

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO DIAMÓNICO Y ETANOL
SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN VINO”.**

FRANCISCO RODRIGO PEREZ DE ARCE GUZMÁN

Santiago, Chile

2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO DIAMÓNICO Y ETANOL
SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN VINO”.**

**“EFFECT OF DIAMMONIUM PHOSPHATE AND ETANOL CONCENTRATION
ON BIOGENIC AMINES CONTENT IN WINE”**

FRANCISCO RODRIGO PEREZ DE ARCE GUZMÁN

Santiago, Chile
2010

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

“EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO DIAMÓNICO Y ETANOL
SOBRE EL CONTENIDO DE AMINAS BIÓGENAS EN VINO”.

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Agrónomo

Francisco Rodrigo Perez De Arce Guzmán

PROFESOR GUÍA	Calificaciones
Sr. Álvaro Peña P. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,7
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Eduardo Loyola M. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,2
Sr. Alfredo Olivares E. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,0

Santiago, Chile
2010

AGRADECIMIENTOS

Esta memoria se la dedico a mi esposa y a mi hijo que son mi razón y mi alegría por la cual vivir día a día, por todo el amor y apoyo que me brindaron.

A mis padres, los que con sus consejos, apoyo y cariño me acompañaron y animaron para poder llegar al fin de este camino de forma exitosa.

A mis hermanas, por toda la ayuda y buenos deseos que me ofrecieron cada vez que lo necesité.

A toda mi familia que se hicieron presente durante este camino dándome su apoyo y ánimo para salir adelante.

A mis profesores, por su apoyo, paciencia y compromiso que me ayudaron para llegar al final.

A la Rosita quien con sus cafés, alegría y buena disposición de siempre en el laboratorio, me animaba constantemente generando un grato ambiente para trabajar y estar. A la Lily por toda la ayuda prestada.

A mis amigos con quienes vivimos grandes momentos durante toda la carrera, generando una amistad duradera y entrañable. A todos ellos les agradezco su apoyo, compañía y les deseo lo mejor.

Y a todas las personas que directa o indirectamente me ayudaron a lograr mi título, gracias.

INDICE

RESUMEN	5
Palabras Clave	5
ABSTRACT	6
Key Words	6
ABREVIACIONES	7
INTRODUCCION	8
Efectos a la salud	8
Efectos sensoriales	9
Aminas Biógenas en mostos y vinos	9
Factores que inciden en la concentración de aminas biógenas	10
Hipótesis	12
Objetivos	12
MATERIALES Y METODOS	13
Lugar de Estudio	13
Materiales	13
Metodología	13
Determinaciones analíticas	15
Análisis estadístico	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Aminas Biógenas	18
Relación ácidos orgánicos y composición química con Amina biógenas	26
Ácidos Orgánicos	26
Análisis Básicos	27
Análisis Componentes Principales	29
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFIA	33
ANEXOS	38

RESUMEN

La aspiración de Chile en convertirse en potencia agroalimentaria incentiva el estudio de compuestos que alteren la calidad e inocuidad de los alimentos. Es así que el objetivo de este estudio fue determinar el efecto que producen distintas concentraciones de fosfato diamónico y alcohol durante la fermentación maloláctica sobre el contenido final de las aminas biógenas en el vino. Para lograrlo se fermentó mosto estéril del cv. Cabernet Sauvignon y se utilizó en la fermentación maloláctica la bacteria *Lactobacillus hilgardii* cepa 464. Una vez terminada la fermentación alcohólica, se realizaron 8 tratamientos con cuatro concentraciones diferentes de fosfato diamónico: 20, 50, 120 y 200 g/hL y dos concentraciones de alcohol: 12 y 14,5 % v/v. Midiéndose en tres momentos la concentración de aminas biógenas: antes del inicio y una vez terminada la fermentación alcohólica y al finalizar la fermentación maloláctica, utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con derivatización en precolumna con 6-amino-quinolil-N-hidroxinimidil carbamato (AQC). Además se hicieron análisis básicos y de ácidos orgánicos por HPLC buscando relaciones entre estas variables con las concentraciones de aminas biógenas de los vinos.

Los resultados muestran que no existe una interacción entre los factores (grado alcohólico y fosfato de amonio) y que para las aminas histamina, metilamina y agmatina fue determinante las diferentes concentraciones de fosfato diamónico, disminuyendo el contenido de las dos primeras aminas a medida que aumentaba la concentración de este compuesto. Por otra parte, el contenido de agmatina aumentó a medida que aumentaba la concentración de fosfato diamónico. Solo para etilamina se encontró significativo el contenido de alcohol, siendo mayor su concentración a menor grado alcohólico. Para el total de aminas se encontró que ambos factores influyeron de forma independiente, aumentando el contenido total de aminas cuando era mayor la concentración de fosfato diamónico (fuertemente influenciado por la concentración de agmatina) y menor el grado alcohólico. No se encontraron relaciones de importancia entre los ácidos orgánicos y las aminas biógenas. Entre los análisis básicos y las aminas biógenas, tampoco se encontraron relaciones de importancia, a excepción al de agmatina con el pH, existiendo una relación directamente proporcional.

Palabras Clave: Aminas biógenas, fosfato diamónico, alcohol, *Lactobacillus hilgardii*, vino.

ABSTRACT

The aspiration of Chile to become agricultural power encourages the study of compounds that alter the quality and safety of food. That is why the aim of this study was to determine the effect of different concentrations of diammonium phosphate and alcohol during malolactic fermentation on the final content of biogenic amines in wine. To achieve was fermented sterile must of cv. Cabernet sauvignon and malolactic fermentation was carried out by using *Lactobacillus hilgardii* strain 464. Once the alcoholic fermentation was finished, 8 treatments were performed with four different concentrations of diammonium phosphate: 20, 50, 120 and 200 g/hL and two ethanol concentrations: 12 and 14.5% v / v. At three times was measured the concentration of biogenic amines: before the start and after alcoholic fermentation and after malolactic fermentation, which was used high-performance liquid chromatography (HPLC) and a precolumn for derivatization with 6-amino-quinolyl-N-hydroxynimidil carbamate (AQC). Furthermore, were made basic analysis and measured organic acids by HPLC to find relationships between these variables with the concentrations of biogenic amines in wine.

The results show that there is no interaction between the factors (alcohol degree and diammonium phosphate) and the amines histamine, methylamine and agmatine was determining the different concentrations of diammonium phosphate, reducing the content of the first two amines when there was greater concentration of this compound. Moreover, the content of agmatine increased as increasing concentrations of diammonium phosphate. Only ethylamine was found to have significant relation with alcohol content; while a higher concentration of ethylamine was a lower the alcohol content. For total amines was found that both factors independently influenced the total concentrations obtained, increasing the total content of amines as a higher concentration of diammonium phosphate (strongly influenced by the concentration of agmatine) and lower alcoholic degree. No were found relations between organic acids and biogenic amines. Among the basic analysis and biogenic amines, no significant relations were found, except for agmatine with pH, that was proportional directly.

Key Words: Biogenic Amines, diammonium phosphate, alcohol, *Lactobacillus hilgardii*, wine.

ABREVIACIONES

AB	Aminas biógenas
FDA	Fosfato diamónico
cv.	Cultivar
Fin FA	Fin fermentación alcohólica
Total	Total de aminas biógenas
Total s/agm.	Total de aminas biógenas sin agmatina
Hist.	Histamina
Agm.	Agmatina
Met.	Metilamina
Put.	Putrescina
Etil.	Etilamina
Tir.	Tiramina
Cad.	Cadaverina
Trip.	Triptamina

INTRODUCCIÓN

En un mundo cada vez más preocupado de la calidad e inocuidad de los alimentos, sumado a la aspiración de Chile en convertirse en potencia agroalimentaria, es relevante conocer y estudiar todos los componentes que alteren la calidad e inocuidad de los productos que se ofrecen. Dentro de este contexto, es que se justifica el estudio de las aminas biógenas, compuestos orgánicos nitrogenados, que alteran la calidad sanitaria del vino y pueden afectar la salud humana (Flanzy, 2000; Carrascosa *et al.*, 2005). Estos compuestos poseen un bajo peso molecular, presentando actividad fisiológica, pudiendo ser formados y degradados durante el metabolismo normal de animales, plantas y microorganismos y también en la putrefacción (Brink *et al.*, 1990; Önal, 2007). Además, se pueden encontrar en numerosos alimentos, principalmente en los fermentados (Carrascosa *et al.*, 2005), e incluso, pueden ser usados como un indicador de alteración (Önal, 2007).

Las aminas biógenas son principalmente producidas por una descarboxilación microbiana de aminoácidos durante la fermentación (Zoecklein *et al.*, 2001; Flanzy, 2000; Hidalgo, 2003; Carrascosa *et al.*, 2005), pero también hay otra vía de síntesis que corresponde a una aminación de compuestos no-nitrogenados como aldehídos y cetonas (Ough *et al.*, 1981). Las monoaminas más comunes, histamina, tiramina y triptamina; y las diaminas putrescina y cadaverina, son producidas respectivamente a partir de histidina, tirosina, triptofano, ornitina y lisina (Hidalgo, 2003; Önal, 2007).

La presencia de aminas biógenas es importante en variados alimentos; es así como en alimentos no fermentados como frutas, vegetales, carnes, leche y pescado, pueden tener un origen endógeno a bajas concentraciones. En cambio, altas concentraciones de aminas biógenas se han encontrado en alimentos fermentados, generalmente producto de microbiota contaminante (Sillas-Santos, 1996). En general, los alimentos asociados a grandes concentraciones de aminas biógenas, son frecuentemente alimentos ricos en proteínas, que además se presentan una actividad proteolítica microbial que aumenta la cantidad de aminoácidos libres. En el caso del vino, si bien éste no es rico en proteínas, si presenta aminoácidos libres (Vidal-Carou *et al.*, 1990).

Efectos a la salud

Los síntomas que puede producir una ingesta excesiva de aminas biógenas son náuseas, dificultades respiratorias, sofocos, sudoraciones frías, palpitations del corazón, dolor de cabeza, erupciones, quemaduras orales, e hiper o hipotensión (Bauza y Teissedre, 1995). Estos efectos tóxicos pueden ser particularmente serios en personas con una reducida actividad de monoamina oxidasa, enzima relacionada con la degradación de aminas (Anderson *et al.*, 1993; Bodmer *et al.*, 1999; Stratton *et al.*, 1991; citados por Soufleros *et al.*, 2007). Además, el problema en el vino es que las dosis necesarias para que se produzcan efectos adversos son menores debido a la presencia de alcohol; por ejemplo, si en un derivado de carne o pescado se necesitan 53 mg, en vinos solo se necesitan 3 mg (Sandler y Reynolds, 1976; Rivas-Gonzalo y Mariné, 1983; Bauza y Teissedre, 1995,

Gloria *et al.*, 1998). Entre las aminas biógenas, histamina es la más tóxica y sus efectos pueden verse potenciados por la presencia de otras aminas y etanol (Chu y Bejdanes, 1981; Bauza y Teissedre, 1995).

Efectos sensoriales

Las aminas biógenas pueden resultar negativas cuando se encuentran en concentraciones elevadas, principalmente porque modifican el equilibrio aromático y gustativo de los alimentos, incluyendo la fase retronasal del mismo (Perez, 2006).

Aminas Biógenas en mostos y vinos

En vinos se han encontrado al menos 25 aminas biógenas (Lehtonen, 1996), con concentraciones muy bajas en comparación a otros alimentos fermentados, no obstante su efecto se ve incrementado por el etanol (Soufleros *et al.*, 2007). En el vino las aminas biógenas son principalmente producidas durante la fermentación maloláctica; siendo las más comunes histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y 2-feniletilamina (Lehtonen, 1996; y Lonvaud-Funel, 2001).

Las bacterias lácticas varían en su capacidad de producir aminas biógenas. En el vino, los principales productores son bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Respecto a la facultad del género *Oenococcus* para formar aminas biógenas, principalmente histamina, es variable y solo determinadas cepas poseen la actividad histidina descarboxilasa (Carrascosa *et al.*, 2005).

Algunas aminas biógenas en bajos niveles como putrescina, espermidina e histamina forman parte de la materia prima de los vinos, las uvas. Es así como Broquedis *et al.* (1989) menciona que espermina y putrescina son cuantitativamente las aminas más importantes en los granos de uva de Cabernet Sauvignon y Ugni blanc (citado por Soufleros *et al.*, 2007). Por su parte, Vidal-Carou *et al.* (1990) encontraron que las concentraciones de histamina eran menores a 1 mg/L en uvas. Mientras que Del Prete *et al.* (2008) en sus estudios encontraron presentes en el mosto a etanolamina, etilamina y putrescina, no hallando histamina, concluyendo que la variedad de la uva y las condiciones climáticas de un año a otro afectarían el contenido de aminas biógenas en la uva y posteriormente en el vino.

Hay autores que señalan que cadaverina, putrescina, espermidina y espermina son formadas por las levaduras durante la fermentación alcohólica (Buteau *et al.*, 1984 citado por Soufleros *et al.*, 2007; Torrea y Ancín, 2002). Del Prete *et al.* (2008) indican que al final de la fermentación alcohólica se produciría un descenso en el contenido de aminas biógenas, respecto al que había en el mosto, junto a la aparición de nuevas aminas biógenas en bajas concentraciones. Luego al finalizar la fermentación maloláctica se ha encontrado que se produciría un aumento del contenido de aminas biógenas, superando al presente en el mosto, y apareciendo concentraciones de agmatina y tiramina, además de aumentar las concentraciones de las aminas presentes en el mosto (Del Prete *et al.*, 2008), lo que concuerda con Ough *et al.* (1981) que sugieren que algunas aminas disminuyen en cantidad

durante la fermentación. No obstante lo anterior, los mismos autores señalan que en algunos casos, hay luego una liberación que ocurre durante la autólisis de las levaduras o en la etapa de almacenaje del vino.

Hay otros autores que encontraron que histamina, tiramina y putrescina pueden desarrollarse en cantidades importantes, durante y después de la fermentación maloláctica (Bauza y Teissedre, 1995; Gerboux y Monamy, 2000), esto por la microflora de la segunda fermentación (Bauza y Teissedre, 1995; Buteau *et al.*, 1984, citado por Soufleros *et al.*, 2007), encontrándose también autores que afirman que las aminas biógenas son principalmente producidas durante la fermentación maloláctica, siendo las más comunes histamina tiramina, putrescina, cadaverina y 2-feniletilamina (Lehtonen, 1996; Lonvaud-Funel, 2001; Gardini *et al.*, 2005).

Factores que inciden en la concentración de aminas biógenas

En la uva los tipos y niveles de aminas van a depender de una serie de factores, como la variedad y grado de maduración de la uva, tipo de suelo (Gloria *et al.*, 1998; Zoecklein *et al.*, 2001) y el contenido de compuestos nitrogenados en el mosto (Coton *et al.*, 1998; Sass-Kiss *et al.*, 2000; citados por Soufleros *et al.*, 2007). Por ejemplo, putrescina se asocia a problemas de deficiencia de potasio en el suelo (Brodequis *et al.*, 1989; Leitão *et al.*, 2003). Según Goñi y Azpilicueta (2001) las concentraciones de aminas biógenas en los vinos pueden venir determinadas por la composición de aminoácidos y por la cepa de levadura que realiza la fermentación alcohólica. Bell y Henschke (2005) mencionan que la concentración de histamina aumentaría entre un 1,6 a 3,8 veces, en el mosto y vino proveniente de vides a las que se les realizan aplicaciones de nitrógeno en exceso en campo. Bertrand *et al.* (1991, citados por Bell y Henschke, 2005) encontraron que en bayas del cv. Merlot, las concentraciones de histamina se duplicaban en vides tratadas con nitrógeno en comparación a las que no se les realizaban ninguna aplicación. También mencionan que lo mismo ocurriría con otras aminas biógenas, pero en menor grado.

Otro factor que afecta la concentración de algunas aminas, es la condición higiénica de la uva; por ejemplo, si la uva está podrida, ésta presentará niveles más altos de aminas, especialmente de isopentilamina y de 2-feniletilamina (Eder *et al.*, 2002; citado por Soufleros *et al.*, 2007).

Durante la fermentación Caruso *et al.* (2002) estudiaron la influencia de la levadura, encontrando que cepas como *Kloeckera apiculata*, *Brettanomyces bruxellensis* y *Metschnikowia pulcherrima* formaban agmatina y β -feniletilamina con una variabilidad considerable, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* producía etanolamina, también en cantidades variables (desde trazas hasta 16 mg/L).

Por otra parte, algunos tratamientos enológicos pueden afectar el contenido de aminas; por ejemplo, según Meyer y Pause (1985) los tratamientos de bentonita en vinos, pueden disminuir la concentración de aminas como histamina, putrescina e isoamilamina. Según Desser y Bandion (1985), la aplicación combinada de ictiocola y gelatina, baja la cantidad de aminas biógenas en vinos blancos (ambos citados por Soufleros *et al.*, 2007).

El etanol presente en el vino también influye en la concentración de histamina. Landete (2005) encontró que cuando las concentraciones superaban el 10% v/v de etanol se observaba una disminución en la población microbiana y por tanto en los niveles de histamina. Sin embargo cuando los niveles de etanol eran iguales o inferiores al 10% v/v, encontró que la producción de histamina aumentaba con la concentración alcohólica; concluyendo que la actividad del enzima descarboxilasa se ve favorecida por la presencia de etanol hasta cierto grado alcohólico.

Según Pérez (2006), la aplicación de nutrientes en forma de aminoácidos o nitrógeno inorgánico, influiría en la aparición de las aminas biógenas al incorporar fuentes de aminoácidos. Además, hay investigaciones que mencionan algunos otros factores que pueden estar afectando la cantidad de aminas biógenas como la duración de la maceración de pieles; guarda en barricas; y el crecimiento de bacterias y levaduras indígenas (Bauza y Teissedre, 1995; Cilliers y Van Wyk, 1985; Gloria *et al.*, 1998). Según Gardini *et al.* (2005) un alto pH aumentaría el contenido de aminas biógenas mientras que una alta concentración de etanol y una baja concentración de piridoxal-5-fosfato (cofactor durante la descarboxilación) reducirían su acumulación.

Estos compuestos también pueden evolucionar durante el envejecimiento del vino, al contener niveles importantes de aminoácidos libres que pueden ser descarboxilados por poblaciones microbianas residuales formándose las correspondientes aminas. Según resultados de Jiménez y Ancín (2007), el grado de turbidez de los vinos al envejecer no influiría en la acumulación de aminas biógenas. Se ha encontrado que una parte de histamina y tiramina se degradaría al final del envejecimiento, ya que algunos autores afirman que la acción residual de enzimas oxidasas degradarían estas aminas (Enes-Dapkevicius *et al.*, 2000; Voigt y Eitenmiller, 1978). Mientras que putrescina y cadaverina no se formarían durante esta etapa. Marques *et al.* (2008) estudiando las variaciones de las aminas biógenas en el envejecimiento con lías encontraron que los niveles de tiramina y cadaverina fueron mayores en estos vinos. Por otra parte Jiménez *et al.* (2003) no encontraron diferencias en la concentración de aminas biógenas durante en el envejecimiento ya sea en barricas de origen francés o americano. También hay estudios durante la guarda en botella del vino no observándose cambios drásticos en la concentración de aminas biógenas. González y Ancín (2006) estudiaron el efecto de diferentes temperaturas de guarda, señalando que sólo existieron diferencias en la evolución durante los primeros 45 días. Posteriormente la concentración de aminas biógenas se mantiene hasta no tener diferencias entre los tratamientos de temperatura aplicadas a los vinos, asumiendo que la actividad oxidasa de las bacterias aún existe en botella.

Hipótesis

La producción de aminos biógenas se ve influenciada por el contenido de compuestos nitrogenados y el grado alcohólico en el vino.

Objetivos

Evaluar el efecto de las distintas concentraciones de fosfato diamónico y de etanol en la producción de aminos biógenas en vino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio

El estudio se realizó en la Planta Piloto y laboratorios de Enología, Cromatografía y Microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

El trabajo se realizó en 420 L de mosto estéril Cabernet Sauvignon del Valle de Maipo de la empresa Jugos del Maipo. Se utilizaron estanques con una capacidad de 25 L para cada tratamiento, levadura seleccionada *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin ICV D-47 de Lallemand, una bacteria láctica productora de aminos biógenas *Lactobacillus hilgardii* cepa 464 perteneciente a la CECT (Colección Española de Cepas Tipo), fosfato diamónico y etanol potable.

Metodología

Tratamientos y Diseño de Experimentos

Se realizaron 8 tratamientos con 3 repeticiones los que corresponden a:

- T1, 20 g/hL de fosfato diamónico, sin adición de etanol;
- T2, 20 g/hL de fosfato diamónico, con adición de etanol;
- T3, 50 g/hL de fosfato diamónico, sin adición de etanol;
- T4, 50 g/hL de fosfato diamónico, con adición de etanol;
- T5, 120 g/hL de fosfato diamónico, sin adición de etanol;
- T6, 120 g/hL de fosfato diamónico, con adición de etanol;
- T7, 200 g/hL de fosfato diamónico, sin adición de etanol;
- T8, 200 g/hL de fosfato diamónico, con adición de etanol.

Procedimiento

Los 420 L de mosto estéril se dividieron en 3 estanques de acero inoxidable, vertiendo 140 L de mosto a cada uno y se realizó la fermentación alcohólica. Luego se separó en los 8 tratamientos, a estas 3 cubas se les hicieron análisis de pH, acidez total, grados brix según los métodos descritos por Bordeau y Scarpa (1998), además de calcular el grado alcohólico probable (GAP) dando valores normales y un GAP favorable para el estudio a realizar. Los resultados se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados análisis realizados al mosto y al finalizar la fermentación alcohólica de Cabernet Sauvignon. GAP, grado alcohólico probable; Fin FA, final fermentación alcohólica.

	pH	Ac. Total g/L	Grado Brix	GAP (% v/v)	Ac. Volátil (g/L)	Az. Resid. (g/L)	Alcohol (% v/v)
Mosto	3,45	3,43	20,5	12,1	-	-	-
Fin FA	3,39	3,43	-	-	0,47	1,89	12

Para llevar a cabo la fermentación alcohólica se inoculó con levadura seleccionada *Saccharomyces cerevisiae* en dosis de 15 g/hL, más la adición de 40 g/hL de fosfato de amonio en total, aplicado en 2 tiempos durante la fermentación. El mosto se fermentó en 16 días durante los cuales observó su evolución con el seguimiento de densidad y temperatura, al finalizar se midió el contenido de azúcar residual, acidez total y volátil, grado alcohólico y pH, esto según métodos recopilados en Bordeau y Scarpa (1998) los resultados se muestran en el Cuadro 1.

De los resultados obtenidos se observa que se logró un vino seco, menor a 2 g/L de azúcares residuales, con una acidez volátil típica de un vino sano y recién fermentado (Zoecklein *et al.*, 2001); valores superiores a 0,7 – 0,8 g/L de ácido acético indicarían actividad bacteriana y un posible deterioro en la calidad del vino. El grado alcohólico obtenido se encuentra en los 12 % v/v que se buscaba. En conclusión la fermentación se llevó a cabo óptimas condiciones logrando un vino con las características requeridas para la realización del estudio. Luego se procedió a juntar y mezclar los estanques de fermentación para formar cada tratamiento. En 12 estanques de 20 L se dejó el grado alcohólico alcanzado, 12 % v/v, y en otros 12 se adicionó alcohol hasta llegar a 14,5 % v/v, a los que se aplicó fosfato diamónico en concentraciones de 20, 50, 120 y 200 g/hL según correspondía para cada tratamiento, como se muestra en la Figura 1. Posteriormente, se inoculó con una bacteria láctica productora de aminas biógenas para la fermentación maloláctica (*Lactobacillus hilgardii* cepa 464); previamente cultivada y multiplicada en medio MRS líquido, en una población 1×10^7 cel/mL; realizando un recuento poblacional en medio MRS cada 3 días mientras ésta se llevó a cabo.

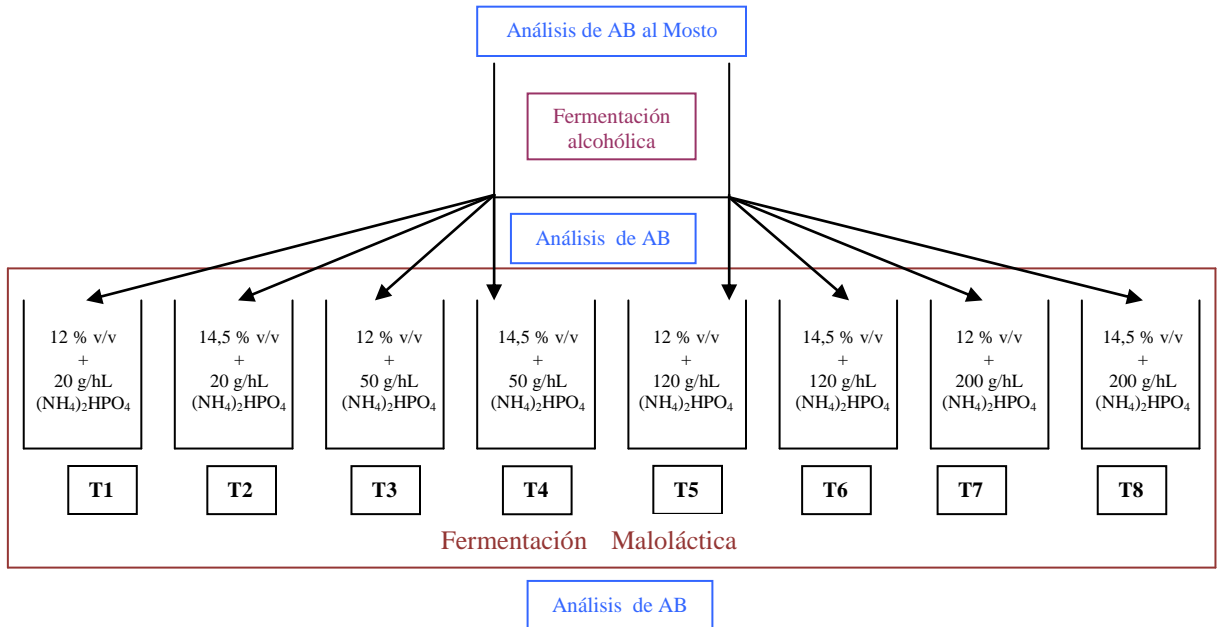


Fig. 1. Esquema de los tratamientos. Diferentes concentraciones de fosfato diamónico (20, 50, 120, 200 g/hL) con 2 niveles de alcohol. AB (Aminas Biogénas).

Los análisis correspondientes a determinar las aminos biogénas presentes en el vino y sus concentraciones se realizaron al inicio, al mosto estéril, una vez finalizada la fermentación alcohólica, y posterior a la fermentación maloláctica. Adicionalmente se midió el contenido de ácidos orgánicos en los mismos tres momentos mencionados anteriormente.

Determinaciones analíticas

Los análisis correspondientes a determinar las aminos biogénas presentes en el vino y sus concentraciones se realizaron al inicio, al mosto estéril, una vez finalizada la fermentación alcohólica, y luego de la fermentación maloláctica. Las aminos biogénas que se midieron en este estudio fueron: histamina, agmatina, metilamina, etilamina, tiramina, putrescina, cadaverina y triptamina. Para esto se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un detector de fluorescencia (HPLC-FL), marca Agilent Technologies 1200 Series, siguiendo la metodología propuesta por Hernández-Orte *et al.* (2006). Esta consiste en la derivatización en una precolumna con 6-amino-quinolil-N-hidroxynimidil carbamato (AQC) restituido a partir del kit enzimático AccQ Fluor (Waters, EE.UU.). Para ésta derivatización se toman 20 μ L de vino en un tubo eppendorf, previa centrifugación (3500 rpm por 15 minutos), que luego se filtra en una membrana de porosidad 0,22 μ m y diluye a 1:5. Posteriormente se aplican 50 μ L de buffer borato y 30 μ L del agente derivatizante. Por último, las muestras se inyectan en el cromatógrafo a un volumen de 5 μ L por muestra. Se utilizaron las longitudes de onda 250 y 395 nm para identificar los compuestos de interés. La columna cromatográfica que se utilizó fue Luna 5u C18 100A y tiene como fase

estacionaria dimetiloctadecilsilil de 250 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno. La columna se acondiciona a 65°C y la composición de las fases móviles fueron las siguientes:

- Fase A: Solución de acetato de sodio trihidrato (140 mM) y trietilamina (17 mM) con el pH ajustado a 5,05 con ácido fosfórico (85%).
- Fase B: 100% metanol.

El programa cromatográfico ocupado fue: 80% de fase A y 20% de fase B por 5 minutos seguido por un gradiente de elusión lineal de 20 a 80% de fase B hasta los 25 minutos.

Para efecto de cuantificar cada amina se realizaron rectas de calibrado, las cuales se efectuaron para cada uno de los compuestos. Se analizaron 10 puntos para formar las rectas los cuales estaban entre una concentración de 0,25 y 20 ppm para cada patrón. Los estándares de aminas biógenas para cuantificación y rectas de calibración fueron adquiridos a Sigma (EE.UU.).

Respecto a la determinación de ácidos orgánicos, también se realizó en tres momentos, al mosto, luego de la fermentación alcohólica y una vez terminada la fermentación maloláctica. Los ácidos medidos fueron, ácido tartárico, ácido málico y ácido láctico. Para esto se ocupó un cromatógrafo de líquidos de alta eficacia acoplado a un detector de fotodiodos alineados (HPLC-DAD) de marca Agilent technologies 1200 series, siguiendo un método adaptado en el laboratorio de Cromatografía del Departamento de Agroindustria y Enología. Para la determinación primero se realiza una extracción de ácidos mediante una columna de extracción fase sólida C-18 previa activación, a través de la elución de 1 mL de Metanol (grado HPLC) y luego de 10 mL de agua bidestilada. Luego, se centrifugan 25 mL de muestra a analizar por 10 minutos a 3000 rpm. Se toman 2 mL del sobrenadante y se colocan en la columna de extracción. La solución es eluída a un matraz aforado de 10 mL. Se lava la columna de extracción con 2 mL de solución buffer fosfato pH 3,0 y se deja eluir completamente en el mismo matraz de 10 mL. Se afora el matraz con solución Buffer fosfato pH 3,0, se agita y filtra en una membrana 0,22 µm de diámetro de poro. Se procede a inyectar las muestras en el cromatógrafo con un volumen de inyección de 20 µL. La columna que se utilizó para la detección fue Discovery RP Amide C16 25x4.6, 5µm y la detección se realizó a una longitud de onda de 220 nm, acondicionada a una temperatura de 30 °C. La fase móvil utilizada fue de Buffer fosfato KH_2PO_4 (0,1 M) ajustado a pH 3,0 con ácido fosfórico concentrado, el programa cromatográfico se hace de modo isocrático con un flujo de 1 mL/min. Orden de elusión ácidos orgánicos se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Orden de elusión en la detección de ácidos orgánicos en HPLC.

Compuesto	Tiempo retención relativos
Acido Tartárico	3,2 min
Acido Málico	3,7 min
Acido Láctico	4,1 min

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variaciones de AB se utilizó un diseño experimental que fue completamente al azar, con una estructura factorial 4x2 con 3 repeticiones.

La unidad experimental es de 17 L de vino.

Los análisis de significancia estadística se realizaron mediante ANDEVA, utilizando el test de Tukey para la comparación de múltiples variables con el fin de determinar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Para esto se utilizó el programa computacional MINITAB 14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aminas Biógenas

El contenido de aminas biógenas (AB) en las dos primeras etapas de la fermentación fue determinado como se describe en materiales y métodos. Los niveles se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Contenidos de AB en Cabernet Sauvignon. Se determinó la concentración en mg/L de las diferentes AB en el mosto y al final de la fermentación alcohólica (Fin FA). Adicionalmente se muestran los niveles totales de AB en cada una de estas etapas.

mg*L ⁻¹	Histamina	Agmatina	Metilamina	Etilamina	Tiramina	Putrescina	Cadaverina	Triptamina	TOTAL
Mosto	1,84	0,00	1,56	3,78	0,00	6,30	1,16	0,00	14,64
Fin FA	2,12	0,00	0,00	1,30	0,92	4,46	1,31	1,82	11,92

En general se puede observar que el total de AB durante estos 2 momentos de la elaboración del vino es alta, y que disminuye al finalizar la fermentación alcohólica. Como se describe en el Cuadro 3, en el mosto están presentes las aminas histamina, metilamina, etilamina, putrescina y cadaverina. Esto concuerda con lo determinado por otros autores, que han establecido que las aminas biógenas se encuentran originalmente en la materia prima del vino. Es así, como se ha reportado previamente que la presencia de putrescina en el mosto se ha asociado a deficiencias de potasio en el suelo (Brodequis *et al.*, 1989, citado por Leitão, 2005); adicionalmente, su contenido varía en función de la cepa de uva utilizada y de las condiciones climáticas (Buteau *et al.*, 1984 citado por Soufleros *et al.*, 2007; Torrea y Ancín, 2002; Del Prete *et al.*, 2008), del estado sanitario de la uva (Eder *et al.*, 2002; citado por Soufleros *et al.*, 2007), del grado de maduración y del tipo de suelo (Gloria *et al.*, 1998).

Posteriormente a la fermentación alcohólica, se encuentran presentes histamina, etilamina, tiramina, putrescina, cadaverina y triptamina. Tanto la metilamina, putrescina, como etilamina disminuyeron sus concentraciones en comparación a los niveles determinados en el mosto. Esto concuerda con lo descrito previamente por Del Prete *et al.* (2008), donde se ha propuesto que esta disminución de AB es causada por la incorporación de estos compuestos en el metabolismo de las levaduras. Así, por ejemplo, se ha determinado que etilamina es utilizada como fuente de carbono y nitrógeno (Del Prete *et al.*, 2008) siendo liberadas por la autólisis de las levaduras una vez finalizada la fermentación de alcohólica (Soufleros *et al.*, 2007). Por otra parte se ha determinado que la histamina aumenta su concentración, mientras que después de la fermentación alcohólica aparecen tiramina y triptamina, situación similar a la reportada en el trabajo de Vidal-Carou *et al.* (1990), cuyos análisis indican que la fermentación alcohólica inducía a la producción de tiramina pero en cantidades de poca consideración.

Con el fin de establecer más detalladamente las variaciones en los niveles de AB se realizaron diferentes tratamientos como se ha descrito anteriormente. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4 donde se aprecia el contenido de las diferentes aminas biógenas en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada uno de los tratamientos una vez terminada la fermentación maloláctica. El contenido de AB producido exclusivamente por cada uno de los tratamientos se obtuvo de la diferencia entre la concentración al final de la fermentación maloláctica menos la concentración final de la fermentación alcohólica.

Cuadro 4. Contenido promedio de AB posterior a la fermentación maloláctica.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Histamina	14,74 ± 3,7 ^b	13,22 ± 2,6 ^b	13,27 ± 1,5 ^{ab}	12,96 ± 0,5 ^{ab}	11,58 ± 0,3 ^{ab}	11,05 ± 1,3 ^{ab}	9,69 ± 3,0 ^a	9,58 ± 2,2 ^a
Agmatina	22,52 ± 1,6 ^{ab}	20,00 ± 4,7 ^{ab}	16,70 ± 2,6 ^a	17,05 ± 2,7 ^a	33,64 ± 12,1 ^b	25,92 ± 9,2 ^b	44,16 ± 5,5 ^c	36,40 ± 3,0 ^c
Metilamina	12,04 ± 2,2 ^b	10,99 ± 1,5 ^b	8,76 ± 1,2 ^b	10,91 ± 0,9 ^b	7,70 ± 1,5 ^a	6,93 ± 0,7 ^a	6,06 ± 0,4 ^a	6,20 ± 0,4 ^a
Etilamina	1,57 ± 1,1 ^B	nd ^A	1,19 ± 0,9 ^B	nd ^A	0,78 ± 0,7 ^B	0,10 ± 0,1 ^A	0,58 ± 0,5 ^B	nd ^A
Tiramina	4,28 ± 2,7	2,87 ± 2,9	2,60 ± 2,1	5,89 ± 2,3	1,79 ± 1,4	3,73 ± 0,8	3,00 ± 2,0	3,28 ± 1,2
Putresina	0,61 ± 0,6	0,83 ± 0,8	0,87 ± 0,8	0,46 ± 0,4	0,57 ± 0,5	nd	0,40 ± 0,3	nd
Cadaverina	0,13 ± 0,1	nd	Nd	0,34 ± 0,2	0,19 ± 0,2	nd	0,28 ± 0,1	nd
Triptamina	1,61 ± 1,4	1,41 ± 1,4	1,28 ± 1,3	1,31 ± 1,3	nd	nd	2,57 ± 2,2	0,84 ± 0,7
Total	57,51 ± 6,2 ^{abB}	49,38 ± 3,5 ^{abA}	44,76 ± 5,6 ^{ab}	49,01 ± 5,3 ^{aa}	56,26 ± 9,2 ^{ab}	47,70 ± 8,8 ^{aa}	66,73 ± 4,5 ^{bb}	56,31 ± 4,0 ^{ba}
Total s/Agm	34,99 ± 6,0 ^b	29,37 ± 1,9 ^b	28,06 ± 4,0 ^b	31,96 ± 4,9 ^b	22,62 ± 3,2 ^a	21,78 ± 0,5 ^a	22,57 ± 1,0 ^a	19,91 ± 1,8 ^a

Las concentraciones se presentan en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \pm$ desviación estándar. Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para el factor FDA. Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para el factor grado alcohólico. Sin letras en el superíndice indica que no hubo diferencias significativas para ese factor. Agm, abreviación de agmatina. nd: no detectado

La concentración final de aminas biógenas posterior a la fermentación maloláctica es en promedio de $53,46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, un contenido alto, mientras que la menor concentración de AB se obtiene en el tratamiento 3 ($44,76 \pm 5,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y la mayor concentración con el tratamiento 7 ($66,73 \pm 4,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Estos resultados sugieren que el contenido de AB se correlaciona con el grado alcohólico del tratamiento. Es así como en tratamientos con mayores grados alcohólicos (tratamientos 2, 4 y 6; 14,5 % v/v) muestran menores niveles de AB en comparación con tratamientos impares (tratamientos 1, 5 y 7) que corresponden a tratamientos con menor grado alcohólico (12% v/v). Este fenómeno puede deberse a que el grado alcohólico altera la actividad metabólica bacteriana, al encontrarse en un medio más limitante, disminuyendo el crecimiento bacteriano (Fleet, 1993). A pesar de la relación entre alcohol y contenido AB Total, existe una excepción en el tratamiento 3, en donde con un bajo grado alcohólico (12 % v/v) se obtiene un menor contenido de AB total en comparación al tratamiento 4 (14 % v/v).

En cuanto al contenido de AB totales respecto a la adición de fosfato diamónico (FDA) se observa una tendencia leve hacia el aumento. Los tratamientos que tenían una concentración intermedia de FDA (tratamientos 3 y 4 con 50 g/hL, tratamientos 5 y 6 con 120 g/hL) presentaron las concentraciones más bajas de AB totales no encontrándose diferencias significativas entre ellos. Mientras, los tratamientos con 200 g/hL de FDA presentaron las concentraciones más altas de AB totales (tratamientos 7 y 8), seguidos por los tratamientos con 20 g/hL de FDA (tratamiento 1 y 2).

Las AB que se presentaron en mayor concentración fueron, agmatina con un promedio en todos los tratamientos de $27,05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguida por histamina y metilamina, representando aproximadamente el 90% de las aminas biógenas en cada uno de los tratamientos. Mientras que las AB que se presentaron en menores concentraciones fueron cadaverina, con un promedio de $0,13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguida en mayor concentración por putrescina, etilamina y triptamina. Cabe destacar que gran parte del aumento en el contenido total de AB se debe a la síntesis de Agmatina, ya que al restarla del total se observa que la tendencia es hacia la disminución de AB a medida que aumenta el contenido de FDA, además de observar siempre una disminución cuando el grado alcohólico es mayor. Esto queda más claro en la Figura 2.

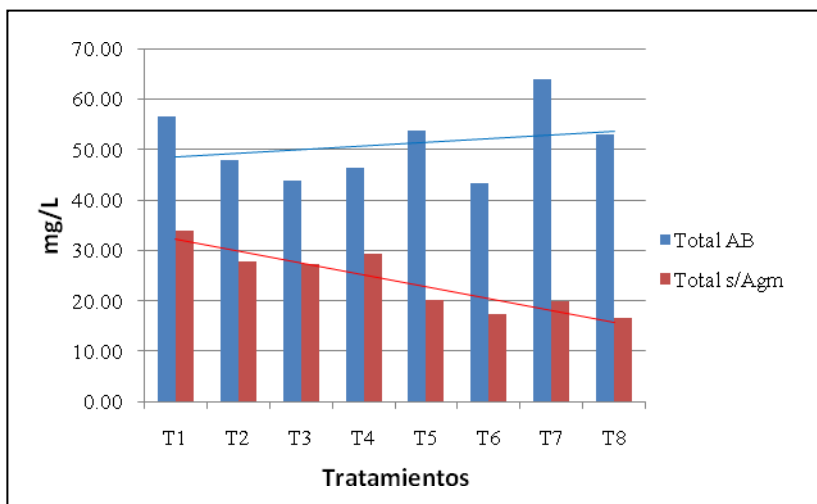


Figura 2. Contenido total de AB con y sin agmatina para cada uno de los tratamientos, con su respectiva línea de tendencia.

Según el análisis estadístico, con un nivel de significancia del 2% para todas las aminas se aceptó que los errores son normales y con un nivel de significancia del 2% se aceptó la homogeneidad de la varianza para todas las AB incluyendo el total. Luego, no se encontraron diferencias significativas para la interacción de los factores en ninguno de los tratamientos.

Para el total de AB se hallaron diferencias significativas para cada uno de los factores estudiados por separado, contenidos de FDA y grado alcohólico, con un valor p de 0,006 para el primer factor y de 0,019 para el segundo. Para el total sin agmatina se encontraron diferencias significativas solo para el contenido de FDA, diferenciando los tratamientos 1, 2, 3 y 4 de los tratamientos 5, 6, 7 y 8, esto con un valor p de 0.

Para la histamina, se encontró que el contenido de FDA presentaba diferencias significativas, dando un valor p de 0,016, como también lo fue para agmatina y metilamina con valores de 0 en el valor p . Cabe destacar que para histamina y metilamina el contenido de AB fue significativamente menor en los tratamientos con 200 g/hL de FDA (tratamientos 7 y 8) mientras que el más alto contenido se encontró en los tratamientos con 20 g/hL de FDA (tratamientos 1 y 2). Para la histamina, las diferencias significativas se hallaron en los tratamientos con 20 g/hL y 200 g/hL de FDA mientras que los otros tratamientos resultaron ser un intermedio de estos dos (tratamientos 3, 4, 5 y 6). En el caso de metilamina se encontró que los tratamientos con 20 y 50 g/hL de FDA (tratamientos 1, 2, 3 y 4) se diferenciaban de los tratamientos con 120 y 200 g/hL de FDA (tratamientos 5, 6, 7 y 8). En cuanto a agmatina se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos con 50 g/hL (tratamientos 3 y 4), 120 g/hL (tratamientos 5 y 6) y 200 g/hL de FDA (tratamientos 7 y 8) aumentando el contenido de esta AB cuando más alto era la concentración de FDA; los tratamientos 1 y 2 (20 g/hL) resultaron ser un intermedio de los tratamientos con 50 y 120 g/hL de FDA, sin encontrar diferencias significativas para el grado alcohólico en ninguna de estas tres aminas.

Para etilamina se encontraron diferencias significativas en el grado alcohólico con un valor p de 0,001, sin encontrar diferencias significativas en el contenido de FDA. Hallando un menor contenido de esta AB cuando el grado alcohólico era mayor, es decir en los tratamientos pares.

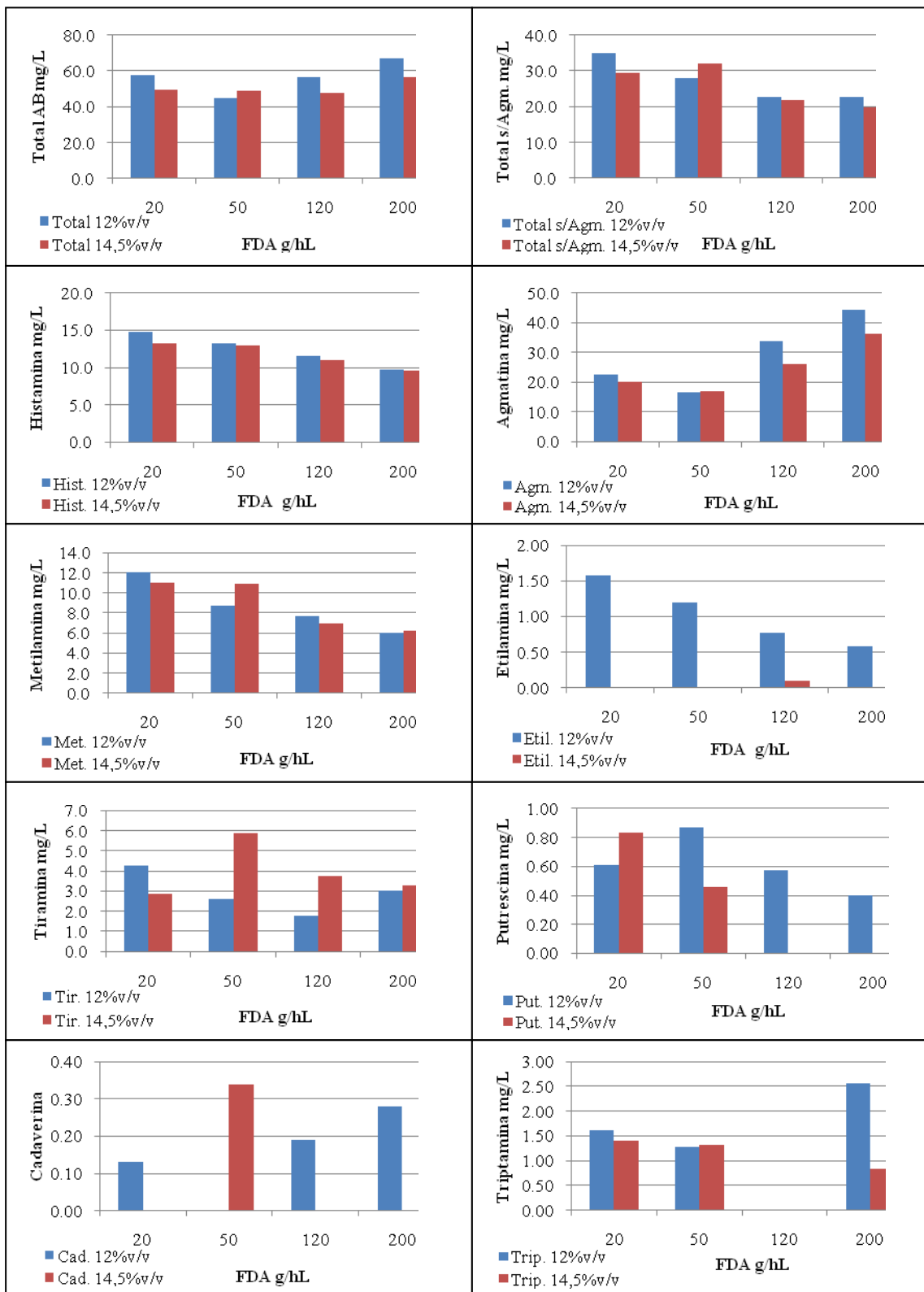
Para putrescina, tiramina, triptamina y cadaverina, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores.

En resumen, el contenido de FDA presentó diferencias significativas en histamina, metilamina y el total de AB sin agmatina, significando que a medida que la concentración de esta sal aumentó, representó una disminución en la producción de las AB mencionadas. Esto puede ser explicado por el efecto que el medio, tan abundante en FDA, provocó en las bacterias utilizada, por lo que a mayores concentraciones residuales que quedasen en el vino terminada la fermentación alcohólica por una aplicación sobre estimada de FDA estaría disminuyendo la producción de estas aminas, ya sea por un cambio en la ruta de obtención de energía o por una menor población, por lo que un medio más abundante nutricionalmente haría menos necesaria la producción de estas aminas para la obtención de energía de las bacterias. Sin embargo, hay que considerar que esto no ocurrió para agmatina y para el total de AB, las que también presentaron diferencias significativas para este factor. Siendo agmatina la única de las aminas cuya concentración aumentó a medida que los tratamientos tenían un mayor contenido de FDA haciendo que el contenido total de las aminas estudiadas aumentara, lo que puede atribuirse a que esta amina se origina de la

descarboxilación de la arginina, uno de los aminoácidos más abundante en el mosto y que permanece en cantidades significativas una vez finalizada la fermentación alcohólica, esto sumado a que la cepa utilizada sería una de las pocas con la habilidad genética de hacer esta descarboxilación (Landete, 2005). Si bien, que queden altas concentraciones residuales de FDA podría estar ayudando a disminuir el contenido de histamina, cuya concentración límite se encuentra recomendada para los países productores, no hay que olvidar que dichas concentraciones residuales de FDA producen inestabilidad biológica en el vino en especial en aquellos que van a bodega pudiendo aumentar la actividad de *Brettanomyces* (Bell y Henschke, 2005), en el caso que la bodega tuviera contaminada con esta levadura. Mientras que para putrescina, triptamina, tiramina y cadaverina no presentan ninguna diferencia al aumentar la concentración de FDA.

En cuanto a los tratamiento relacionados con grado alcohólico, solo se encuentran diferencias significativas para etilamina, disminuyendo su concentración a un mayor grado alcohólico, pudiéndose observar que en las concentraciones del resto de las AB se aprecia una tendencia hacia la disminución, a pesar que estadísticamente no se encuentran diferencias significativas, por lo que este factor estaría disminuyendo el contenido de AB, esto debido a que disminuye la población microbiana, inhibiendo el crecimiento y/o el metabolismo (Fleet, 1993; Landete, 2005). Esto se puede apreciar más claramente en los gráficos de la Figura 3. Hay autores que además señalan que el etanol inhibiría también la actividad de la enzima descarboxilasa como Farías *et al.* (1993), como también hay otros autores como Rollan *et al.* (1995) que encontraron que la actividad no se ve afectada, y otros que encontraron que dicha actividad se encuentra favorecida (Landete, 2005).

Figura 3. Contenido de cada AB según la concentración de FDA (g/hL) para cada grado alcohólico estudiado (%v/v). Total s/Agm. = Total sin agmatina.



El contenido de cada una de las AB estudiada en los tratamientos se analiza a continuación.

Para la histamina, se hallaron concentraciones menores tanto al aumentar el grado alcohólico como al aumentar la concentración de FDA, encontrándose su menor concentración en el tratamiento 8 y la mayor en el tratamiento 1, obteniéndose un promedio de 12,01 con una desviación estándar de 2,54 mg*L⁻¹. Esta amina representa un 23% del total promediado de todos los tratamientos, con un rango de 6,27 a 17,19 mg*L⁻¹. Esta monoamina heterocíclica es producida por la descarboxilación de histidina, cabe destacar que esta cepa en particular produce grandes concentraciones de esta amina (Landete *et al.* 2005), por lo que no es de extrañar que en los tratamientos se encuentre en concentraciones más alta que las recomendaciones máximas admisibles que van desde los 2 hasta los 10 mg*L⁻¹ para Alemania y Austria respectivamente (Lehtonen, 1996). En cuanto a lo encontrado en vinos chilenos estos valores son más altos que los encontrados por Gálvez (2008).

La agmatina es la única amina que tiene una tendencia clara a aumentar su concentración en los tratamientos que tienen un mayor contenido de FDA. El tratamiento con mayor concentración de esta amina fue el 7, mientras que el menor se halló en el tratamiento 3. Como ya se mencionó, su promedio en todos los tratamientos fue de 27,05 y una desviación estándar de 10,88 mg*L⁻¹, representando un 60% del total promediado de todos los tratamientos, con un rango de 14,08 a 50,39 mg*L⁻¹. Estos valores son muy superiores a los encontrados por Gálvez (2008) y Salinas (2009) en vinos chilenos en donde esta amina se presentaba esporádicamente y cuando lo hacía era bajas concentraciones. Algunos autores mencionan que esta amina es producida solo por cepas de *Lactobacillus hilgardii* (Arena y Manca de Nadra, 2001), bacteria utilizada para esta investigación, en la que estas seguirían un vía anómala para el catabolismo de la arginina, descarboxilandola a agmatina, ya que habitualmente es metabolizada directamente a putrescina o metabolizada primero a ornitina, y luego a putrescina (König *et al.*, 2009; Moreno-Arribas y Polo, 2008). Landete *et al.* (2008) señalan que la agmatina puede, luego ser también transformada a putrescina mediante dos vías, una directa mediante la agmatina deiminasa y una segunda vía mediante la formación de N-carbamoilputrescina por la agmatinasa para luego ser transformada a putrescina por acción de la N-carbamoilputrescina hidrolasa.

La metilamina presenta una disminución en su concentración en los tratamientos en que el FDA aumenta, mientras que el grado alcohólico no es un factor determinante en su disminución, encontrando su mayor concentración en el tratamiento 1 y la menor en el tratamiento 7. Esta AB presenta un promedio de 8,7 con una desviación estándar de 2,47 mg*L⁻¹, representando el 19% del total promediado de AB de todos los tratamientos, ubicándose en un rango de 5,62 a 14,3 mg*L⁻¹. Estos valores son similares a los encontrados por Gálvez (2008) en vinos del cv. Cabernet sauvignon de Chile.

La etilamina posee una menor concentración en los tratamientos que poseen un mayor grado alcohólico, hallando su mayor concentración en el tratamiento 1 y no siendo detectada en los tratamientos con mayor grado alcohólico con excepción en el tratamiento 6. Esta AB se presentó en general en bajas concentraciones, teniendo un promedio de 0,54 y una desviación estándar de 0,78 mg*L⁻¹, con un rango que va desde no detectado a 2,82 mg*L⁻¹. Estas bajas concentraciones son similares a lo encontrado en vinos chilenos por Gálvez (2008) y por Hyötyläinen *et al.* (2001).

En cuanto a la tiramina, no se encontró un aumento o una disminución de su concentración conforme cambiaban las concentraciones de FDA o el grado alcohólico en los diferentes tratamientos, encontrando su mayor concentración en el tratamiento 4 y la menor en el tratamiento 5. Esta amina mostró un promedio de 3,43 con una desviación estándar de 2,08 mg*L⁻¹, representando el 7% del total promediado de AB de todos los tratamientos, con un rango que varía entre 0,17 a 7,91 mg*L⁻¹. Estos valores son más altos que los 1,27 mg*L⁻¹ en promedio encontrados por Gálvez (2008) en vinos del cv. Cabernet sauvignon de Chile. En general esta AB no es comúnmente producida por las bacterias lácticas, sin embargo algunas cepas de *Lactobacillus hilgardii* se encuentran dentro de las que expresan el gen para la descarboxilación de la tirosina (König *et al.*, 2009; Landete, 2005), a pesar de lo cual las concentraciones encontradas son menores a los 25 mg*L⁻¹ encontrados como tóxico para la salud humana (Rivas-Gonzalo y Mariné, 1983).

Para la putrescina, se puede señalar que presentó un promedio de 0,47 con una desviación estándar de 0,63 mg*L⁻¹, con un rango que va desde no detectado a 1,88 mg*L⁻¹. Como se ve esta amina se encontró en concentraciones bajas que no estaría afectando el aroma ni el sabor ya que Woller (2005) comentó que concentraciones superiores a 30 mg*L⁻¹ le confiere a los vinos tintos aromas malolientes o pútridos, aunque menciona también que concentraciones de 10 a 20 mg*L⁻¹ pueden ayudar a redondear el sabor en vinos tintos.

En cadaverina no se observa ni un aumento o disminución en su concentración a medida que en los tratamientos varió el grado alcohólico y el FDA. Su mayor concentración se encontró en el tratamiento 4 y en los tratamientos 2, 3, 6 y 8 no fue detectada en estos tratamientos. Esta AB tiene un promedio de 0,13 con una desviación estándar de 0,25 mg*L⁻¹, con un rango que va desde no detectado hasta 0,83 mg*L⁻¹. Tanto putrescina como cadaverina es importante que se encuentren en bajas concentraciones ya que son las relacionadas con la falta de higiene dentro de la planta de producción (Mafra *et al.*, 1999).

La triptamina, así como la cadaverina y tiramina, tampoco presentan un aumento o disminución a medida que varían el contenido de los factores estudiados en los tratamientos, hallando su mayor concentración en el tratamiento 7 y no siendo detectada en los tratamientos 5 y 6. Posee un promedio de 1,13 con una desviación estándar de 1,57 mg*L⁻¹, con rangos que van de no detectado hasta 4,24 mg*L⁻¹, valores similares a los encontrados por Gálvez (2008) en vinos chilenos.

Relación ácidos orgánicos y composición química con Amina biógenas

Adicionalmente se realizaron análisis básicos y de ácidos orgánicos medidos por HPLC-DAD para buscar relaciones entre éstos y las aminas biógenas mediante un análisis de componentes principales.

Ácidos Orgánicos

En el Cuadro 5 se pueden ver los resultados obtenidos en la medición de ácidos orgánicos después de la fermentación maloláctica.

Cuadro 5. Contenido promedio de ácidos orgánicos para cada uno de los tratamientos (g/L). \pm , desviación estándar. Fin FA, final fermentación alcohólica.

	Ácido		
	Tartárico	Málico	Láctico
Mosto	2,27	2,89	0,00
Fin FA	1,80	3,26	0,00
T1	3,36 \pm 0,58	0,06 \pm 0,07	5,83 \pm 1,20
T2	3,18 \pm 0,39	0,34 \pm 0,29	5,35 \pm 2,15
T3	3,52 \pm 0,54	0,21 \pm 0,20	6,50 \pm 2,78
T4	2,93 \pm 0,39	0,19 \pm 0,18	4,72 \pm 2,14
T5	3,70 \pm 0,37	0,19 \pm 0,19	7,68 \pm 2,26
T6	3,35 \pm 0,40	0,12 \pm 0,11	7,77 \pm 2,02
T7	4,25 \pm 0,70	0,33 \pm 0,24	8,08 \pm 3,79
T8	3,38 \pm 0,57	0,22 \pm 0,22	6,97 \pm 3,75

Como se puede observar en el Cuadro 5, existe un aumento poco común del contenido de ácido málico ocurrido de mosto al finalizar la fermentación alcohólica lo que puede deberse a lo encontrado por Zelle *et al.* (2008) en que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son capaces de sintetizar ácido málico durante la fermentación alcohólica. Luego durante la fermentación maloláctica, el ácido málico se metabolizó casi por completo quedando un contenido muy bajo el que no presentó ninguna tendencia a medida que se aumentaba el contenido de FDA o el grado alcohólico. El ácido láctico tiene una leve tendencia a tener una concentración más alta cuando hay un mayor contenido de FDA, como también se ve que en los tratamientos pares, los que tienen un grado alcohólico más alto, el contenido de ácido láctico es menor a excepción del tratamiento 6.

Análisis Básicos

Los resultados de los análisis básicos realizados a cada uno de los tratamientos se muestran en la Cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados de los análisis básicos realizados a cada uno de los tratamiento al finalizar la fermentación maloláctica.

	Alcohol % v/v	pH	Ac. Total g/L	Ac. Volátil g/L
T1	12,00	3,52 ^a	3,59	0,60
T2	14,60	3,56 ^a	3,92	0,73
T3	12,10	3,63 ^a	3,76	0,57
T4	14,50	3,61 ^a	3,59	0,63
T5	12,10	3,74 ^b	3,43	0,60
T6	14,60	3,79 ^b	4,08	0,62
T7	11,90	3,86 ^c	3,59	0,69
T8	14,50	3,99 ^c	3,92	0,70

Las letras minúsculas indican diferencias significativas en el pH para las diferentes concentraciones de FDA

El grado alcohólico obtenido para los tratamientos se encuentra dentro de los rangos que se querían alcanzar, 12 y 14,5 % v/v.

En cuanto al pH, los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos normales de un vino y se observa un aumento a medida que el contenido de FDA es mayor, y a la vez se puede ver una leve tendencia a encontrar pH mayores cuando el grado alcohólico era mayor a excepción del tratamiento 4. El FDA es una sal que se encuentra entre pH 7 y 8 por lo que claramente está afectando el pH obtenido en los tratamientos, subiendo éste a medida que es mayor su contenido en los tratamientos finales.

En cuanto a la acidez total se observa un efecto del alcohol en los resultados obtenidos siendo mayor la acidez cuando el grado alcohólico era más alto, siendo la excepción el tratamiento 4.

En cuanto a la acidez volátil se encontraron valores menores a 0,8 que se considera como un umbral sensorial y a la vez como indicio de contaminación microbiológica. No se observa ninguna tendencia.

Mediante ANDEVA se buscaron diferencias significativas para los datos obtenidos en pH, acidez total y acidez volátil. Con un nivel de significancia del 5% se aceptó que los errores eran normales y que existe homogeneidad de la varianza, y solo se encontró que el pH presentaba diferencias significativas para los diferentes contenidos de FDA. Mediante el test de tukey se halló que los tratamientos con 20 y 50 g/hL de FDA se diferenciaban de los tratamientos con 120 g/hL y estos de los tratamientos con 200 g/hL; aumentando el pH a medida que mayor era el contenido de FDA. En cuanto al grado alcohólico la leve tendencia encontrada no representa diferencias significativas para el pH.

Al comparar estos resultados con los obtenidos al final de la fermentación alcohólica se observa que tanto el pH, la acidez total y la acidez volátil aumentaron sus valores, producto de la actividad de las bacterias lácticas inoculadas, como por el efecto del FDA. El aumento de pH del vino mejora las condiciones de crecimiento para las células y la ganancia de energía derivada de la formación de aminos biógenos crea una fuerza motriz que moviliza protones para formar ATP (Navascués, 2005).

Análisis Componentes Principales

Para poder encontrar relaciones existentes entre las aminas biógenas estudiadas, los análisis básicos y los ácidos orgánicos (ácido málico y láctico) se realizó un análisis de componentes principales cuyos resultados se encuentran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Resultados del análisis de componentes principales. PC: componente principal

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4
A. Tartárico	0,266	-0,349	0,223	-0,083
A. Málico	0,14	-0,212	0,156	-0,473
A. Láctico	0,276	-0,368	-0,042	-0,168
Histamina	-0,307	-0,246	-0,042	0,104
Agmatina	0,371	-0,002	0,255	0,25
Metilamina	-0,403	-0,107	0,147	-0,11
Etilamina	-0,132	-0,31	0,045	0,368
Tiramina	-0,183	0,298	0,332	-0,23
Putrescina	-0,149	-0,391	0,05	-0,218
Cadaverina	0,046	-0,358	0,125	0,158
Triptamina	-0,051	0,329	0,276	0,171
Total	0,189	-0,042	0,498	0,315
Total s/Agm	-0,407	-0,056	0,248	-0,005
pH	0,387	0,18	-0,072	-0,02
Ac. Total	0,062	0,007	-0,45	-0,123
Ac. Volátil	0,081	0,122	0,334	-0,501
Varianza	4,8997	2,6857	2,0139	1,8079
Proporción	0,306	0,168	0,126	0,113
Proporción Acumulada	0,306	0,474	0,6	0,713

Se tomaron las cuatro primeras componentes que explican el 71,3% de la varianza total. De ellas la primera componente principal explica el 30,6% de la varianza y la segunda explica el 16,8 %. En el Cuadro 7 se marcaron los resultados mayores a 0,3 y menores a -0,3 para las 2 primeras componentes, ya que en las demás componentes ninguna variable fue decisiva. En la primera componente se observa que el pH y agmatina correlacionan positivamente, mientras que histamina, metilamina y el total sin agmatina correlacionan de manera negativa. En la segunda componente las variables más importantes son el ácido tartárico, el ácido láctico, etilamina, cadaverina, putrescina y triptamina, correlacionando, las tres primeras, negativamente con el modelo mientras que triptamina lo hace de manera positiva.

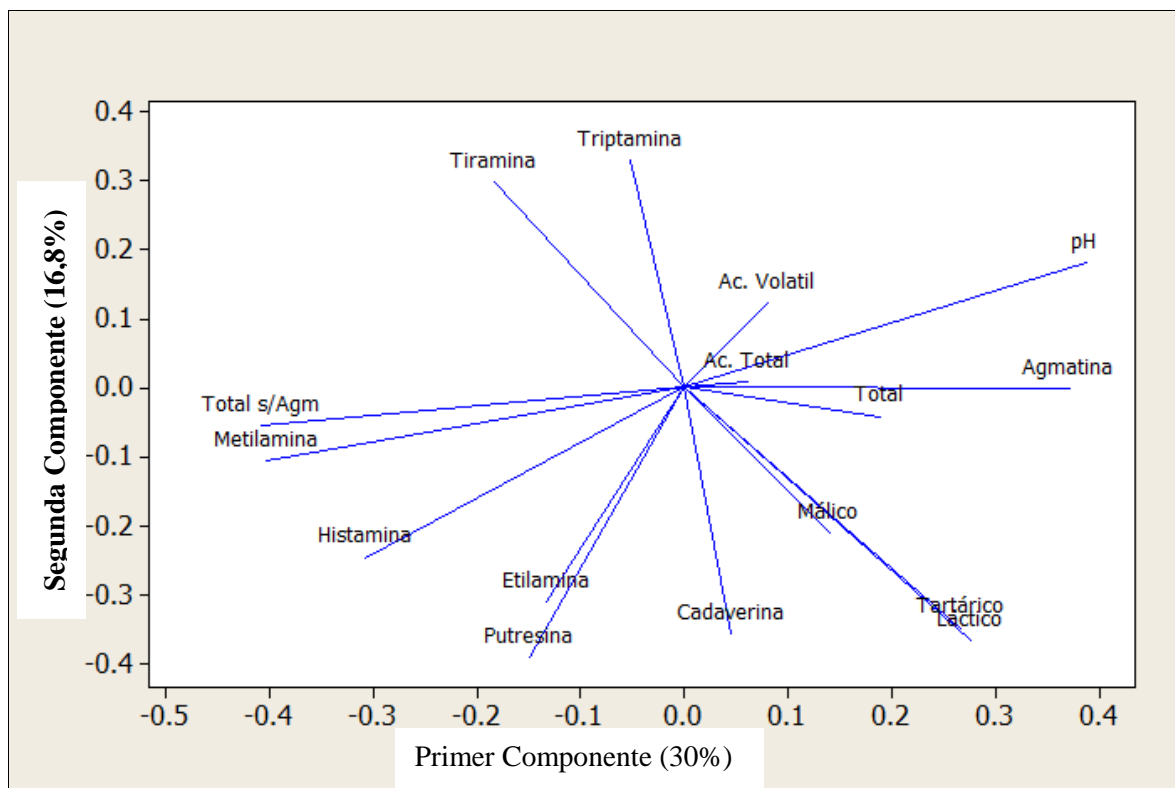


Figura 4. Análisis de componentes principales

Como se observa en la Figura 4 las aminas histamina, metilamina y para el total sin agmatina, el pH se relacionaría de manera negativa, mientras que para agmatina la relación sería positiva. Cabe destacar que hay que tener cuidado al interpretar estos resultados ya que asumir, por ejemplo, que subiendo el pH obtendría una menor concentración de histamina es algo equivocado y que a su vez contrasta con varios autores que mencionan que la relación es directamente proporcional debido a que un aumento del pH mejora las condiciones de crecimiento celular en las bacterias lácticas (Soufleros *et al.*, 2007) en especial *Lactobacillus* y *Pediococcus*, además de favorecer una mayor diversidad de especies (Landete, 2005), también hay autores que señalan que la actividad de la enzima que produce histamina se ve aumentada a mayor pH (Landete, 2005), entonces hay que entender que la disminución de histamina y metilamina se ve influenciada por el tratamiento, así como la producción de agmatina se ve favorecida. A modo general, en el pH se puede observar que existe un aumento desde el final de la fermentación alcohólica al final de la fermentación maloláctica, y a su vez un aumento en el contenido de aminas biógenas, lo que en términos generales se puede traducir, en que aparte del consecuente aumento del pH producto del catabolismo del ácido málico en ácido láctico, ocurre lo que señalan algunos autores en que la producción de AB se ve realizada cuando las condiciones de crecimiento son menos favorables debido a la falta de sustratos fermentables y a la presencia de etanol a pH bajo (König *et al.*, 2009). Soufleros *et al.* (2007) y Navascues (2005) mencionan que este aumento de pH sería ventajoso para la adaptación de las

bacterias al medio, mejorando sus condiciones de crecimiento y además implica una ganancia energética derivada de la producción de AB ya que crea una fuerza motora que moviliza protones para formar ATP. Además de lo anterior, hay que tener en cuenta que la aplicación de FDA una vez terminada la fermentación alcohólica para realizar el tratamiento también se encuentra afectando el pH.

En cuanto al ácido málico, en este estudio, no se encontró relación con alguna de las aminos, ni con el total. Mientras que con el ácido láctico se encontró una relación con triptamina, de forma inversa, a menor contenido de ácido láctico más contenido de triptamina. Respecto a la relación que puede existir entre el ácido málico o el ácido láctico, con la producción de aminos biógenas, existen varias posiciones, sin embargo, cabe destacar que la descarboxilación de aminoácidos por bacterias lácticas tiene como objetivo la obtención de energía y la regulación del pH interno (Molenaar *et al.*, 1993). Esto se explica porque cuando las bacterias lácticas no disponen de medios de obtener energía es cuando descarboxilan los aminoácidos es así que Soufleros *et al.* (1998) encontraron que el incremento de histamina estaba relacionado con una disminución de ácido málico y ácido cítrico, asociándolo a medios pobres nutricionalmente. También están aquellos que encontraron que el contenido de ácido láctico no estaría influenciando la producción de histamina (Landete, 2005), dentro de los que se encuentra este estudio, mientras que otros hallaron que tendría una influencia negativa sobre su producción (Rollan *et al.*, 1995). Farías *et al.* (1993) observaron que el ácido málico y el ácido cítrico aumentarían la actividad de la enzima descarboxilasa, mientras que Landete (2005) no encontró ningún efecto.

CONCLUSIÓN

El contenido de fosfato diamónico influncia el contenido de aminos biógenas en el vino inoculado con *Lactobacillus hilgardii*, disminuyendo sus concentraciones, a excepción de agmatina.

El grado alcohólico afecta la producción de etilamina, disminuyendo su concentración a mayor grado alcohólico.

El contenido de ácidos orgánicos no se relaciona de forma importante con el de aminos biógenas.

De los análisis básicos, el pH es el único que presenta relación con el contenido de aminos biógenas, principalmente con agmatina, aumentando la concentración de esta amina a medida que el pH aumenta.

BIBLIOGRAFÍA

- Arena M. E. y M.C. Manca de Nadra. 2001 Biogenic Amine production by *Lactobacillus*. *Journal Applied Microbiology*. 90:158-162
- Bauza, T. y P. Teissedre. 1995. Les amines biogènes du vin. Métabolisme et toxicité. *Bulletin l' OIV* 68 : 42-67.
- Bell S. y P. Henschke. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11: 242–295
- Bordeau, E. y J. Scarpa. 1998. Análisis químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 253 p.
- Brink, B.C., H.M. Damink, L.J. Joosten y J. H. J. Veld. 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology* 11: 73–84.
- Broquedis, M.; Dumery, B. et Boucard, J. 1989. Ise en evidence de polyamines (putrescine, cadaverine, nor-spermidine et spermine) dans les feuilles et les grappes de *Vitis vinifera* L. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 23: 1-6.
- Carrascosa, A., R. Muñoz, y R. Gonzáles. 2005. *Microbiología del Vino*. 1ª Edición. AMV Ediciones, Madrid, España, 398p.
- Caruso, M., C. Fiore, M. Contursi, G. Salzano, A. Paparella y P. Romano. 2002 Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 159-163.
- Chu, C. y L. Bejdanes. 1981. Effects of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin in vitro. *Journal of Food Science* 47: 79
- Cilliers, J. D. y C. J. Van Wyk. 1985. Histamine and tyramine content in South African wines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 6: 35–40.
- Del Prete, V., A. Costantini, F. Cecchini, M. Morassut y E. Garcia-Moruno. 2008. Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*.
- Enes-Dapkevicius, M.L.N., M.J.R. Nout y W. Wymenga. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 57: 107-114.

Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 783p.

Fleet, G. 1993. *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood academic publishers. Sydney, Australia. 510 p.

Gardini, F., A. Zaccarelli, N. Belletti, F. Faustini, A. Cavazza, M. Martuscelli, D. Mastrocola y G. Suzzi. 2005. Factors influencing biogenic amine production by strain of *Oenococcus oeni* in model system. *Food Control* 16: 609-616.

Gálvez, C. 2008. *Aminas biógenas en vinos chilenos : incidencia según el origen y microorganismos involucrados*. Tesis Magister en Enología y Viticultura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 92p

Gerbaux, V. y C. Monamy. 2000. Biogenic amines in Burgundy wines. Contents and origin in wines. *Rev. Fr. Oenol.* 183, 25-28.

Gloria, M., B. Watson, L. Simon-Sarkadi y M. Daeschel. 1998. A survey of Biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 49: 279–282.

Gonzales, A. y C. Ancín. 2006. Amines concentrations in wine store in bottle at different temperatures. *Food Chemistry* 99: 680–685.

Goñi, D. y C. Azpilicueta. 2001. Influence of yeast strain on biogenic amines content in wines: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 185-190.

Hernández-Orte P., A. Peña-Gallego, M. J. Ibarz, J. Cacho y V. Ferreira. 2006. Determination of the biogenic amines in musts and wines before and after malolactic fermentation using 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate as the derivatizing agent. *Journal of Chromatography A* 1129: 160–164.

Hidalgo J. 2003. *Tratado de Enología*. Tomo I. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 752p.

Hyötyläinen, T., N. Savola, P. Lehtonen, y M-L. Riekkola. 2001. Determination of biogenic amines in wine by multidimensional liquid chromatography with online derivatisation. *Analyst* 126: 2124-2127.

Jiménez, N y Ancín, C. 2007. Acumulación de aminas biógenas durante el envejecimiento de vinos con diferente turbidez. *Revista Enólogos* 47: 54-59.

Jiménez, N.; D. Torrea and C. Ancín. 2003. Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 51: 5732-5737.

König, Helmut; Uden, Gottfried y Fröhlich, Jürgen - 2009 Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. 522 páginas

Landete, J. M. 2005. Tesis doctoral: Estudio y Caracterización molecular de la producción de Aminas Biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Universitat de Valencia 178 p

Landete J.M., S. Ferrer y I. Pardo 2005. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology*. 10: 39-44

Landete J.M., M.E. Arena, I. Pardo, M.C. Manca de Nadra y S. Ferrer. 2008. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiology*. 25: 882– 887

Lehtonen, P. 1996. Determination of amines and amino acid in wine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 127-133.

Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199: 9-13.

Leitão M. C., A.P. Marques and M.V. San Romão. 2003. A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines. *Food Control* 16: 199–204

Mafra, I., P. Herbert, L. Santos, P. Barros, y A. Alves. 1999. Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *American Journal of Enology and Viticulture* 50: 128–132.

Marques, A., M. Leitão y M. San Romão. 2008. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry* 107: 853-860.

Molenaar, D., J.S. Bosscher, B. ten Brink, J.M. Driessen y W.N. Konings. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal Bacteriology* 175: 2864-2870.

Navascués, E. 2005. Aminas biógenas en el vino. Estrategias para evitar su generación. *Revista Viticultura/Enología Profesional* 97 Marzo/Abril: 29-37.

Moreno-Arribas, M. V. y C. Polo. 2008. *Wine Chemistry and Biochemistry* - 736 páginas

Önal, A. 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 103: 1475-1486.

- Ough, C.S., C. E. Daudt, y E. A. Crowell. 1981. Identification of new volatile amines in grapes and wines. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 29: 938-941.
- Pérez, J. 2006. Resultados de aminas biógenas en vinos de variedades canarias. In: III Jornadas Enológicas de Canarias. Lanzarote, España. Disponible en: <http://www.gobcan.es/agricultura/icca/jornadas/enologicas/ponencias/juanpedroperez.pdf>.
- Rivas-Gonzalo, J. y A. Mariné. 1983. Migrañas de orden alimentario: Aspectos relacionados con la tiramina. *Circular Farmacéutica* 278: 1-6.
- Rollan, G.C., E. Coton and A. Lonvaud-Funel. 1995. Histidine decarboxylase activity of 388 *Leuconostoc oenos* 9204. *Food Microbiology* 12: 455-461.
- Salinas, P. 2009. Perfil de aminas biógenas en vinos de los cvs. merlot y carmenere provenientes de cinco regiones vitivinícolas. Tesis Magister en Enología y Viticultura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 49p.
- Sandler, M. y G. Reynolds. 1976. Does phenylethylamine cause schizophrenia. *The Lancet* 1: 70-71.
- Soufleros, E., B. Marie-Lyse, y A. Bertrand, 1998. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 266-277.
- Soufleros E.H., E. Bouloumpasi, A. Zotou y Z. Loukou. 2007. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry* 101 (2007) 704–716
- Silla-Santos, M. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal Food Microbiology* 29: 213–231.
- Torrea, D., y C. Ancín. 2002. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4895–4899.
- Vidal-Carou, M.C., A. Ambattle-Espunyes, M.C. Ulla-Ulla and A. Mariné-Font. 1990. Histamine and tyramine in Spanish wines: their formation during the winemaking, *American Journal of Enology and Viticulture* 41: 160-167.
- Voigt, M.N. y R.R. Eitenmiller. 1978. Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono and diamine oxidases in amine build-up in cheese. *Journal of Food Protection* 41: 182-186.

Woller, R. 2005. Aminas biógenas: presencia en el vino y efectos en el organismo. ACE, Revista de Enología 54: 9-13.

Zelle, R. M.; E. de Hulster, W.A. van Winden, P. de Waar, C. Dijkema, A.A. Winkler, J.M. Geertman, J.P. van Dijken, J.T. Pronk y A.J. Maris. 2008. Malic acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of piruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(9): 2766- 2777.

Zoecklein B. W., K. Fugelsang, B. Gump y F. Nury. 2001. Análisis y Producción de vino. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 613p.

ANEXO I

	Histamina	Agmatina	Metilamina	Etilamina	Tiramina	Putrescina	Cadaverina	Triptamina	Total
T1R1	10,45	21,63	9,88	1,10	4,53	0,52	0,00	2,43	50,55
T1R2	17,19	24,42	11,94	2,82	1,43	1,31	0,40	0,00	59,52
T1R3	16,57	21,51	14,30	0,80	6,89	0,00	0,00	2,40	62,47
T2R1	11,34	14,61	12,00	0,09	6,20	1,61	0,00	0,00	45,85
T2R2	16,16	23,30	11,66	0,00	0,71	0,87	0,07	0,00	52,77
T2R3	12,16	22,09	9,32	0,00	1,70	0,00	0,00	4,24	49,51
T3R1	12,32	19,36	9,68	2,21	4,53	1,88	0,00	1,07	51,05
T3R2	12,44	16,67	9,16	0,80	0,39	0,74	0,24	0,00	40,43
T3R3	15,06	14,08	7,45	0,57	2,87	0,00	0,00	2,79	42,80
T4R1	12,43	14,23	10,61	0,22	6,34	0,60	0,00	0,00	44,42
T4R2	13,08	19,62	10,19	0,00	3,44	0,79	0,67	0,00	47,79
T4R3	13,36	17,31	11,94	0,00	7,91	0,00	0,36	3,94	54,82
T5R1	11,91	20,28	9,47	0,67	2,62	1,64	0,00	0,00	46,60
T5R2	11,28	36,84	6,73	1,68	0,17	0,08	0,57	0,00	57,35
T5R3	11,56	43,81	6,91	0,00	2,57	0,00	0,00	0,00	64,85
T6R1	11,01	22,77	7,67	0,19	3,46	0,00	0,00	0,00	45,09
T6R2	12,42	18,71	6,25	0,00	3,09	0,00	0,00	0,00	40,47
T6R3	9,73	36,28	6,87	0,01	4,64	0,00	0,00	0,00	57,54
T7R1	6,27	40,17	6,44	1,32	5,27	0,00	0,00	3,63	63,10
T7R2	11,23	50,39	5,62	0,42	2,14	1,19	0,83	0,00	71,81
T7R3	11,57	41,94	6,13	0,00	1,57	0,00	0,00	4,08	65,29
T8R1	8,64	39,83	6,11	0,00	4,69	0,00	0,00	1,41	60,67
T8R2	8,03	34,96	5,85	0,00	2,79	0,00	0,00	1,11	52,75
T8R3	12,06	34,42	6,66	0,00	2,38	0,00	0,00	0,00	55,51
Promedio	12,01	27,05	8,70	0,54	3,43	0,47	0,13	1,13	53,46
Menor	6,27	14,08	5,62	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	40,43
Mayor	17,19	50,39	14,30	2,82	7,91	1,88	0,83	4,24	71,81
Dev. Est	2,54	10,88	2,47	0,78	2,08	0,63	0,25	1,57	8,54

Resultados de análisis de aminas biógenas de todos los tratamientos y repeticiones realizados en el presente estudio. Prom., promedio. Menor, corresponde a la menor concentración encontrada para cada amina biógena. Mayor, corresponde a la mayor concentración encontrada para cada amina biógena. D. est., es la desviación estándar de cada amina biógena.