métodos que hagan uso de la misma. En el primero de ellos, Espalha y col. [220] desarrollaron un método para la determinación de 8 ABs en muestras de pescado, empleando una columna MXT-200 (30 m) como fase estacionaria, y aire como gas portador, sin necesidad de derivatizar los analitos, empleando IMS (espectrometría de movilidad iónica, por sus siglas en inglés "*Ionic Mobility Spectrometer*") como detector. Por otra parte, Kamankesh y col. [221] y Wojnowski y col. [222] emplearon la GC acoplada a MS para la determinación de 4 ABs en muestras de pescado en conserva y 7 ABs en muestras de carne, respectivamente. En el método de Kamankesh y col. [221] la separación se realizó en una columna HP-5 MS (30 m), empleando helio como gas portador, y sin necesidad de derivatizar los analitos. Por su parte, en el método de Wojnowski y col. [222] se derivatizaron las ABs con una mezcla de cloroformiato de etilo y cloroformiato de isobutilo. La separación se realizó utilizando una columna Zebbron ZB-5MS (30 m x 0.25 mm; 0.25 μ m), empleando helio como gas portador.

- *Otras técnicas cromatográficas*

Respecto al empleo de otras técnicas cromatográficas, destaca el empleo de cromatografía de intercambio iónico. Así, se han encontrado varios métodos que hacen uso de esta técnica para la determinación de diferentes ABs en diferentes matrices. Además, también se han encontrado algunos métodos que emplean la cromatografía en capa fina, así como cromatografía de inyección secuencial y de fluidos supercríticos.

Rivoira y col. [223] determinaron 7 ABs en muestras de queso mediante cromatografía iónica con detección electroquímica, empleando un electrodo de oro. Wojciak y col. [224] emplearon esta misma técnica para comprobar la influencia del tiempo de sonicación durante la producción de carne de ternera seca y fermentada en la formación de 7 ABs. Hicieron uso de un analizador de aminoácidos, equipado con una columna de intercambio iónico (Ostion LG AAA8, 100.8 x 3.6 μ m). Por su parte, Anderegg y col. [225] determinaron 4 ABs en muestras de salchichas fermentadas, empleando una columna IonPac CS18 (250 mm) para su separación. Por

otro lado, Jablonska-Rys y col. [226] y Kononiuk y col. [227], determinaron 7 y 4 ABs en muestras de champiñones y carne, respectivamente. Para ello hicieron uso de una columna Ostion LG AAA8 (100.8 x 3.6 μm), y derivatizaron los analitos con ninhidrina, detectando los derivados a 570 nm.

Cambiando de técnica, los grupos de Tan [228], Silva [229] y Zhang [230] emplearon la cromatografía en capa fina. Tan y col. [228] la usaron para la determinación de histamina en marisco, combinando la separación con espectrometría RAMAN, aplicando después redes neuronales artificiales para la predicción de las concentraciones del analito. Silva y col. [229] utilizaron la técnica para la determinación de 6 ABs en muestras de miel y productos derivados, derivatizando con Dns-Cl y detección fluorescente. Por último, Zhang y col. [230] modificaron la superficie de la capa fina con ninhidrina para la detección visual *in situ* de 8 ABs en marisco.

Finalmente, Gama y col. [231] y Song y col. [232] emplearon cromatografía de inyección secuencial y cromatografía de fluidos supercríticos, respectivamente, para la determinación de ABs. En el primer caso [231] se determinaron 3 ABs en muestras de queso parmesano, sin necesidad de derivatizarlas ni utilizar disolventes. En el segundo [232], se separaron 9 ABs provenientes de la salsa de soja, empleando MS como detector.

- *Electroforesis capilar*

El empleo de CE está también ampliamente extendido para la determinación de ABs en matrices alimentarias, ya que permite lidiar con aquellos analitos que no son adecuados para la determinación por GC debido a su inestabilidad térmica. Los métodos de CE han demostrado su utilidad en caracterización de alimentos, control de calidad, monitorización de procesos y detección de contaminantes. Entre sus ventajas se encuentran su rapidez y sencillez, lo que genera separaciones más rápidas que LC y con una buena resolución, además de un bajo consumo de reactivos. Por otro lado, presenta menor sensibilidad que otras técnicas y mayores requerimientos de purificación de la muestra. Además, como se ha comentado anteriormente, suele ser necesario un paso previo de limpieza (en el caso de vino y cerveza normalmente es suficiente con el empleo de PVPP) y derivatización [136,142–145].

Además de los métodos ya resumidos por los diferentes artículos de revisión, se ha encontrado un nuevo método de 2020 que emplea electroforesis capilar de zona con detección fotométrica para la determinación de 4 ABs en diversos alimentos [233]. En este trabajo se

derivatizaron los analitos empleando Dns-Cl, y se detectaron midiendo a 214 nm. La separación se realizó empleando un capilar de 40 cm x 75 μm .

Técnicas electroquímicas

Respecto a las técnicas electroquímicas, se han encontrado dos métodos que las emplean para la determinación de ABs. En el primero de ellos [234], se desarrolló un método para la determinación de histamina en muestras de pescado en conserva, mediante voltamperometría de onda cuadrada. Para ello, se empleó un electrodo impreso de grafeno. Los resultados fueron validados por HPLC, y se obtuvieron valores de 0.62 mg/L y 2.06 mg/L como LOD y LOQ, respectivamente. Además, se estudiaron las posibles interacciones de triptamina y tiramina, pero debido a sus bajas concentraciones en pescado, no se consideró que pudieran ser un problema en la determinación. En el segundo método [235], se empleó un electrodo termoplástico acoplado a microfluidos para la determinación de triptamina en muestras de agua y queso. Se hizo uso de la voltamperometría de onda cuadrada, y no fue necesaria la derivatización del analito, pero sí su extracción. Las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 87 y el 92%.

Técnicas espectroscópicas

Bettini y col. [236] desarrollaron un método para la determinación de histamina en bebidas mediante el empleo de SERS (espectrometría RAMAN aumentada en la superficie, por sus siglas en inglés "*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*"), usando para ello un sustrato híbrido de nanopartículas de plata y celulosa. El método permite la determinación de concentraciones picomolares (10^{-12} M).

Por otro lado, Shim y col. [237] emplearon la técnica de NIRS (espectroscopía de infrarrojo cercano, por sus siglas en inglés "*Near-InfraRed Spectroscopy*") para la evaluación de la frescura de un tipo de pescado, en base a su contenido de cadaverina. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante HPLC, obteniéndose una correlación de 0.98 – 0.99, lo que indica que el uso de esta técnica es un método fiable y rápido para la determinación de cadaverina en muestras de pescado. Fan y col. [238] emplearon NIR-HSI (infrarrojo cercano hiperespectral, por sus siglas en inglés "*Near InfraRed HyperSpectral Imaging*") junto con el análisis de correlación bidimensional para la determinación rápida y no destructiva de ABs durante el almacenamiento

de carne de cordero. Los resultados demostraron un excelente coeficiente de predicción, por lo que podría tratarse de un método efectivo para la monitorización de estos analitos.

Por último, Lapenna y col. [239] desarrollaron un método colorimétrico para la determinación de histamina en vino mediante el empleo de nanopartículas de oro. Las nanopartículas se conjugan con la histamina provocando un cambio de color notorio a simple vista, y fácilmente cuantificable mediante el empleo de un espectrofotómetro. Navarro y col. [240] también hicieron uso de una reacción colorimétrica para la determinación de putrescina y cadaverina en muestras de atún. La reacción se basa en la enzima DAO y el sistema ABTS. Los resultados obtenidos indican que esta reacción podría ser útil para la fabricación de sensores, ya que los resultados son buenos y selectivos, aun en presencia de otras ABs. Por su parte, Zhu y col. [241] desarrollaron un método colorimétrico y fluorescente para la determinación de ABs como cadaverina y putrescina en muestras de pescado, para su empleo como detector de posibles contaminaciones. Como reactivo se empleó un derivado de la cumarina, obteniéndose un bajo LOD y buenas recuperaciones. Finalmente, Li y col. [242] también desarrollaron un método colorimétrico, en este caso, para la determinación del contenido total de putrescina y cadaverina en muestras de productos acuáticos. La reacción se basa en el empleo de puntos de carbón dopados con hierro y cobalto, que actúan de forma similar a la enzima peroxidasa. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por HPLC, y las recuperaciones obtenidas oscilaron entre el 98.2 y el 115.7%.

Biosensores

Los biosensores son dispositivos ampliamente empleados en la determinación de ABs en alimentos, debido a su rapidez, su fácil manejo, su alta sensibilidad y su relativo bajo coste. Además, permiten la monitorización dinámica continua y el uso *in situ*. Se trata de dispositivos muy específicos, que solo responden frente a sustratos específicos, lo que reduce el pretratamiento de las muestras. Aunque existen varios tipos de biosensores, la mayoría se basan en la presencia de enzimas amino-oxidasas inmovilizadas. El empleo de ciertas enzimas concretas permite la determinación específica de una amina en particular, mientras que el uso de enzimas no específicas permite la obtención del contenido total de ABs. Existe una gran variedad de transductores empleados, siendo los más comunes los ópticos y los electroquímicos. Dentro de los segundos, se prefiere la detección potenciométrica a la amperométrica, ya que es más sensible [136,143–145]. Debido a su creciente importancia, varios autores han revisado los últimos avances en el empleo de los mismos [243–246].

2.3. Aminoácidos

Los aminoácidos (AAs) son una clase de compuestos orgánicos que presentan en su estructura un grupo amino y un grupo carboxilo. Se trata de las unidades básicas de las enzimas y otras proteínas, y poseen importantes papeles en diferentes procesos metabólicos [135,247]. Los AAs son muy importantes en la salud humana ya que son necesarios para la síntesis de proteínas, hormonas y algunos neurotransmisores. Además, los AAs tienen funciones relacionadas con el catabolismo de la mucosa intestinal, con los enterocitos y con los linfocitos, y son los precursores de los ácidos nucleicos y los nucleótidos [248]. Tanto cerveza como vino tienen en su composición AAs considerados como esenciales (aquellos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y que deben conseguirse mediante su ingesta). Sin embargo, debido a las concentraciones en las que se suelen encontrar en dichas matrices, no se considera que ni cerveza ni vino sean fuentes nutricionales de dichos analitos [134]. Por otro lado, y como se ha visto en el *Apartado 2.2*, también son los precursores directos de las ABs. En la Figura 8 se muestran las estructuras de los nueve AAs determinados en esta memoria, y se indica, en rojo, la AB generada por la descarboxilación de cada uno de ellos. Así mismo, en verde, y cuando procede, se indica el AA precursor.

El vino es una matriz rica en AAs, con concentraciones que varían entre 10 y 2400 mg/L, representando más del 90% del nitrógeno de los mostos. Los AAs proceden de la proteólisis del zumo de uva durante el proceso de vinificación. Son un importante indicador de calidad, ya que su contenido está relacionado con características del proceso de fermentación, así como con el tipo de uva y su origen geográfico [135,247,248].

El perfil y la concentración de AAs en el vino depende fuertemente de varios factores, como la variedad de uva, las prácticas de cultivo, el tipo de suelo, la climatología o el uso de fertilizantes basados en nitrógeno. En este último caso, además, afecta la forma en la que se encuentre el nitrógeno en el fertilizante, el tipo de aplicación, los tiempos, etc. El empleo de ciertos fungicidas en los viñedos, por su parte, reduce el contenido de los mismos. Por otro lado, los procesos enológicos llevados a cabo durante el proceso de vinificación también afectan a la concentración y tipo de AAs presentes en el vino final. Los factores con mayor importancia durante este proceso son la cepa y la variante de levadura empleada, la adición de diferentes nutrientes al mosto y el tiempo de envejecimiento. La concentración y perfil de los AAs no es constante durante la vinificación, y las cantidades pueden ir disminuyendo y/o aumentando a lo largo del proceso. Es común que la concentración de AAs disminuya durante la fermentación alcohólica, ya que los AAs sirven de sustrato para las levaduras. Esta disminución también se ha

comprobado durante la fermentación maloláctica, acompañada de un aumento de las ABs. Por otro lado, su concentración puede aumentar de nuevo con el paso del tiempo, debido a la proteólisis y autólisis de las levaduras. Además, los tratamientos térmicos también pueden afectar [29,248].

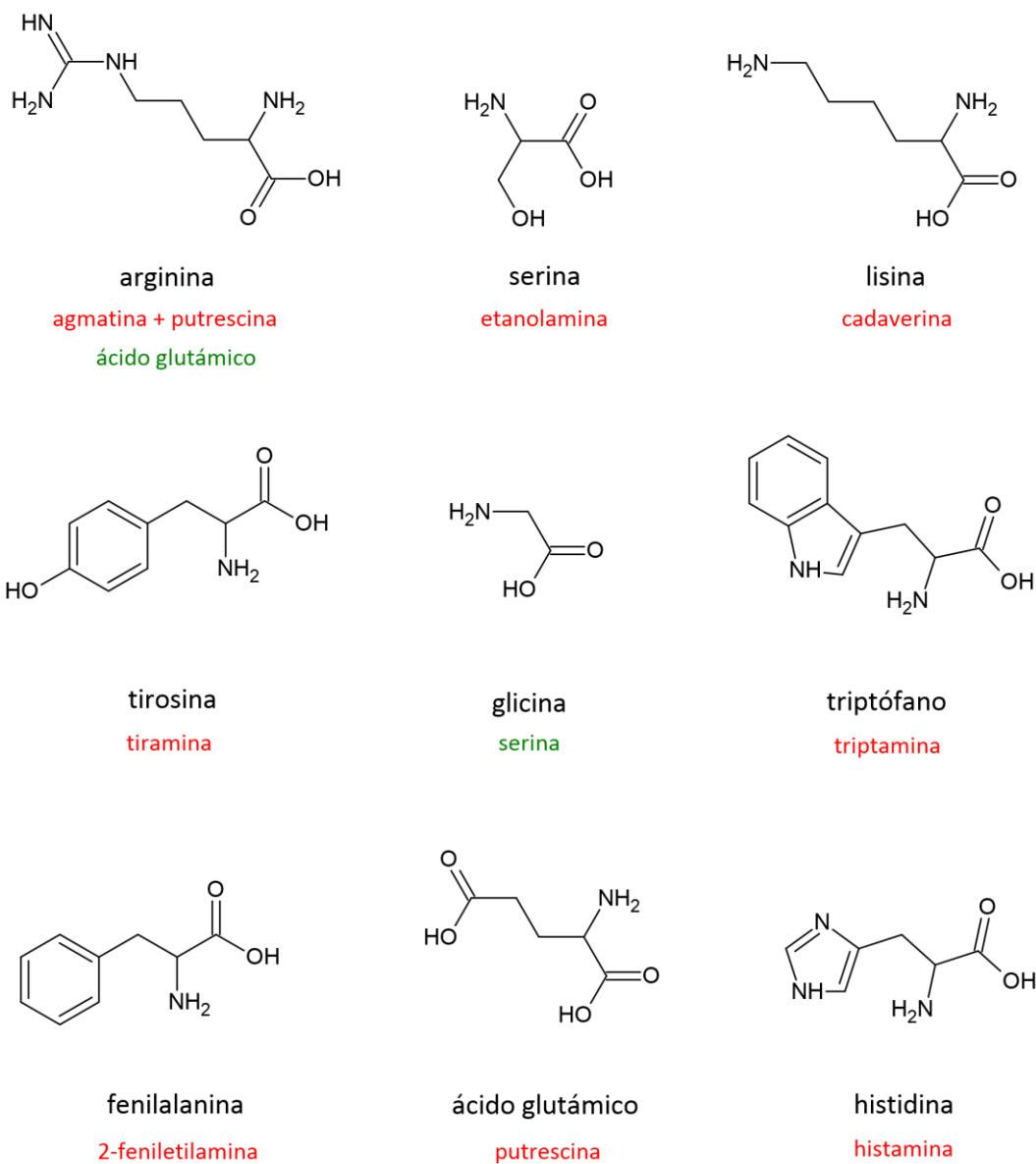


Figura 8. Estructuras químicas de los nueve aminoácidos determinados en esta memoria. En rojo se indica la amina biógena que genera su descarboxilación. En verde se indica el aminoácido del que provienen, si procede.

Su función principal durante el proceso de fermentación es servir de sustento a las levaduras, formando, junto con el amonio, el nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN, por sus siglas en inglés “*Yeast Assimilable Nitrogen*”), ya que las proteínas y los péptidos de cadena larga no son metabolizados por las mismas. Como sustento de las levaduras, los AAs contribuyen a las propiedades organolépticas, la estabilidad microbiana y el flavor del vino. Aunque los AAs en sí no son volátiles, sí que juegan un papel importante en las características organolépticas del vino, ya que son precursores de importantes compuestos volátiles, que pueden formarse durante el metabolismo enzimático de las levaduras o durante la fermentación alcohólica. Algunos de estos metabolitos secundarios son alcoholes superiores, ésteres de etilo, compuestos carbonílicos, ácidos grasos volátiles, fenoles, lactonas y compuestos azufrados. Además, los AAs que quedan libres tras la finalización de la fermentación también pueden llegar a afectar al sabor de la bebida final cuando se encuentran en altas concentraciones, otorgando notas amargas, dulces o ácidas, dependiendo del AA en cuestión [29,135,247,248]. Por otro lado, los AAs están relacionados con la formación de compuestos indeseables como las ABs (como se ha visto en el *Apartado 2.2*), la urea y el carbamato de etilo, por lo que su concentración en el mosto tiene una gran importancia en la concentración final de ABs en el vino [29].

La cerveza, por su parte, contiene una mayor cantidad y un perfil más amplio de compuestos nitrogenados que el vino, aunque una gran parte se metaboliza durante los procesos de cocción y fermentación. El contenido total de nitrógeno en la cerveza oscila entre 300 y 4000 mg/L, donde los AAs pueden llegar a representar hasta el 15% [140]. Los AAs proceden principalmente de la proteólisis de las proteínas de la cebada y de las levaduras presentes en el medio. La función de los AAs en el mosto es la de proporcionar sustento a las levaduras para que puedan crecer (mediante la síntesis de proteínas) y realizar sus rutas metabólicas. Dependiendo de la facilidad que tengan las levaduras para su asimilación, los AAs se dividen en cuatro grupos, desde los que se asimilan inmediatamente, hasta los que no se asimilan nunca o casi nunca, como es el caso de la prolina. Dentro de estos grupos, los AAs pertenecientes a los grupos 2 y 3 (asimilación media) son los que tienen mayor influencia en la calidad final de la cerveza, aunque los residuos de prolina (grupo 4), pese a su dificultad para asimilarse, también ayudan a producir diferentes compuestos aromáticos que pueden influenciar el aroma de la bebida final. El metabolismo de los AAs asimilados depende de la fase y las condiciones de la fermentación, de la cantidad total presente y de la cepa de levadura empleada. El perfil de AAs no afecta al crecimiento de las levaduras en sí, pero tiene efecto en

el sabor de la cerveza final, ya que su metabolismo produce diferentes compuestos volátiles de gran importancia organoléptica [22,140,249–252].

La degradación de los AAs puede darse a lo largo de todo el proceso de elaboración de la cerveza, a través de diferentes rutas metabólicas. Durante la molienda es de gran importancia tanto la reacción de Maillard como la degradación de Strecker. La reacción de Maillard consiste en una serie de reacciones químicas que comienzan con la adición de un azúcar a un compuesto nitrogenado, generando finalmente una pigmentación no enzimática, que afectará al color de la cerveza, produciendo las llamadas maltas oscuras. La formación de los distintos compuestos aromáticos y saborizantes durante esta reacción depende de varios factores (por ejemplo, temperatura, pH, contenido de agua y tiempo de reacción), pero el factor más importante es el perfil de AAs y azúcares presentes en el mosto. Los productos de la reacción de Maillard más importantes en la cerveza son furfural y 5-hidroximetilfurfural, que presentan aromas amargos y vínicos, así como aromas a cartón y pepino, respectivamente. Durante el proceso de molienda, también se lleva a cabo la degradación de Strecker, reacción durante la cual se forman muchos compuestos volátiles denominados aldehídos de Strecker, y que está basada en una trasaminación entre un AA y un compuesto dicarbonílico. Los compuestos aromáticos formados tienen diferentes aromas, normalmente frutales, florales o almendrados [250].

Por otro lado, el proceso de fermentación también depende de la concentración y perfil de compuestos nitrogenados. Como en el caso del vino, los AAs representan la mayor fuente de nitrógeno asimilable por las levaduras. En el caso de la cerveza, el tipo de fermentación (alta o baja) afectará a la cantidad de AAs asimilados, siendo mayor la asimilación en las cervezas de fermentación alta, que presentan, por ejemplo, una mayor concentración de ésteres. Esto se debe a que la temperatura del proceso de fermentación afecta de forma importante a la actividad metabólica de las levaduras, provocando que los compuestos de aroma sintetizados sean diferentes. Por tanto, las concentraciones de AAs dependerán de la cepa de levadura empleada. Normalmente, las cepas que usan una mayor cantidad de YAN generan aromas y sabores más picantes, mientras que aquellas que emplean una menor concentración dan lugar a aromas más dulces y con notas azufradas en la bebida final. Por otro lado, unos niveles de YAN excesivamente altos pueden asociarse con la producción de olores indeseables, como diacetilo y algunos alcoholes superiores como alcohol isoamílico, propanol e isobutanol. El metabolismo de los AAs es esencial para la síntesis de los compuestos aromáticos de la cerveza, siendo el 80% de los mismos sintetizados durante el metabolismo de las levaduras en el proceso fermentativo.

Los compuestos aromáticos de mayor importancia producidos durante este proceso son los alcoholes superiores, los ésteres, las cetonas y los compuestos azufrados [250,251,253].

2.3.1. Antecedentes bibliográficos de la determinación de aminoácidos

Los AAs son analitos muy importantes, tanto a nivel nutricional como fisiológico, por lo que existe un gran número de métodos desarrollados para su determinación en diferentes matrices, y empleando diferentes técnicas analíticas. Debido a este gran número de métodos, la revisión se ha realizado sobre los desarrollados en la última década. Por otro lado, y dado que la determinación de los AAs que se ha llevado a cabo en esta memoria ha sido conjuntamente con la determinación de ABs, la revisión bibliográfica de los antecedentes de estos analitos se ha centrado en aquellos métodos que determinan AAs y ABs de forma conjunta en matrices alimentarias.

Técnicas separativas

En general, la gran mayoría de los métodos que determinan conjuntamente AAs y ABs en muestras alimentarias hacen uso de la cromatografía líquida de alta resolución. Los métodos encontrados se resumen en la Tabla 5. Como puede comprobarse, casi todos los métodos emplean columnas C18 como fases estacionarias, mientras que la fase móvil suele estar formada por ACN y/o MeOH como disolvente orgánico, y tampón acetato como fase acuosa. Sin embargo, hay algunos métodos que emplean otras fases acuosas tales como formiato de amonio, ácido fórmico diluido, tampón fosfato o simplemente agua. Respecto a la derivatización, el 90% de los métodos derivatizan los analitos para su determinación. El derivatizante más empleado para la determinación conjunta de AAs y ABs es dietoximetilenmalonato (DEEMM; más del 40% de los métodos encontrados), seguido por Dns-Cl y OPA. El detector más empleado ha sido DAD, aunque también hay métodos que emplean FD o MS.

Las muestras sobre las que se han realizado estos análisis han sido principalmente vino, cerveza y otros productos fermentados, aunque también se han analizado diferentes frutas, carnes y verduras.

Tabla 5. Métodos de determinación conjunta de AAs y ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
23 AAs 6 ABs	Vino	HPLC-DAD Gradiente	Nova-Pak C18 (300 x 3.9 mm; 4 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.65) B: ACN:MeOH (80:20)	DEEMM	[254]
24 AAs ABs	Vino, fruta y miel	HPLC-FD Gradiente	Equisil (250 x 3 mm) A: Tampón acetato (0.05 M; pH 6.5):MeOH (95:5) B: MeOH:ACN (70:30)	OPA + NAC	[255]
4 AAs 4 ABs	Salami, cerveza y almejas	HPLC-DAD Gradiente	LiChrospher C18 (250 x 4 mm; 5 µm) A: ACN B: Formiato de amonio (9 mM; pH 3.40)	Dns-Cl	[256]
23 AAs 7 ABs	Cerveza, queso y salchichas	HPLC-MS Gradiente	Acquity (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: H ₂ O (0.1% HFO) B: ACN (0.1% HFO)	Dns-Cl	[257]
19 AAs 8 ABs	Vino	HPLC-FD Gradiente	Spherisorb ODS2 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de sodio (75 mM; pH 7.2; 0.018% TEA; 0.3% THF) B: H ₂ O:MeOH:ACN (20:40:40)	OPA	[258]
3 AAs 2 ABs	Productos derivados de gambas	HPLC-DAD Gradiente	Chromsep SS C18 (150 x 4.6 mm; 5 µm) A: THF:MeOH:tampón fosfato (10 mM) (1:8:91) B: MeOH:tampón fosfato (10 mM) (80:20)	OPA	[259]

Tabla 5. Métodos de determinación conjunta de AAs y ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
17 AAs 8 ABs	Vino	HPLC-FD Gradiente	Waters AccQTag C18 (150 x 3.9 mm) A: Tampón fosfato (0.02 M; pH 7.3):MeOH :THF (91.5:8:0.5) B: Tampón fosfato (0.02 M; pH 7.3):MeOH (20:80)	OPA	[260]
22 AAs 7 ABs	Queso	UPLC-DAD Gradiente	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 6.7; 0.02% NaN ₃) B: MeOH C: ACN	DEEMM	[261]
17 AAs 5 ABs	Vino	HPLC-DAD Gradiente	ACE HPLC (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.8; 0.02 g/L NaN ₃) B: ACN:MeOH (80:20)	DEEMM	[262]
23 AAs 10 ABs	Vino	UPLC-DAD Gradiente	Zorbax SB-C18 (50 x 3 mm; 1.8 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.8; 0.02% NaN ₃) B: ACN	DEEMM	[263]
16 AAs 7 ABs	Vino	HPLC-MS Gradiente	Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 x 3 mm; 2.6 µm) A: ACN B: H ₂ O aq. (0.1%)	Sin derivatizar	[264]
1 AA 7 ABs	Arroz integral	HPLC-DAD Gradiente	SB C18 (50 x 2.1 mm) A: H ₂ O B: MeOH	2-Hidroxi-1- naftaldehído	[265]

Tabla 5. Métodos de determinación conjunta de AAs y ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
17 AAs 9 ABs	Vino	HPLC-DAD Gradiente	5 C18-HL (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (0.025 M; pH 5.8) B: ACN	DEEMM	[266]
20 AAs 11 ABs	Vino	HPLC-FD Gradiente	Phenomenex Gemini C18 110A (150 x 4.6 mm; 3 µm) A: Tampón acetato:ACN (80:20; pH 4.1) B: ACN	Dns-Cl	[267]
22 AAs 11 ABs	Vinagre	HPLC-DAD Gradiente	Nova-Pak C18 (300 x 3.9 mm; 4 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.65) B: ACN:MeOH (80:20)	DEEMM	[268]
8 AAs 9 ABs	Varios alimentos	UPLC-MS Gradiente	SB C18 (50 x 2.1 mm; 1.8 µm) A: ACN:H ₂ O (5:95; 0.1% HFO) B: ACN (0.1% HFO)	Cloruro de 4'-carbonil- rosamina (CCR)	[269]
21 AAs 6 ABs	Queso	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.8; 0.02% NaN ₃) B: ACN:MeOH (80:20)	DEEMM	[270]
4 AAs 4 ABs	Vino tinto	HPLC-DAD Gradiente	Spherisorb S5 ODS2 C18 (250 x 4.6 mm) A: Tampón fosfato (9.0 mM; pH 3.5) + heptanosulfonato (8.3 mM) B: Alcohol metílico	Sin derivatizar	[271]

Tabla 5. Métodos de determinación conjunta de AAs y ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
20 AAs 8 ABs	Puré de fresas	HPLC-DAD Gradiente	LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.8; 0.02% NaN ₃) B: ACN:MeOH (80:20)	DEEMM	[272]
23 AAs 7 ABs	Vinos de diferentes frutas	HPLC-DAD Gradiente	XBP-C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.8; 0.02% NaN ₃) B: ACN:MeOH (4:1)	DEEMM	[273]
2 AAs 9 ABs	Coliflor	UPLC-DAD Gradiente	Ace 5 C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: ACN B: ACN:H ₂ O (50:50)	Dns-Cl	[274]
23 AAs 7 ABs	Cerveza artesana	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Tampón acetato (25 mM; pH 5.8; 0.02% NaN ₃) B: ACN:MeOH (4:1)	DEEMM	[275]
4 AAs 4 ABs	Vino	HPLC-DAD Gradiente	Spherisorb S5 ODS2 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Heptasulfonato de sodio (8.3 mM) + KH ₂ PO ₄ (9 mM); pH 3.5 B: MeOH	Sin derivatizar	[276]
16 AAs 1 AB	Champiñones	UPLC-DAD Gradiente	CSH C18 (50 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: Acetato de sodio (0.01 M; pH 4.80) B: ACN	AQC	[277]
10 ABs 17 AAs	Champiñones	UPLC-DAD Gradiente	CSH C18 (50 x 2.1 mm; 1.7 µm) A: Acetato de sodio (0.01 M; pH 4.8) B: ACN	AQC	[278]

Tabla 5. Métodos de determinación conjunta de AAs y ABs mediante cromatografía de líquidos. Los significados de las abreviaturas empleadas se encuentran en el Anexo I.

Analitos	Matriz	Detección Elución	Fase estacionaria Fase móvil	Derivatizante	Ref.
8 AAs 9 ABs	Verduras fermentadas	HPLC-MS Gradiente	Waters C18 (100 x 2.1 mm; 1.6 µm) A: H ₂ O:ACN (90:10; 1% HFO; 5 mM formiato de amonio) B: ACN:H ₂ O (90:10; 1% HFO; 5 mM formiato de amonio)	Dns-Cl	[279]
2 AAs 3 ABs	Chocolate y licor de cacao	UPLC-MS Gradiente	UPLC HSS T3 (100 x 2.1 mm; 1.8 µm) A: H ₂ O (HFO 0.1%) B: ACN (HFO 0.1%)	Sin derivatizar	[280]
3 AAs 7 ABs	Leche y queso	HPLC-DAD Gradiente	Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 4.6 mm; 5 µm) A: Acetato de sodio (50 mM; pH 8.75; 0.02% NaN ₃) B: ACN:MeOH (80:20)	DEEMM	[281]
HIM y HIS	Pescado	HPLC-FD Isocrático	MetroSep C4 (150 x 4 mm; 5 µm) HNO ₃ aq. (7 mM)	OPA	[282]

Por otro lado, se han encontrado dos métodos que determinan conjuntamente ambos tipos de analitos empleando otras técnicas separativas. Rabie y col. [283] estudiaron la evolución de 22 AAs y 6 ABs durante el almacenaje de salchichas preparadas a partir de diferentes tipos de carne (caballo, ternera y pavo). Los analitos fueron extraídos y cuantificados empleando un analizador de aminoácidos, equipado con una columna de intercambio iónico (Watrex Polymer 8 Ion Exchange; 200 x 37 mm). La detección de los mismos se realizó a 570 y 440 nm (para AAs y ABs, respectivamente), tras su derivatización con ninhidrina. Por su parte, Anderegg y col. [284] estudiaron el efecto de la concentración de sal sobre la producción de tiramina y la inhibición de las bacterias que degradan la tirosina, sobre un modelo sintético de queso. Para ello hicieron uso de la cromatografía iónica, empleando una columna IonPac CS18 (250 x 2 mm), y con un gradiente de fase móvil formado por ácido metanosulfónico y H₂O, sin necesidad de derivatizar los analitos.

Por otro lado, no se ha encontrado ningún método que emplee otras técnicas separativas (cromatografía de gases y electroforesis capilar) para la determinación conjunta de ambos tipos de analitos en matrices alimentarias.

Técnicas espectroscópicas

Se han encontrado cuatro métodos que hacen uso de técnicas espectroscópicas, concretamente, RMN, para la determinación de AAs y ABs en matrices alimentarias. Los estudios incluían más analitos aparte de AAs y ABs ya que el objetivo era estudiar los cambios en el perfil metabólico producidos en el almacenamiento de diferentes alimentos. Shumilina y col. [285] estudiaron los cambios en la calidad de salmón y productos derivados durante su almacenamiento, empleando para ello diferentes técnicas de RMN. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente y permitieron determinar los principales procesos que ocurren durante el almacenamiento de estos productos. Además, la concentración de ABs fue empleada como índice de frescura de los mismos. Por su parte, Cheol Kim y col. [286] emplearon la técnica de 2D q-RMN (resonancia magnética nuclear cuantitativa bi-dimensional, por sus siglas en inglés “2D Quantitative-Nuclear Magnetic Resonance”) para determinar los cambios metabólicos en la corteza de carne de ternera seca a lo largo del tiempo. La aplicación de diferentes herramientas multivariantes permitió la clasificación de las muestras en base al método, grado y tipo de cocción. Hee Chun y col. (Chun et al., 2020) estudiaron el efecto de la concentración de sal durante el proceso de fermentación del *doenjang*, un producto tradicional coreano. El análisis metabólico se realizó empleando 1H-RMN, y se comprobó que las diferentes concentraciones de sal afectaban al pH y a la abundancia de bacterias y hongos, por lo que afectaban a las concentraciones de ABs. Los AAs, por su parte, no se vieron afectados. Por último, Lou y col. [287] analizaron los cambios metabólicos producidos durante el almacenamiento de muestras de pescado inoculadas con dos cepas de *Shewanella baltica*. El análisis permitió determinar un total de 39 metabolitos, así como las diferencias provocadas por cada cepa.

3. HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS EMPLEADAS

Actualmente, y cada vez de forma más habitual, se están aplicando herramientas quimiométricas a la resolución de problemas analíticos. El empleo de este tipo de herramientas permite tanto la clasificación como la cuantificación de mezclas de analitos. En este segundo caso, además, no hay necesidad de separación previa de los mismos, incluso aunque las señales producidas por los mismos estén solapadas. De este modo, se pueden emplear técnicas analíticas más sencillas y económicas, lo que se traduce en un ahorro de tiempo y recursos, así como en un mayor respeto al medio ambiente, en comparación con las técnicas separativas tradicionales [288]. En la Figura 9 se resumen las herramientas quimiométricas empleadas durante el desarrollo de esta memoria.

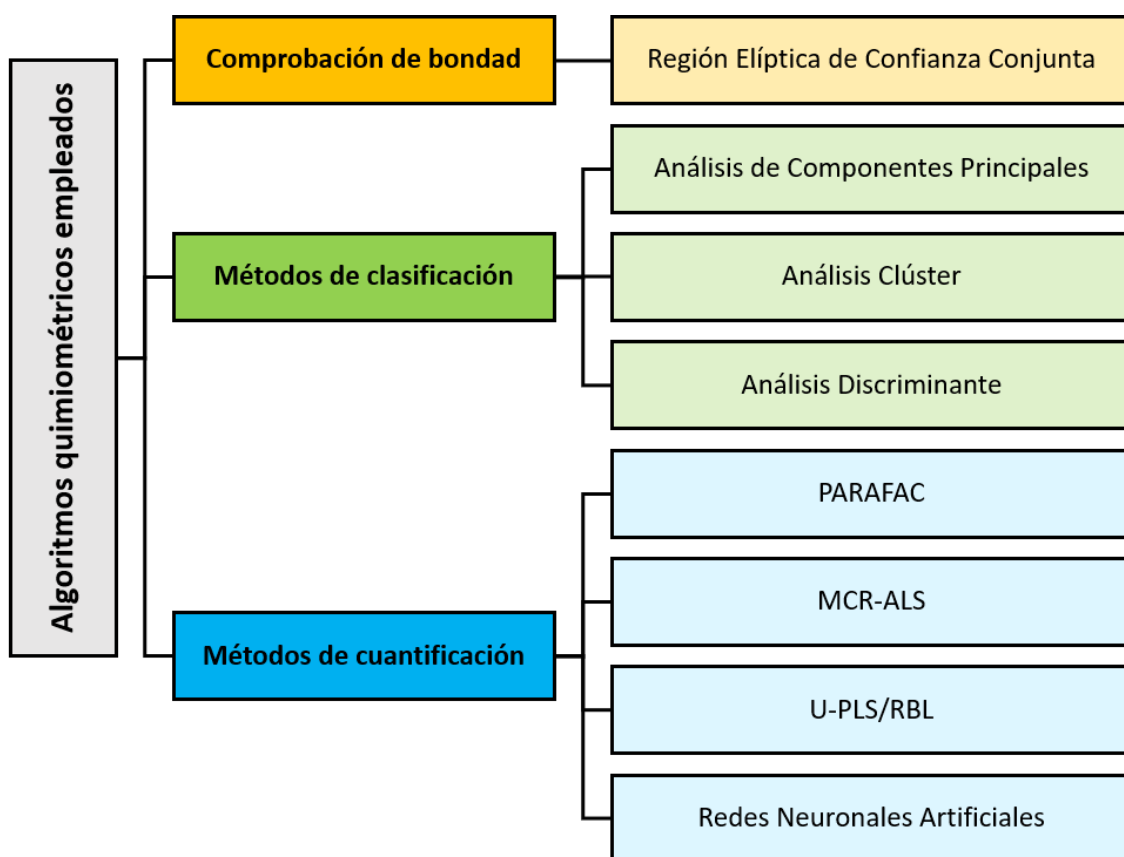


Figura 9. Esquema de las herramientas quimiométricas empleadas a lo largo de esta memoria.

Antes de pasar a describir las herramientas quimiométricas empleadas en los trabajos incluidos en esta memoria, se van a introducir algunos conceptos generales relacionados con los conjuntos de muestras empleados y el tipo de datos que pueden ser analizados mediante estas herramientas.

Respecto a los diferentes conjuntos de muestras empleados por las técnicas quimiométricas, se diferencian tres tipos: el conjunto de muestras de calibración o entrenamiento, el conjunto de muestras de validación o test y el conjunto de muestras reales. El conjunto de muestras de calibración está formado por muestras conocidas en base a las cuales se establece la relación entre la concentración/clase del analito y las señales obtenidas. Las muestras de validación o test son muestras preparadas de forma similar a las del conjunto de calibración, cuya concentración/clase también es conocida. Se emplean para evaluar la bondad del modelo de calibración construido. Por último, en el conjunto de muestras reales aparecerán interferencias procedentes de la matriz y otros compuestos. El caso ideal es conocer la concentración/clase de estas muestras mediante el empleo de un método analítico de referencia. De esta forma, se podrán comparar los resultados obtenidos y comprobar si el modelo construido es aceptable para su aplicación en muestras similares [288].

Por otro lado, los tipos de datos con los que se puede trabajar en quimiometría se clasifican en base a su orden, es decir, el número de dimensiones que presentan para cada muestra individual (Figura 10). Así, encontramos [289]:

- Datos de orden cero o de una vía: para cada muestra se obtiene un solo valor (rectas de calibrado típicas, en las que a cada concentración X le corresponde una señal Y).
- Datos de primer orden o de dos vías: para cada muestra se obtiene un vector de datos. Son datos de este tipo los espectros y los cromatogramas, por ejemplo.
- Datos de segundo orden o de tres vías: para cada muestra se obtiene una matriz de datos, es decir, datos registrados en dos dimensiones. Algunos ejemplos son las matrices de excitación-emisión, las reacciones cinéticas seguidas por fotometría o el registro de espectros durante la obtención de un cromatograma.
- Datos de tercer orden o cuatro vías: en este caso, para cada muestra se obtiene un cubo de datos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante el registro de matrices de excitación-emisión a lo largo de una reacción cinética.

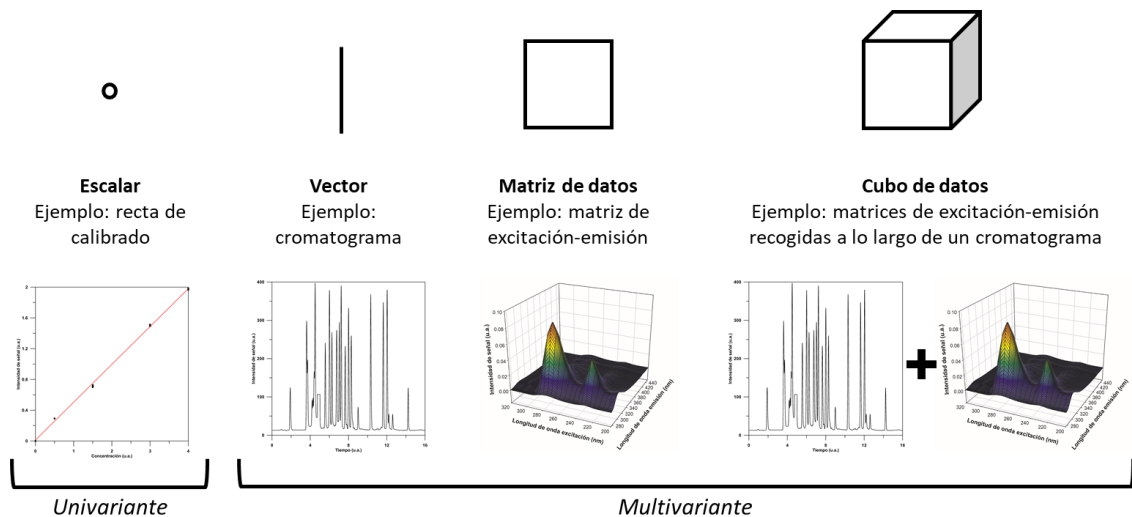


Figura 10. Representación gráfica de los diferentes órdenes de magnitud de los datos empleados en calibración uni y multivariante.

Los datos, además, pueden clasificarse también en base a su linealidad. Los datos de primer orden y superior se denominan bilineales cuando el número de componentes principales coincide con el número de factores de variabilidad. Al aumentar el rango de los datos, los datos de segundo orden o superior se diferencian en datos trilineales y no trilineales. Los datos trilineales son aquellos en los que, además de cumplirse la condición de bilinealidad, al pasar de una muestra a otra, la forma de las matrices no varía, solo la intensidad (es decir, los perfiles de los constituyentes son iguales y solo varía la concentración de los mismos). Este tipo de datos es común al trabajar con matrices de excitación-emisión, pero no suele aparecer al trabajar con cromatografía, electroforesis capilar o voltamperometría. Por su parte, los datos no trilineales se clasifican en tres tipos. Los datos no trilineales pero que cumplen la condición de bilinealidad se diferencian en datos no trilineales de Tipo I y II, según tengan uno o dos modos en los que se rompe la trilinealidad, respectivamente. Los datos no trilineales de Tipo III son aquellos en los que ni siquiera se cumple la condición de bilinealidad [290,291].

Tras esta pequeña descripción de los conceptos básicos, se explican brevemente los algoritmos empleados en los trabajos incluidos en esta memoria. La exposición de los mismos se realiza de forma general, sin incluir las expresiones matemáticas en los que se basan, que se encuentran descritas en la bibliografía empleada. Se han diferenciado las herramientas empleadas con fines clasificatorios de aquellas con fines de cuantificación. Además, se ha incluido la descripción del test empleado para comprobar la bondad de los diferentes modelos predictivos construidos.

3.1. Comprobación de la bondad de los modelos predictivos

Para la comprobación de la bondad de los modelos predictivos propuestos en los trabajos descritos en esta memoria se ha empleado la Región Elíptica de Confianza Conjunta o EJCR (por sus siglas en inglés “*Elliptical Joint Confidence Region*”). La EJCR es un test para comprobar la exactitud de un método, ya sea comparando los resultados obtenidos con los valores nominales o con los valores obtenidos mediante un método de referencia. Se trata de un test de gran precisión y que permite comparar diferentes métodos. Se realiza mediante una regresión por mínimos cuadrados, por lo que podría considerarse como un algoritmo de orden cero.

De forma ideal, al comparar los resultados obtenidos con los valores nominales o de referencia, la pendiente debería ser unitaria y la ordenada en el origen, cero. Antiguamente, estos valores se comparaban de forma independiente, pero se comprobó que aparecían errores debido a que ambos están correlacionados. Por esta razón, se desarrolló la EJCR, que tiene en cuenta ambos parámetros a la vez. En la misma gráfica de la EJCR se señala el punto ideal (1, 0). Si éste está incluido dentro de la elipse, las concentraciones predichas por el método que está siendo analizado son buenas; tanto más, cuanto más pequeña y estrecha sea la elipse. Si por el contrario el punto ideal queda fuera de la elipse, las concentraciones predichas no poseen una exactitud aceptable respecto a los valores nominales o de referencia. En la Figura 11 se describen los diferentes tipos de elipses que se pueden obtener al aplicar este test.

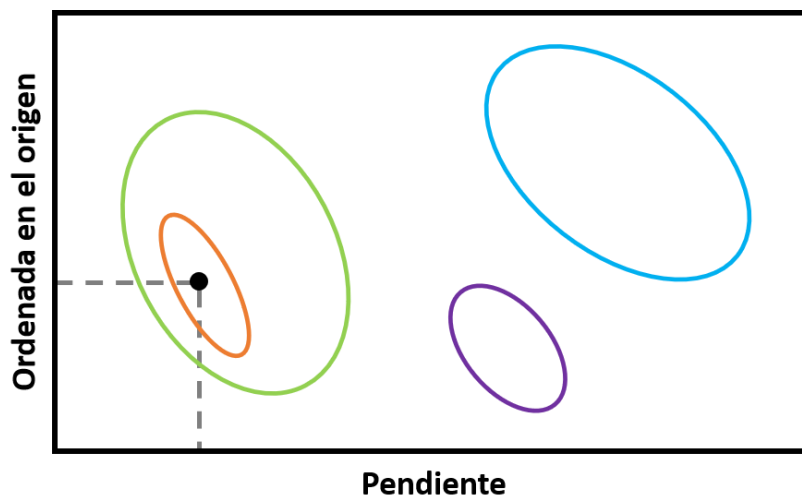


Figura 11. Ejemplos de distintos tipos de elipses obtenidas mediante EJCR. En naranja, elipse exacta y precisa; en verde, exacta pero imprecisa; en morado, precisa pero inexacta; y en azul, inexacta e imprecisa. El punto negro indica el punto ideal (1, 0).

La comparación de los datos en base a la EJCR hace uso de diferentes métodos según el tipo de datos con los que estemos trabajando [292]:

- Mínimos cuadrados ordinarios u OLS (por sus siglas en inglés “*Ordinary Least Squares*”): se emplea cuando se trabaja con datos homocedásticos, es decir, aquellos que poseen una varianza aproximadamente constante y similar. Se asume, por tanto, que la incertidumbre asociada a los datos obtenidos por ambos métodos es muy pequeña.
- Mínimos cuadrados ponderados o WLS (por sus siglas en inglés “*Weighted Least Squares*”): se emplea cuando los datos no son homocedásticos, y la desviación estándar no es constante entre diferentes muestras. Un ejemplo podría ser la comparación de la precisión de un método analítico con valores nominales o de materiales de referencia, por lo que solo se dispondría de las desviaciones de las medidas realizadas con el método que se está analizando. En este caso se asume que no existe incertidumbre en los valores nominales o de referencia, aunque es más correcto decir que la incertidumbre asociada a estos valores es significativamente menor que la asociada a los valores obtenidos por el nuevo método analítico.
- Mínimos cuadrados bilineales o BLS (por sus siglas en inglés “*Bilinear Least Squares*”): se emplea cuando los datos son heterocedásticos en ambos ejes, como cuando se compara la precisión de un método frente a un método de referencia, por lo que hay que tener en cuenta la incertidumbre de ambos.

3.2. Algoritmos empleados con fines clasificatorios

3.2.1. Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales o PCA (por sus siglas en inglés “*Principal Components Analysis*”) es una de las herramientas quimiométricas más empleadas. Sus usos más extendidos son la clasificación de muestras y la reducción de la dimensionalidad de los datos, siendo también bastante común su empleo como paso previo de varios métodos multivariados de análisis de datos. Se trata de una técnica no supervisada, es decir, su objetivo no es predecir una respuesta, sino extraer información del conjunto de datos.

Conceptualmente, PCA consiste en reducir un número elevado de variables, más o menos correlacionadas, obteniendo un número inferior de variables ortogonales entre sí (es decir, no correlacionadas), que contienen la información principal del sistema, eliminando la información redundante y reduciendo la contribución del ruido. La definición de PCA puede realizarse geométrica y matemáticamente.

Geoméricamente, PCA crea un nuevo espacio de coordenadas, en el que los nuevos ejes (ortogonales entre sí y denominados componentes principales o CP) son combinaciones lineales de las variables iniciales. Así pues, el primer CP será aquella combinación de las variables iniciales (que se corresponderá con una dirección en el nuevo espacio de coordenadas) que explique la máxima variabilidad. El segundo CP será otra combinación de variables iniciales que genere una dirección perpendicular a la primera, y que explique la máxima variabilidad una vez extraída la explicada por el primer componente, y así sucesivamente. Estos nuevos ejes se definen en base a sus *loadings* y *scores*. Los primeros son los cosenos de los ángulos que forman con los ejes antiguos; mientras que los segundos son las coordenadas de las muestras en los nuevos ejes.

Por otra parte, desde el punto de vista matemático, PCA consiste en la descomposición de una matriz de datos X en las matrices T (matriz de *scores*) y P (matriz de *loadings*), más una matriz E de residuales de X . Aunque para tener una reproducción perfecta de la matriz X se necesitarían todos los vectores de T y P , se puede obtener una representación adecuada de X con un número de vectores menor, ya que la información relevante está contenida en los primeros componentes.

Por último, hay que tener en cuenta que no existe una solución única que determine los *loadings*. Una vez obtenido el nuevo espacio de coordenadas y reducido la dimensionalidad de los datos, cuando el sistema es demasiado complejo o la interpretación de PCA es complicada, se puede reducir aún más la dimensionalidad y simplificar la interpretación mediante la rotación de dichos ejes, que consiste en multiplicar la matriz P por una matriz ortogonal. Existen varios métodos para ello, pero uno de los más empleados y el usado en esta memoria es el método Varimax. Este método consiste en la rotación ortogonal de los componentes principales, para minimizar el número de variables que tienen altas cargas en cada factor y maximizar el número de variables que tienen pesos casi nulos, tendiendo así a asimilar cada eje con una o pocas variables. De esta forma, se simplifica la interpretación de los componentes principales [293,294].

3.2.2. Análisis Clúster

El Análisis Clúster (CA, por sus siglas en inglés “*Cluster Analysis*”) es un conjunto de técnicas multivariantes no supervisadas cuyo objetivo es agrupar datos en base a sus características, de forma que los datos de cada grupo sean lo más similares entre sí, y los grupos, lo más diferentes entre sí. El CA puede dividirse en dos tipos de modelos: modelos no jerarquizados y modelos jerarquizados.

Los modelos no jerarquizados son aquellos que permiten la clasificación de los datos en grupos o clústeres independientes previamente establecidos. En esta memoria se ha empleado el modelo *k-means*, en el que el prototipo de cada grupo se denomina centroide y se define como el valor medio de los datos asignados a dicho grupo. Los datos se van incluyendo en los grupos buscando minimizar la varianza residual dentro del mismo.

Los modelos jerarquizados, por su parte, son aquellos métodos en los que se parte de los datos individuales, que se van agrupando en base a sus similitudes, hasta formar un único grupo. Existen varios modelos jerarquizados, pero el empleado en esta memoria es el método de Ward, que consiste en minimizar la varianza intra-grupos. Así, se van creando los grupos mediante la unión de aquellos datos individuales que minimicen el incremento en la suma de dichas varianzas. Como resultado de este modelo se puede obtener un dendrograma.

Tanto los modelos no jerarquizados como los jerarquizados permiten la obtención de un perfil de clases, en el que se pueden identificar aquellas variables que más influencia tienen en la clasificación de los datos [295,296].

3.2.3. Análisis Discriminante

El Análisis Discriminante o DA (por sus siglas en inglés “*Discriminant Analysis*”) es una técnica multivariante cuyo objetivo es obtener una función capaz de clasificar a un nuevo dato a partir de los valores de ciertas variables discriminantes. Cada grupo posee la varianza mínima dentro del mismo, y el máximo de heterogeneidad posible con el resto de grupos. Se pretende, por tanto, identificar qué tiene de específico cada grupo, para poder asignar los datos de forma correcta. Los grupos deben ser conocidos con anterioridad, al igual que la clasificación de los datos dentro de estos grupos, ya que la calibración no se realiza en base a una variable continua, si no en base a una variable categórica (grupo 1, grupo 2, etc). La clasificación puede realizarse mediante el empleo de funciones lineales o cuadráticas, en función de la matriz de covarianza de los datos [6,297].

3.3. Algoritmos empleados con fines cuantitativos

3.3.1. PARAFAC

El Análisis Paralelo de Factores o PARAFAC (por sus siglas en inglés “*PARA*rell *FACT*or *analysis*”) es uno de los algoritmos de segundo orden más empleados, y fue desarrollado por Rasmus Bro en 1997 [298]. Trabaja con datos trilineales, formando un cubo con todas las matrices, y gracias a la ventaja de segundo orden, permite la calibración de los analitos en presencia de interferentes no calibrados. Se trata de un método no supervisado, en el que la información sobre la concentración no se emplea para calcular la descomposición de la matriz de datos, y cuya optimización del modelo se basa únicamente en la minimización de los residuales. Sin embargo, una vez obtenido el modelo, se realiza una regresión entre los *scores* obtenidos y las concentraciones del conjunto de muestras de calibración, y se emplea el modelo para la predicción de las concentraciones en nuevas muestras [291].

PARAFAC puede definirse como una versión restrictiva de PCA, que, mediante la reducción de los grados de libertad, da lugar a modelos predictivos más simples y sencillos de interpretar. Al igual que PCA, PARAFAC descompone los datos en *loadings* y *scores*, pero los trata numéricamente igual. Se trata de un modelo iterativo, en el cual se van estimando las soluciones hasta encontrar el modelo que minimice la suma de los cuadrados de los residuales. Algunas de las características principales de PARAFAC son [291,294,298–300]:

- La solución que se obtiene es única, ya que, al restringir los grados de libertad, no existe la posibilidad de libertad rotacional (la que permitía, por ejemplo, la aplicación de Varimax en PCA).
- Los factores no aparecen según un orden intrínseco, por lo que la identificación de cada componente se debe realizar tras la construcción del modelo, en base a los *loadings* obtenidos.
- La escala no está definida, por lo que no se puede cuantificar directamente, sino que se necesita de una referencia (muestras de calibración) que proporcione la escala.

El número de factores óptimo con el que trabajar se elige en base a diferentes criterios. Es importante tener en cuenta la información que tenemos del sistema, así como inspeccionar los perfiles obtenidos y comprobar si tienen sentido, se repiten o solo modelan ruido. Esto es muy importante cuando los diferentes modelos dan soluciones diferentes, y queda en la mano

del analista decidir qué criterio tomar [299,300]. De entre los diferentes criterios existentes, los más empleados y los que han sido usados en esta memoria son:

- Test de consistencia del modelo o CORCONDIA (por sus siglas en inglés “CORCONDIA Consistency Diagnostic”): la consistencia del modelo comienza cercana al 100% en modelos con pocos componentes, y va disminuyendo cuando se empiezan a seleccionar demasiados componentes. Según este criterio, se selecciona como número óptimo de factores el anterior a que la consistencia del modelo disminuya por debajo del 50%.
- Desviación estándar del ajuste: el número de factores óptimo es aquel que genera una desviación estándar del ajuste similar a la producida por el ruido instrumental, es decir, cercana a 0.1. Se selecciona como número óptimo el primer valor a partir del cual la desviación estándar del ajuste se estabiliza.

Por otra parte, y según el tipo de datos con los que se esté trabajando, es necesario realizar algunas restricciones antes de aplicar PARAFAC. En general, al trabajar con espectros es común emplear las restricciones de no-negatividad (ya que ni las concentraciones ni los espectros toman valores negativos) y de unimodalidad (ya que cada espectro tiene un único máximo) [294,298,300].

3.3.2. MCR-ALS

MCR-ALS es un algoritmo de segundo orden que combina dos algoritmos diferentes: Resolución Multivariada de Curvas o MCR (por sus siglas en inglés “*Multivariate Curves Resolution*”) y Mínimos Cuadrados Alternantes o ALS (por sus siglas en inglés “*Alternating Least Squares*”). MCR es un algoritmo bilineal con un gran potencial resolutivo y con pocos requisitos que puede resolver componentes múltiples en mezclas desconocidas, sin necesidad de disponer de información previa de la composición o naturaleza del sistema, y en presencia de interferencias no calibradas (ventaja de segundo orden). Por su parte, ALS es un algoritmo de resolución de ecuaciones de forma iterativa, que puede implementarse rápidamente y adaptarse a diferentes sistemas y estructuras de datos [301]. De esta forma, MCR-ALS permite obtener los perfiles de respuesta de los diferentes constituyentes de una mezcla. Entre sus ventajas más importantes destacan su amplia aplicación en diversos sistemas y su capacidad para admitir pequeños cambios en la forma y/o posición de los perfiles de los componentes de

las muestras, permitiendo el análisis de datos que se desvían ligeramente de la trilinealidad [289,302].

MCR-ALS permite procesar tanto una única matriz de datos como el análisis de varias matrices simultáneamente, mediante el empleo de matrices aumentadas en columnas y/o filas. Para su aplicación, el primer paso es estimar el número de componentes. Esta estimación puede realizarse de forma manual o mediante la Descomposición en Valores Singulares o SVD (por sus siglas en inglés "*Singular Value Decomposition*"), que consiste en calcular cuántos componentes contribuyen de manera significativa en la varianza. Después, se construyen las estimaciones iniciales, que son aproximaciones a los perfiles reales, a partir de los cuales comenzará la iteración. Estas estimaciones iniciales pueden proceder de datos experimentales o de diferentes algoritmos, entre los que destaca PURE o SIMPLISMA [303], que elige como punto de partida aquellas filas o columnas más diferentes o "puras" de la matriz de datos. Tras ajustar estas estimaciones, se optimiza el modelo mediante la aplicación iterativa de ALS, incluyendo las restricciones que sean necesarias para modelar los perfiles respetando las condiciones químicas y/o matemáticas deseadas (por ejemplo: no-negatividad, unimodalidad, clausura, etc). Hay que tener en cuenta que las restricciones pueden aplicarse al sistema completo o solo a una parte, y que es fundamental ser prudente y aplicarlas solo si se tiene total seguridad de su validez. Tras este proceso, una vez que se alcanza la convergencia (es decir, que alcanza un nivel de error aceptable), se obtienen los perfiles de concentración y los espectros de los diferentes componentes de la mezcla [289,301,302].

3.3.3. U-PLS/RBL

U-PLS/RBL es un algoritmo de segundo orden que combina Mínimos Cuadrados Parciales Desdoblados o U-PLS (por sus siglas en inglés "*Unfolded Partial Least Squares*") con el método de Bilinealización Residual o RBL (por sus siglas en inglés "*Residual Bi-Linearization*"). El método de U-PLS consiste en desdoblar una matriz de datos para convertirla en un vector de datos. De esta forma, se puede trabajar con datos de segundo orden como si fueran datos de primer orden, permitiendo la aplicación del algoritmo PLS (por sus siglas en inglés "*Partial Least Squares*"). Este algoritmo pretende establecer una regresión lineal entre un conjunto de concentraciones de muestras y las señales instrumentales que generan. Esta regresión se basa en la descomposición de la matriz de datos en dos matrices: una matriz de *loadings* y una matriz de *scores*, que son estimadas en base a la explicación del máximo de varianza de los datos, tal y como se hace en PCA, pero enfatizando la información relevante y disminuyendo la influencia

del ruido. PLS tiene la ventaja de que se obtienen conjuntos de *loadings* y *scores* específicos para cada analito, por lo que la calibración se realiza de forma independiente para cada uno. Sin embargo, los *loadings* y *scores* obtenidos no contienen información físicamente reconocible, ya que se trata de combinaciones lineales de los perfiles reales y las concentraciones.

Uno de los puntos más importantes durante la aplicación de PLS es la estimación del número de variables latentes de calibración. Una de las formas más comunes para realizarlo es la validación cruzada dejando-uno-fuera o "*leave-one-out cross-validation*" (en inglés), que consiste en ir dejando cada una de las muestras de calibración fuera, y predecir su concentración utilizando el modelo construido con el resto de muestras de calibración. El error al cuadrado de cada una de estas predicciones se suma para obtener el parámetro PRESS (por sus siglas en inglés "*PRedicted Error Sum of Squares*"). Este parámetro tiende a ir disminuyendo al aumentar el número de variables latentes, pero luego aumenta ya que las últimas variables latentes describen el ruido. De forma intuitiva, se seleccionaría como óptimo el mínimo valor de PRESS, sin embargo, y siguiendo el principio de parsimonia, es suficiente con seleccionar aquel valor de PRESS que no sea estadísticamente superior al mínimo valor de PRESS. En la práctica, esto se soluciona mediante la aplicación del criterio de Halaand y Thomas [304,305], que hace uso del test estadístico F de Fisher. Así, se comparan los valores de PRESS y se selecciona como número óptimo de variables latentes a emplear en PLS aquel que conduzca a una probabilidad de F inferior al 75% (es decir, cuyo valor de parámetro p sea inferior a 0.75).

Aunque U-PLS permite su aplicación a sistemas que se desvían ligeramente de la trilinealidad, no alcanza la ventaja de segundo orden, por lo que las recuperaciones obtenidas son buenas siempre y cuando no existan interferentes que aumenten de forma excesiva los valores de los residuales. Cuando esto no se cumple y los residuales obtenidos tras la aplicación de U-PLS son mayores que el nivel de ruido, se emplea RBL para lograr recuperar la ventaja de segundo orden. Este algoritmo asume que los residuales pueden ser ordenados en una matriz bilinear, formada por dos contribuciones: los datos test, que pueden ser explicados por U-PLS, y la contribución de potenciales interferentes. La aplicación de RBL se realiza mediante la modelación de los residuales mediante SVD, manteniendo constante la matriz de los *loadings* y variando la matriz de *scores*, con el objetivo de eliminar el efecto de los potenciales interferentes, obteniendo de esta forma nuevos *scores* que solo contengan información de los componentes calibrados. Esta información es la que se empleará luego en la predicción por U-PLS. El proceso iterativo de RBL se termina cuando el valor de los residuales es comparable al valor del ruido.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la aplicación de estos algoritmos permite un aumento de la flexibilidad de uso de PLS, pero poseen la desventaja de que, al contrario de lo que pasa con PARAFAC y MCR-ALS, no permiten ver los perfiles y emplearlos como información cualitativa sobre los componentes [288,306–309].

3.3.4. Redes Neuronales Artificiales

Las Redes Neuronales Artificiales o ANNs (por sus siglas en inglés “*Artificial Neural Networks*”) provienen del campo de la inteligencia artificial, y pretenden imitar algunas de las características únicas del cerebro humano, como la habilidad de aprender mecanismos generales a partir de un conjunto de muestras reducido o de interpolar información correcta a partir de un conjunto de datos incompleto o distorsionado. Para ello, las ANNs hacen uso de varias técnicas de regresión no-paramétricas (es decir, que no asumen ninguna forma de modelo concreta) que, tras su correspondiente procedimiento de entrenamiento, son capaces de aprender la correlación existente entre un conjunto de variables predictoras y la respuesta obtenida [310].

Para la descripción de las ANNs se suele emplear una analogía biológica, donde cada nodo de cálculo se denomina neurona. Éstas se disponen en tres capas diferentes [310,311]:

- Capa de entrada o “input” (del inglés): se trata de las señales medidas. Son variables independientes, también llamadas descriptores. Pueden tratarse tanto de las variables originales, como de una selección adecuada que represente la variabilidad del conjunto de muestras (por ejemplo, las obtenidas tras la aplicación de PCA). Por analogía biológica, se correspondería con las dendritas de la neurona.
- Capa oculta o “hidden” (del inglés): se trata del modelo de computación. En la analogía biológica, se correspondería con el procesamiento de la información que se realiza durante la sinapsis.
- Capa de salida o “output” (del inglés): se trata de las propiedades predichas por el modelo de calibración. Son las variables dependientes, también llamadas respuesta. Suele consistir en una única neurona, que especifica la concentración del analito en cada muestra, y que se corresponde con el axón de las neuronas cerebrales.

Durante el proceso de calibración o entrenamiento, la capa oculta y la capa de salida reciben de forma iterativa contribuciones ponderadas de la información, que son luego proyectadas sobre una función de transferencia (normalmente sigmoideal), para generar un valor de salida no-lineal. El proceso de aprendizaje consiste, por tanto, en el ajuste de la relación entre las señales y las concentraciones, mediante la modificación de los pesos ponderados relacionados con las conexiones inter-neuronales, hasta conseguir la convergencia (es decir, que se alcance un nivel de error preestablecido o aceptable, similar al nivel de ruido presente en el sistema, que dé lugar a valores finales de salida cercanos a los valores experimentales). El proceso de aprendizaje comienza con valores aleatorios de pesos ponderados y funciones de transferencia, que se van ajustando en base a dos procesos, que dan lugar a cada iteración o “*epoch*” [310,311]:

- Pase hacia delante o “*forward pass*” (en inglés): se trata del proceso de cálculo, en el que los valores de pesos ponderados y funciones de transferencia se aplican a un conjunto de muestras de entrenamiento, hasta obtener el valor final de salida. El orden de aplicación de los algoritmos es desde la capa de entrada hasta la de salida.
- Propagación de errores o “*error back propagation*” (en inglés): una vez obtenido el valor final, se calcula la magnitud del error entre los valores obtenidos y los experimentales. Este error se emplea para reajustar todos los pesos ponderados de la red neuronal, mediante la aplicación de diferentes algoritmos. Uno de los más empleados es el algoritmo de descenso en gradiente, que se basa en la estimación de la primera derivada del error con respecto a cada peso. El cálculo de realiza desde la capa de salida hasta la capa de entrada.

La familia de ANNs se divide en tres grupos: Redes de Perceptrón Multicapa o MLP (por sus siglas en inglés “*Multilayer Perceptron Networks*”), Funciones de Base Radial o RBF (por sus siglas en inglés “*Radial Basis Functions*”) y Máquinas de Vectores de Soporte o SVM (por sus siglas en inglés “*Support Vector Machines*”), siendo los dos primeros tipos los más empleados en la resolución de problemas de calibración multivariada. Las características que diferencian estos dos tipos de redes son [307]:

- Las redes RBF tienen una sola capa oculta, mientras que las redes MLP pueden tener una o varias.
- En las redes RBF, la capa oculta es no lineal y la capa de salida, lineal. Además, cada capa tiene una función diferente. Por otro lado, en las redes MLP existe un único modelo en todas las capas.
- En las redes RBF, el argumento de la función de transferencia es la distancia euclídea entre el vector de entrada y el centro de la función, mientras que las redes MLP computan el producto del vector de entrada y el vector de pesos.

Una de las mayores ventajas de las ANNs aplicadas a la regresión es que se tratan de aproximadores universales, que pueden ajustarse a cualquier función continua dentro de un dominio acotado, con una precisión predefinida. Para ello, las ANNs encuentran el modelo que mejor ajuste los valores de señales y respuestas, aunque la forma del modelo no esté definida. A pesar de ello, el empleo de ANNs solo se recomienda en aquellos modelos en los que la relación entre descriptores y respuestas no sea lineal, ya que los modelos lineales suelen generar mejores ajustes con los datos lineales [310].

4. REFERENCIAS

- [1] S. Radonjić, V. Maraš, J. Raičević y T. Košmerl, «Wine or beer? Comparison, changes and improvement of polyphenolic compounds during technological phases», *Molecules*, 25, 2020, 4960-4995. DOI: doi.org/10.3390/molecules25214960
- [2] M. Makwana y S. Hati, «Chapter 1: Fermented beverages and their health benefits», en: *Fermented Beverages. Volume 5: The Science of Beverages*, Woodhead Publishing Limited, 2019, 1-29. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00001-4
- [3] Organización Internacional de la Viña y el Vino, «Definición de productos», 2021. <http://www.oiv.int/public/medias/5985/definici-n-de-productos.pdf> (Último acceso 22 de enero de 2021)
- [4] J. Ochoa, «El vino y su cata», Gobierno de Navarra, 1995
- [5] J. Unterkofler, R.A. Muhlack y D.W. Jeffery, «Processes and purposes of extraction of grape components during winemaking: current state and perspectives», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 2020, 4737-4755. DOI: doi.org/10.1007/s00253-020-10558-3
- [6] B.V. Canizo, L.B. Escudero, R.G. Pellerano y R.G. Wuilloud, «Chapter 10: Quality monitoring and authenticity assessment of wines – analytical and chemometric methods», en: *Quality Control in the Beverage Industry. Volume 17: The Science of Beverages*, Academic Press, 2019, 335-384. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-816681-9.00010-2
- [7] J. Bujan, «Guía de la nueva cultura del vino», Rubes Editorial S.L., 2003
- [8] M.I. Mijares García-Pelayo y J.A. Sáez Illobre, «El vino de la cepa a la copa», Ediciones Mundi-Prensa, 1998
- [9] A.L. Waterhouse, G.L. Sacks y D.W. Jeffery, «Chapter 19: Outline of wine production», en: *Understanding Wine Chemistry*, Wiley, 2016, 159-171. DOI: doi.org/10.1002/9781118730720.ch19
- [10] R.S. Jackson, «Chapter 7: Fermentation», en: *Wine Science*, Academic Press, 2020, 462-572. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-816118-0.00007-6
- [11] Consejo Regulador de la DO, «Pliego de condiciones de la denominación de origen (DO) Ribera del Guadiana», 2020, 1-17
- [12] H. Fraga, «Viticulture and winemaking under climate change», *Agronomy*, 9, 2019, 2-5. DOI: doi.org/10.3390/agronomy9120783

- [13] Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2021. <https://www.oiv.int/es/> (Último acceso 22 de enero de 2021)
- [14] Observatorio Español del Mercado del Vino, «Superficie de viñedo en España 2020», 2020. <https://www.oemv.es/superficie-de-vinedo-en-espana-ano-2020> (Último acceso 25 de mayo de 2021)
- [15] Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, «La producción de vino y mosto de la campaña 2019/2020 se sitúa en 37.2 millones de hectolitros», 2020. <https://www.mapa.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/la-produccion-de-vino-y-mosto-de-la-campa%C3%B1a-2019/2020-se-sit%C3%BAa-en-372-millones-de-hectolitros/tcm:30-523946> (Último acceso 25 de mayo de 2021)
- [16] M. Díaz-González, «Capítulo 7: El sector vitivinícola», en: *La Agricultura y la Ganadería en Extremadura*, Fundación CB, 2015, 139-154
- [17] M.I. Talaverano Arroba, «Mejora de la calidad de uvas y vinos en Extremadura mediante técnicas vitícolas», Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura (España), 2017
- [18] Dirección General Agricultura y Ganadería, «Pliego de condiciones de la Indicación Geográfica Protegida “Vinos de la Tierra de Extremadura”», 2013
- [19] C.W. Bamforth, «Capítulo 2: La cerveza», en: *Alimentos, fermentación y microorganismos*, Editorial Acirbia S.A., 2005, 42-47
- [20] Grupo Mahou - San Miguel, Cervecerías, 2021. <https://www.loscervecistas.es/> (Último acceso 22 de enero de 2021)
- [21] L. Fernández Gil, «Revisión bibliográfica sobre la determinación analítica de aminas biógenas en bebidas alcohólicas», Trabajo Fin de Grado, Universidad de Extremadura (España), 2017
- [22] Q. Li, J. Wang y C. Liu, «Chapter 12: Beers», en: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, Elsevier B.V., 2017, 305-351. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00012-1
- [23] Statista, «La industria de la cerveza en España», 2020. <https://es.statista.com/estudio/31626/el-sector-cervecerero-en-espana-dossier-statista/> (Último acceso 22 de enero de 2021)

- [24] The Brewers of Europe, «Beer statistics 2018 Edition», 2018. <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2018/EU-beer-statistics-2018-web.pdf> (Último acceso 20 de enero de 2021)
- [25] The Brewers of Europe, «The contribution made by beer to the European economy», 2020. <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2020/contribution-made-by-beer-to-EU-economy-2020.pdf> (Último acceso 22 de enero de 2021)
- [26] Cerveceros de España y Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, «Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2019», 2019. https://cerveceros.org/uploads/5f6cb047a114e__Informe%20Socioeconomico%202019%20-%20Cerveceros%20de%20Espa%C3%B1a.pdf (Último acceso 25 de mayo de 2021)
- [27] Boletín Oficial del Estado, «Código de la cerveza», 2021. https://www.boe.es/biblioteca_juridica/codigos/codigo.php?id=265_Codigo_de_la_Cerveza&modo=1 (Último acceso 25 de mayo de 2021)
- [28] AECAI, Asociación Española de Cerveceros Artesanos e Independientes, 2021. <https://aecai.es/> (Último acceso 22 de enero de 2021)
- [29] C. Ancín-Azpilicueta, N. Jiménez-Moreno y C. Sola-Larrañaga, «Chapter 9: Wine», en: *Innovations in Traditional Foods*, Elsevier Inc., 2019, 221-256. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00009-5
- [30] M.A. Mirza, A.J. Kandhro, M.Y. Khuhawar, R. Arain, M.A. Choudhary y T.M. Jahangir, «Analysis of glyoxal, methylglyoxal and dimethylglyoxal in beverages and edible products by MEKC using meso-stilbenediamine as derivatizing reagent», *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 35, 2013, 52-57
- [31] C.M. Santos, I.M. Valente, L.M. Gonçalves y J.A. Rodrigues, «Chromatographic analysis of methylglyoxal and other α -dicarbonyls using gas-diffusion microextraction», *Analyst*, 138, 2013, 7233-7237. DOI: doi.org/10.1039/c3an00766a
- [32] D. Saison, D.P. de Schutter, F. Delvaux y F.R. Delvaux, «Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, 1216, 2009, 5061-5068. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.077

- [33] A. Barros, J.A. Rodrigues, P.J. Almeida y M.T. Oliva-Teles, «Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with *o*-phenylenediamine», *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 22, 1999, 2061-2069. DOI: doi.org/10.1081/JLC-100101786
- [34] J.H. Jeong, J. Cha y K.G. Lee, «Validation of analytical method for α -dicarbonyl compounds using gas chromatography–nitrogen phosphorous detector and their levels in alcoholic beverages», *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 2017, 1491-1497. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.13414
- [35] M. Bueno, J. Zapata y V. Ferreira, «Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy», *Journal of Chromatography A*, 1369, 2014, 33-42. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.004
- [36] C. Andrés-Iglesias, J. Nešpor, M. Karabín, O. Montero, C.A. Blanco y P. Dostálek, «Comparison of carbonyl profiles from Czech and Spanish lagers: traditional and modern technology», *LWT - Food Science and Technology*, 66, 2016, 390-397. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.066
- [37] G. de Revel y A. Bertrand, «A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 61, 1993, 267-272. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.2740610221
- [38] S. Chatterjee y A. Chen, «Voltammetric detection of the α -dicarbonyl compound: methylglyoxal as a flavoring agent in wine and beer», *Analytica Chimica Acta*, 751, 2012, 66-70. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2012.09.011
- [39] M. Daglia, A. Amoroso, D. Rossi, D. Mascherpa y G. Maga, «Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells», *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 2013, 67-74. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.002
- [40] G. de Revel, L. Pripis-Nicolau, J.C. Barbe y A. Bertrand, «The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 2000, 102-108. DOI: doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000101)80:1<102::AID-JSFA493>3.0.CO;2-Y

- [41] R. Flamini y A. Dalla Vedova, «Glyoxal/glycolaldehyde: a redox system involved in malolactic fermentation of wine», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2003, 2300-2303. DOI: doi.org/10.1021/jf020639h
- [42] T.J. Dwyer y J.D. Fillo, «Assaying α -dicarbonyl compounds in wine: a complementary GC-MS, HPLC, and visible spectrophotometric analysis», *Journal of Chemical Education*, 83, 2006, 273-276. DOI: doi.org/10.1021/ed083p273
- [43] A.C. da Silva Ferreira, S. Reis, C. Rodrigues, C. Oliveira y P.G. de Pinho, «Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma», *Journal of Food Science*, 72, 2007, 314-318. DOI: doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00368.x
- [44] P.S.C. Sri Harsha, M. Mesias, V. Lavelli y F.J. Morales, «Grape skin extracts from winemaking by-products as a source of trapping agents for reactive carbonyl species», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2016, 656-663. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.7137
- [45] B. Gibson, V. Aumala, R.L. Heiniö, A. Mikkelsen y K. Honkapää, «Differential evolution of Strecker and non-Strecker aldehydes during aging of pale and dark beers», *Journal of Cereal Science*, 83, 2018, 130-138. DOI: doi.org/10.1016/j.jcs.2018.08.009
- [46] M. Hellwig y T. Henle, «Maillard reaction products in different types of brewing malt», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 2020, 14274-14285. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06193
- [47] A. Bravo, J.C. Herrera, E. Scherer, Y. Ju-Nam, H. Rübsam, J. Madrid, C. Zufall y R. Rangel-Aldao, «Formation of α -dicarbonyl compounds in beer during storage of pilsner», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2008, 4134-4144. DOI: doi.org/10.1021/jf703696p
- [48] S. Rakete, A. Klaus y M.A. Glomb, «Investigations on the Maillard reaction of dextrans during aging of pilsner type beer», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2014, 9876-9884. DOI: doi.org/10.1021/jf503038c
- [49] L. Pripis-Nicolau, G. de Revel, A. Bertrand y A. Maujean, «Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, 3761-3766. DOI: doi.org/10.1021/jf991024w
- [50] M.A. Glomb, D. Rösch y R.H. Nagaraj, «Chapter 12: Maillard modifications in beer», en: *Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants*, American Chemical Society, 2001, 180-186. DOI: doi.org/10.1021/bk-2001-0775.ch012

- [51] N.R. Neng, C.A.A. Cordeiro, A.P. Freire y J.M.F. Nogueira, «Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization», *Journal of Chromatography A*, 1169, 2007, 47-52. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.060
- [52] G. Arribas-Lorenzo y F.J. Morales, «Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2010, 2966-2972. DOI: doi.org/10.1021/jf902815p
- [53] J.A. Donarski, D.P.T. Roberts y A.J. Charlton, «Quantitative NMR spectroscopy for the rapid measurement of methylglyoxal in Manuka honey», *Analytical Methods*, 2, 2010, 1479-1483. DOI: doi.org/10.1039/c0ay00125b
- [54] K.P. Mahar, M.Y. Khuhawar, T.G. Kazi, K. Abbasi y A.H. Channer, «Quantitative analysis of glyoxal, methyl glyoxal and dimethyl glyoxal from foods, beverages and wines using HPLC and 4-nitro-1,2-phenylenediamine as derivatizing reagent», *Asian Journal of Chemistry*, 22, 2010, 6983-6990
- [55] J. Wang y T. Chang, «Methylglyoxal content in drinking coffee as a cytotoxic factor», *Journal of Food Science*, 75, 2010, 167-171. DOI: doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01658.x
- [56] E. Arena, G. Ballistreri, F. Tomaselli y B. Fallico, «Survey of 1,2-dicarbonyl compounds in commercial honey of different floral origin», *Journal of Food Science*, 76, 2011, 1203-1210. DOI: doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02352.x
- [57] H. Ye, Y. Miao, C. Zhao y Y. Yuan, «Acrylamide and methylglyoxal formation in potato chips by microwaving and frying heating», *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2011, 1921-1926. DOI: doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02702.x
- [58] J. Atrott, S. Haberlau y T. Henle, «Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey», *Carbohydrate Research*, 361, 2012, 7-11. DOI: doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.025
- [59] J. Degen, M. Hellwig y T. Henle, «1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2012, 7071-7079. DOI: doi.org/10.1021/jf301306g

- [60] S. Gensberger, S. Mittelmaier, M.A. Glomb y M. Pischetsrieder, «Identification and quantification of six major α -dicarbonyl process contaminants in high-fructose corn syrup», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 2012, 2923-2931. DOI: doi.org/10.1007/s00216-012-5817-x
- [61] S. Oelschlaegel, M. Gruner, P.-N. Wang, A. Boettcher, I. Koelling-Speer y K. Speer, «Classification and characterization of Manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2012, 7229-7237. DOI: doi.org/10.1021/jf300888q
- [62] S. Windsor, M. Pappalardo, P. Brooks, S. Williams y M. Manley-Harris, «A convenient new analysis of dihydroxyacetone and methylglyoxal applied to Australian *Leptospermum* honeys», *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 4, 2012, 6-11. DOI: doi.org/10.5897/JPP11.025
- [63] A. Amoroso, G. Maga y M. Daglia, «Cytotoxicity of α -dicarbonyl compounds submitted to in vitro simulated digestion process», *Food Chemistry*, 140, 2013, 654-659. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.063
- [64] S. Kokkinidou y D.G. Peterson, «Response surface methodology as optimization strategy for reduction of reactive carbonyl species in foods by means of phenolic chemistry», *Food and Function*, 4, 2013, 1093-1104. DOI: doi.org/10.1039/c3fo60032g
- [65] T. Kunz, A. Strähmel, N. Cortés, L.W. Kroh y F.J. Methner, «Influence of intermediate Maillard reaction products with enediol structure on the oxidative stability of beverages», *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71, 2013, 114-123. DOI: doi.org/10.1094/ASBCJ-2013-0429-01
- [66] A. Papetti, D. Mascherpa, G. Marrubini y G. Gazzani, «Effect of *in vitro* digestion on free α -dicarbonyl compounds in balsamic vinegars», *Journal of Food Science*, 78, 2013, 514-519. DOI: doi.org/10.1111/1750-3841.12062
- [67] S. Windsor, K. Kavazos y P. Brooks, «The quantitation of hydroxymethylfurfural in Australian *Leptospermum* honeys», *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5, 2013, 21-25. DOI: doi.org/10.5897/JPP12.016
- [68] A.R. Corrales Escobosa, A. Gomez Ojeda, K. Wrobel, A.A. Magana y K. Wrobel, «Methylglyoxal is associated with bacteriostatic activity of high fructose agave syrups», *Food Chemistry*, 165, 2014, 444-450. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.140

- [69] M.C. Hurtado-Sánchez, A. Espinosa-Mansilla, M.I. Rodríguez-Cáceres y I. Durán-Merás, «Evaluation of liquid chromatographic behavior of lumazinic derivatives, from α -dicarbonyl compounds, in different C18 columns: application to wine samples using a fused-core column and fluorescence detection», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2014, 97-106. DOI: doi.org/10.1021/jf404180t
- [70] T. Kocadağlı y V. Gökmen, «Investigation of α -dicarbonyl compounds in baby foods by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2014, 7714-7720. DOI: doi.org/10.1021/jf502418n
- [71] H. Liu y J. Li, «Changes in glyoxal and methylglyoxal content in the fried dough twist during frying and storage», *European Food Research and Technology*, 238, 2014, 323-331. DOI: doi.org/10.1007/s00217-013-2110-y
- [72] S.M. Marshall, K.R. Schneider, K.V. Cisneros y L. Gu, «Determination of antioxidant capacities, α -dicarbonyls, and phenolic phytochemicals in Florida varietal honeys using HPLC-DAD-ESI-MSⁿ», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2014, 8623-8631. DOI: doi.org/10.1021/jf501329y
- [73] A. Papetti, D. Mascherpa y G. Gazzani, «Free α -dicarbonyl compounds in coffee, barley coffee and soy sauce and effects of in vitro digestion», *Food Chemistry*, 164, 2014, 259-265. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.022
- [74] J. Wichaphon, A. Giri, T. Ohshima y S. Lertsiri, «Determination of glyoxal and methylglyoxal in Thai fish sauce and their changes during storage test», *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8, 2014, 241-248. DOI: doi.org/10.1007/s11694-014-9197-0
- [75] M.C. Hurtado-Sánchez, A. Espinosa-Mansilla y I. Durán-Merás, «Influence of the presence of natural monosaccharides in the quantification of α -dicarbonyl compounds in high content sugar samples. A comparative study by ultra-high performance liquid chromatography-single quadrupole mass spectrometry using different derivatization reactions», *Journal of Chromatography A*, 1422, 2015, 117-127. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.001
- [76] Y. Sultanbawa, D. Cozzolino, S. Fuller, A. Cusack, M. Currie y H. Smyth, «Infrared spectroscopy as a rapid tool to detect methylglyoxal and antibacterial activity in Australian honeys», *Food Chemistry*, 172, 2015, 207-212. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.067

- [77] A. Hamzalıođlu y V. Gökmen, «Investigations on the reactions of α -dicarbonyl compounds with amino acids and proteins during: *in vitro* digestion of biscuits», *Food and Function*, 7, 2016, 2544-2550. DOI: doi.org/10.1039/c5fo01555c
- [78] M. Mesías, F. Holgado, G. Márquez-Ruiz y F.J. Morales, «Risk/benefit considerations of a new formulation of wheat-based biscuit supplemented with different amounts of chia flour», *LWT - Food Science and Technology*, 73, 2016, 528-535. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.056
- [79] N. Göncüođlu Taş y V. Gökmen, «Effect of alkalization on the Maillard reaction products formed in cocoa during roasting», *Food Research International*, 89, 2016, 930-936. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.021
- [80] N. Göncüođlu Taş y V. Gökmen, «Maillard reaction and caramelization during hazelnut roasting: a multiresponse kinetic study», *Food Chemistry*, 221, 2017, 1911-1922. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.159
- [81] J.H. Suh, C.T. Ho y Y. Wang, «Evaluation of carbonyl species in fish oil: an improved LC-MS/MS method», *Food Control*, 78, 2017, 463-468. DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.014
- [82] M. Navarro y F.J. Morales, «Effect of hydroxytyrosol and olive leaf extract on 1,2-dicarbonyl compounds, hydroxymethylfurfural and advanced glycation endproducts in a biscuit model», *Food Chemistry*, 217, 2017, 602-609. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.039
- [83] P. Yu, X.B. Xu y S.J. Yu, «The effect of pH and amino acids on the formation of methylglyoxal in a glucose-amino acid model system», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 2017, 3159-3165. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.8158
- [84] J. Deng, R. Liu, Q. Lu, P. Hao, A. Xu, J. Zhang y J. Tan, «Biochemical properties, antibacterial and cellular antioxidant activities of buckwheat honey in comparison to Manuka honey», *Food Chemistry*, 252, 2018, 243-249. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.115
- [85] T.T. Feng, J.H. Wu, X. Liang, M. Du, M.Q. Tan, L. Qin y X.B. Xu, «Quality properties and formation of α -dicarbonyl compounds in abalone muscle (*Haliotis discus*) as affected by tenderization and baking processes», *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 2018, 1503-1512. DOI: doi.org/10.1007/s11694-018-9765-9
- [86] M. Hellwig, L. Kühn y T. Henle, «Individual Maillard reaction products as indicators of heat treatment of pasta — A survey of commercial products», *Journal of Food Composition and Analysis*, 72, 2018, 83-92. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.009

- [87] J. Huang, Y. Wang, L. Yang, X. Peng, J. Zheng y S. Ou, «Effect of maize bran feruloylated oligosaccharides on the formation of endogenous contaminants and the appearance and textural properties of biscuits», *Food Chemistry*, 245, 2018, 974-980. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.075
- [88] Q. Lin, L. Han, G. Liu, W. Cheng y L. Wang, «A preliminary study on the formation pathways of glycated phosphatidylethanolamine of food rich in phospholipid during the heat-processing», *RSC Advances*, 8, 2018, 11280-11288. DOI: doi.org/10.1039/c8ra01072b
- [89] L. Paravisini y D.G. Peterson, «Role of reactive carbonyl species in non-enzymatic browning of apple juice during storage», *Food Chemistry*, 245, 2018, 1010-1017. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.071
- [90] J. Rückriemen y T. Henle, «Pilot study on the discrimination of commercial *Leptospermum* honeys from New Zealand and Australia by HPLC–MS/MS analysis», *European Food Research and Technology*, 244, 2018, 1203-1209. DOI: doi.org/10.1007/s00217-018-3036-1
- [91] X.-J. Wang, F. Gao, L.-C. Li, X. Hui, H. Li y W.-Y. Gao, «Quantitative analyses of α -dicarbonyl compounds in food samples by HPLC using 4-(2,3-dimethyl-6-quinoxaliny)-1,2-benzenediamine as a derivatizing reagent», *Microchemical Journal*, 141, 2018, 64-70. DOI: doi.org/10.1016/j.microc.2018.05.006
- [92] N. Göncüoğlu Taş y V. Gökmen, «Effect of roasting and storage on the formation of Maillard reaction and sugar degradation products in hazelnuts (*Corylus avellana* L.)», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 2019, 415-424. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05048
- [93] A. Hamzalıoğlu y V. Gökmen, «Investigations on the effect of broccoli and wine sulphur compounds on glyoxal scavenging under simulated physiological conditions», *Journal of Functional Foods*, 55, 2019, 220-228. DOI: doi.org/10.1016/j.jff.2019.02.033
- [94] Z. Han, J. Gao, X. Wang, W. Wang, J. Dong, Y. Zhang y S. Wang, «Formation and alterations of the potentially harmful Maillard reaction products during the production and storage of brown fermented milk», *Molecules*, 24, 2019, 272. DOI: doi.org/10.3390/molecules24020272
- [95] Y. Jiao, J. He, Z. He, D. Gao, F. Qin, M. Xie, M. Zeng y J. Chen, «Formation of N^ε-(carboxymethyl)lysine and N^ε-(carboxyethyl)lysine during black tea processing», *Food Research International*, 121, 2019, 738-745. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.051

- [96] F. Luo y X. Fei, «Maillard reaction derived from oil-tea camellia seed through roasting», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2019, 5000-5007. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.9740
- [97] L. Paravisini y D.G. Peterson, «Mechanisms non-enzymatic browning in orange juice during storage», *Food Chemistry*, 289, 2019, 320-327. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.049
- [98] Y. Wang, H. Hu, D.J. McClements, S. Nie, M. Shen, C. Li, Y. Huang, J. Chen, M. Zeng y M. Xie, «Effect of fatty acids and triglycerides on the formation of lysine-derived advanced glycation end-products in model systems exposed to frying temperature», *RSC Advances*, 9, 2019, 15162-15170. DOI: doi.org/10.1039/c9ra01410a
- [99] W. Zhang, M.M. Poojary, V. Rauh, C.A. Ray, K. Olsen y M.N. Lund, «Quantitation of α -dicarbonyls and advanced glycation endproducts in conventional and lactose-hydrolyzed ultrahigh temperature milk during 1 year of storage», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 2019, 12863-12874. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05037
- [100] W. Zhang, M.M. Poojary, K. Olsen, C.A. Ray y M.N. Lund, «Formation of α -dicarbonyls from dairy related carbohydrates with and without N α -Acetyl-L-Lysine during incubation at 40 and 50°C», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 2019, 6350-6358. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01532
- [101] Z. Batool, D. Xu, M. Wu, W. Jiao, U. Roobab, L. Weng, X. Zhang, X. Li, Y. Liang, B. Li y L. Li, «Determination of α -dicarbonyl compounds and 5-hydroxymethylfurfural in commercially available preserved dried fruits and edible seeds by optimized UHPLC–HR/MS and GC–TQ/MS», *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, 2020, 1-12. DOI: doi.org/10.1111/jfpp.14988
- [102] S. Cengiz, C. Kışmıroğlu, N. Çebi, J. Çatak y M. Yaman, «Determination of the most potent precursors of advanced glycation end products (AGEs) in chips, crackers, and breakfast cereals by high performance liquid chromatography (HPLC) using precolumn derivatization with 4-nitro-1,2-phenylenediamine», *Microchemical Journal*, 158, 2020, 105170. DOI: doi.org/10.1016/j.microc.2020.105170
- [103] E.D. Cömert y V. Gökmen, «Investigation of the methylglyoxal scavenging kinetics of different food matrices under simulated intestinal conditions», *European Food Research and Technology*, 246, 2020, 2461-2470. DOI: doi.org/10.1007/s00217-020-03589-7

- [104] E.E. Çelik y V. Gökmen, «Formation of Maillard reaction products in bread crust-like model system made of different whole cereal flours», *European Food Research and Technology*, 246, 2020, 1207-1218. DOI: doi.org/10.1007/s00217-020-03481-4
- [105] I. Gürsul Aktağ y V. Gökmen, «A survey of the occurrence of α -dicarbonyl compounds and 5-hydroxymethylfurfural in dried fruits, fruit juices, puree and concentrates», *Journal of Food Composition and Analysis*, 91, 2020, 103523. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103523
- [106] I. Gürsul Aktağ y V. Gökmen, «Multiresponse kinetic modelling of α -dicarbonyl compounds formation in fruit juices during storage», *Food Chemistry*, 320, 2020, 126620. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126620
- [107] A. Hamzalıoğlu y V. Gökmen, «5-hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling», *Food Chemistry*, 318, 2020, 126647. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126467
- [108] M.M. Poojary, W. Zhang, S.B. Olesen, V. Rauh y M.N. Lund, «Green tea extract decreases Arg-derived advanced glycation endproducts but not Lys-derived AGEs in UHT milk during 1-year storage», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 2020, 14261-14273. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05995
- [109] B. Yusufoglu, M. Yaman y E. Karakuş, «Determination of the most potent precursors of advanced glycation end products in some high-sugar containing traditional foods using high-performance liquid chromatography», *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, 2020, 1-6. DOI: doi.org/10.1111/jfpp.14708
- [110] H. Zhan, W. Tang, H. Cui, K. Hayat, S. Hussain, M.U. Tahir, S. Zhang, X. Zhang y C.T. Ho, «Formation kinetics of Maillard reaction intermediates from glycine–ribose system and improving Amadori rearrangement product through controlled thermal reaction and vacuum dehydration», *Food Chemistry*, 311, 2020, 125877. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125877
- [111] Y. Zhuang, L. Dong, J.-P. Wang, S.-J. Wang y S. Wang, «Formation and migration of α -dicarbonyl compounds during storage and reheating of a sugary food simulation system», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 2020, 2296-2304. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.10263

- [112] S. Brighina, C. Poveda Turrado, C. Restuccia, G. Walton, B. Fallico, M.J. Oruna-Concha y E. Arena, «Detrimental effect on the gut microbiota of 1,2-dicarbonyl compounds after in vitro gastro-intestinal and fermentative digestion», *Food Chemistry*, 341, 2021, 128237. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128237
- [113] Y. Kato, Y. Kishi, Y. Okano, M. Kawai, M. Shimizu, N. Suga, C. Yakemoto, M. Kato, A. Nagata y N. Miyoshi, «Methylglyoxal binds to amines in honey matrix and 2'-methoxyacetophenone is released in gaseous form into the headspace on the heating of Manuka honey», *Food Chemistry*, 337, 2021, 127789. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127789
- [114] D. Liu, Y. He, J. Xiao, Q. Zhou y M. Wang, «The occurrence and stability of Maillard reaction products in various traditional Chinese sauces», *Food Chemistry*, 342, 2021, 128319. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128319
- [115] K. Maasen, J.L.J.M. Scheijen, A. Opperhuizen, C.D.A. Stehouwer, M.M. Van Greevenbroek y C.G. Schalkwijk, «Quantification of dicarbonyl compounds in commonly consumed foods and drinks; presentation of a food composition database for dicarbonyls», *Food Chemistry*, 339, 2021, 128063. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128063
- [116] X.-Y. Wang, Y.-J. Ma, Y. Guo, X.-L. Luo, M. Du, L. Dong, P. Yu y X.-B. Xu, «Reinvestigation of 2-acetylthiazole formation pathways in the Maillard reaction», *Food Chemistry*, 345, 2021, 128761. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128761
- [117] H. Zhang, A.D. Troise, H. Zhang y V. Fogliano, «Cocoa melanoidins reduce the formation of dietary advanced glycation end-products in dairy mimicking system», *Food Chemistry*, 345, 2021, 128827. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128827
- [118] L. Zhang, Y. Sun, D. Pu, Y. Zhang, B. Sun y Z. Zhao, «Kinetics of α -dicarbonyl compounds formation in glucose-glutamic acid model of Maillard reaction», *Food Science and Nutrition*, 9, 2021, 290-302. DOI: doi.org/10.1002/fsn3.1995
- [119] C. Wang, Y. Lu, Q. Huang, T. Zheng, S. Sang y L. Lv, «Levels and formation of α -dicarbonyl compounds in beverages and the preventive effects of flavonoids», *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2017, 2030-2040. DOI: doi.org/10.1007/s13197-017-2639-z

- [120] J.M. Stephens, R.C. Schlothauer, B.D. Morris, D. Yang, L. Fearnley, D.R. Greenwood y K.M. Loomes, «Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand Manuka and Kanuka honeys», *Food Chemistry*, 120, 2010, 78-86. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.074
- [121] H.W. Jang, Y. Jiang, M. Hengel y T. Shibamoto, «Formation of 4(5)-methylimidazole and its precursors, α -dicarbonyl compounds, in Maillard model systems», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2013, 6865-6872. DOI: doi.org/10.1021/jf401958w
- [122] M. Serrano, M. Gallego y M. Silva, «Static headspace gas chromatography-mass spectrometry for the one-step derivatisation and extraction of eleven aldehydes in drinking water», *Journal of Chromatography A*, 1307, 2013, 158-165. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.065
- [123] M. Serrano, M. Gallego y M. Silva, «Quantitative analysis of aldehydes in canned vegetables using static headspace-gas chromatography-mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, 1524, 2017, 21-28. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.067
- [124] N.N. Gandhi, P.F. Cobra, J.L. Steele, J.L. Markley y S.A. Rankin, «Lactobacillus demonstrate thiol-independent metabolism of methylglyoxal: implications toward browning prevention in Parmesan cheese», *Journal of Dairy Science*, 101, 2018, 968-978. DOI: doi.org/10.3168/jds.2017-13577
- [125] Y.Y. Lee, T. Shibamoto, S. Do Ha, J. Ha, J. Lee y H.W. Jang, «Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in red ginseng products using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with GC-MS», *Journal of Separation Science*, 42, 2019, 1230-1239. DOI: doi.org/10.1002/jssc.201800841
- [126] I.K. Karabagias, M. Maia, V.K. Karabagias, I. Gatzias y A.V. Badeka, «Quality and origin characterisation of Portuguese, Greek, Oceanian, and Asian honey, based on poly-parametric analysis hand in hand with dimension reduction and classification techniques», *European Food Research and Technology*, 246, 2020, 987-1006. DOI: doi.org/10.1007/s00217-020-03461-8
- [127] H.H. Lim y H.S. Shin, «In-solution derivatization and detection of glyoxal and methylglyoxal in alcoholic beverages and fermented foods by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry», *Journal of Food Composition and Analysis*, 92, 2020, 103584. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103584

- [128] J. Kwon, H. Ahn y K.G. Lee, «Analysis of α -dicarbonyl compounds in coffee (*Coffea arabica*) prepared under various roasting and brewing methods», *Food Chemistry*, 343, 2021, 128525. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128525
- [129] C.E. Baños y M. Silva, «Analysis of low-molecular mass aldehydes in drinking waters through capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection», *Electrophoresis*, 31, 2010, 2028-2036. DOI: doi.org/10.1002/elps.200900734
- [130] L.P. Alagappan, P. Shanmugasundaram, B.L. Ramachandra, M.B. Gumpu, N. Nesakumar, K.J. Babu, S. Vedantham y J.B.B. Rayappan, «Fabrication of electrochemical biosensor with vanadium pentoxide nano-interface for the detection of methylglyoxal in rice», *Analytical Biochemistry*, 528, 2017, 19-25. DOI: doi.org/10.1016/j.ab.2017.04.010
- [131] A. Jayaprakasan, A. Thangavel, L.R. Bhat, M.B. Gumpu, N. Nesakumar, K.J. Babu, S. Vedantham y J.B.B. Rayappan, «Fabrication of an electrochemical biosensor with ZnO nanoflakes interface for methylglyoxal quantification in food samples», *Food Science and Biotechnology*, 27, 2018, 9-17. DOI: doi.org/10.1007/s10068-017-0193-0
- [132] A. Le Gresley, J. Kenny, C. Cassar, A. Kelly, A. Sinclair y M.D. Fielder, «The application of high resolution diffusion NMR to the analysis of Manuka honey», *Food Chemistry*, 135, 2012, 2879-2886. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.072
- [133] M.L. Mohedano, P. López, G. Spano y P. Russo, «Chapter 12: Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods», en: *Advances in Fermented Foods and Beverages. Improving Quality, Technologies and Health Benefits*, Elsevier Ltd, 2015, 273-310. DOI: doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00012-8
- [134] A.J. Buglass, «Chapter 5: Macronutrient content of alcoholic beverages», en: *Handbook of Alcoholic Beverages. Analytical and Nutritional Aspects*, John Wiley & Sons, Ltd, 2011, 961-974
- [135] R.S. Jackson, «Chapter 6: Chemical constituents of grapes and wine», en: *Wine Science*, Academic Press, 2020, 375-459. DOI: doi.org/10.1016/b978-0-12-816118-0.00006-4
- [136] M. Papageorgiou, D. Lambropoulou, C. Morrison, E. Kłodzińska, J. Namieśnik y J. Płotka-Wasyłka, «Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages», *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 98, 2018, 128-142. DOI: doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001

- [137] P. Kalac y M. Krížek, «A review of biogenic amines and polyamines in beer», *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 2003, 123-128. DOI: doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00141.x
- [138] S. Loret, P. Deloyer y G. Dandrifosse, «Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples», *Food Chemistry*, 89, 2005, 519-525. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.010
- [139] Organización Internacional de la Viña y el Vino, «Código OIV de buenas prácticas vitivinícolas para limitar al máximo la presencia de aminos biógenas en los productos de la viña», en: *Compendium of International Analysis of Methods OIV*, 2011
- [140] A.J. Buglass, «Chapter 10: Chemical composition of beverages and drinks», en: *Handbook of Food Chemistry*, Springer, 2015, 225-300. DOI: doi.org/10.1007/978-3-642-36605-5
- [141] M.A. Munir y K.H. Badri, «The importance of derivatizing reagent in chromatography applications for biogenic amine detection in food and beverages», *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020, 5814389. DOI: doi.org/10.1155/2020/5814389
- [142] G.I. Mohammed, A.S. Bashammakh, A.A. Alsibai, H. Alwael y M.S. El-Shahawi, «A critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs», *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 78, 2016, 84-94. DOI: doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.007
- [143] J.L. Ordóñez, A.M. Troncoso, M.D.C. García-Parrilla y R.M. Callejón, «Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review», *Analytica Chimica Acta*, 939, 2016, 10-25. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045
- [144] Y.-J. Zhang, Y. Zhang, Y. Zhou, G.-H. Li, W.-Z. Yang y X.-S. Feng, «A review of pretreatment and analytical methods of biogenic amines in food and biological samples since 2010», *Journal of Chromatography A*, 1605, 2019, 360361. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.015
- [145] Z. Stojanović y J. Kos, «Chapter 2: Detection of metabolites of microbial origin in beverages with harmful effect on human health-biogenic amines and mycotoxins», en: *Safety Issues in Beverage Production. Volume 18: The Science of Beverages*, 2019, 39-77. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-816679-6.00002-4
- [146] C. Ruiz-Capillas y A.M. Herrero, «Impact of biogenic amines on food quality and safety», *Foods*, 8, 2019, 62. DOI: doi.org/10.3390/foods8020062

- [147] Organización Internacional de la Viña y el Vino, «Method of determination of biogenic amines in wine by High-Performance Liquid Chromatography with photodiode array detection», en: *Compendium of International Analysis of Methods OIV*, 2015
- [148] S. Akan y Ö.Ö. Ocak, «Evaluation of storage time and grape seed extract addition on biogenic amines content of tarhana: a cereal-based fermented food», *LWT - Food Science and Technology*, 111, 2019, 861-868. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.109
- [149] Y. Alan, «Culture fermentation of *Lactobacillus* in traditional pickled gherkins: microbial development, chemical, biogenic amine and metabolite analysis», *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2019, 3930-3939. DOI: doi.org/10.1007/s13197-019-03866-8
- [150] M.B. da Silva, L.F.O.S. Rodrigues, G.C. Monteiro, G.R.S. Monar, H.A. Gomez Gomez, S. Seabra Junior, I.O. Minatel y G.P.P. Lima, «Evaluation of biogenic amines and nitrate in raw and pickled jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) fruit», *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2019, 2970-2978. DOI: doi.org/10.1007/s13197-019-03772-z
- [151] D. Cao, X. Xu, S. Xue, X. Feng y L. Zhang, «An *in situ* derivatization combined with magnetic ionic liquid-based fast dispersive liquid-liquid microextraction for determination of biogenic amines in food samples», *Talanta*, 199, 2019, 212-219. DOI: doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.065
- [152] Y.H. Chen, X.W. Liu, J.L. Huang, S. Baloch, X. Xu y X.F. Pei, «Microbial diversity and chemical analysis of Shuidouchi, traditional Chinese fermented soybean», *Food Research International*, 116, 2019, 1289-1297. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.018
- [153] O. Cwiková y G. Franke, «Biogenic amines in smear ripened cheeses», *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13, 2019, 378-384. DOI: doi.org/10.5219/1105
- [154] B.N. do Carmo Brito, R. Campos Chisté, A. Santos Lopes, M.B. Abreu Glória y R. da Silva Pena, «Influence of spontaneous fermentation of *manipueira* on bioactive amine and carotenoid profiles during *tucupi* production», *Food Research International*, 120, 2019, 209-216. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.040
- [155] C. Douny, S. Benmedjadi, F. Brose, O.H.I. Afé, A. Igout, D.J. Hounhouigan, V.B. Anihouvi y M.L. Scippo, «Development of an analytical method for the simultaneous measurement of 10 biogenic amines in meat: application to Beninese grilled pork samples», *Food Analytical Methods*, 12, 2019, 2392-2400. DOI: doi.org/10.1007/s12161-019-01587-4

- [156] G. Duflos, G. Inglebert, C. Himber, S. Degremont, B. Lombard y A. Brisabois, «Validation of standard method EN ISO 19343 for the detection and quantification of histamine in fish and fishery products using high-performance liquid chromatography», *International Journal of Food Microbiology*, 288, 2019, 97-101. DOI: doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.023
- [157] F. Esposito, P. Montuori, M. Schettino, S. Velotto, T. Stasi y T. Cirillo, «Level of biogenic amines in red and white wines, dietary exposure, and histamine-mediated symptoms upon wine ingestion», *Molecules*, 24, 2019, 3629
- [158] X. Feng, C. Jo, K.C. Nam y D.U. Ahn, «Impact of electron-beam irradiation on the quality characteristics of raw ground beef», *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 54, 2019, 87-92. DOI: doi.org/10.1016/j.ifset.2019.03.010
- [159] M. Ishimaru, Y. Muto, A. Nakayama, H. Hatate y R. Tanaka, «Determination of biogenic amines in fish meat and fermented foods using column-switching high performance liquid chromatography with fluorescence detection», *Food Analytical Methods*, 12, 2019, 166-175. DOI: doi.org/10.1007/s12161-018-1349-0
- [160] E. Jamróz, P. Kulawik, P. Guzik y I. Duda, «The verification of intelligent properties of furcellaran films with plant extracts on the stored fresh Atlantic mackerel during storage at 2°C», *Food Hydrocolloids*, 97, 2019, 105211. DOI: doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105211
- [161] S.J. Laly, J. Annamalai, K.A. Kumar, T. V. Sankar, L. KV y G. Ninan, «Formation of biogenic amines and associated biochemical and microbial attributes of whole sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) during iced storage», *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28, 2019, 221-232. DOI: doi.org/10.1080/10498850.2019.1572683
- [162] D.W. Li, J.J. Liang, R.Q. Shi, J. Wang, Y.L. Ma y X.T. Li, «Occurrence of biogenic amines in sufu obtained from Chinese market», *Food Science and Biotechnology*, 28, 2019, 319-327. DOI: doi.org/10.1007/s10068-018-0500-4
- [163] L. Li, D. Zou, L. Ruan, Z. Wen, S. Chen, L. Xu y X. Wei, «Evaluation of the biogenic amines and microbial contribution in traditional Chinese sausages», *Frontiers in Microbiology*, 10, 2019, 1-11. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2019.00872
- [164] J. Li, L. Zhou, W. Feng, H. Cheng, A.I. Muhammad, X. Ye y Z. Zhi, «Comparison of biogenic amines in Chinese commercial soy sauces», *Molecules*, 24, 2019, 1-10. DOI: doi.org/10.3390/molecules24081522

- [165] J. Majcherczyk y K. Surówka, «Effects of onion or caraway on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation and refrigerated storage», *Food Chemistry*, 298, 2019, 125083. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125083
- [166] Y.M. Kang, M.J. Kim, S.Y. Park, M.S. Heu y J.S. Kim, «Survey and exposure assessment of biogenic amines in fish species commonly consumed in Korea», *Journal of Food Protection*, 82, 2019, 151-158. DOI: doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-258
- [167] J. Milheiro, L.C. Ferreira, L. Filipe-Ribeiro, F. Cosme y F.M. Nunes, «A simple dispersive solid phase extraction clean-up/concentration method for selective and sensitive quantification of biogenic amines in wines using benzoyl chloride derivatisation», *Food Chemistry*, 274, 2019, 110-117. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.116
- [168] C.O. Mohan, C.N. Ravishankar, K. Ashok Kumar y T.K. Srinivasa Gopal, «Biogenic amines and nucleotide breakdown products of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate treated seer fish (*Scomberomorus commerson*) during iced storage», *Journal of Food Safety*, 39, 2019, 1-7. DOI: doi.org/10.1111/jfs.12633
- [169] B. Regubalan y L. Ananthanarayan, «Investigation of biogenic amines content in fermented idli batter during storage», *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2019, 1775-1784. DOI: doi.org/10.1007/s13197-019-03609-9
- [170] C. Reguera, S. Sanllorente, A. Herrero, L.A. Sarabia y M.C. Ortiz, «Detection of cold chain breaks using partial least squares-class modelling based on biogenic amine profiles in tuna», *Talanta*, 202, 2019, 443-451. DOI: doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.072
- [171] S. Shukla, J.S. Lee, V.K. Bajpai, I. Khan, Y.S. Huh, Y.K. Han y M. Kim, «Toxicological evaluation of lotus, ginkgo, and garlic tailored fermented Korean soybean paste (Doenjang) for biogenic amines, aflatoxins, and microbial hazards», *Food and Chemical Toxicology*, 133, 2019, 110729. DOI: doi.org/10.1016/j.fct.2019.110729
- [172] J.S. Choi, S.T. Jeong, H.S. Lee, B.H. Lee y S.M. Kim, «Biogenic amine production of makgeollis with controlled alcohol concentrations», *Food Science and Biotechnology*, 28, 2019, 923-930. DOI: doi.org/10.1007/s10068-018-0517-8
- [173] Y. Wang, X. Bao, F. Wang, H. Wang y L. Fu, «Dynamic detection of biogenic amines as a quality indicator and their relationship with free amino acids profiles in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)», *Journal of Food Science*, 84, 2019, 254-260. DOI: doi.org/10.1111/1750-3841.14425

- [174] S.Y. Han, L.L. Hao, X. Shi, J.M. Niu y B. Zhang, «Development and application of a new QuEChERS method in UHPLC-QQQ-MS/MS to detect seven biogenic amines in Chinese wines», *Foods*, 8, 2019, 1-18. DOI: doi.org/10.3390/foods8110552
- [175] J. Zhang, J. Hu, S. Wang, X. Lin, H. Liang, S. Li, C. Yu, X. Dong y C. Ji, «Developing and validating a UPLC-MS method with a StageTip-based extraction for the biogenic amines analysis in fish», *Journal of Food Science*, 84, 2019, 1138-1144. DOI: doi.org/10.1111/1750-3841.14597
- [176] I. Dias, M. Laranjo, M.E. Potes, A.C. Agulheiro-Santos, S. Ricardo-Rodrigues, A.R. Fialho, J. Véstia, M.J. Fraqueza, M. Oliveira y M. Elias, «Autochthonous starter cultures are able to reduce biogenic amines in a traditional portuguese smoked fermented sausage», *Microorganisms*, 8, 2020, 686. DOI: doi.org/10.3390/microorganisms8050686
- [177] E. Bartkiene, V. Lele, V. Sakiene, P. Zavistanaviciute, E. Zokaityte, A. Dauksiene, P. Jagminas, D. Klupsaite, S. Bliznikas y M. Ruzauskas, «Variations of the antimicrobial, antioxidant, sensory attributes and biogenic amines content in Lithuania-derived bee products», *LWT - Food Science and Technology*, 118, 2020, 108793. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108793
- [178] T. Bogdanović, S. Petričević, M. Brkljača, I. Listeš y J. Pleadin, «Biogenic amines in selected foods of animal origin obtained from the Croatian retail market», *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 37, 2020, 815-830. DOI: doi.org/10.1080/19440049.2020.1726503
- [179] A.F. Borges, A. Cózar, L. Patarata, L.T. Gama, C.M. Alfaia, M.J. Fernandes, M.H. Fernandes, H.V. Pérez y M.J. Fraqueza, «Effect of high hydrostatic pressure challenge on biogenic amines, microbiota, and sensory profile in traditional poultry- and pork-based semidried fermented sausage», *Journal of Food Science*, 85, 2020, 1256-1264. DOI: doi.org/10.1111/1750-3841.15101
- [180] A. Bouchefra, T. Idoui y C. Montanari, «El kadid a traditional salted dried camel meat from Algeria: contribution to the study of the composition in biogenic amine, organic acid, aromatic profile and microbial biodiversity», *Carpathian Journal of Food Science and Technology*, 12, 2020, 84-90. DOI: doi.org/10.34302/crpfst/2020.12.4.9
- [181] O. Bouzgarrou, R. Baron y S. Sadok, «Determination of the quality of liquid smoked tilapia fillets based on physicochemical analysis», *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2020, 978-991. DOI: doi.org/10.1007/s11694-019-00347-6

- [182] I.M. Al Bulushi, N. Guizani, M. Ayyash, M. Al Za'abi, A. Abushelaibi, H.C. Deeth, Z. Al Kharousi, F. Al Hamadani, S. Al Maskari y J. Alkalbani, «Bacterial diversity, biogenic amines and lipids oxidation in traditional dried anchovy (*Encrasicholina punctifer*) during ambient storage», *International Journal of Food Studies*, 9, 2020, 238-250. DOI: doi.org/10.7455/IJFS/9.1.2020.A9
- [183] D. Cao, X. Xu, X. Feng y L. Zhang, «Designed multifunctional visual observation of magnetic ionic liquid coupling with microwave-assisted derivatization for determination of biogenic amines», *Food Chemistry*, 333, 2020. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127518
- [184] A. Cicero, F.G. Galluzzo, G. Cammilleri, A. Pulvirenti, G. Giangrosso, A. Macaluso, A. Vella y V. Ferrantelli, «Development of a rapid and eco-friendly UHPLC analytical method for the detection of histamine in fish products», *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 2020, 1-11. DOI: doi.org/10.3390/ijerph17207453
- [185] A. Cicero, G. Cammilleri, F.G. Galluzzo, I. Calabrese, A. Pulvirenti, G. Giangrosso, N. Cicero, V. Cumbo, A. Vella, A. MacAluso y V. Ferrantelli, «Histamine in fish products randomly collected in Southern Italy: A 6-year study», *Journal of Food Protection*, 83, 2020, 241-248. DOI: doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-305
- [186] K. Delgado, C. Vieira, I. Dammak, B. Frasso, A. Brígida, M. Costa y C. Conte, «Different ultrasound exposure times influence the physicochemical and microbial quality properties in probiotic goat milk yogurt», *Molecules*, 25, 2020, 1-22. DOI: doi.org/10.3390/molecules25204638
- [187] K.C.A. Francisco, P.F. Brandão, R.M. Ramos, L.M. Gonçalves, A.A. Cardoso y J.A. Rodrigues, «Salting-out assisted liquid-liquid extraction with dansyl chloride for the determination of biogenic amines in food», *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 2020, 248-258. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.14300
- [188] S. He, Y. Chen, X. Yang, J. Gao, D. Su, J. Deng y B. Tian, «Determination of biogenic amines in Chub Mackerel from different storage methods», *Journal of Food Science*, 85, 2020, 1699-1706. DOI: doi.org/10.1111/1750-3841.15146
- [189] P. Ikonić, T. Peulić, M. Jakanović, B. Šojić, S. Škaljac, S. Popović, L. Šarić, A. Novaković, V. Tomović y D. Vasilev, «Evaluation of the physicochemical, biochemical and microbiological characteristics of three Serbian traditional dry-fermented sausages», *Journal of Food Science and Technology*, 2020. DOI: doi.org/10.1007/s13197-020-04825-4

- [190] W. Jia, R. Zhang, L. Shi, F. Zhang, J. Chang y X. Chu, «Effects of spices on the formation of biogenic amines during the fermentation of dry fermented mutton sausage», *Food Chemistry*, 321, 2020, 126723. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126723
- [191] B. Karayigit, N. Colak, F. Ozogul, A. Gundogdu, H. Inceer, N. Bilgiçli y F.A. Ayaz, «The biogenic amine and mineral contents of different milling fractions of bread and durum wheat (*Triticum L.*) cultivars», *Food Bioscience*, 37, 2020, 100676. DOI: doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100676
- [192] Y. Li, S. Jia, H. Hong, L. Zhang, S. Zhuang, X. Sun, X. Liu y Y. Luo, «Assessment of bacterial contributions to the biochemical changes of chill-stored blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fillets: protein degradation and volatile organic compounds accumulation», *Food Microbiology*, 91, 2020, 103495. DOI: doi.org/10.1016/j.fm.2020.103495
- [193] C. Liu, T. Zhu, H. Song, C. Niu, J. Wang, F. Zheng y Q. Li, «Evaluation and prediction of the biogenic amines in Chinese traditional broad bean paste», *Journal of Food Science and Technology*, 2020. DOI: doi.org/10.1007/s13197-020-04781-z
- [194] B. Liu, Z. Cao, L. Qin, J. Li, R. Lian y C. Wang, «Investigation of the synthesis of biogenic amines and quality during high-salt liquid-state soy sauce fermentation», *LWT - Food Science and Technology*, 133, 2020, 109835. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109835
- [195] S.M. Bani, M. Saaid y B. Saad, «An *in situ* dansylation ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on ionic liquid for determination of biogenic amines in foods», *Food Analytical Methods*, 13, 2020, 568-577. DOI: doi.org/10.1007/s12161-019-01656-8
- [196] K. Nalazek-Rudnicka, P. Kubica y A. Wasik, «Discrepancies in determination of biogenic amines in beer samples by reversed phase and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry», *Microchemical Journal*, 159, 2020, 105574. DOI: doi.org/10.1016/j.microc.2020.105574
- [197] M.N. Roselino, L.F. Maciel, V. Sirocchi, M. Caviglia, G. Sagratini, S. Vittori, M.P. Taranto y D.C.U. Cavallini, «Analysis of biogenic amines in probiotic and commercial salamis», *Journal of Food Composition and Analysis*, 94, 2020, 103649. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103649

- [198] L. Peivasteh-Roudsari, A. Rahmani, N. Shariatifar, B. Tajdar-Oranj, M. Mazaheri, P. Sadighara y A.M. Khaneghah, «Occurrence of histamine in canned fish samples (tuna, sardine, kilka, and mackerel) from markets in Tehran», *Journal of Food Protection*, 83, 2020, 136-141. DOI: doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-288
- [199] E.S. Plakidi, N.C. Maragou, M.E. Dasenaki, N.C. Megoulas, M.A. Koupparis y N.S. Thomaidis, «Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish based on pyrene sulfonyl chloride pre-column derivatization», *Foods*, 9, 2020, 1-20. DOI: doi.org/10.3390/foods9050609
- [200] N. Qiao, Z. Tao, S. Xie, H. Zhang, T. Zhang y Y. Jiang, «Investigation of biogenic amines in dried bonito flakes from different countries using high performance liquid chromatography», *Food Analytical Methods*, 13, 2020, 2213-2221. DOI: doi.org/10.1007/s12161-020-01830-3
- [201] R.M. Ramos, P.F. Brandão y J.A. Rodrigues, «Development of a SALLE-HPLC-FLD analytical method for the simultaneous determination of ten biogenic amines in cheese», *Food Analytical Methods*, 13, 2020, 1088-1098. DOI: doi.org/10.1007/s12161-020-01730-6
- [202] X. Sang, K. Li, Y. Zhu, X. Ma, H. Hao, J. Bi, G. Zhang y H. Hou, «The impact of microbial diversity on biogenic amines formation in grasshopper sub shrimp paste during the fermentation», *Frontiers in Microbiology*, 11, 2020, 1-13. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2020.00782
- [203] S.-K. Shen, Y.-W. Chen, X.-P. Dong, F.-J. Liu, W.-Q. Cai, J.-L. Wei, F. Bai, Y.-G. Shi, P. Li y Y.-R. Wang, «Changes in food quality and microbial composition of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) fillets treated with low temperature vacuum heating method during storage at 4°C», *Food Research International*, 138, 2020, 109665. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109665
- [204] S. Simunovic, V. Đorđević, F.J. Barba, J.M. Lorenzo, M. Rašeta, S. Janković y I. Tomasevic, «Characterisation of changes in physicochemical, textural and microbiological properties of Njeguška sausage during ripening», *Journal of Food Science and Technology*, 2020. DOI: doi.org/10.1007/s13197-020-04862-z
- [205] S. Shukla, A. Bahuguna, H.K. Park, J.K. Kim y M. Kim, «Effect of *Rhizopus nigricans* (*Rhizopus stolonifera*)-based novel starter culture on quality and safety attributes of doenjang, a traditional Korean soybean fermented food product», *Scientific Reports*, 10, 2020, 1-10. DOI: doi.org/10.1038/s41598-019-57382-y

- [206] Y. Sun, P. Gao, Y. Xu, W. Xia, Q. Hua y Q. Jiang, «Effect of storage conditions on microbiological characteristics, biogenic amines, and physicochemical quality of low-salt fermented fish», *Journal of Food Protection*, 83, 2020, 1057-1065. DOI: doi.org/10.4315/JFP-19-607
- [207] R. Wedekind, P. Keski-Rahkonen, N. Robinot, F. Mercier, E. Engel, I. Huybrechts y A. Scalbert, «Metabolic signatures of 10 processed and non-processed meat products after *in vitro* digestion», *Metabolites*, 10, 2020, 1-14. DOI: doi.org/10.3390/metabo10070272
- [208] F.L.Y. Fong, K.Y. Lam, C.S. Lau, K.H. Ho, Y.H. Kan, M.Y. Poon, H. El-Nezami y E.T.P. Sze, «Reduction in biogenic amines in douchi fermented by probiotic bacteria», *PLoS ONE*, 15, 2020, e0230916. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0230916
- [209] C. Zhang, Y. Zhang, D. Luan, Y. Qu, Y. Fan y K. Lai, «Changes in biogenic amines and total volatile base nitrogen in *Gonatopsis borealis* muscle during storage», *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2020, 106-113. DOI: doi.org/10.1007/s11694-019-00272-8
- [210] G.C.A. Chagas Junior, N.R. Ferreira, M.B.A. Gloria, L.H. da Silva Martins y A.S. Lopes, «Chemical implications and time reduction of on-farm cocoa fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*», *Food Chemistry*, 338, 2021, 127834. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127834
- [211] M. Castrica, L.M. Chiesa, M. Nobile, F. De Battisti, E. Siletti, D. Pessina, S. Panseri y C.M. Balzaretto, «Rapid safety and quality control during fish shelf-life by using a portable device», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 2021, 315-326. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.10646
- [212] I. Ivanova, M. Ivanova, G. Ivanov y E. Bilgucu, «Effect of somatic cells count in cow milk on the formation of biogenic amines in cheese», *Journal of Food Science and Technology*, 2021. DOI: doi.org/10.1007/s13197-020-04935-z
- [213] S. Kandasamy, J. Yoo, J. Yun, H.B. Kang, K.H. Seol y J.S. Ham, «Quantitative analysis of biogenic amines in different cheese varieties obtained from the Korean domestic and retail markets», *Metabolites*, 11, 2021, 1-16. DOI: doi.org/10.3390/metabo11010031
- [214] W. Li, H. Lu, Z. He, Y. Sang y J. Sun, «Quality characteristics and bacterial community of a Chinese salt-fermented shrimp paste», *LWT - Food Science and Technology*, 136, 2021, 110358. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110358

- [215] E. Lorencová, R.N. Salek, L. Buňková, M. Szczybrochová, M. Černíková y F. Buňka, «Assessment of biogenic amines profile in ciders from the Central Europe region as affected by storage time», *Food Bioscience*, 41, 2021, 100957. DOI: doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100957
- [216] J.K.G. Pataca, P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, H. Caldeira y J.S. Câmara, «Profiling the occurrence of biogenic amines in different types of tuna samples using an improved analytical approach», *LWT - Food Science and Technology*, 139, 2021, 110804. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110804
- [217] S.A. Saewan, Z.K. Khidhir y M.H. Al-Bayati, «The impact of storage duration and conditions on the formation of biogenic amines and microbial content in poultry meat», *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35, 2021, 183-188. DOI: doi.org/10.33899/ijvs.2020.126584.1346
- [218] G. Vinci, L. Gobbi, L. Maddaloni y S.A. Prencipe, «Simple, reliable determination of biogenic amines in Italian red wines. Direct analysis of underivatized biogenic amines by LC-ESI-MS», *Journal of Advanced Mass Spectroscopy*, 1, 2021, 1-6
- [219] M.Y. Esse, T.S. Guehi, J. Grabulos, G. Morel, R.T. Malomar, E. Tardan, C. Mestres y N. Achir, «Fate of proteic and lipidic compounds during production of a traditional legume condiment (Soumbala) made from African locust bean (*Parkia biglobosa*) seeds», *International Journal of Food Science and Technology*, 56, 2021, 804-813. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.14724
- [220] C. Espalha, J. Fernandes, M. Diniz y V. Vassilenko, «Fast and direct detection of biogenic amines in fish by GC-IMS technology», 6th IEEE Portuguese Meeting on Bioengineering, ENBENG 2019 - Proceedings, 2019. DOI: doi.org/10.1109/ENBENG.2019.8692532
- [221] M. Kamankesh, A. Mohammadi, A. Mollahosseini y S. Seidi, «Application of a novel electromembrane extraction and microextraction method followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine biogenic amines in canned fish», *Analytical Methods*, 11, 2019, 1898-1907. DOI: doi.org/10.1039/c9ay00224c
- [222] W. Wojnowski, J. Namieśnik y J. Płotka-Wasyłka, «Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for *in situ* determination of biogenic amines in meat: estimation of meat's freshness», *Microchemical Journal*, 145, 2019, 130-138. DOI: doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.034

- [223] L. Rivoira, M. Castiglioni y M.C. Bruzzoniti, «Chromatographic determination of biogenic amines in four typical Italian cheeses: correlations with processing and nutritional characteristics through a chemometric approach», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2019, 4963-4968. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.9730
- [224] K.M. Wójciak, D.M. Stasiak, J. Stadnik, K. Ferysiuk y A. Kononiuk, «The influence of sonication time on the biogenic amines formation as a critical point in uncured dry-fermented beef manufacturing», *International Journal of Food Science and Technology*, 54, 2019, 75-83. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.13906
- [225] J. Anderegg, M. Fischer, J. Dürig, A. Die, C. Lacroix y L. Meile, «Detection of biogenic amines and tyramine-producing bacteria in fermented sausages from Switzerland», *Journal of Food Protection*, 83, 2020, 1512-1519. DOI: doi.org/10.4315/JFP-19-468
- [226] E. Jabłońska-Ryś, A. Sławińska, A. Stachniuk y J. Stadnik, «Determination of biogenic amines in processed and unprocessed mushrooms from the Polish market», *Journal of Food Composition and Analysis*, 92, 2020, 103492. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103492
- [227] A.D. Kononiuk y M. Karwowska, «Comparison of selected parameters related to food safety of fallow deer and beef uncured fermented sausages with freeze-dried acid whey addition», *Meat Science*, 161, 2020, 108015. DOI: doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108015
- [228] A. Tan, Y. Zhao, K. Sivashanmugan, K. Squire y A.X. Wang, «Quantitative TLC-SERS detection of histamine in seafood with support vector machine analysis», *Food Control*, 103, 2019, 111-118. DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.032
- [229] I.P. Silva, L.G. Dias, M.O. da Silva, C.S. Machado, V.M.B. Paula, N.S. Evangelista-Barreto, C.A.L. de Carvalho y L.M. Estevinho, «Detection of biogenic amines in mead of social bee», *LWT - Food Science and Technology*, 121, 2020, 108969. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108969
- [230] Y. Zhang, J. Yu, S. Lai, J. Song, X. Wu, D. Wang, L. Pang y T. Chai, «Rapid determination of histamine level in seafood using read-out strips based on high-performance thin layer chromatography modified with self-visualization nanomaterials», *Food Control*, 122, 2021, 107816. DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107816
- [231] M.R. Gama y F.R.P. Rocha, «Solventless separation of underivatized biogenic amines by sequential injection chromatography», *Microchemical Journal*, 156, 2020, 104839. DOI: doi.org/10.1016/j.microc.2020.104839

- [232] L. Song, Y. Huang, M.J. Gou, J. Crommen, Z. Jiang y Y. Feng, «Method development and validation for the determination of biogenic amines in soy sauce using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry», *Journal of Separation Science*, 43, 2020, 2728-2736. DOI: doi.org/10.1002/jssc.202000030
- [233] J.O.F. Mantoanelli, L.M. Gonçalves y E.A. Pereira, «Dansyl chloride as a derivatizing agent for the analysis of biogenic amines by CZE-UV», *Chromatographia*, 83, 2020, 767-778. DOI: doi.org/10.1007/s10337-020-03896-x
- [234] P. Nakthong, T. Kondo, O. Chailapakul y W. Siangproh, «Development of an unmodified screen-printed graphene electrode for nonenzymatic histamine detection», *Analytical Methods*, 12, 2020, 5407-5414. DOI: doi.org/10.1039/d0ay01443e
- [235] L.A. Pradela-Filho, D.A.G. Araújo, R.M. Takeuchi, A.L. Santos y C.S. Henry, «Thermoplastic electrodes as a new electrochemical platform coupled to microfluidic devices for tryptamine determination», *Analytica Chimica Acta*, 1147, 2021, 116-123. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.059
- [236] S. Bettini, S. Pal, S. Sawalha, A. Licciulli, L. Valli, G. Giancane y R. Pagano, «Cellulose-based substrate for SERS-promoted histamine picomolar detection in beverages», *Chemistry Select*, 4, 2019, 2968-2975. DOI: doi.org/10.1002/slct.201803323
- [237] K. Shim y Y. Jeong, «Freshness evaluation in chub mackerel (*Scomber japonicus*) using near-infrared spectroscopy determination of the cadaverine content», *Journal of Food Protection*, 82, 2019, 768-774. DOI: doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-529
- [238] N. Fan, G. Liu, G. Wan, J. Ban, R. Yuan, Y. Sun y Y. Li, «A combination of near-infrared hyperspectral imaging with two-dimensional correlation analysis for monitoring the content of biogenic amines in mutton», *International Journal of Food Science and Technology*, 2021, 1-10. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.14950
- [239] A. Lapenna, M. Dell'Aglio, G. Palazzo y A. Mallardi, «“Naked” gold nanoparticles as colorimetric reporters for biogenic amine detection», *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 600, 2020, 124903. DOI: doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124903
- [240] J. Navarro, I. Sanz-Vicente, R. Lozano, S. de Marcos y J. Galbán, «Analytical possibilities of putrescine and cadaverine enzymatic colorimetric determination in tuna based on diamine oxidase: a critical study of the use of ABTS», *Talanta*, 208, 2020, 120392. DOI: doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120392

- [241] B. Zhu, L. Jiang, T. Chen, G.M. Bao, L. Zeng, X. Hu y H.Q. Yuan, «A colorimetric and fluorescence lighting-up probe for the determination of biogenic primary diamine during the spoilage of fish», *Dyes and Pigments*, 186, 2021, 108963. DOI: doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108963
- [242] Y.F. Li, Z.Z. Lin, C.Y. Hong y Z.Y. Huang, «Colorimetric detection of putrescine and cadaverine in aquatic products based on the mimic enzyme of (Fe,Co) codoped carbon dots», *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 2021, 1747-1753. DOI: doi.org/10.1007/s11694-020-00782-w
- [243] A.I. Danchuk, N.S. Komova, S.N. Mobarez, S.Y. Doronin, N.A. Burmistrova, A.V. Markin y A. Duerkop, «Optical sensors for determination of biogenic amines in food», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 2020, 4023-4036. DOI: doi.org/10.1007/s00216-020-02675-9
- [244] S.K. Kannan, B. Ambrose, S. Sudalaimani, M. Pandiaraj, K. Giribabu y M. Kathiresan, «A review on chemical and electrochemical methodologies for the sensing of biogenic amines», *Analytical Methods*, 12, 2020, 3438-3453. DOI: doi.org/10.1039/d0ay00358a
- [245] R. Torre, E. Costa-Rama, H.P.A. Nouws y C. Delerue-Matos, «Screen-printed electrode-based sensors for food spoilage control: bacteria and biogenic amines detection», *Biosensors*, 10, 2020, 139. DOI: doi.org/10.3390/BIOS10100139
- [246] N. Verma, V. Hooda, A. Gahlaut, A. Gothwal y V. Hooda, «Enzymatic biosensors for the quantification of biogenic amines: a literature update», *Critical Reviews in Biotechnology*, 40, 2020, 1-14. DOI: doi.org/10.1080/07388551.2019.1680600
- [247] K. Tang y Q. Li, «Chapter 11: Biochemistry of wine and beer fermentation», en: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Food and Beverages Industry*, Elsevier B.V., 2017, 281-304. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00011-X
- [248] G. Gutiérrez-Gamboa, T. Garde-Cerdán, Y. Moreno-Simunovic y E.P. Pérez-Álvarez, «Chapter 10: Amino acid composition of grape juice and wine – principal factors that determine its content and contribution to the human diet», en: *Nutrients in Beverages. Volume 12: The Science of Beverages*, Elsevier Inc., 2019, 369-391. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-816842-4.00010-1
- [249] G.G. Stewart, «Saccharomyces: brewer's yeast», en: *Encyclopedia of Food Microbiology. Second Edition*, Elsevier, 2014, 302-308. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00293-7

- [250] I.M. Ferreira y L.F. Guido, «Impact of wort amino acids on beer flavour: a review», *Fermentation*, 4, 2018, 23. DOI: doi.org/10.3390/fermentation4020023
- [251] A.E. Hill y G.G. Stewart, «Free amino nitrogen in brewing», *Fermentation*, 5, 2019, 22-33. DOI: doi.org/10.3390/fermentation5010022
- [252] H.E. Anderson, I.C. Santos, Z.L. Hildenbrand y K.A. Schug, «A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control», *Analytica Chimica Acta*, 1085, 2019, 1-20. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061
- [253] A.G. Cordente, S. Schmidt, G. Beltran, M.J. Torija y C.D. Curtin, «Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 2019, 4325-4336. DOI: doi.org/10.1007/s00253-019-09840-w
- [254] M.J. Cejudo-Bastante, F. Sonni, F. Chinnici, A. Versari, M.S. Perez-Coello y C. Riponi, «Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines», *LWT - Food Science and Technology*, 43, 2010, 1501-1507. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.011
- [255] M.T. Kelly, A. Blaise y M. Larroque, «Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey», *Journal of Chromatography A*, 1217, 2010, 7385-7392. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.047
- [256] E. Mazzucco, F. Gosetti, M. Bobba, E. Marengo, E. Robotti y M.C. Gennaro, «High performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for the simultaneous determination of typical biogenic amines and precursor amino acids. Applications in food chemistry», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2010, 127-134. DOI: doi.org/10.1021/jf9030053
- [257] S. Jia, Y.P. Kang, J.H. Park, J. Lee y S.W. Kwon, «Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry», *Journal of Chromatography A*, 1218, 2011, 9174-9182. DOI: doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.040

- [258] R. López, I. López-Alfaro, A.R. Gutiérrez, C. Tenorio, P. Garijo, L. González-Arenzana y P. Santamaría, «Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition», *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2011, 2373-2381. DOI: doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02759.x
- [259] C. Bueno-Solano, J. López-Cervantes, D.I. Sánchez-Machado y O.N. Campas-Baypoli, «HPLC determination of histamine, tyramine and amino acids in shrimp by-products», *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23, 2012, 96-102. DOI: doi.org/10.1590/s0103-50532012000100014
- [260] M.P. Arrieta y M.S. Prats-Moya, «Free amino acids and biogenic amines in Alicante Monastrell wines», *Food Chemistry*, 135, 2012, 1511-1519. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.008
- [261] B. Redruello, V. Ladero, I. Cuesta, J.R. Álvarez-Buylla, M.C. Martín, M. Fernández y M.A. Alvarez, «A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent», *Food Chemistry*, 139, 2013, 1029-1035. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071
- [262] B.C. Agustini, D.B. de Lima y T.M.B. Bonfim, «Composition of amino acids and bioactive amines in common wines of Brazil», *Acta Scientiarum - Health Sciences*, 36, 2014, 225-233. DOI: doi.org/10.4025/actascihealthsci.v36i2.20187
- [263] Y.Q. Wang, D.Q. Ye, B.Q. Zhu, G.F. Wu y C.Q. Duan, «Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during fermentation and evaluation of matrix effect», *Food Chemistry*, 163, 2014, 6-15. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.064
- [264] M. Arbulu, M.C. Sampedro, A. Gómez-Caballero, M.A. Goicolea y R.J. Barrio, «Untargeted metabolomic analysis using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry for non-volatile profiling of wines», *Analytica Chimica Acta*, 858, 2015, 32-41. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.028
- [265] A. Hayat, T.M. Jahangir, M.Y. Khuhawar, M. Alamgir, Z. Hussain, F.U. Haq y S.G. Musharraf, «HPLC determination of gamma amino butyric acid (GABA) and some biogenic amines (BAs) in controlled, germinated, and fermented brown rice by pre-column derivatization», *Journal of Cereal Science*, 64, 2015, 56-62. DOI: doi.org/10.1016/j.jcs.2015.04.014

- [266] Q. Jin, L. Chen, Z. Li, X. Li y J. Li, «Effect of diammonium phosphate supplementation on the amino acid metabolism during fermentation and sensory properties of fresh spine grape (*Vitis davidii* Foex) wine», *Food Science and Biotechnology*, 24, 2015, 2051-2057. DOI: doi.org/10.1007/s10068-015-0273-y
- [267] C.I.G. Tuberoso, F. Congiu, G. Serreli y S. Mameli, «Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD», *Food Chemistry*, 175, 2015, 29-35. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.120
- [268] F. Chinnici, E. Durán-Guerrero y C. Riponi, «Discrimination of some European vinegars with protected denomination of origin as a function of their amino acid and biogenic amine content», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 2016, 3762-3771. DOI: doi.org/10.1002/jsfa.7566
- [269] Y. He, X.E. Zhao, R. Wang, N. Wei, J. Sun, J. Dang, G. Chen, Z. Liu, S. Zhu y J. You, «Simultaneous determination of food-related biogenic amines and precursor amino acids using *in situ* derivatization ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 2016, 8225-8234. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03536
- [270] J.M. Poveda, G.M. Molina y S. Gómez-Alonso, «Variability of biogenic amine and free amino acid concentrations in regionally produced goat milk cheeses», *Journal of Food Composition and Analysis*, 51, 2016, 85-92. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2016.06.012
- [271] C. Lorenzo, M. Bordiga, E.P. Pérez-Álvarez, F. Travaglia, M. Arlorio, M.R. Salinas, J.D. Coisson y T. Garde-Cerdán, «The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine», *Food Research International*, 99, 2017, 328-335. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.016
- [272] J.L. Ordóñez, A.M. Cañete-Rodríguez, R.M. Callejón, M.I. Santos-Dueñas, A.M. Troncoso, I. García-García y M.C. García-Parrilla, «Effect of gluconic acid submerged fermentation of strawberry purée on amino acids and biogenic amines profile», *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, 2017, 1-8. DOI: doi.org/10.1111/jfpp.12787
- [273] X. Ouyang, S. Wang, G. Yuan, Y. Liu, P. Gu, B. Zhang y B. Zhu, «Comparison of amino acids, biogenic amines and ammonium ion of wines made of different types of fruits», *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 2017, 448-456. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.13300

- [274] M.S. Diamante, C.V. Borges, M.B. da Silva, I.O. Minatel, C.R. Corrêa, H.A.G. Gomez y G.P.P. Lima, «Bioactive amines screening in four genotypes of thermally processed cauliflower», *Antioxidants*, 8, 2019, 1-15. DOI: doi.org/10.3390/antiox8080311
- [275] J.M. Poveda, «Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: a statistical approach», *Food Control*, 96, 2019, 227-233. DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.012
- [276] M. Bordiga, R. Guzzon, R. Larcher, F. Travaglia, M. Arlorio y J.D. Coisson, «Variation in content of tyramine, histamine, 2-phenylethylamine, tryptamine and their precursor amino acids in a Chardonnay wine by using different commercial active dry yeasts and nitrogen sources», *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 2020, 559-568. DOI: doi.org/10.1111/ijfs.14307
- [277] G.C.L. Reis, B.M. Dala-Paula, O.L. Tavano, L.R. Guidi, H.T. Godoy y M.B.A. Gloria, «*In vitro* digestion of spermidine and amino acids in fresh and processed *Agaricus bisporus* mushroom», *Food Research International*, 137, 2020, 109616. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109616
- [278] G.C.L. Reis, L.R. Guidi, C. Fernandes, H.T. Godoy y M.B.A. Gloria, «UPLC-UV method for the quantification of free amino acids, bioactive amines, and ammonia in fresh, cooked, and canned mushrooms», *Food Analytical Methods*, 13, 2020, 1613-1626. DOI: doi.org/10.1007/s12161-020-01777-5
- [279] O. Świder, M.Ł. Roszko, M. Wójcicki y K. Szymczyk, «Biogenic amines and free amino acids in traditional fermented vegetables-dietary risk evaluation», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 2020, 856-868. DOI: doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05625
- [280] E. Tuenter, C. Delbaere, A. de Winne, S. Bijttebier, D. Custers, K. Foubert, J. Van Durme, K. Messens, K. Dewettinck y L. Pieters, «Non-volatile and volatile composition of West African bulk and Ecuadorian fine-flavor cocoa liquor and chocolate», *Food Research International*, 130, 2020, 108943. DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108943
- [281] S. Rodríguez-Sánchez, I.M. Ramos, S. Seseña, J.M. Poveda y M.L. Palop, «Potential of *Lactobacillus* strains for health-promotion and flavouring of fermented dairy foods», *LWT - Food Science and Technology*, 143, 2021, 111102. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111102

- [282] A. Tsiasioti y P.D. Tzanavaras, «Selective post-column derivatization coupled to cation exchange chromatography for the determination of histamine and its precursor histidine in fish and Oriental sauce samples», *Food Chemistry*, 351, 2021, 129351. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129351
- [283] M.A. Rabie, C. Peres y F.X. Malcata, «Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats», *Meat Science*, 96, 2014, 82-87. DOI: doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.042
- [284] J. Anderegg, F. Constancias y L. Meile, «Effects of sodium chloride on tyramine production in a fermented food model and its inhibition by tyrosine-degrading *Lactobacillus plantarum* JA-1199», *Chimia*, 74, 2020, 391-397. DOI: doi.org/10.2533/CHIMIA.2020.391
- [285] E. Shumilina, R. Slizyte, R. Mozuraityte, A. Dykyy, T.A. Stein y A. Dikiy, «Quality changes of salmon by-products during storage: assessment and quantification by NMR», *Food Chemistry*, 211, 2016, 803-811. DOI: doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.088
- [286] H.C. Kim, K.H. Baek, Y. Ko, H.J. Lee, D. Yim y C. Jo, «Dry-aged beef using 2D NMR spectroscopy», *Molecules*, 25, 2020, 3087
- [287] X. Lou, D. Zhai y H. Yang, «Changes of metabolite profiles of fish models inoculated with *Shewanella baltica* during spoilage», *Food Control*, 123, 2021, 107697. DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107697
- [288] O. Monago Maraña, «Caracterización de componentes minoritarios y trazas en pimentón. Desarrollo de métodos analíticos espectroscópicos y cromatográficos en combinación con algoritmos quimiométricos de calibración multivariante multi-vía», Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura (España), 2018
- [289] C.M. Teglia, «Desarrollo de estrategias analíticas basadas en técnicas cromatográficas y modelado quimiométrico para la determinación de ácido retinoico y principios activos de uso veterinario en muestras de interés biológico», Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Litoral (Argentina), 2017
- [290] A.C. Olivieri y G.M. Escandar, «Practical three-way calibration», Elsevier, 2014
- [291] R. Boqué Martí y J. Ferré Baldrich, «Chapter 1: Fundamentals of PARAFAC», en: *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*, Elsevier, 2015, 7-35
- [292] A.C. Olivieri, «Regresión lineal en química analítica». <https://es.slideshare.net/PatricioHerrera1/regresion-lineal-en-quimica-analitica> (Último acceso 6 de mayo de 2021)

- [293] J. Amat Rodrigo, «Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA) y t-SNE», 2017. https://www.cienciadedatos.net/documentos/35_principal_component_analysis (Último acceso 3 de abril de 2021)
- [294] M. Porcel, «Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis», Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona (España), 2001
- [295] F. Parra, «Estadística y machine learning con R», 2019. <https://bookdown.org/content/2274/portada.html> (Último acceso 3 de abril de 2021)
- [296] P.-N. Tan, M. Steinbach, A. Karpatne y V. Kumar, «Chapter 7: Cluster Analysis. Basic concepts and algorithms», en: *Introduction to Data Mining. 2nd Edition*, Pearson, 2019, 525-612
- [297] A.F.M. Alkarkhi y W.A.A. Alqaraghuli, «Chapter 10: Discriminant Analysis and Classification», en: *Easy Statistics for Food Science with R*, Academic Press, 2019, 161-175. DOI: doi.org/10.1016/b978-0-12-814262-2.00010-8
- [298] R. Bro, «PARAFAC. Tutorial and applications», *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38, 1997, 149-171. DOI: [doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00032-4)
- [299] D. Airado-Rodríguez, I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz y J.P. Wold, «Front-face fluorescence spectroscopy. A new tool for control in the wine industry», *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 2011, 257-264. DOI: doi.org/10.1016/j.jfca.2010.10.005
- [300] H.C. Goicoechea, «Parte 3: Segundo orden PARAFAC - Análisis de datos multivariados para la calibración en química analítica». <https://www.fbc.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/wp-content/uploads/2016/06/3-PARAFAC-2016.pdf> (Último acceso 6 de mayo de 2021)
- [301] H.C. Goicoechea, «Parte 5: Segundo orden MCR-ALS - Análisis de datos multivariados para la calibración en química analítica». <https://fbc.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/wp-content/uploads/2016/06/5-MCR-2016.pdf> (Último acceso 6 de mayo de 2021)
- [302] R. Tauler y A. de Juan, «Chapter 5: Multivariate Curve Resolution for quantitative analysis», en: *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*, Elsevier, 2015, 247-292
- [303] W. Windig y J. Guilment, «Interactive self-modeling mixture analysis», *Analytical Chemistry*, 63, 1991, 1425-1432

- [304] D.M. Haaland y E.V. Thomas, «Partial Least-Squares methods for spectral analyses. 1: Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information», *Analytical Chemistry*, 60, 1988, 1193-1202. DOI: doi.org/10.1021/ac00162a020
- [305] D.M. Haaland y E.V. Thomas, «Partial Least-Squares methods for spectral analyses. 2: Application to simulated and glass spectral data», *Analytical Chemistry*, 60, 1988, 1202-1208. DOI: doi.org/10.1021/ac00162a021
- [306] H.C. Goicoechea, «Parte 4: Segundo orden U-PLS/RBL - Análisis de datos multivariados para la calibración en química analítica». <https://www.fbcu.unl.edu.ar/laboratorios/ladaq/wp-content/uploads/2016/06/4-UPLS-2016.pdf> (Último acceso 6 de mayo de 2021)
- [307] A. García-Reiriz, P.C. Damiani, M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea y A.C. Olivieri, «A versatile strategy for achieving the second-order advantage when applying different artificial neural networks to non-linear second-order data: unfolded principal component analysis/residual bilinearization», *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 92, 2008, 61-70. DOI: doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.12.002
- [308] A. de Araújo Gomes, M.R. Alcaraz, H.C. Goicoechea y M.C.U. Araújo, «The successive projections algorithm for interval selection in trilinear partial least-squares with residual bilinearization», *Analytica Chimica Acta*, 811, 2014, 13-22. DOI: doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.022
- [309] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, H.C. Goicoechea y A. Muñoz de la Peña, «Chapter 7: Unfolded and multiway Partial Least Squares with residual multilinearization. Fundamentals», en: *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*, Elsevier, 2015, 347-364
- [310] F. Despagne, «Neural networks in multivariate calibration», *Analyst*, 123, 1998, 157R-178R. DOI: doi.org/10.1039/a805562i
- [311] A.C. Olivieri, «On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization. Second-order advantage and precision properties», *Journal of Chemometrics*, 19, 2005, 253-265. DOI: doi.org/10.1002/cem.927



CAPÍTULO II

Resultados y Discusión



En el trabajo de investigación que se recoge en la presente Tesis se han desarrollado diferentes metodologías analíticas para la determinación de distintos compuestos minoritarios en muestras de bebidas alcohólicas fermentadas. El objetivo ha sido intentar mejorar los métodos propuestos en la bibliografía, ya fuera mediante el desarrollo de nuevas reacciones de derivatización, separaciones cromatográficas más rápidas, tratamiento de muestra más simple o mayor automatización del proceso. Además, se ha trabajado con diferentes herramientas quimiométricas, tanto con fines cualitativos (optimización de métodos o clasificación de muestras) como con fines cuantitativos. El empleo de estos algoritmos ha permitido la agrupación de las muestras en base a diferentes condiciones de almacenamiento, así como la identificación de los principales factores de variación de los datos. Además, también ha permitido la cuantificación de diferentes analitos en presencia de interferentes sin necesidad de emplear técnicas separativas, con el consecuente ahorro de tiempo, reactivos y disolventes. Los artículos a los que se hace referencia durante esta discusión de resultados se encuentran en el *Capítulo IV. Publicaciones*.

Tal y como se ha adelantado en el capítulo anterior, los compuestos dicarbonílicos son importantes en enología por diferentes razones, principalmente: impacto sensorial, reactividad con otros compuestos y posibles efectos microbiológicos. De la misma forma, en la cerveza también están relacionados con las características sensoriales, normalmente de forma desagradable. Además, también pueden tener efectos negativos en la salud de los consumidores si se ingieren en grandes cantidades. Por esta razón, su detección y cuantificación en bebidas alcohólicas fermentadas es importante.

Dentro de la gran familia de compuestos que forman este grupo, el trabajo de esta Tesis se ha centrado en los analitos GL y MGL, ya que se trata de compuestos muy comúnmente encontrados en bebidas fermentadas, pero menos estudiados que otros compuestos dicarbonílicos como el diacetilo. Además, al tratarse de los representantes más pequeños de esta familia, son los compuestos más reactivos de la misma.

Así pues, tras la obligada revisión bibliográfica para conocer los métodos analíticos desarrollados hasta la fecha con el mismo objetivo, se comprobó que la etapa de derivatización era fundamental para la determinación de estos analitos, y que los reactivos derivatizantes empleados tenían en común la característica de que poseían dos grupos amino contiguos en su estructura. Además, se trataban de reacciones de derivatización normalmente largas (entre 30 minutos y 15 horas) y que, en varios casos, necesitaban de altas temperaturas. Con esta premisa, se decidió buscar nuevos compuestos que pudiesen reaccionar con estos analitos (**Artículo 1**).

Así, se eligieron como posibles reactivos derivatizantes los compuestos 2,3-diaminopiridina (2,3-DAP) y 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP), cuyas estructuras aparecen en la Figura 12. Mediante el empleo de fluorescencia molecular se estudió la estabilidad de las disoluciones de ambos compuestos, así como la influencia del pH. Del mismo modo, también se realizaron estudios para comprobar si existía reactividad entre los mismos y los analitos. Tras la obtención de los espectros correspondientes, se comprobó que 2,3-DAP producía una disminución de la intensidad de fluorescencia de los analitos, mientras que 3,4-DAP la aumentaba. Por tanto, se seleccionó este último como nuevo reactivo derivatizante.

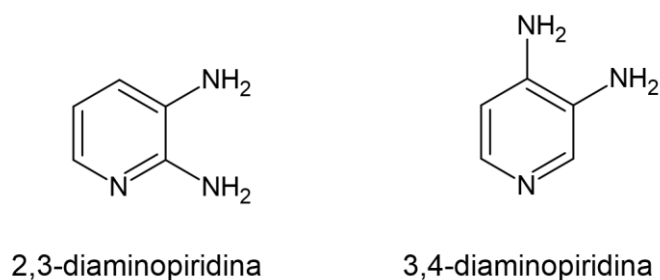


Figura 12. Estructura de los reactivos derivatizantes empleados.

Tras la optimización de los parámetros de la reacción de derivatización (pH, tiempo de calentamiento, temperatura de calentamiento y relación reactivo derivatizante/analito), se obtuvo que las condiciones ideales para llevar a cabo la derivatización eran pH 2.0 (tampón ácido cloracético/cloroacetato de sodio; 0.3 M), reactivo derivatizante en relación 3:1 (mg/L) respecto al analito y calentamiento durante 120 minutos a 90°C. En estas condiciones, se comprobó si la reacción se producía con otros compuestos dicarbonílicos, pero resultó ser específica para GL y MGL (probablemente debido a su mayor reactividad).

Tras la derivatización de ambos analitos, se procedió a establecer las condiciones cromatográficas necesarias para su separación, teniendo en cuenta los métodos ya propuestos. Se empleó una columna Zorbax Eclipse XBD-C18 (150 x 4.6 mm; 5 μm) como fase estacionaria, y un tampón ácido acético/acetato de sodio (pH 5.5; 60 mM) como fase móvil, a un flujo de 0.65 mL/min. En estas condiciones, la separación de los derivados se consiguió en menos de cuatro minutos. El detector empleado fue el de fluorescencia, midiendo la señal emitida por los analitos a 371 nm (excitando a 307 nm). La validación del método dio como resultado una buena linealidad (98.08 – 98.49%) y RSD (1.9 – 2.9%). Los LOD y LOQ obtenidos mediante el método de la IUPAC oscilaron entre 0.44 y 4.32 mg/L.

El método desarrollado se aplicó a un total de 16 vinos monovarietales procedentes de la DO “Ribera del Guadiana”, junto con 2 vinos experimentales, generosamente cedidos por la bodega experimental de la Universidad de Extremadura (también monovarietales). La determinación de los analitos se realizó mediante el empleo del método de adición patrón, debido al efecto matriz de las muestras de vino (ya que no se realizó ningún paso previo de limpieza y/o extracción). Las concentraciones encontradas en todas las muestras, teniendo en cuenta un consumo moderado de vino, no eran suficientes como para llegar a afectar de forma negativa a la salud de los consumidores. Por otro lado, se comprobó que los vinos tintos tenían una concentración media mayor de ambos analitos que los vinos blancos, tal y como se había encontrado en la bibliografía.

A continuación, se procedió a intentar mejorar el método mediante la extracción de los analitos, lo que permitiría una determinación cromatográfica más sencilla, al eliminar posibles interferentes de la matriz de vino, así como su posible aplicación a otras matrices (**Artículo 2**). De entre todas las opciones de extracción posibles, se seleccionó la DLLME, debido a que se trata de una técnica de extracción sencilla y rápida, que además permite la concentración de los analitos, con un gasto mínimo de disolventes. La DLLME había sido anteriormente empleada para la determinación de diferentes compuestos (principalmente contaminantes) en muestras de vino y cerveza, pero no se encontró ningún método que la empleara para la determinación de compuestos inherentes a dichas bebidas, tales como los analitos en estudio (GL y MGL).

En primer lugar, se estudió si la extracción daba mejores resultados realizándose antes o después de la reacción de derivatización. Como la extracción de los analitos sin derivatizar no dio resultados, se procedió a la optimización de los parámetros que afectaban al proceso de la DLLME tras la derivatización de los analitos con 3,4-DAP (según las condiciones del Artículo 1). Así, se estudiaron diferentes tipos de disolventes (tanto extractantes como dispersantes) y la influencia de sus volúmenes. Además, también se comprobó cómo afectaba el pH del medio y el tiempo de agitación al proceso de extracción. Sin embargo, durante los estudios de repetibilidad de la DLLME se comprobó que, durante la extracción del analito, se producía de forma simultánea la derivatización del mismo, así como un incremento de la señal analítica con el paso del tiempo. Por esta razón, se estudió cómo afectaba el tiempo de reposo de la mezcla en la señal analítica, así como la cantidad de reactivo derivatizante, tanto mediante fluorescencia molecular como por cromatografía líquida. Por otro lado, también se estudió si la reacción era posible con MGL, pero en estas condiciones solo el GL (mucho más reactivo) reaccionó.

Tras la derivatización y extracción simultánea, el derivado de GL fue determinado mediante cromatografía líquida con detección fluorescente, empleando el método optimizado en el estudio anterior. En estas condiciones, se obtuvo una buena linealidad, así como un alto coeficiente de correlación (0.9906). La RSD fue adecuada e inferior al 5%, y los LOD y LOQ obtenidos fueron del orden de $\mu\text{g/L}$.

Por tanto, el nuevo método desarrollado reducía drásticamente el tiempo de reacción, pasando de 120 minutos de reacción de derivatización más el tiempo añadido de la extracción del analito, a tan solo 15 minutos de reacción de derivatización y extracción simultánea. De esta forma se mejoró no solo el método anteriormente desarrollado, sino todos los métodos encontrados en la bibliografía, ya que, además, no era necesario aplicar calor ni emplear microondas o ultrasonidos como asistencia. Por otro lado, se trataba de un método selectivo para GL. En la Figura 13 se muestra de forma esquemática el procedimiento de la reacción de derivatización y extracción simultánea.

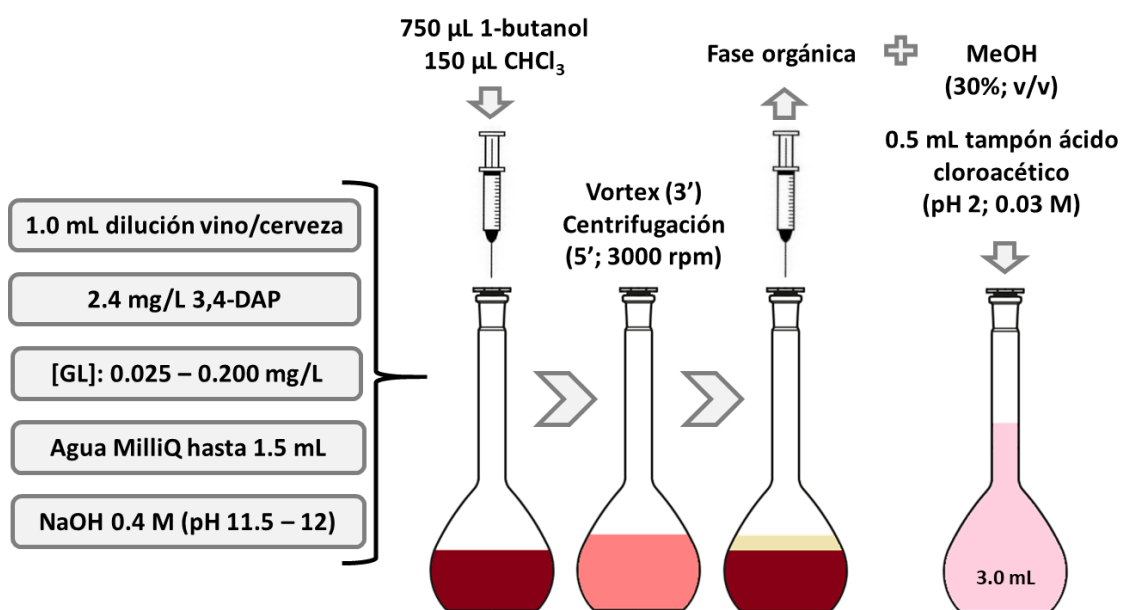


Figura 13. Esquema del procedimiento de la reacción de derivatización y extracción simultánea.

El método fue aplicado a muestras de vino y cerveza diluidas previamente en agua. Se comprobó que, a pesar de la extracción de los analitos, seguía apareciendo efecto matriz, por lo que se procedió a su determinación mediante el método de adición patrón. Las concentraciones encontradas fueron similares a las reportadas en la bibliografía, y lo suficientemente bajas como para no resultar un riesgo para la salud con un consumo moderado de estas bebidas.

Debido al aumento en el interés de las ABs, provocado por la importancia de su presencia en alimentos como indicador de calidad, y su interacción con el alcohol (especialmente importante en bebidas alcohólicas fermentadas), se decidió que esta familia de analitos era interesante para ser estudiada. De entre la extensa familia de estos compuestos se eligieron como analitos agmatina (AGM), cadaverina (CAD), etanolamina (ETA), histamina (HIM), 2-feniletilamina (PEA), putrescina (PUT), tiramina (TYM) y triptamina (TRY), debido a que se trataba de las ABs que normalmente aparecen en muestras de vino y cerveza, según la bibliografía.

En primer lugar, y tras la correspondiente revisión bibliográfica de los métodos empleados para su determinación, se decidió optimizar la separación cromatográfica de los derivados obtenidos mediante la reacción con OPA (método oficial propuesto por la OIV) (**Artículo 3**). Para ello, se empleó una columna de ultra-alta resolución (Zorbax Eclipse XDB-C18, 100 x 4.6 mm; 1.8 μ m) como fase estacionaria, con objeto de reducir el tiempo de separación, y una mezcla de tampón TRIS (0.08 M; pH 8.3) y ACN como fase móvil. La detección se realizó gracias a la fluorescencia de los derivados, midiendo la señal analítica a 445 nm (excitando a 356 nm). Tras la optimización del gradiente, se consiguió la separación de ocho ABs en 12 minutos. Una vez validado el método y obtenidos sus parámetros de calidad, se aplicó a diferentes muestras de vino. No se realizó ningún tratamiento previo de las muestras excepto dilución con agua ultrapura para la determinación de ETA y PUT. Debido al efecto matriz existente, la determinación se llevó a cabo mediante el uso conjunto de los métodos de patrón interno y adición patrón. Como patrón interno (PI) se empleó la octilamina (OCT).

Con los datos obtenidos se llevaron a cabo dos estudios paralelos. Por una parte, se analizaron los perfiles de aminas biógenas de trece vinos “Tempranillo” procedentes de diferentes zonas vitivinícolas pertenecientes a la DO “Ribera del Guadiana”, de los cuales seis eran jóvenes, seis eran roble y uno era crianza. Los perfiles de ABs obtenidos fueron consistentes con los datos encontrados en la bibliografía, aunque, en general, los vinos extremeños tenían una menor concentración de HIM, AGM, TYM y CAD. Las menores concentraciones de HIM y TYM, las aminas potencialmente más peligrosas para la salud de los consumidores, podrían representar una ventaja de estos vinos frente a otros vinos españoles. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre la concentración total de ABs en vinos jóvenes y robles. No se estudiaron posibles diferencias con el vino crianza debido a que solo se analizó una muestra de este tipo.

Por otra parte, una vez abiertas las botellas, se seleccionó un vino de cada grado de envejecimiento (joven, roble y crianza) y se realizó un estudio para comprobar qué condiciones eran las óptimas para su almacenamiento. Así, se seleccionaron dos temperaturas (de refrigeración, 4°C, y temperatura ambiente, aproximadamente unos 25°C) y dos tipos de cierre de la botella (tapón de corcho o atmósfera inerte de argón). Se llevaron a cabo análisis de muestras tomadas de la botella recién abierta, a los siete días y tras treinta días. Los resultados obtenidos, en principio, no mostraron grandes cambios, aunque sí que parecía que la concentración total de ABs disminuía al aumentar el grado de envejecimiento del vino. En el vino joven, las ABs con mayor concentración fueron ETA y PUT. En el vino roble, el cambio más destacado fue la aparición de TYM a partir del séptimo día y la aparición de CAD el último día. Por su parte, el cambio más destacado en el vino crianza fue la aparición de AGM a partir del séptimo día.

Estos datos obtenidos en diferentes condiciones de almacenamiento fueron estudiados de forma más minuciosa mediante el empleo de diferentes algoritmos quimiométricos con fines clasificatorios. En primer lugar, se realizó un Análisis de Componentes Principales (Figura 14), que permitió explicar la varianza de los datos con solo dos componentes principales (91.9%). Los scores obtenidos por las diferentes muestras permitieron la clasificación de las mismas en base al grado de envejecimiento del vino, apareciendo bien separadas las muestras de vino joven (definidas por una mayor concentración de ETA), las de vino roble (definidas por concentraciones de TYM, PUT y HIM por encima de la media) y las de vino crianza (definidas por una concentración de aminos inferior a la del resto de vinos).

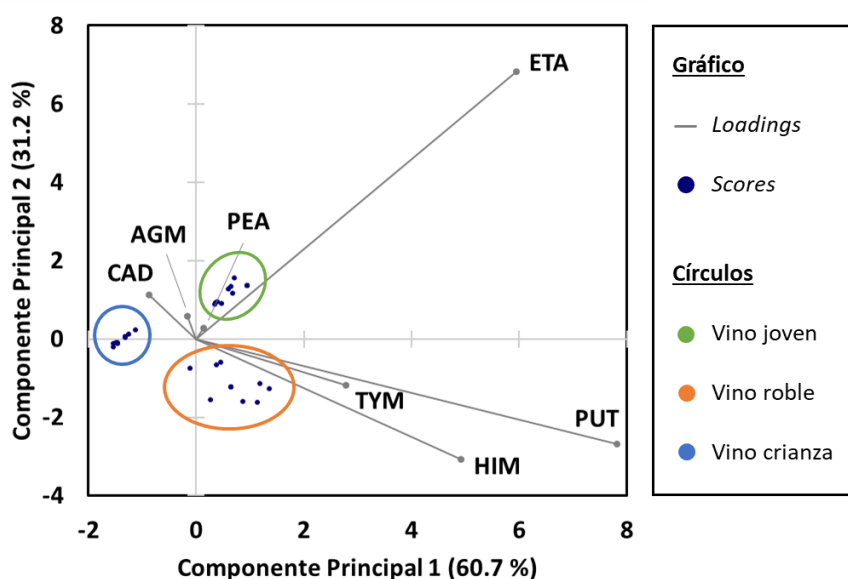


Figura 14. Gráfico combinado de loadings y scores obtenido tras la aplicación de PCA.

A pesar de que la interpretación del Análisis de Componentes Principales era sencilla, se decidió simplificar aún más y emplear la rotación Varimax, con objeto de encontrar parámetros discriminantes (Figura 15). Así, el primer componente principal quedó constituido por la contribución de PUT y HIM, mientras que el segundo componente se basaba en la concentración de ETA. El resto de ABs apenas tenían influencia en la varianza. La rotación de los *loadings* modificó ligeramente los *scores* de las muestras, pero los tres grupos se mantuvieron bien diferenciados. Gracias al Análisis de Componentes Principales rotado se pudieron definir dos parámetros discriminantes: la concentración de ETA diferenciaba los vinos jóvenes (alta concentración) de los vinos crianzas (baja concentración), mientras que altas concentraciones de PUT y HIM diferenciaban a los vinos robles del resto.

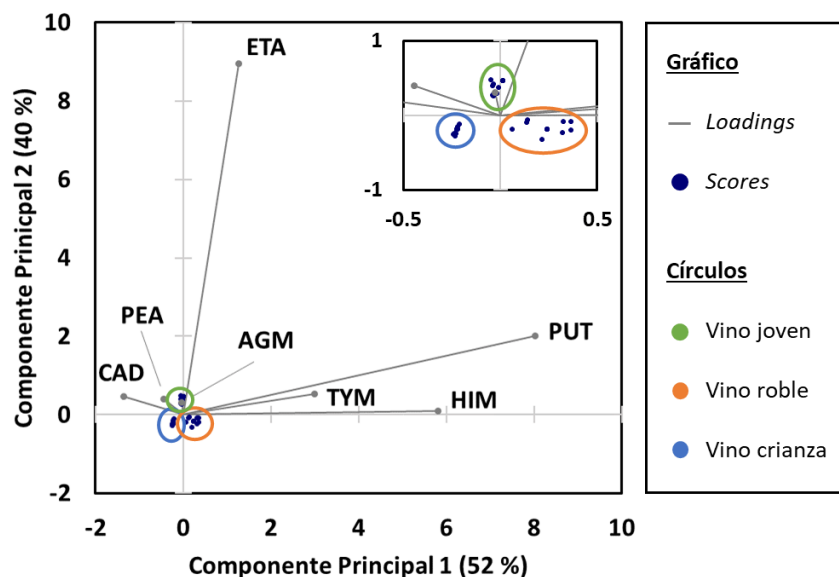


Figura 15. Gráfico combinado de loadings y scores obtenido tras la aplicación de PCA con rotación Varimax.

Con el objetivo de contrastar la información obtenida de Análisis de Componentes Principales, se llevó a cabo también un Análisis Clúster, tanto jerarquizado como no jerarquizado. Para el análisis no jerarquizado se empleó el modelo *k-means*, que permitió la clasificación correcta de todas las muestras. En el análisis jerarquizado se empleó el método de Ward, que dio lugar a tres clústeres, correspondientes a los tres grados de envejecimiento del vino. Es importante destacar que los clústeres correspondientes a los vinos jóvenes y crianzas eran más similares entre sí, y se diferenciaban más de los vinos robles. Esta información estaba en concordancia con los parámetros discriminantes descritos por el Análisis de Componentes Principales. Además, los perfiles de clases obtenidos por ambos métodos demostraron que los analitos más influyentes eran, efectivamente, ETA, PUT e HIM.

Por último, para comprobar si existían diferencias debidas a las condiciones de almacenamiento, se realizó un Análisis Discriminante con cada condición. Así, para los tres grados de envejecimiento del vino se consiguió diferenciar las muestras en base al tipo de cierre, la temperatura de almacenamiento y el día de muestreo, con un 100% de acierto. Con respecto al tipo de cierre, un solo factor permitió la diferenciación de las muestras. Las muestras almacenadas en atmósfera de argón mostraron una mayor concentración de HIM y TYM, lo que permitió su diferenciación de las muestras almacenadas con tapón de corcho, además de constatar este tipo de cierre como más beneficioso, al disminuir las concentraciones de las aminas más peligrosas. La clasificación en base a la temperatura de almacenamiento también se basó en un solo factor. Las muestras almacenadas en refrigeración produjeron menor cantidad de HIM, lo que permitió diferenciarlas de las muestras almacenadas a temperatura ambiente. Por último, la clasificación de las muestras también se pudo realizar en base al día de muestreo. De nuevo, solo fue necesario un factor, y se comprobó que, al aumentar el tiempo de almacenamiento, aumentaban las concentraciones de CAD, AGM y PEA.

Gracias al empleo de estos algoritmos con fines clasificatorios se pudo concluir que, a pesar de que solo existían pequeñas diferencias entre los perfiles de ABs de vinos con diferente grado de envejecimiento, éstas eran suficientes para clasificarlos mediante el empleo de algoritmos quimiométricos. Además, se confirmó que el almacenamiento a temperatura de refrigeración y con tapón de corcho eran las mejores condiciones para el almacenamiento de botellas de vino abiertas, ya que prevenían el aumento de concentración de HIM y TYM, las ABs potencialmente más peligrosas para la salud de los consumidores.

Mientras que se realizaba este último estudio, se procedió a intentar mejorar el método cromatográfico empleado en la determinación anterior. De esta forma, se aumentó el número de analitos (incluyendo también los AAs precursores de las ocho ABs determinadas y otros AAs relacionados), y se intentó la automatización de la reacción de derivatización (**Artículo 4**). En primer lugar, para conseguir la separación de los 17 analitos, fue necesario modificar el método cromatográfico empleado anteriormente. La fase estacionaria empleada fue la misma que en el estudio anterior, pero la fase móvil se modificó, tanto en composición como en gradiente, hasta conseguir la separación de todos los analitos en menos de 15 minutos. Así, se aumentó la concentración del tampón TRIS (0.1 M; pH 8.3) y se incluyó un tercer componente (MeOH) en su composición. Por otro lado, también fue necesario termostatar la columna a 50°C para conseguir la separación de los derivados.

Una vez optimizada la separación, se procedió a la puesta a punto de la reacción de derivatización automatizada y online. Tras la correspondiente revisión de la bibliografía se decidió emplear el modo de inyección tipo sándwich (reactivo derivarizante + muestra + reactivo derivatizante) y se fijó el volumen de muestra en 5 μL . No se planteó el cambio de OPA por otro reactivo derivatizante ya que, además de ser el empleado de forma oficial por la OIV, producía la reacción de forma instantánea, a temperatura ambiente. Se realizaron estudios previos para elegir el mejor método de inyección (seleccionándose finalmente el modelo secuencial) y la velocidad de la misma (empleándose, finalmente, la velocidad por defecto: 90 $\mu\text{L}/\text{min}$). Para la optimización del resto de parámetros se procedió al establecimiento de un diseño de experimentos central compuesto, en el que los parámetros a variar fueron el número de mezclados (entre 0 y 60 veces), el volumen de reactivo derivatizante (entre 0.5 y 8.0 μL) y el tiempo de espera antes de inyectar la mezcla (entre 0 y 5 minutos). Para la selección de los mejores valores se empleó la metodología de Superficie de Respuesta. La función de respuesta empleada se estableció en base a la contribución positiva del sumatorio de las áreas y la resolución media de los picos más cercanos entre sí, así como en base a la contribución negativa del tiempo total de análisis. El análisis ANOVA del modelo obtenido con esta función de respuesta aseguró su bondad, con un buen coeficiente de correlación y una falta de ajuste no significativa.

Esta función fijó 2.0 μL de reactivo derivatizante como el volumen óptimo (ya que volúmenes menores no eran suficientes para derivatizar todos los analitos, y volúmenes superiores daban lugar a una intensa señal de fondo que complicaba el cromatograma). Con este valor fijado, se encontraron dos puntos máximos en la superficie de respuesta: 10 mezclados y 5 minutos de espera o 60 mezclados y 1 minuto de espera. Aunque ambas opciones daban resultados muy parecidos, finalmente se eligió la segunda debido a que parecía que resolvía mejor los picos correspondientes a los derivados de AGM y CAD. En la Figura 16 se muestra el cromatograma obtenido en las condiciones optimizadas de derivatización y separación.

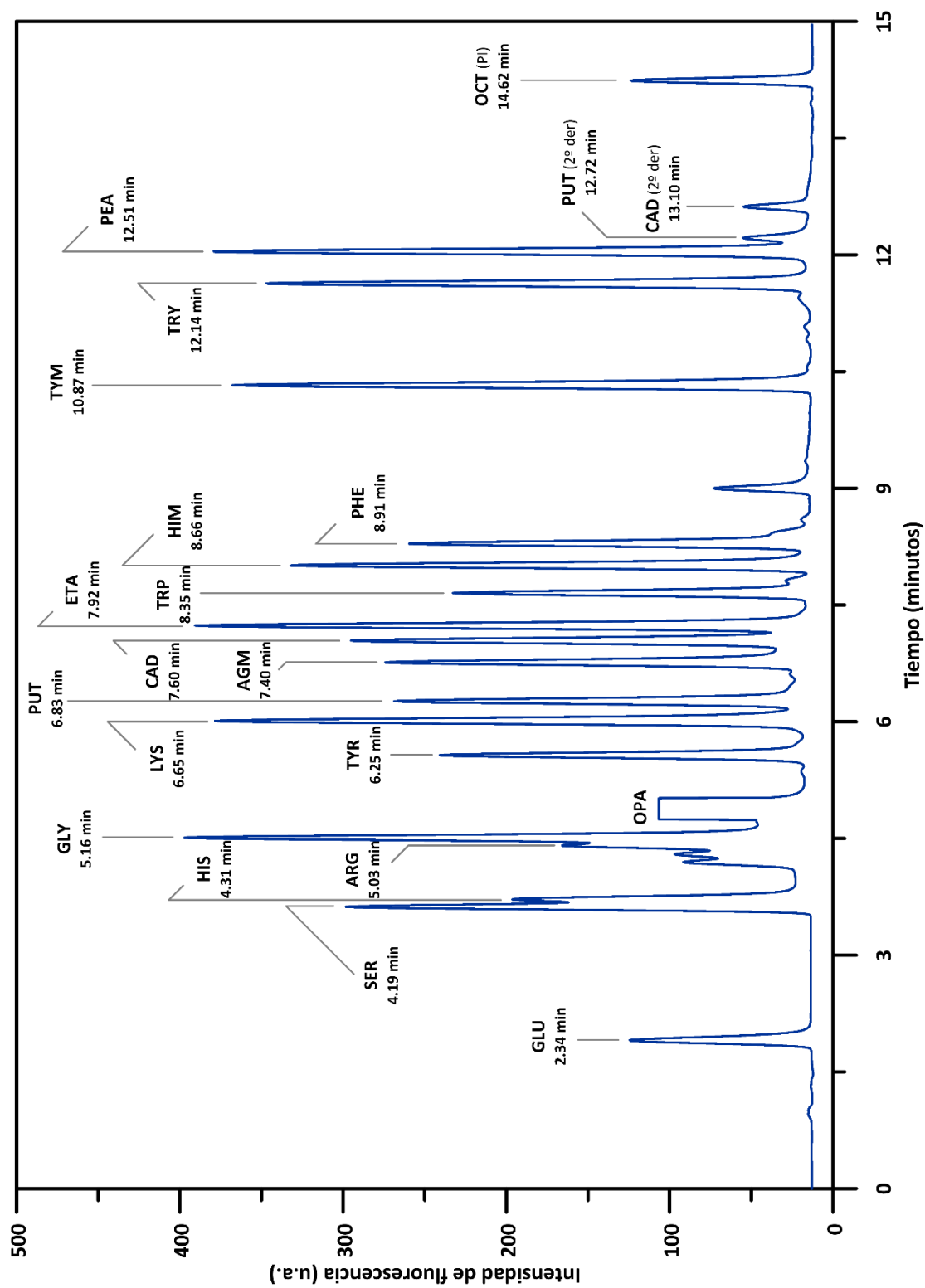


Figura 16. Cromatograma de un patrón obtenido en las condiciones óptimas de derivatización online automática, y separación.

Tras la evaluación del método y la obtención de sus cifras de mérito, se validó en muestras de vino y cerveza. Las muestras fueron diluidas en el caso de ser necesario, así como sonicadas y filtradas antes de ser analizadas. Se empleó el método de adición patrón combinado con el método de patrón interno (siendo este de nuevo OCT), ya que las muestras presentaban efecto matriz. Los valores de recuperación obtenidos fueron satisfactorios en los tres tipos de bebida estudiados (vino blanco, vino tinto y cerveza).

El método fue aplicado para la determinación del perfil de ABs y sus AAs precursores en muestras de cerveza artesana recogidas durante el proceso de elaboración, generosamente cedidas por una empresa cervecera artesana extremeña. Así mismo, también se analizó la misma cerveza una vez terminado el proceso de elaboración y ya embotellada. El análisis de los datos obtenidos permitió comprobar que el mosto inicial era muy rico en AAs, siendo el principal tirosina (TYR). En los siguientes días la concentración de los AAs disminuyó drásticamente hasta el quinto día. A partir de este día, la concentración de AAs volvió a aumentar, hasta alcanzar, aproximadamente, un tercio de la concentración del mosto inicial, siendo nuevamente TYR el AA principal. En la cerveza embotellada, la concentración de los AAs siguió aumentando hasta aproximadamente un 50% más. Los cambios más destacados fueron la desaparición de arginina (ARG) y la aparición de serina (SER), así como un gran aumento de las concentraciones de histidina (HIS), TYR y triptófano (TRP). Aunque parece lógico pensar que la concentración de AAs debería disminuir con el tiempo, debido a su descarboxilación por parte de diferentes microorganismos, estos aumentos en la concentración de algunos AAs se explican debido a los procesos de proteólisis y autólisis de las levaduras ocurridos durante los procesos de fermentación y almacenamiento.

Por su parte, a pesar de encontrarse los AAs precursores de todas las ABs, solo se detectaron PUT, AGM y ETA en todas las muestras analizadas, lo que podría indicar que los microorganismos responsables de la descarboxilación de los AAs no estaban presentes en el mosto, lo cual da una idea de su buena calidad microbiológica. Esta buena calidad microbiológica se puede corroborar con la obtención de los valores del Índice de Aminas Biógenas, que en ningún caso fue superior a 1. Su concentración total fue mucho menor que en el caso de los AAs. Sus concentraciones no sufrieron grandes cambios durante el proceso de elaboración de la cerveza, aunque el quinto día, al igual que pasó con los AAs, alcanzaron su valor más bajo, para luego volver a aumentar. La amina principal fue la AGM, que es la única que proviene de la malta. En la cerveza terminada y embotellada sí que se encontró un gran aumento de la concentración de aminas, multiplicando por 4 la concentración encontrada durante el proceso de fermentación. Además, se pudo detectar TYM, aunque no cuantificar. De nuevo, fue la AGM la

amina con mayor concentración, probablemente debido a la desaparición de ARG, su AA precursor.

Para el siguiente estudio (**Artículo 5**) se decidió estudiar los AAs y ABs mediante voltamperometría. En concreto, se trabajó con un electrodo de carbono vitrificado, empleando la modalidad de diferencial de pulso. Como se ha visto anteriormente en la revisión bibliográfica, no existen muchos métodos que empleen la electroquímica para la determinación de ABs, y los métodos que la emplean suelen utilizar biosensores. En nuestro estudio, además, se decidió emplear la quimiometría para la resolución de los analitos. En general, hay pocos métodos que empleen la quimiometría con señales electroquímicas en comparación con otro tipo de señales (normalmente, cromatográficas o espectroscópicas), y los métodos que las utilizan suelen trabajar con datos de primer orden. Sin embargo, en nuestro trabajo se estudió la posibilidad de obtener datos de segundo orden.

Específicamente, se decidió estudiar el comportamiento electroquímico de HIM, ya que, como se ha mencionado anteriormente, se trata de la AB potencialmente más peligrosa para la salud humana. En primer lugar, y en base a estudios previos realizados, se seleccionó el electrodo de carbono vitrificado y la modalidad de diferencial de pulso, como se ha avanzado anteriormente. Después, se optimizaron los parámetros para la obtención de los voltamperogramas del analito en disolución acuosa. El rango de potenciales en el que se trabajó fue entre +0.9 – +1.5V, y se obtuvo linealidad hasta una concentración de 10.0 mg/L de HIM. De igual forma, también se optimizaron las condiciones de la limpieza del electrodo. En las condiciones optimizadas, se comprobó que HIS, el AA precursor de HIM y potencial interferente en aquellas muestras donde esté presente el analito, también daba señal, y que esta solapaba con la del analito. Por otro lado, se comprobó que las señales de HIM estaban fuertemente afectadas por el pH del medio, desplazándolas a potenciales más bajos al aumentar la basicidad del mismo.

Habiendo encontrado, por tanto, dos vías de modificación de la señal producida por HIM (concentración del analito y pH del medio), se procedió a la obtención de una matriz de datos para la calibración de la misma, empleando disoluciones acuosas durante este estudio. Así, se obtuvieron los voltamperogramas de HIM en el rango de 0.0 – 10.0 mg/L, a seis valores de pH diferentes (4.0 – 9.0). Aprovechando la ventaja de segundo orden, se preparó de la misma forma un conjunto de muestras de validación que incluía tres concentraciones diferentes de HIM (2.0, 4.0 y 8.0 mg/L) y tres niveles de contaminación con HIS (5.0, 15.0 y 25.0 mg/L) para cada concentración. Las concentraciones de HIS se plantearon para que fueran generalmente

superiores a las de HIM debido a que en las matrices con las que se había trabajado (vino y cerveza), los AAs se encontraban en mayor concentración que las ABs.

Una vez obtenidos los voltamperogramas, estos se inspeccionaron visualmente. Así, se comprobó que la señal de HIM no solo se desplazaba según el pH del medio (Figura 17), sino que, a un mismo pH, diferentes concentraciones de analito también generaban desplazamientos de la señal (Figura 18).

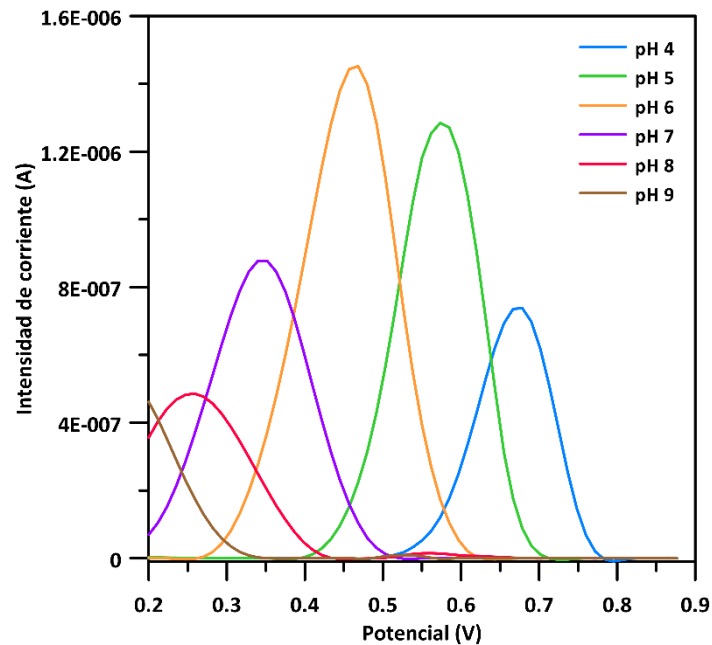


Figura 17. Variación del potencial de la histamina con el pH; [HIS] = 6.0 mg/L.

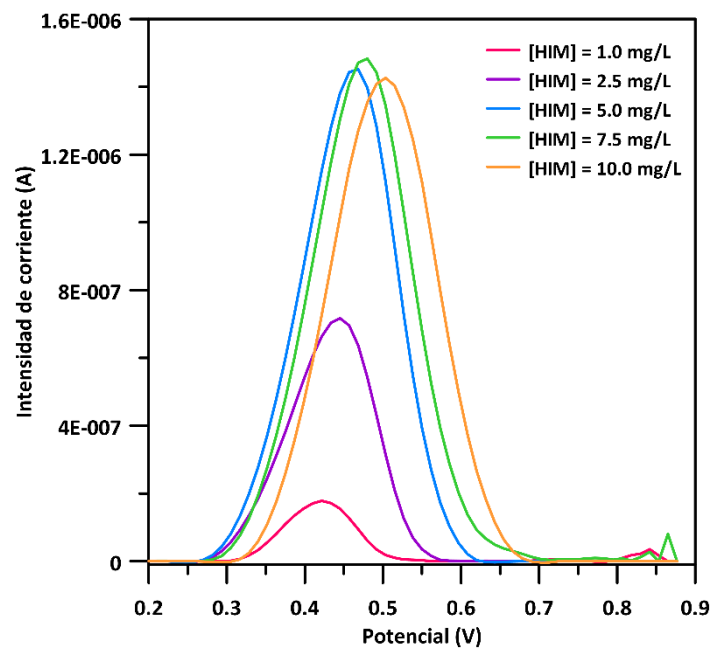


Figura 18. Variación del potencial de la histamina con la concentración; pH = 6.0.

Por tanto, la primera conclusión a la que se pudo llegar es que los datos obtenidos eran no trilineales de tipo III. Este tipo de datos, como se comentó en el capítulo anterior, son aquellos en los que no se cumple el principio de bilinealidad. Los datos no bilineales han sido muy poco empleados con objetivos de cuantificación y, hasta donde sabemos, era la primera vez que se empleaban datos electroquímicos no trilineales de tipo III para la cuantificación de un analito.

Tras determinar el tipo de datos con el que se estaba trabajando, se exploraron diferentes alternativas para su modelado quimiométrico. En primer lugar, se decidió intentar recuperar la bilinealidad mediante el alineamiento de las señales obtenidas al mismo pH, de modo que el potencial de las señales no dependiera de la concentración de los patrones. Para ello, se empleó el método *i-coshift*, que se pudo aplicar debido que no existían distorsiones apreciables de las señales. No se procedió a la recuperación de la bilinealidad en la segunda vía (pH), debido a que se hubiera perdido la selectividad que aportaba. Con este conjunto de datos ya bilineales, se evaluó la relación concentración – señal a cada pH, observándose grandes diferencias: la relación era lineal a pH básicos, mientras que a pH ácidos no lo era.

Con objeto de evaluar y explicar este comportamiento, se decidió aplicar MCR-ALS. Este algoritmo permite obtener información sobre la contribución de los constituyentes de una mezcla incluso en sistemas de los que no se posee información previa. La matriz fue desdoblada previamente para disminuir la ambigüedad rotacional asociada a este algoritmo, y las condiciones iniciales fueron estimadas mediante SIMPLISMA y SVD. Además, se impusieron diferentes restricciones durante el proceso iterativo. La descripción del comportamiento de HIM se explicó mediante dos componentes, mientras que un tercero era necesario en las muestras que poseían también HIS. Estos resultados estaban de acuerdo con los resultados observados a simple vista, en los que existían dos tipos de comportamiento (lineal y no lineal). Además, se comprobó que el componente no lineal prevalecía en medios ácidos, mientras que la linealidad aumentaba junto con el pH. Para la predicción de las concentraciones de HIM en las muestras de validación, se realizó una calibración pseudo-univariada en base al componente lineal encontrado, obteniéndose que, al aumentar la concentración del interferente, disminuía el poder predictivo para el analito. Este hecho podría explicarse por una posible interacción analito – interferente, o porque la ambigüedad rotacional era más relevante al aumentar el solapamiento.

Debido a la imposibilidad de emplear este modelo para predecir correctamente la concentración de HIM, se procedió a aplicar U-PLS/RBL, ya que se trata de uno de los algoritmos lineales de segundo orden más flexibles, y es capaz de lidiar con algunas desviaciones no

demasiado pronunciadas de la linealidad. Tras la aplicación del mismo, los mejores resultados se obtuvieron con cuatro factores de PLS (lo que indicaba la alta complejidad de los datos, pertenecientes a un solo analito) y dos componentes de RBL, que explicaban la presencia del interferente en las muestras de validación. Aunque se consiguió mejorar las predicciones respecto a MCR-ALS, seguían siendo algo bajas (82%), sobre todo en aquellas muestras que poseían una mayor concentración de interferente, lo que reforzó la idea de que existía una interacción analito – interferente durante la detección.

Teniendo en cuenta la gran influencia del componente no lineal y la imposibilidad de predecir la concentración de HIM mediante el empleo de algoritmos lineales, se decidió utilizar redes neuronales artificiales. Como la información de los datos de segundo orden puede ser redundante, se decidió emplear sus componentes principales como neuronas de entrada o *inputs*. Sin embargo, al existir un componente no esperado en las muestras de validación, la predicción de las muestras por parte de la red neuronal podría no ser adecuada. Teniendo esto en cuenta, y en base a la bibliografía, se decidió incluir un algoritmo capaz de separar la contribución del analito de la del interferente, antes de la aplicación de la red neuronal en sí. Así, se decidió resolver el problema mediante la aplicación de U-PCA/RBL-RBF. El número de componentes principales obtenido fue cuatro (empleado como número de neuronas de entrada), y se emplearon dos factores de RBL para el modelado del sistema, que permitieron diferenciar las señales propias de HIM de las del interferente HIS. La estructura de la red neuronal RBF elegida fue (4-10-1) (capa de entrada, oculta y de salida, respectivamente). En estas condiciones, las recuperaciones obtenidas fueron cercanas al 100%.

Además de utilizar por primera vez datos electroquímicos no trilineales de tipo III con fines de cuantificación, este estudio permitió comprobar que una evaluación exhaustiva y profunda de los datos experimentales obtenidos es fundamental para la selección correcta de la mejor herramienta quimiométrica para su modelado y la obtención final de resultados fiables.

Finalmente, y con la idea de proponer métodos sencillos y económicos para la determinación de los analitos, se aprovechó la fluorescencia nativa que presentan algunos de los analitos para su determinación mediante dicha técnica (**Artículo 6**).

En primer lugar, y empleando el método desarrollado en el Artículo 4, se procedió a la determinación del perfil de ABs y AAs de muestras de vino recogidas durante el proceso de vinificación de un vino “Tempranillo”. Las muestras fueron amablemente cedidas por la bodega experimental de la Universidad de Extremadura. Tras la obtención de los cromatogramas correspondientes a todas las muestras recogidas y su comparación, se procedió al análisis de

aquellas que se correspondían con los cambios más importantes o con hitos fundamentales de la vinificación (por ejemplo, el inicio de las fermentaciones). Así, se obtuvo el perfil de ABs y AAs completo de siete días de vinificación.

Tras revisar los datos obtenidos se pudo comprobar que la mayoría de los analitos apenas sufrían cambios durante el proceso de vinificación. Los analitos con más variaciones fueron TYR (cuya concentración era la más alta en general, y además iba aumentando con el tiempo) y ARG (cuya concentración era alta hasta el inicio de la fermentación alcohólica, momento en el que sufría una bajada drástica y, a partir de ahí, permanecía constante). Estos datos estaban en concordancia con los encontrados en la bibliografía. Por otro lado, también se comprobó que la concentración de TRP aumentaba ligeramente en dos ocasiones, al iniciar la fermentación maloláctica y al final de la misma.

Debido a que los cambios estaban básicamente producidos por estos analitos, se decidió realizar un análisis exploratorio para comprobar si, en efecto, se trataba de los analitos más influyentes. Así, se realizó un Análisis de Componentes Principales y se obtuvo que dos componentes explicaban el 93% de la varianza. De ellos, el primer componente explicaba un 82% de la varianza, y estaba principalmente formado por la contribución positiva de TYR y la negativa de ARG. El segundo componente, por su parte, estaba definido por la contribución positiva de ARG, TYR y TRP. Así se pudo concluir que TYR era, efectivamente, el analito más influyente en el proceso de vinificación, seguido muy de lejos por ARG y TRP. Los *scores* obtenidos, junto con la información ofrecida por el bodeguero, permitieron la diferenciación de las muestras. El mosto inicial era la muestra que presentaba mayores diferencias, con una cantidad de ARG muy superior al resto. El día 3 comenzó la fermentación alcohólica, hecho representado por la disminución drástica de ARG. El día 10 comenzó la fermentación maloláctica, y a partir de entonces, la concentración de TYR fue aumentando con el paso del tiempo.

Para contrastar esta información se realizó un Análisis Clúster, tanto jerarquizado como no jerarquizado. El método no jerarquizado empleado fue *k-means* que, aunque no permitió la separación de las muestras en diferentes clases, sí que dio lugar a un perfil de clases en el que, claramente, TYR era el analito más influyente. El método de Ward (jerarquizado) sí que clasificó las muestras en tres grupos. El primer clúster estaba formado por las muestras previas al inicio de la fermentación maloláctica. El segundo estaba constituido únicamente por el inicio de la fermentación maloláctica, y el tercer clúster reunía a las muestras post-fermentación maloláctica. En el perfil de clases obtenido por este método, de nuevo TYR fue el analito más

influyente, aunque ARG tuvo algo de influencia en el clúster uno (el cambio drástico de concentración entre las dos muestras que lo componen) y TRP, en el clúster tres (el pequeño incremento al inicio de la fermentación maloláctica que se comentó anteriormente).

Teniendo en cuenta, por tanto, que TYR era el analito más influyente, y que presenta fluorescencia nativa, se propuso optimizar un nuevo método para la monitorización del proceso de vinificación en base a los cambios en su concentración, empleando fluorescencia molecular. Se optimizaron las condiciones (rango de longitudes de onda y voltaje) para la obtención de matrices de excitación-emisión (EEM, por sus siglas en inglés “*Excitation-Emission Matrices*”) y, en las mismas, se registró la señal fluorescente de los analitos que presentaban esta propiedad según la bibliografía: TYM/TYR, TRY/TRP y PEA/PHE. Los analitos más fluorescentes fueron la pareja TYM/TYR, seguidos de TRY/TRP y PEA/PHE. También se comprobó que cada AB tenía el mismo máximo de fluorescencia que su correspondiente AA precursor. Teniendo en cuenta que TYM, TRY y PEA no se habían detectado en ninguna muestra de vino, y que las concentraciones de PHE eran muy bajas y que también era baja su intensidad de fluorescencia, todos estos analitos fueron descartados y el estudio se centró en la determinación de TYR y TRP.

Los ensayos previos se realizaron en muestras de vino sintético, para minimizar la señal propia de la matriz y así poder elegir las mejores condiciones para su medida. Se compararon los resultados obtenidos mediante la modalidad *front-face* y la modalidad convencional, eligiéndose finalmente la segunda, ya que el filtro interno existente impedía la obtención de señales en el modo *front-face*. Las muestras se diluyeron al 10%, para disminuir el filtro interno sin afectar a la intensidad de la señal. Las muestras reales de vino, además de ser diluidas, fueron limpiadas previamente con PVPP, para eliminar la señal fluorescente producida por los polifenoles. Además, esta limpieza también ayudó a reducir en parte el filtro interno.

En las condiciones óptimas de medida, se estableció la matriz de calibración en el rango de concentraciones en las que se habían encontrado los analitos en las muestras de vino. Por otro lado, también se preparó un conjunto de muestras de validación y, además, se utilizaron las muestras de vino determinadas cromatográficamente como un segundo conjunto de muestras de validación, tomando los valores predichos como valores nominales.

Tras la obtención de las EEMs, estas fueron corregidas mediante el empleo de la rutina *EEM_corr* para eliminar la dispersión Rayleigh. Después, se utilizó PARAFAC para determinar el número de componentes y predecir la concentración de las muestras. El número de componentes óptimo, tanto por el criterio CORCONDIA como por el ajuste del sistema, fue tres. Estos componentes se correspondían con TRP, un componente desconocido y TYR,

respectivamente. Para su obtención, se empleó como restricción la no negatividad en todos los modos, ya que ni las concentraciones ni los espectros pueden tomar valores negativos. En la Figura 19 se muestra la comparativa entre las EEMs obtenidas de patrones de TRP y TYR y los componentes 1 y 3, respectivamente.

En estas condiciones, se procedió a predecir las concentraciones de ambos conjuntos de muestras de validación. Las predicciones para las muestras de validación en vino sintético fueron adecuadas para ambos analitos. Sin embargo, al predecir las muestras reales de vino, la predicción fue solo adecuada en el caso de las concentraciones de TYR. Las concentraciones de TRP, por su parte, no fueron bien predichas, probablemente debido a las bajas concentraciones presentes en las muestras de vino, así como la menor intensidad de fluorescencia de este analito. Además, su máximo de fluorescencia se encuentra en la zona de UV (301 nm), por lo que podría haberse visto más afectado por el resto de componentes del vino.

A pesar de ello, y debido a que TYR era el analito más influyente, la monitorización del proceso de vinificación se pudo realizar gracias a la cuantificación de este analito. Así, se obtuvieron las EEMs correspondientes a todas las muestras de vino recogidas durante el proceso de vinificación y se predijo la concentración de TYR en las mismas. Se pudo comprobar que la concentración de TYR desde el mosto inicial hasta el comienzo de la fermentación maloláctica fue aumentando progresivamente, hasta casi doblar su valor. A partir de ese momento, la concentración de TYR fue sufriendo altibajos, que podrían explicarse debido a dos razones. En primer lugar, el vino es un medio vivo, en el que las propias levaduras son las responsables de homogeneizar la muestra dentro de la cuba. Por esta razón, la homogenización puede no ser total, y aparecer más variaciones de las esperadas. Por otro lado, durante el proceso de vinificación se producen dos procesos opuestos al mismo tiempo: consumo de TYR por parte de las levaduras y su transformación en TYM, y proteólisis y autólisis de las levaduras que aumenta la concentración de TYR.

Finalmente, se encontró un pequeño incremento en la concentración de TYR en el último día, que podría emplearse como indicador de que la fermentación maloláctica ha terminado y es hora de transferir el vino a las botellas. Así pues, el método desarrollado podría permitir la monitorización del proceso de vinificación de forma más sencilla, rápida y económica que empleando la cromatografía de líquidos.

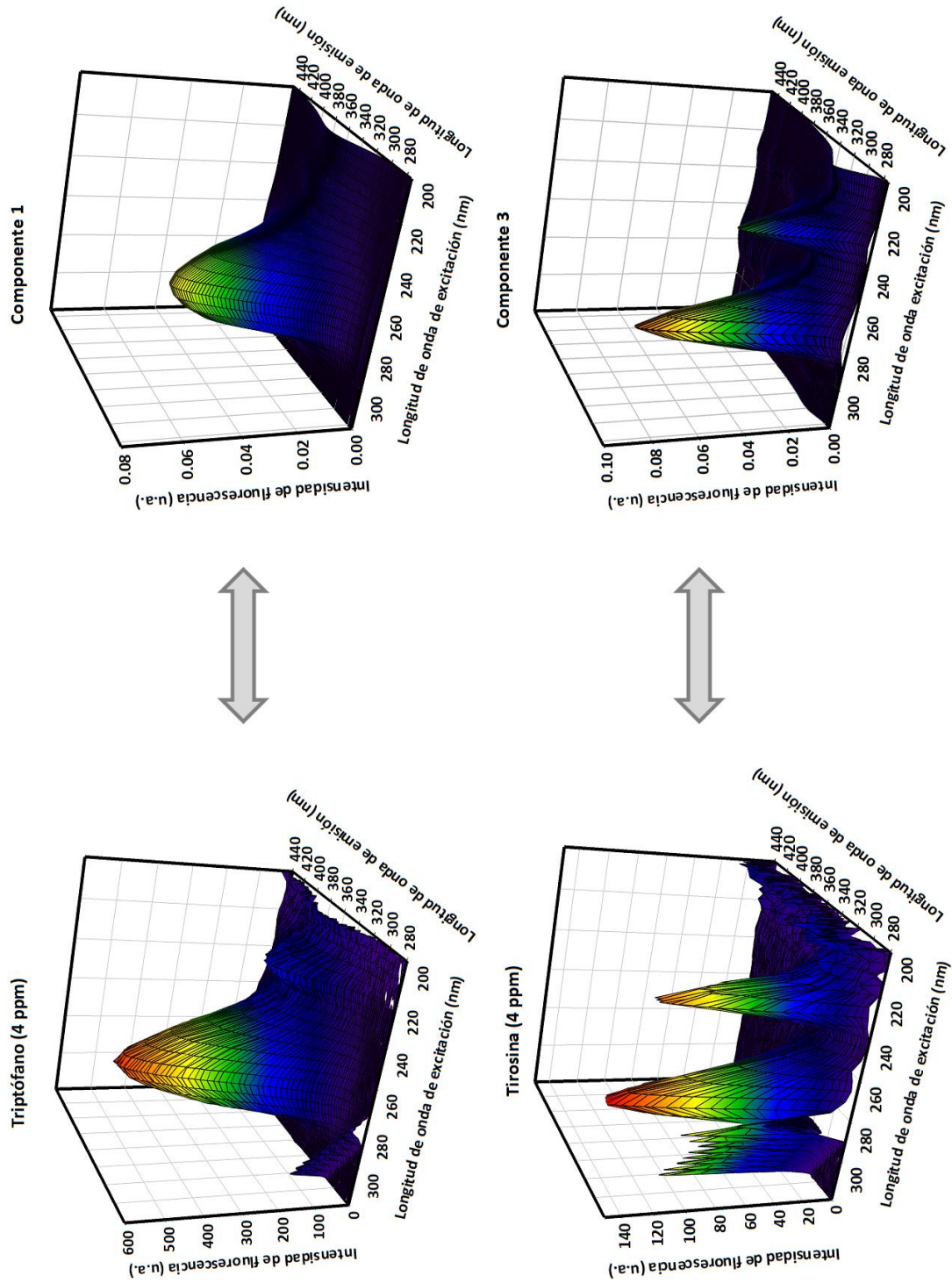


Figura 19. Comparación de las matrices de excitación-emisión obtenidas de patrones y los componentes obtenidos mediante PARAFAC.



CAPÍTULO III

Conclusiones



El trabajo experimental llevado a cabo en esta Tesis ha permitido la obtención de las siguientes conclusiones:

1. Se ha optimizado una nueva reacción de derivatización de glioxal y metilglioxal con el nuevo reactivo derivatizante 3,4-DAP. Los derivados obtenidos han sido separados y cuantificados mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente en menos de cuatro minutos. El método se ha aplicado a diferentes muestras de vino, sin necesidad de limpieza ni tratamiento previo.
2. Se ha puesto a punto el proceso simultáneo de derivatización y extracción de glioxal en muestras de vino y cerveza mediante el empleo de micro-extracción líquido-líquido dispersiva. El método desarrollado redujo drásticamente el tiempo de reacción entre glioxal y 3,4-DAP, mejorando los métodos encontrados en la bibliografía, y con la ventaja añadida de ser selectivo para el glioxal debido a su alta reactividad.
3. Se ha desarrollado un nuevo método para la determinación de ocho ABs mediante cromatografía de líquidos con detección fluorescente tras su derivatización con OPA. El método se ha aplicado a diferentes muestras de vinos monovarietales, sin que se encontraran diferencias significativas entre los perfiles obtenidos en vinos jóvenes y robles. Se ha estudiado si existían diferencias en el perfil de ABs en base a las condiciones de almacenamiento de botellas abiertas. Así, se compararon tres vinos con diferentes grados de envejecimiento, almacenados a dos temperaturas y con dos tipos de cierre durante un total de 30 días. La aplicación de diferentes algoritmos clasificatorios permitió la diferenciación de los vinos en base a su envejecimiento (PCA y CA) y las condiciones de almacenamiento (DA), con un 100% de acierto. Los resultados obtenidos sugirieron que las mejores condiciones para almacenar botellas de vino abiertas son tapón de corcho y temperatura de refrigeración, ya que previenen el incremento en las concentraciones de histamina y tiramina.
4. Se ha ampliado y, por tanto, mejorado dicho método cromatográfico mediante la introducción como analitos de los AAs precursores de dichas ABs. Además, la derivatización de los mismos se produce en línea con la inyección, consiguiéndose la determinación de 17 analitos en menos de 30 minutos (derivatización + separación). El método fue validado en muestras de vino y cerveza y se aplicó a

muestras de cerveza artesana recogidas durante el proceso de elaboración, concretamente, durante el paso de fermentación. El perfil obtenido de AAs y ABs no sufrió muchos cambios a lo largo de los días, y, a pesar de que casi todos los AAs estaban presentes en el mosto inicial, solo tres ABs fueron detectadas en las muestras, lo que parecía indicar que los microorganismos responsables de la descarboxilación de los AAs no estaban presentes. Esto es un indicador de la buena calidad microbiológica de las muestras analizadas.

5. Se ha aplicado una estrategia combinada de diferentes algoritmos quimiométricos, tanto paramétricos como no paramétricos, para la obtención de información cualitativa y cuantitativa sobre un sistema de histamina en presencia de histidina, en muestras acuosas. Los datos electroquímicos con los que se trabajó se obtuvieron mediante la aplicación de voltamperometría diferencial de pulso, empleando un electrodo de carbono vitrificado. La variación de las concentraciones de histamina y del pH del medio permitieron obtener datos de segundo orden, obteniéndose un conjunto de datos no trilineales de tipo III, que, en base a nuestro conocimiento, han sido empleados con fines de cuantificación por primera vez.
6. Se ha propuesto una nueva metodología para la cuantificación de tirosina en muestras de vino mediante el empleo de EEMs y PARAFAC, gracias a su fluorescencia nativa. Tras un análisis exploratorio (PCA y CA), la tirosina resultó ser el analito más influyente en la varianza de los perfiles de ABs y AAs obtenidos cromatográficamente, en muestras de vino recogidas durante el proceso de vinificación. El método desarrollado se empleó para la monitorización del proceso de vinificación, y los cambios en la concentración de tirosina permitieron determinar los puntos de inicio y fin de la fermentación maloláctica. De esta forma, las EEMs podrían emplearse como una metodología mucho más barata y rápida para monitorizar el proceso de vinificación.



CAPÍTULO IV

Publicaciones



Artículo 1

Food Chemistry 187 (2015) 159 – 165

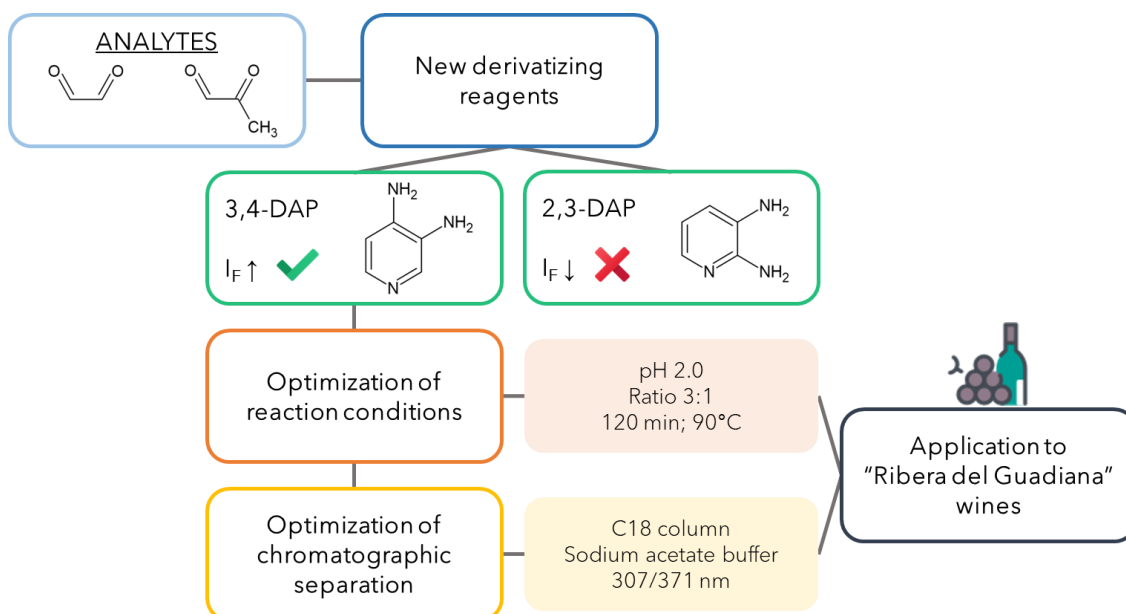
Novel HPLC-Fluorescence methodology for the determination of methylglyoxal and glyoxal. Application to the analysis of monovarietal wines “Ribera del Guadiana”

María Isabel Rodríguez Cáceres*, Mónica Palomino Vasco, Nielen Mora Diez y María Isabel Acedo Valenzuela

Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz (España)

maribelro@unex.es

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.103>



Artículo 2

Talanta 168 (2017) 100 – 104

Dispersive liquid-liquid microextraction for a rapid determination of glyoxal in alcoholic beverages

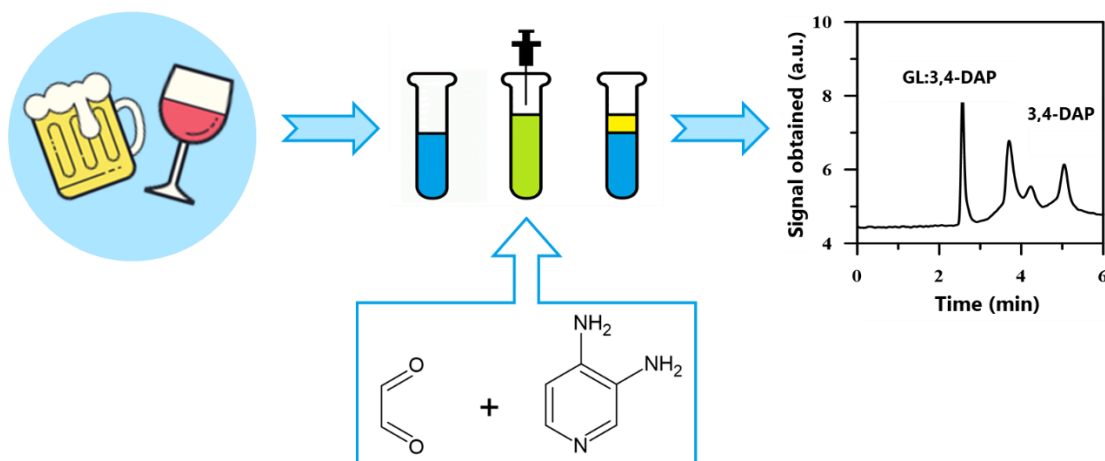
María Isabel Rodríguez Cáceres, Mónica Palomino Vasco*, Nielene Mora Diez y María Isabel Acedo Valenzuela

Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz (España)

monicapv@unex.es

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.031>

SIMULTANEOUS DERIVATIZATION AND EXTRACTION



Artículo 3

Journal of Food Composition and Analysis 83 (2019) 103295

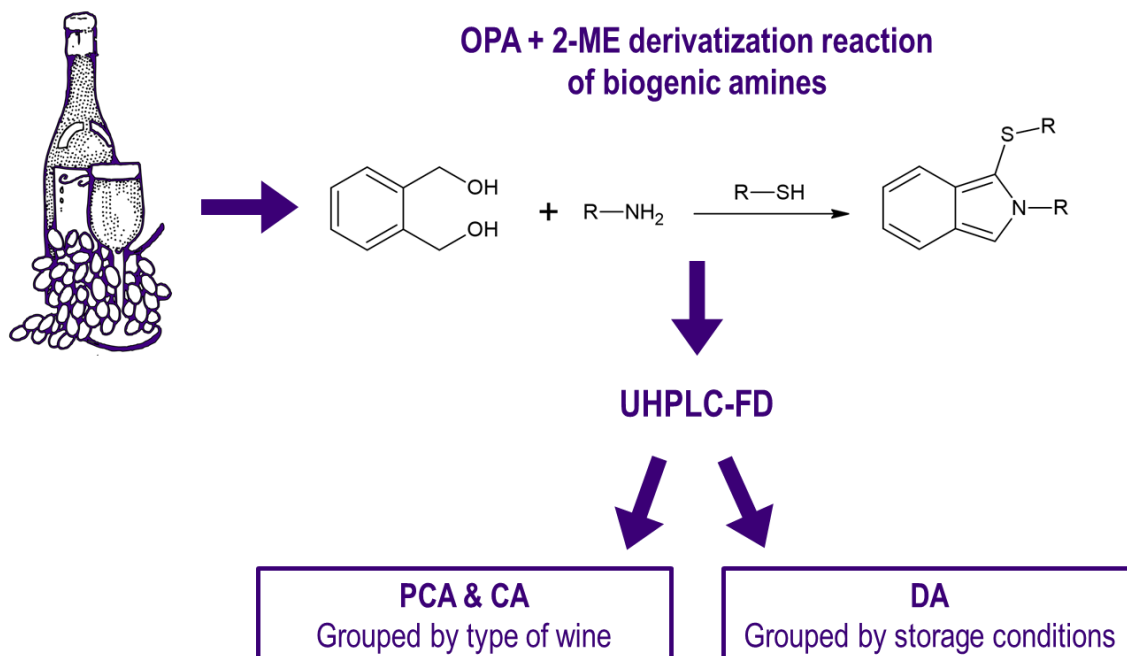
Biogenic amines profile in red wines regarding aging and storage conditions

Mónica Palomino Vasco*, María Isabel Rodríguez Cáceres, Nielené Mora Díez, Rosario Pardo Botello y María Isabel Acedo Valenzuela

Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz (España)

monicapv@unex.es

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103295>



Artículo 4

Journal of Chromatography A 1601 (2019) 155 – 163

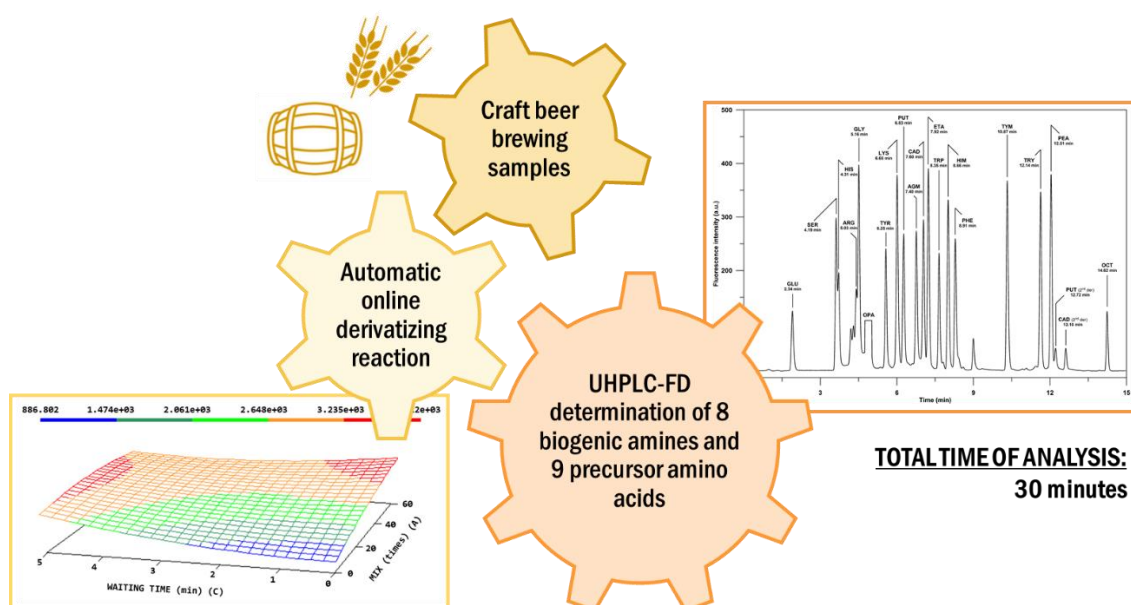
Automated chromatographic method with fluorescent detection to determine biogenic amines and amino acids. Application to craft beer brewing process

Mónica Palomino Vasco*, María Isabel Acedo Valenzuela, María Isabel Rodríguez Cáceres y Nielene Mora Diez

Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz (España)

monicapv@unex.es

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.063>



Artículo 5

Analytica Chimica Acta 1141 (2021) 63 – 70

Exploring the potential of combining chemometric approaches to model non-linear multi-way data with quantitative purposes – A case study

Mónica Palomino Vasco¹, Nielen Mora Diez¹, María Isabel Rodríguez Cáceres¹, María Isabel Acedo Valenzuela¹, Mirta R. Alcaraz^{2,3*} y Héctor C. Goicoechea^{2,3}

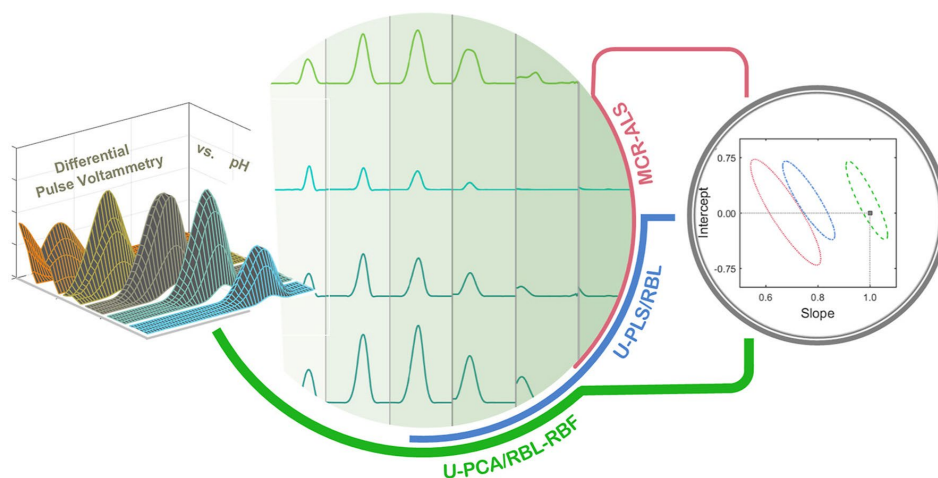
¹Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz (España)

²Laboratorio de Desarrollo Analítico y Quimiometría (LADAQ), Cátedra de Química Analítica I, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, S3000ZAA Santa Fe (Argentina)

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), C1425FQB CABA (Argentina)

malcaraz@fcb.unl.edu.ar

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.10.039>



Artículo 6

Food Chemistry 344 (2021) 128721

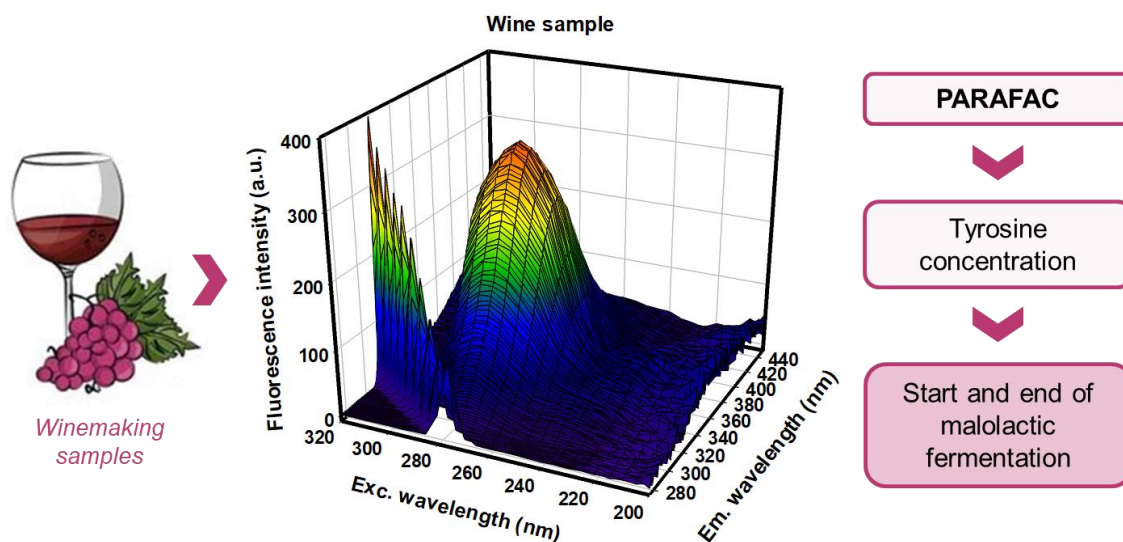
Monitoring winemaking process using tyrosine influence in the excitation-emission matrices of wine

Mónica Palomino Vasco*, María Isabel Acedo Valenzuela, María Isabel Rodríguez Cáceres y Nielen Mora Diez

Departamento de Química Analítica e IACYS, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06006 Badajoz (España)

monicapv@unex.es

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128721>





ANEXO I

Abreviaturas y Acrónimos



NÚMEROS

1,2-DAB: 1,2-diaminobenceno

2,3-DAP: 2,3-diaminopiridina

2D q-NMR: Resonancia Magnética Nuclear cuantitativa bi-dimensional, por sus siglas en inglés *"2D Quantitative-Nuclear Magnetic Resonance"*

3,4-DAP: 3,4-diaminopiridina

4-MPD: Hidrocloruro de 4-metoxi-orto-fenilendiamina

A

AA(s): Aminoácido(s)

AB(s): Amina(s) biógena(s)

ACN: Acetonitrilo

AECAI: Asociación Española de Cerveceros Artesanos Independientes

AGEs: Productos de glicación avanzada, por sus siglas en inglés *"Advanced Glycation End products"*

AGM: Agmatina

ALS: Mínimos cuadrados alternantes, por sus siglas en inglés *"Alternating Least Squares"*

ANNs: Redes neuronales artificiales, por sus siglas en inglés *"Artificial Neural Networks"*

aq.: Disolución acuosa

AQC: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato

ARG: Arginina

B

BAI: Índice de aminas biógenas, por sus siglas en inglés *"Biogenic Amine Index"*

BLS: Mínimos cuadrados bilineales, por sus siglas en inglés *"Bilinear Least Squares"*

Bnz-Cl: Cloruro de benzoilo

C

CA: Análisis Clúster, por sus siglas en inglés "*Cluster Analysis*"

CAD: Cadaverina

CE: Electroforesis capilar, por sus siglas en inglés "*Capillary Electrophoresis*"

CNBF: 2-cloro-1,3-dinitro-5-(trifluorometil)benzeno

CORCONDIA: Test de consistencia del modelo, por sus siglas en inglés "*CORe CONSistency DIAgnostic*"

CP: Componente principal

CZE: Electroforesis capilar de zona, por sus siglas en inglés "*Capillary Zone Electrophoresis*"

D

DA: Análisis discriminante, por sus siglas en inglés "*Discriminant Analysis*"

DAD: Detector de arreglo de diodos, por sus siglas en inglés "*Diode Array Detector*"

DAO: Enzima diamino oxidasa

DDP: Sulfato de 5,6-diamino-2,4-hidroxipirimidina

DEEMM: Dietoximetilenmalonato

DLLME: Micro-extracción líquido-líquido dispersiva, por sus siglas en inglés "*Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction*"

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidracina

Dns-Cl: Cloruro de dansilo

DO: Denominación de Origen

E

EEM: Matrices de excitación-emisión, por sus siglas en inglés "*Excitation Emission Matrices*"

EJCR: Región Elíptica de Confianza Conjunta, por sus siglas en inglés "*Elliptical Joint Confidence Region*"

ENAC: Entidad Nacional de Acreditación

ETA: Etanolamina

F

FD: Detector de fluorescencia, por sus siglas en inglés "*Fluorescence Detector*"

FID: Detector de ionización de llama, por sus siglas en inglés "*Flame Ionization Detector*"

G

GC: Cromatografía de gases, por sus siglas en inglés "*Gas Chromatography*"

GCE: Electrodo de carbono vitrificado, por sus siglas en inglés "*Glassy Carbon Electrode*"

GL: Glioxal

GLU: Ácido glutámico

GLY: Glicina

H

HAc: Ácido acético

HFBA: Ácido heptafluorobutírico

HFo: Ácido fórmico

HIM: Histamina

HIS: Histidina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución, por sus siglas en inglés "*High Performance Liquid Chromatography*"

I

IGP: Indicación Geográfica Protegida

IR: Espectroscopía de infrarrojos

L

LC: Cromatografía líquida, por sus siglas en inglés "*Liquid Chromatography*"

LIF: Fluorescencia inducida por láser, por sus siglas en inglés "*Laser Induced Fluorescence*"

LOD: Límite de detección, por sus siglas en inglés "*Limit Of Detection*"

LOQ: Límite de cuantificación, por sus siglas en inglés "*Limit Of Quantification*"

LYS: Lisina

M

MAO: Enzima monoamino oxidasa

MCR: Resolución multivariada de curvas, por sus siglas en inglés "*Multivariate Curves Resolution*"

MECK: Cromatografía micelar electrocinética, por sus siglas en inglés "*Micellar ElectroKinetic Chromatography*"

MeOH: Metanol

MGL: Metilglioxal

MLP: Redes de perceptrón multicapa, por sus siglas en inglés "*Multilayer Perceptron Networks*"

MS: Detector de espectrometría de masas, por sus siglas en inglés "*Mass Spectrometry*"

MSPD: Dispersión de matriz en fase sólida, por sus siglas en inglés "*Matrix Solid Phase Dispersion*"

N

NaAc: Acetato de sodio

NAC: *N*-acetil-L-cisteína

NIR-HSI: Infrarrojo cercano hiperespectral, por sus siglas en inglés "*Near InfraRed HyperSpectral Imaging*"

NIRS: Espectroscopía de infrarrojo cercano, por sus siglas en inglés "*Near-InfraRed Spectroscopy*"

NPD: Detector de nitrógeno/fósforo, por sus siglas en inglés "*Nitrogen Phosphorus Detector*"

NPDA: 4-nitro-1,2-fenilendiamina

O

OCT: Octilamina

OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino

OLS: Mínimos cuadrados ordinarios, por sus siglas en inglés "*Ordinary Least Squares*"

OPA: *Orto*-ftalaldehído

OPD: *Orto*-fenilendiamina

P

PARAFAC: Análisis paralelo de factores, por sus siglas en inglés "*PARA*rell *FACT*or analysis"

PCA: Análisis de componentes principales, por sus siglas en inglés "*Principal Components Analysis*"

PEA: 2-feniletilamina

PFBHA: *Orto*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina

PHE: Fenilalanina

PI: Patrón interno

PLS: Mínimos cuadrados parciales, por sus siglas en inglés "*Partial Least Squares*"

PRESS: Suma cuadrática de los errores predichos, por sus siglas en inglés "*PR*edicted *ER*ror *SU*m of *SQ*uares"

PUT: Putrescina

PVPP: Polivinilpolopirrolidona

R

RBF: Funciones de base radial, por sus siglas en inglés "*Radial Basis Functions*"

RBL: Bilinealización residual, por sus siglas en inglés "*Residual Bi-Linearization*"

RCS: Especies reactivas de carbono, por sus siglas en inglés "*Reactive Carbonyl Species*"

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés "*Reactive Oxigene Species*"

RSD: Desviación estándar relativa, por sus siglas en inglés "*Relative Standar Deviation*"

S

SER: Serina

SERS: Espectrometría RAMAN aumentada en la superficie, por sus siglas en inglés "*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*"

SPME: Micro-extracción en fase sólida, por sus siglas en inglés "*Solid Phase Micro-Extraction*"

SVD: Descomposición en valores singulares, por sus siglas en inglés "*Singular Value Decomposition*"

SVM: Máquinas de vectores de soporte, por sus siglas en inglés "*Support Vector Machines*"

T

TEA: Trietilamina

TFA: Ácido trifluoroacético

TFEH: Trifluoroetil hidracina

THF: Tetrahidrofurano

TRI: 2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina

TRIS: Trisaminometano

TRP: Triptófano

TRY: Triptamina

TYM: Tiramina

TYR: Tirosina

U

UNE: Asociación Española de Normalización, por las siglas de “Una Norma Española”

UPLC: Cromatografía líquida de ultra-alta resolución, por sus siglas en inglés “*Ultra-high Performance Liquid Chromatography*”

U-PLS: Mínimos cuadrados parciales desdoblados, por sus siglas en inglés “*Unfolded Partial Least Squares*”

W

WLS: Mínimos cuadrados ponderados, por sus siglas en inglés “*Weighted Least Squares*”

Y

YAN: Nitrógeno asimilable por levaduras, por sus siglas en inglés “*Yeast Assimilable Nitrogen*”

