



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN QUESO
AZUL PARA SU EMPLEO EN EL ÁMBITO DE LA
BIOECONOMÍA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Camañes Martí, Jaime José

Tutor/a: Atarés Huerta, Lorena María

Cotutor/a: Torres Giner, Sergio

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL



DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN QUESO AZUL PARA SU EMPLEO EN EL ÁMBITO DE LA BIOECONOMÍA

Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Curso Académico 2022-2023

AUTOR: Jaime Camañes Martí

TUTORA: Lorena Atarés Huerta

COTUTOR: Sergio Torres Giner

Valencia, 14 de julio de 2023

DETERMINACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN QUESO AZUL PARA SU EMPLEO EN EL ÁMBITO DE LA BIOECONOMÍA

RESUMEN:

Las actuales estrategias europeas que afectan al ámbito agroalimentario pretenden potenciar la investigación e innovación en el ámbito de la Bioeconomía mediante el aprovechamiento de residuos. El presente proyecto tiene por objetivo determinar las condiciones más favorables para el desarrollo de las diaminas biógenas putrescina y cadaverina en quesos azules, almacenados a diferentes tiempos y temperaturas, para su posterior valorización en biopolímeros para aplicaciones de envasado. Estos compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular se originan principalmente por la descarboxilación de los aminoácidos ornitina y lisina, respectivamente, presentes en alimentos madurados y fermentados debido a la actividad descarboxilasa de ciertos microorganismos. En general, se trata de sustancias indeseadas en los alimentos por su riesgo toxicológico y que pueden encontrarse presentes en los desperdicios; sin embargo, a la vez, representan una fuente potencial de compuestos naturales de interés para el desarrollo de biopoliamidas. Para alcanzar este objetivo, inicialmente se llevará a cabo la extracción de la parte proteica del queso en medio ácido, con la eliminación de la grasa por medio de centrifugación, y la posterior separación de las proteínas de mayor tamaño por procesos de filtración y precipitación. Finalmente, la última parte del proceso consistirá en la detección y cuantificación de las aminas biógenas en el medio resultante por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En futuros estudios, se pretende sintetizar biopoliamidas a partir de las diaminas extraídas de estos productos lácteos que, posteriormente, puedan emplearse para desarrollar envases alimentarios de altas prestaciones y totalmente reciclables.

PALABRAS CLAVE: aminas biógenas, queso azul, cromatografía, control de calidad, seguridad alimentaria, Bioeconomía.

AUTOR: Jaime Camañes Martí

TUTORA: Lorena Atarés Huerta

COTUTOR: Sergio Torres Giner

Valencia, 14 de julio de 2023

DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN BLUE CHEESE FOR USE IN THE BIOECONOMY FIELD

ABSTRACT:

The current European strategies that affect the agri-food field aim to promote research and innovation in the field of Bioeconomy through the use of waste. The objective of this study is to determine the content of the biogenic diamine putrescine and cadaverine in blue cheese stored at different times and conditions. These low-molecular weight nitrogenous organic compounds originate mainly from the decarboxylation of the amino acid ornithine and lysine, respectively, which are present in ripened and fermented foods due to the decarboxylase activity of certain microorganisms. In general terms, these are unwanted substances in food due to their toxicological risk, however, at the same time, they represent a potential source of natural compounds of interest for the development of high added value materials. To achieve this objective, the protein part of the cheese will initially be extracted in an acidic medium, the fat will be removed by means of centrifugation, and the larger proteins separated by filtration and precipitation processes. Finally, the last part of the process will focus on the detection and quantification of the biogenic amines in the resulting medium by means of high-pressure liquid chromatography (HPLC). Future studies will aim to synthesize biopolyamides from the diamines extracted from these dairy products, which will later be used to develop high-performance and fully recyclable food packaging.

KEYWORDS: biogenic amines, blue cheese, chromatography, quality control, food safety, Bioeconomy.

AUTHOR: Jaime Camañes Martí

TUTOR: Lorena Atarés Huerta

COTUTOR: Sergio Torres Giner

Valencia, July 14th 2023

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme apoyado siempre en todo lo que hago y por preguntarme cada día desde que empecé en el laboratorio qué tal me iba el TFG.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. La estrategia de la Bioeconomía en España y Europa	1
1.2. La industria láctea	1
1.2.1. Datos de la industria	1
1.2.2. Valorización de los desperdicios y subproductos del sector lácteo	2
1.2.3. Aminas biógenas: toxicidad y riesgos para la salud en alimentos	2
1.2.4. Fuentes y vías de formación de aminas biógenas en alimentos	4
1.2.5. Métodos de análisis de aminas biógenas en alimentos	5
1.3. Biopolímeros y biopoliamidas como alternativa sostenible	6
1.3.1. Biopolímeros	6
1.3.2. Biopoliamidas	6
1.3.3. Uso de las aminas biógenas como fuente de biopoliamidas	7
2. Objetivos	7
3. Materiales y métodos	8
3.1. Reactivos y patrones	8
3.2. Preparación de las muestras	8
3.3. Reacción de derivatización	9
3.4. Descripción del equipo y condiciones de HPLC	9
4. Resultados y discusión de los resultados	10
4.1. Validación del método	10
4.2. Determinación de diaminas biógenas en quesos	12
4.3. Implicaciones con las regulaciones de seguridad alimentaria	22
5. Conclusiones	23
6. Referencias bibliográficas	24

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- ✓ Fig. 1. Estructura de la cadaverina y la putrescina.
- ✓ Tabla 1. Clasificación de las aminas biógenas según el número de grupos amina que tienen.
- ✓ Fig. 2. Ruta de biosíntesis de las aminas biógenas.
- ✓ Fig. 3. Queso Cabrales.
- ✓ Fig. 4. Queso Roquefort.
- ✓ Fig. 5. 2695 *Separations Module*.
- ✓ Fig. 6. 2996 *PDA Detector*.
- ✓ Tabla 2. Gradiente binario de elución para la determinación HPLC de aminas biógenas.
- ✓ Fig. 7. Cromatograma del patrón de cadaverina a concentración 5 mM.
- ✓ Fig. 8. Cromatograma del patrón de putrescina a concentración 5 mM.
- ✓ Fig. 9. Recta de calibrado de cadaverina.
- ✓ Fig. 10. Recta de calibrado de putrescina.
- ✓ Fig. 11. Cromatograma de muestra a tiempo 0 de queso Cabrales.
- ✓ Fig. 12. Cromatograma de muestra a tiempo 0 de queso Roquefort.
- ✓ Fig. 13. Cromatogramas de queso Cabrales a los 5 días.
- ✓ Fig. 14. Cromatogramas de queso Cabrales a los 10 días.
- ✓ Fig. 15. Cromatogramas de queso Cabrales a los 21 días.
- ✓ Fig. 16. Cromatogramas de queso Roquefort a los 5 días.
- ✓ Fig. 17. Cromatogramas de queso Roquefort a los 10 días.
- ✓ Fig. 18. Cromatogramas de queso Roquefort a los 21 días.
- ✓ Fig. 19. Evolución de la generación de putrescina y cadaverina en queso Cabrales.
- ✓ Fig. 20. Evolución de la generación de putrescina y cadaverina en queso Roquefort.
- ✓ Fig. 21. Efecto de la temperatura de almacenamiento en queso Roquefort.
- ✓ Fig. 22. Efecto de la temperatura de almacenamiento en queso Cabrales.

1. Introducción

1.1. La estrategia de Bioeconomía en España y Europa

En el año 2012 la Comisión Europea aprobó la Estrategia europea de Bioeconomía dirigida a orientar la economía europea hacia un uso mayor y más sostenible de los recursos renovables. La estrategia identificaba 5 objetivos a los que debía contribuir: garantizar la seguridad alimentaria, gestionar los recursos naturales de manera sostenible, reducir la dependencia de los recursos no renovables, mitigar y adaptarse al cambio climático, y crear empleos y mantener la competitividad de la UE (MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, MAPA, ESPAÑA).

En enero de 2016, España lanzó su propia estrategia en Bioeconomía, reconociendo la importancia de ésta como un motor clave para el crecimiento económico y la sostenibilidad. Dicha estrategia se basa en el fomento de la investigación, el desarrollo y la innovación con el objetivo de aprovechar al máximo el potencial de los recursos naturales y renovables del país, y se centra en tres áreas principales: la producción sostenible de alimentos y biomateriales, la bioenergía y la protección, y la restauración del medio ambiente. La participación de los diferentes sectores económicos dentro de la Bioeconomía es bastante significativa en España, pues representa aproximadamente el 6,5% del PIB, dando empleo a alrededor del 9% de la población activa y para la que cuenta con más de 900000 explotaciones y más de 30000 empresas (Lainez *et al.*, 2018).

En el marco europeo, la Bioeconomía representa un sector económico significativo que genera cerca de 18 millones de empleos en diversas industrias consolidadas, que van desde la agricultura hasta la silvicultura. Si bien la Bioeconomía tiene el potencial de sustituir los combustibles fósiles, su alcance no se limita solo a la energía; también se están explorando nuevos sectores emergentes, como los biomateriales y la química verde. A través de la Bioeconomía, Europa busca encontrar nuevos usos comerciales y competitivos para sus recursos naturales, desarrollar procesos industriales innovadores y eficientes en el uso de los recursos, y liderar la creación de mercados completamente nuevos y sostenibles desde el punto de vista ambiental. Sin embargo, para lograr esto será necesario aumentar la conciencia política sobre la necesidad de promover la inversión y la innovación radical en la Bioeconomía a nivel mundial (Bell *et al.*, 2018).

En línea con los principios y políticas europeas actuales sobre la Bioeconomía, se ha visto que la bioconversión de desechos lácteos en productos de valor añadido mediante bioprocesos microbianos también promueve la producción sostenible y la reducción de desechos. El enfoque principal es la generación de biogás, biohidrógeno y otros biocombustibles, pero también se están investigando otras aplicaciones como la producción de bioplásticos, biosurfactantes y enzimas (Usmani *et al.*, 2022).

1.2. La industria láctea

1.2.1. Datos de la industria

De los 544 millones de toneladas de leche de vaca que se produjeron en 2022 en todo el mundo, la Unión Europea fue la mayor productora (STATISTA, 2023). En conjunto, los 27 países que conforman la UE produjeron 144 millones de toneladas, de los cuales España produjo 7,3 millones (5% del total comunitario). En 2022, España también produjo 503 mil toneladas de leche de oveja y 437 mil de leche de

cabra, convirtiéndose en el segundo país de la UE que más leche de oveja y cabra produce (15% y 20% respectivamente). Así se obtuvieron más de 8 millones de toneladas de productos lácteos, incluyendo leche líquida, yogur, queso, nata, mantequilla, entre otros (FEDERACIÓN NACIONAL DE INDUSTRIAS LÁCTEAS, FENIL, 2023).

El sector lácteo es de gran relevancia en el marco del panorama agroalimentario español, pues las industrias lácteas suponen más de 9500 millones de euros al año (2% de la producción industrial del país) y emplean a más de 30000 personas (FENIL, 2023).

1.2.2. Valorización de los desperdicios y subproductos del sector lácteo

Los desperdicios y subproductos generados por la industria láctea pueden ser aprovechados como materias primas valiosas para la producción de diversos productos, al mismo tiempo que se reduce la huella de carbono. La incorporación de estos residuos en la biorrefinería podrá contribuir a la recuperación y separación de bioproductos, al crecimiento de microorganismos y al avance de la bioeconomía (Sar *et al.*, 2022).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), alrededor de un tercio de los alimentos destinados al consumo humano se pierden o se desperdician y, en el caso de la producción de leche, se estima que se desperdicia aproximadamente el 18%. En este contexto, la leche caducada, el suero de queso y otros subproductos generados por la industria láctea, que poseen un valioso contenido nutricional, han sido reconocidos como materiales de bajo coste y evaluados como sustratos alternativos en procesos de producción microbiana, como la bioenergía, las enzimas, los ácidos orgánicos, los biopolímeros y la biomasa, entre otros (Sar *et al.*, 2022). En este sentido, actualmente una de las principales líneas de trabajo dentro del área de la tecnología de alimentos es el desarrollo de envases alimentarios de calidad y seguros por medio de la valorización de residuos de acuerdo con los principios de la Bioeconomía Circular. Este último concepto se basa en la combinación de la Bioeconomía con la Economía Circular, mediante la cual residuos procedentes de materia orgánica, natural y renovable, da lugar a materiales que, tras uso, puedan ser reciclados o transformados en productos de valor.

1.2.3. Aminas biógenas: toxicidad y riesgos para la salud en alimentos

Consecuencia de la generación de desperdicios y subproductos por la industria láctea, se pueden formar aminas biógenas. Se trata de compuestos de bajo peso molecular principalmente producidos por la descarboxilación microbiana de ciertos aminoácidos, aunque también se pueden formar como resultado de la aminación reductora y la transaminación de aldehídos y cetonas (Wójcik *et al.*, 2020).

Según su estructura, las aminas se clasifican en alifáticas (putrescina y cadaverina), aromáticas (tiramina) y heterocíclicas (histamina). Según el número de grupos amina presentes (Tabla 1), pueden ser monoaminas (feniletilamina y tiramina), diaminas (putrescina y cadaverina) o poliaminas (espermina y espermidina). Y también se pueden dividir en psicoactivas (histamina, putrescina y cadaverina) o vasoactivas (tiramina y triptamina) (Ahmad *et al.*, 2019).



Fig. 1. Estructura de la cadaverina (izquierda) y la putrescina (derecha).

Tabla 1. Clasificación de las aminas biógenas según el número de grupos amina que tienen. Se indica fórmula y peso molecular, estructura química y aminoácido precursor de cada amina biógena (Wójcik *et al.*, 2020).

Name	Molecular formula	Mol mass (g/mol)	Classification	Chemical structure	Precursor amino acid
Methylamine	CH ₅ N	31.06	Monoamine	aliphatic	Glycine
Ethylamine	C ₂ H ₇ N	45.08	Monoamine	aliphatic	Alanine
Phenylethylamine	C ₈ H ₁₁ N	121.18	Monoamine	aromatic	Phenylalanine
Tyramine	C ₈ H ₁₁ NO	137.18	Monoamine	aromatic	Tyrosine
Octopamine	C ₈ H ₁₁ NO ₂	153.18	Monoamine	aromatic	Tyrosine
Dopamine	C ₈ H ₁₁ NO ₂	153.18	Monoamine	aromatic	Tyrosine
Norepinephrine	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.18	Monoamine	aromatic	Tyrosine
Histamine	C ₅ H ₉ N ₃	111.15	Monoamine	heterocyclic	Histidine
Tryptamine	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	160.22	Monoamine	heterocyclic	Tryptophane
Serotonin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176.22	Monoamine	heterocyclic	Hydroxytryptophane
Putrescine	C ₄ H ₁₂ N ₂	88.15	Diamine	aliphatic	Ornithine
Cadaverine	C ₅ H ₁₄ N ₂	102.18	Diamine	aliphatic	Lysine
Agmatine	C ₅ H ₁₄ N ₄	130.19	Polyamine	aliphatic	Arginine
Spermidine	C ₇ H ₁₉ N ₃	145.25	Polyamine	aliphatic	Arginine/Ornithine
Spermine	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	202.34	Polyamine	aliphatic	Arginine/Ornithine

De entre todas ellas, la histamina, la tiramina, la putrescina y la cadaverina son las aminas biógenas más comunes en alimentos fermentados, como es el caso del queso. Factores ambientales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de sustrato, y la elevada proteólisis y la acidez de los quesos favorece la descarboxilación y, por tanto, la formación de aminas biógenas en estos alimentos (Fernández *et al.*, 2007). Se ha podido ver que la concentración de estas aminas es mayor en quesos de leche cruda y larga maduración, como los quesos azules Cabrales y Roquefort, objeto de este estudio.

Las aminas biógenas pueden tener efectos adversos para la salud debido a dos razones principales: 1) cuando su concentración en los alimentos es excesivamente alta, y 2) cuando la capacidad de desintoxicación del organismo se ve inhibida por enfermedades gastrointestinales, predisposición genética, consumo de productos derivados del acetaldehído presentes en el vino, o tratamientos médicos con inhibidores de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) o diamino oxidasa (DAO) (Jaguey-Hernández *et al.*, 2021).

De entre todas las aminas biógenas, la histamina y la tiramina son las que más efectos tóxicos causan, incluyendo síntomas como náuseas, dolor de cabeza, palpitaciones, dificultades respiratorias, hipertensión e hipotensión, taquicardia, migraña... Es por ello por lo que tanto la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) establecen valores máximos de concentración de estas aminas en los alimentos. Por otro lado, aunque la putrescina y la cadaverina son menos tóxicas y causan menos síntomas, también son muy importantes por dos razones: potencian los efectos tóxicos de otras aminas, especialmente la histamina, y pueden reaccionar con nitritos dando lugar a nitrosaminas carcinógenas (Khalid *et al.*, 2021; Wójcik *et al.*, 2020).

1.2.4. Fuentes y vías de formación de aminas biógenas en alimentos

Las aminas biógenas se forman principalmente a través de la acción de enzimas descarboxilasas específicas del sustrato, que catalizan la descarboxilación bacteriana de los aminoácidos correspondientes (Figura 2). La producción de estas aminas está asociada con diferentes grupos de microorganismos, como las enterobacterias que suelen producir putrescina y cadaverina, y los enterococos que se asocian a menudo con la producción de tiramina. Sin embargo, la capacidad de producir aminas biógenas es una característica específica de la cepa dentro de los grupos microbianos, lo que sugiere que la transferencia horizontal de genes puede explicar su distribución entre diferentes cepas. Después de la descarboxilación de los aminoácidos, el transporte de sustratos y la excreción de los productos descarboxilados son procesos acoplados mediados por un antiportador de la membrana interna (EFSA, 2011).

La cadaverina se puede formar a partir de lisina por la actividad de la lisina descarboxilasa, mientras que la putrescina se puede formar a partir de ornitina por la ornitina descarboxilasa. Alternativamente, la arginina se puede convertir en agmatina mediante la arginina descarboxilasa y la agmatina se puede convertir en putrescina mediante el sistema de agmatina deiminasa, que está formado por tres enzimas: agmatina deiminasa, putrescina carbamoiltransferasa y carbamato quinasa. Las bacterias Gram negativas, como las de las familias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Shewanellaceae*, están comúnmente asociadas con la producción de putrescina y cadaverina en los alimentos, mientras que las bacterias del ácido láctico, como los lactobacilos y los estafilococos, también pueden contribuir a la producción de estas aminas. En particular, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus plantarum* se han descrito como productores de putrescina durante la fermentación del vino (EFSA, 2011).

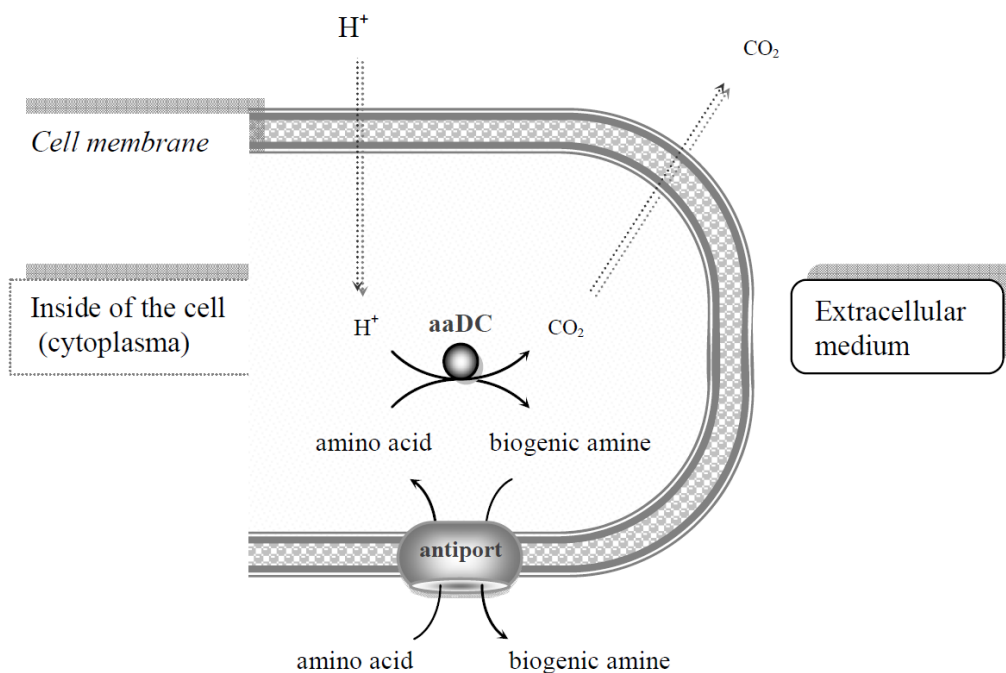


Fig. 2. Ruta de biosíntesis de las aminas biógenas (EFSA, 2011).

Aparte de la ruta de biosíntesis de las aminas biógenas, el crecimiento y acumulación de éstas en los alimentos están influenciados por diversos factores. Las condiciones que favorecen su crecimiento incluyen temperatura óptima, pH adecuado, concentración de sal y tiempo de almacenamiento, pues promueven la acumulación de aminas biógenas. Por ejemplo, un aumento de la temperatura puede acelerar el crecimiento de microorganismos descarboxilantes y, por lo tanto, intensificar la acumulación de aminas como la tiramina. Sin embargo, la concentración de sal puede inhibir el crecimiento de microorganismos descarboxilantes y, por ende, reducir la acumulación de aminas. El pH del medio también influye en la producción de aminas biógenas, ya que un ambiente ácido puede estimular la actividad de enzimas descarboxilasas en bacterias, lo que aumenta la formación de aminas. Por otro lado, ciertos aditivos y conservantes alimentarios, como el sorbato de sodio, pueden retrasar la formación de aminas biógenas, y otros factores como la presencia de oxígeno, el tipo de envase y los métodos de conservación, como la irradiación o la refrigeración, pueden inhibir su acumulación (Ahmad *et al.*, 2019).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que todos estos parámetros dependen del microorganismo que se trate. Por ejemplo, la temperatura óptima para la formación de aminas biógenas por bacterias mesófilas está entre 20 y 37 °C, mientras que la producción disminuye por debajo de 5 °C o por encima de 40 °C; pero *Morganella morganii* produce histamina en marisco a temperaturas de 7-10 °C (EFSA, 2011). Otro ejemplo es *Penicillium roqueforti*, que exhibe una notable adaptación a condiciones de baja disponibilidad de oxígeno en comparación con otras especies de *Penicillium*. Además, es considerado un hongo psicrófilo, lo que significa que puede crecer activamente incluso a temperaturas tan bajas como 4 °C. Se ha observado que el crecimiento de este hongo se ve favorecido por concentraciones bajas de sal, siendo una concentración del 1% de sal (NaCl) la que ejerce el mayor estímulo en su desarrollo (Abbas y Dobson, 2011). Este hongo es inoculado en la elaboración de diferentes quesos, como el Cabrales y el Roquefort, y es el responsable de proporcionar las características distintivas de sabor, aroma y textura a estos quesos.

1.2.5. Métodos de análisis de aminas biógenas en alimentos

La técnica más comúnmente utilizada para la detección y cuantificación de aminas biógenas en alimentos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplada a pasos de derivatización y/o extracción para mejorar la sensibilidad y selectividad de la detección. La columna que más se utiliza es la columna C18, y se emplean gran variedad de detectores como la espectrometría de masas (MS) o MS/MS, el detector de fluorescencia (FLD), el detector UV-visible, detectores de diodos (DAD o PDA), entre otros (Ahmad *et al.*, 2019).

Otros métodos cromatográficos utilizados incluyen la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CE). En la mayoría de los casos, especialmente en HPLC o CE, las muestras son derivatizadas (Jaguey-Hernández *et al.*, 2021). Los agentes de derivatización se pueden emplear antes o después de la columna; algunos ejemplos de estos reactivos incluyen dansilo y cloruro de dansilo, etoximetilmalonato de dietilo (DEEMM), cloruro de benzoílo, fluoresceína, cloroformiato de 9 fluorenilmetilo, o-ftalaldehído (OPA), naftaleno-2,3-dicarboxaldehído, N-acetilcitoína y 2-mercaptoetanol (EFSA, 2011).

1.3. Biopolímeros y biopoliamidas como alternativa sostenible

1.3.1. Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas naturales producidas por organismos vivos, compuestas por monómeros que se unen mediante enlaces químicos para formar cadenas largas. Pueden ser de origen natural, como el almidón, la celulosa, el colágeno, la quitina, el alginato, el caucho natural, los exopolisacáridos (EPS) y los polihidroxialcanoatos (PHA), que se obtienen a partir de fuentes renovables como plantas, animales y microorganismos. También pueden ser de origen natural pero obtenidos de forma sintética, como el ácido poliláctico (PLA), que se obtienen mediante la síntesis química de materias primas renovables. Estos biopolímeros son valorados por su renovabilidad, biodegradabilidad y menor impacto ambiental en comparación con los polímeros sintéticos derivados del petróleo.

El PLA es ampliamente utilizado en diversas industrias como embalaje, agricultura, cuidado personal, cosmética, biomedicina e ingeniería de tejidos debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Díez-Pascual, 2022). Los PHA son una alternativa atractiva a los plásticos convencionales, ya que poseen propiedades similares a los polímeros derivados del petróleo, como el polipropileno, pero son biodegradables y biocompatibles (Zikmanis *et al.*, 2020). Y los exopolisacáridos, por otro lado, son biopolímeros con propiedades físicas y químicas, como la capacidad de retención de agua, viscosidad, estabilidad y capacidad de formar geles, que los hacen adecuados para aplicaciones en diversas industrias, como alimentaria, farmacéutica y cosmética. Pueden desempeñar funciones como espesantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, prebióticos, encapsulantes y agentes de liberación controlada (Sakr *et al.*, 2021).

1.3.2. Biopoliamidas

Las poliamidas son polímeros que se derivan clásicamente de fuentes no renovables, como el petróleo. Se consideran como polímeros de ingeniería, ya que presentan grupos amida recurrentes como parte integral de su cadena principal, lo que les otorga unas elevadas prestaciones físicas, incluyendo alta barrera a gases y vapores, y resultando en candidatos ideales para aplicaciones de conservación de alimentos (Winnacker y Rieger, 2016). Por otro lado, las biopoliamidas son poliamidas que se obtienen a partir de fuentes renovables, como biomasa vegetal o productos derivados de la agricultura, lo que las hace más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Los ácidos dicarboxílicos y las diaminas pueden considerarse precursores de las biopoliamidas, que pueden clasificarse según su estructura (lineal, cicloalifática, aromática) y según la ruta de biosíntesis (policondensación y ROP) (Winnacker y Rieger, 2016). En el caso de los diácidos, el aceite de ricino (*Ricinus communis*) actualmente ya desempeña un papel muy relevante como materia prima natural y renovable. En particular, el aceite de ricino se somete a una etapa de transesterificación o saponificación dando lugar al ácido ricinoleico, que es el compuesto de partida para las diferentes rutas. De esta forma, por ejemplo, se puede obtener ácido sebáico o ácido 1,10-decanodioico ($C_{10}H_{18}O_4$) sometiendo al ácido ricinoleico a altas temperaturas (típicamente alrededor de 250 °C) con álcali (hidróxido de sodio o potasio). Posteriormente, la polimerización por condensación de diaminas y diácidos naturales podrá dar lugar a biopoliamidas lineales y altamente cristalinas, también denominadas "nylons verdes".

1.3.3. Uso de aminas biógenas como fuente de biopoliamidas

Existe en la actualidad una información muy limitada y escasa sobre el uso de aminas biógenas procedentes de desperdicios alimentarios como posibles precursores de biopoliamidas en el futuro. Sin embargo, algunas aminas biógenas ya están presentes en ciertas biopoliamidas comerciales y, además, tienen aplicaciones en la producción de otros polímeros como, por ejemplo, los poliuretanos, a los que pueden proporcionar propiedades especiales, como la capacidad de reticulación. En este nuevo contexto, algunas aminas biógenas podrían emplearse como monómeros para la síntesis de biopoliamidas junto a diácidos, también obtenidos a partir de fuentes naturales, por reacciones de policondensación. Las aminas biógenas más relevantes dentro de la valorización de subproductos y desperdicios de la industria agroalimentaria son las diaminas putrescina o 1,4-butanodiamina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$) y la cadaverina o 1,5-pentanodiamina ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}_2$). De esta forma, la reacción del ácido dicarboxílico obtenido a partir de la destilación seca del aceite de ricino con las aminas biógenas putrescina y cadaverina, procedentes de los residuos de quesos u otros productos lácteos o fermentados, podría dar lugar a las homopoliamidas 410 y 510, respectivamente, así como a las copoliamidas 4510. En ambos casos, se trata de potenciales biomateriales para el desarrollo de envases alimentarios obtenidos completamente de fuentes naturales y/o subproductos, con unas elevadas prestaciones mecánicas y resistencia térmica superior a 200 °C, elevada barrera a gases como oxígeno y dióxido de carbono y baja absorción de agua (> 2%) y con potencial empleo como materiales monocapa para facilitar su posterior reciclaje.

El proceso de obtención de aminas biógenas para su posterior empleo en la síntesis de biopoliamidas, que puedan emplearse como materiales monocapa en aplicaciones de conservación de alimentos, se encuentra altamente relacionado con diversos objetivos de desarrollo sostenibles (ODS), recogidos en la Agenda 2030 y propuestos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU). En particular, están plenamente alineados con los ODS: 12 (Consumo y producción responsables), 14 (Vida submarina) y 15 (Vida de los ecosistemas terrestres), ya que el objetivo de este trabajo trata de desvincular el crecimiento económico de la industria del envasado de alimentos de la degradación del medio ambiente. También contribuye indirectamente a objetivos sociales y económicos, como los ODS 2 (Hambre cero), 3 (Salud y bienestar) y 8 (Trabajo digno y crecimiento económico), al generar nuevas oportunidades de negocio en la conservación de alimentos, lo que, a menudo, tiene beneficios para la salud. De esta forma, el desarrollo de envases alimentarios de biopoliamidas a partir de aminas biógenas procedentes de residuos garantiza un consumo y producción sostenible, lo que contribuye al cumplimiento de los ODS con el fin de proteger el planeta y asegurar la prosperidad.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en la producción y extracción de las diaminas biógenas putrescina y cadaverina de dos quesos azules para su posterior empleo en la síntesis de biopoliamidas. Para maximizar la formación de estas dos diaminas biógenas, los quesos se almacenarán a diferentes temperaturas durante distintos tiempos, de forma que se pueda determinar las mejores condiciones de conservación. Además, se pretende poner a punto una técnica del proceso de extracción de putrescina y cadaverina de los residuos

procedentes de los quesos azules, utilizando medios ácidos en condiciones de alta agitación para la separación de la fase grasa, así como la aplicación de tratamientos de desproteínización. Finalmente, se llevará a cabo una caracterización cromatográfica de los extractos ricos en diaminas biógenas.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos y patrones

Todos los reactivos, incluidos la cadaverina y la putrescina, de pureza 98-99%, fueron comprados en Sigma-Aldrich (Madrid, España): acetonitrilo de grado HPLC, metanol de grado HPLC, ácido clorhídrico, ácido bórico, tampón acetato, hidróxido de sodio, azida de sodio, ácido 3,3'-tiodipropiónico (TDPA), etoximetilenmalonato de dietilo (DEEMM) y ácido L-2-aminoadípico (patrón interno). Todas las disoluciones se hicieron con agua Milli-Q.

A partir de disoluciones madre 10 mM de putrescina y cadaverina se elaboraron los patrones, de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 5 mM. Todas estas disoluciones se prepararon en HCl 0,1 M con TDPA (0,2% w/v) (OIV-OENO 457-2014).

3.2. Preparación de las muestras

Se adquirieron los quesos Cabrales (Figura 3) y Roquefort (Figura 4) en un mercado local y se almacenaron en fragmentos de dimensiones similares durante tres semanas a diferentes temperaturas: 10, 25, 37 y 60 °C. Se tomaron muestras de ambos quesos a tres tiempos diferentes: 5, 10 y 21 días para realizar un seguimiento de la generación de putrescina y cadaverina.



Fig. 3. Queso Cabrales.



Fig. 4. Queso Roquefort.

Para determinar las aminas generadas en los quesos se utilizó el procedimiento descrito en la literatura (Fernández *et al.*, 2007). Para llevar a cabo la extracción, inicialmente se

homogeneizó 1 g de queso con 10 mL de una disolución de HCl 0,1 M con TDPA (0,2% w/v) usando un homogeneizador UltraTurrax (IKA, Alemania), durante 1 min a 20000 rpm. Para desgrasar las muestras, se mantuvo la mezcla en un baño ultrasónico a 30 °C un máximo de 30 min y se centrifugó a 10000 rpm a una temperatura de 4 °C, temperatura que favorece el endurecimiento de las grasas, durante 30 min, tras lo cual se eliminó la capa de grasa superficial. El sobrenadante, que en este punto ya constituye el extracto ácido del queso, se centrifugó 1 h a 3500 g empleando unidades de filtración de 0,5 mL y un MWCO de 3 kDa (Amicon®) para retener todos los péptidos y moléculas de tamaño superior.

3.3. Reacción de derivatización

A continuación, se llevó a cabo el proceso de derivatización con DEEMM para poder determinarlas por cromatografía. Para ello, se mezcló 100 µL de extracto de queso (o de patrón para hacer la recta de calibrado), 175 µL de tampón borato 1 M (a partir de ácido bórico 1 M neutralizado con NaOH 4 M hasta pH 9,0), 75 µL de metanol, 2 µL de patrón interno (2 g/L) y 3 µL de DEEMM. La mezcla se incubó a 30 °C en un baño de ultrasonidos durante 45 min y después se calentó a 70 °C durante 2 h para degradar completamente el exceso de DEEMM y otros subproductos (Redruello *et al.*, 2013). Antes de inyectar las muestras, éstas fueron filtradas mediante filtros de jeringa de PTFE de 0,45 µm (Millex®).

3.4. Descripción del equipo y condiciones de HPLC

El análisis HPLC se llevó a cabo en un 2695 *Separations Module* (Waters®, Milford, MA, EUA) (Figura 5) acoplado a un 2996 *PDA Detector* (Waters®, Milford, MA, EUA) (Figura 6). La separación se hizo a 25 °C en una columna C18 de 1,7 µm (2,1 x 100 mm) y la detección a 280 nm. Los datos se obtuvieron y analizaron con el programa Empower 2 (Waters®).

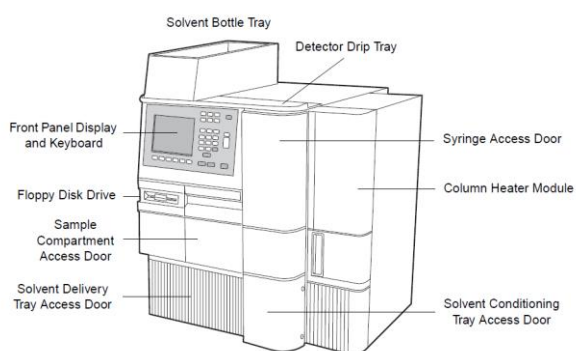


Fig. 5. 2695 *Separations Module* (Izq., 2695 *Separations Module Operator's Guide*, Waters®).

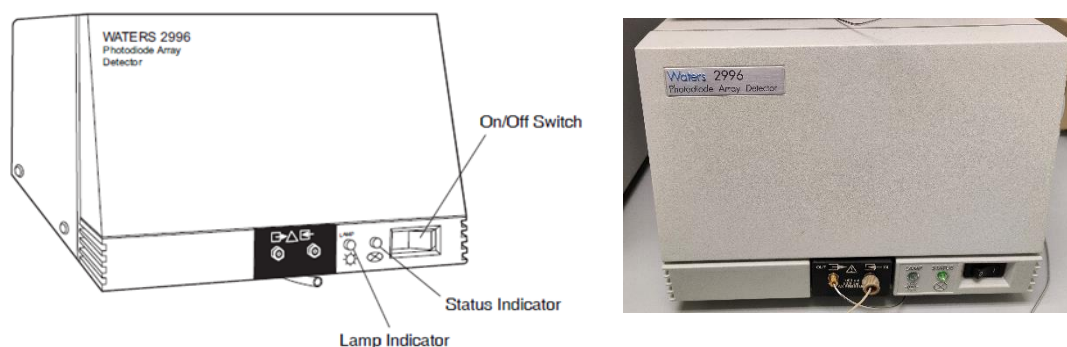


Fig. 6. 2996 PDA Detector (Izq., 2996 PDA Detector Operator's Guide, Waters®).

Durante el ensayo, se aplicó un gradiente de composición de la fase móvil tal como muestra la Tabla 2. El eluyente A fue tampón acetato 25 mM (pH 5,8) con azida de sodio al 0,02% y el eluyente B fue una mezcla 80:20 v/v de acetonitrilo y metanol (Gómez-Alonso *et al.*, 2007). Se inyectaron 10 µL de cada muestra a una tasa de flujo de 0,9 mL/min. Transcurridos los 85 min de cada inyección, y antes de la siguiente muestra, se llevó a cabo un método adicional de limpieza de la columna, de 36 min, con metanol (eluyente C) y agua Milli-Q (eluyente D). Estas medidas se realizaron, en todos los casos, en duplicado.

Tabla 2. Gradiente binario de elución para la determinación HPLC de aminas biógenas.

Tiempo (min)	0.0	20.0	30.5	33.5	65.0	73.0	78.0	82.0	85.0
Eluyente A (%)	90	90	83	83	60	28	18	0	0
Eluyente B (%)	10	10	17	17	40	72	82	100	100

4. Resultados y discusión

4.1. Validación del método

Con los cromatogramas de los patrones de concentración 5 mM, mostrados en las Figuras 7 y 8, se pudo concluir que la cadaverina eluye aproximadamente a los 76,5 min, mientras que la putrescina lo hace a los 75 min. Una vez conocidos los tiempos de elución de las dos diaminas, se procedió con el análisis de las muestras de queso.

También se elaboraron las rectas de calibrado para ambas diaminas, con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9415$ para la cadaverina (Figura 9) y $R^2 = 0,9268$ para la putrescina (Figura 10).

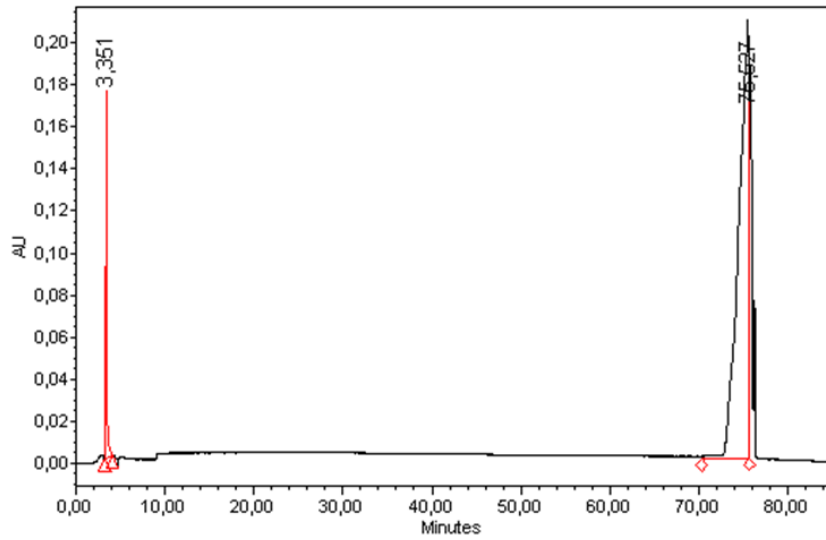


Fig. 7. Cromatograma del patrón de cadaverina a concentración 5 mM.

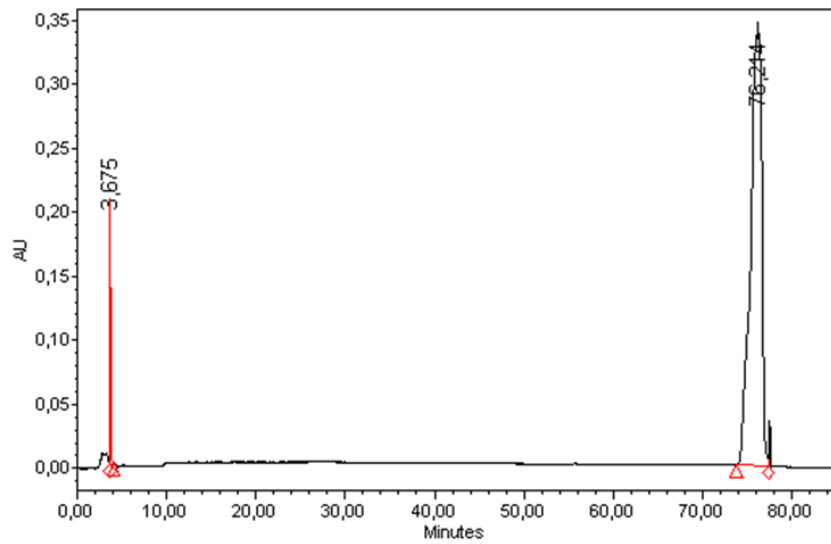
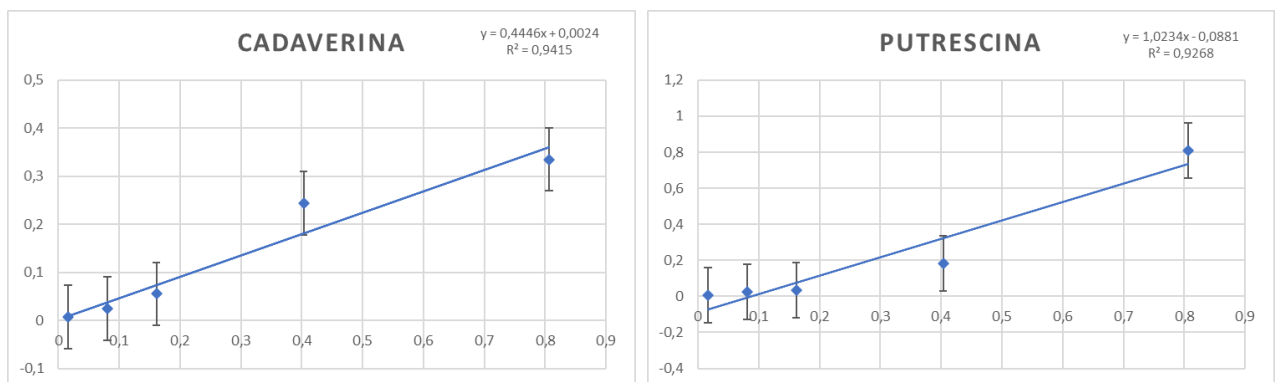


Fig. 8. Cromatograma del patrón de putrescina a concentración 5 mM.



Figuras 9 y 10. Rectas de calibrado de la cadaverina (izquierda) y la putrescina (derecha). Concentraciones: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM y 5 mM.

4.2. Determinación de diaminas biógenas en quesos

Las Figuras 11 y 12 muestran, respectivamente, los cromatogramas correspondientes a muestras de queso Cabrales y Roquefort al inicio del experimento, previamente a su almacenamiento a las diferentes condiciones. Se verificó que el tiempo de retención del patrón interno era aproximadamente de 3,5 min. Estas primeras muestras se analizaron a tiempo 0, antes de almacenar, para tener como referencia inicial de la evolución en la formación de cadaverina y putrescina con el paso del tiempo, así como un propio parámetro de calidad de los quesos. Como se puede observar en ambos cromatogramas, no se detectó ninguna de las dos aminas biógenas en dichas muestras, estando libres de estas diaminas o presentándose en niveles inferiores al límite de detección del equipo.

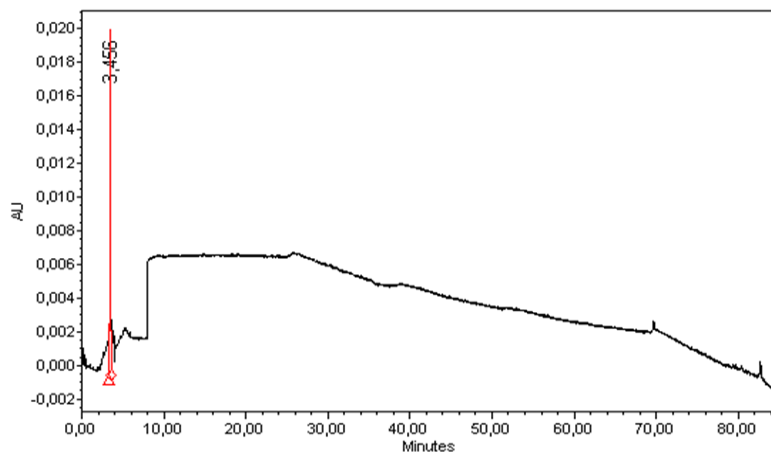


Fig. 11. Cromatograma de la muestra a tiempo 0 de queso Cabrales. La línea vertical corresponde al tiempo de retención del patrón interno.

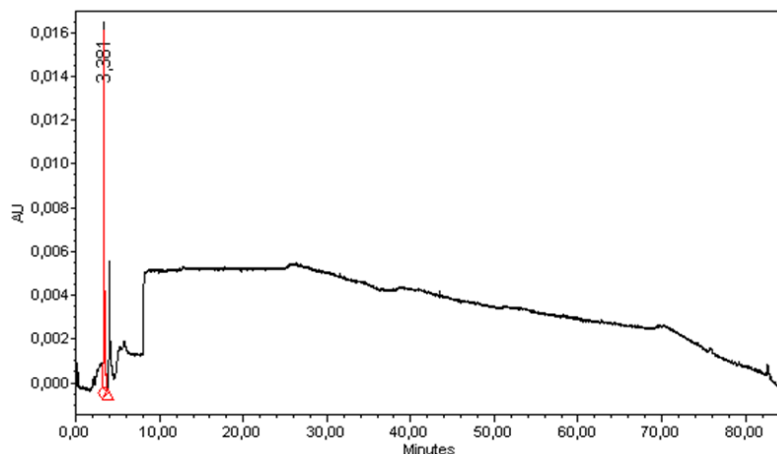


Fig. 12. Cromatograma de la muestra a tiempo 0 de queso Roquefort. La línea vertical corresponde al tiempo de retención del patrón interno

El resto de las muestras, sometidas a las condiciones de almacenamiento previamente mencionadas, dieron los resultados que aparecen en las Figuras 19, 20, 21 y 22. En las Figuras 19 y 20 se muestra la evolución de la concentración de putrescina y cadaverina en los quesos Cabrales y Roquefort en función del tiempo (5, 10 y 21 días) y para cada temperatura de almacenamiento (10, 25, 37 y 60 °C). Por su parte, en las Figuras 21 y 22 se representa el efecto de la temperatura de almacenamiento en la generación de putrescina y cadaverina en ambos quesos.

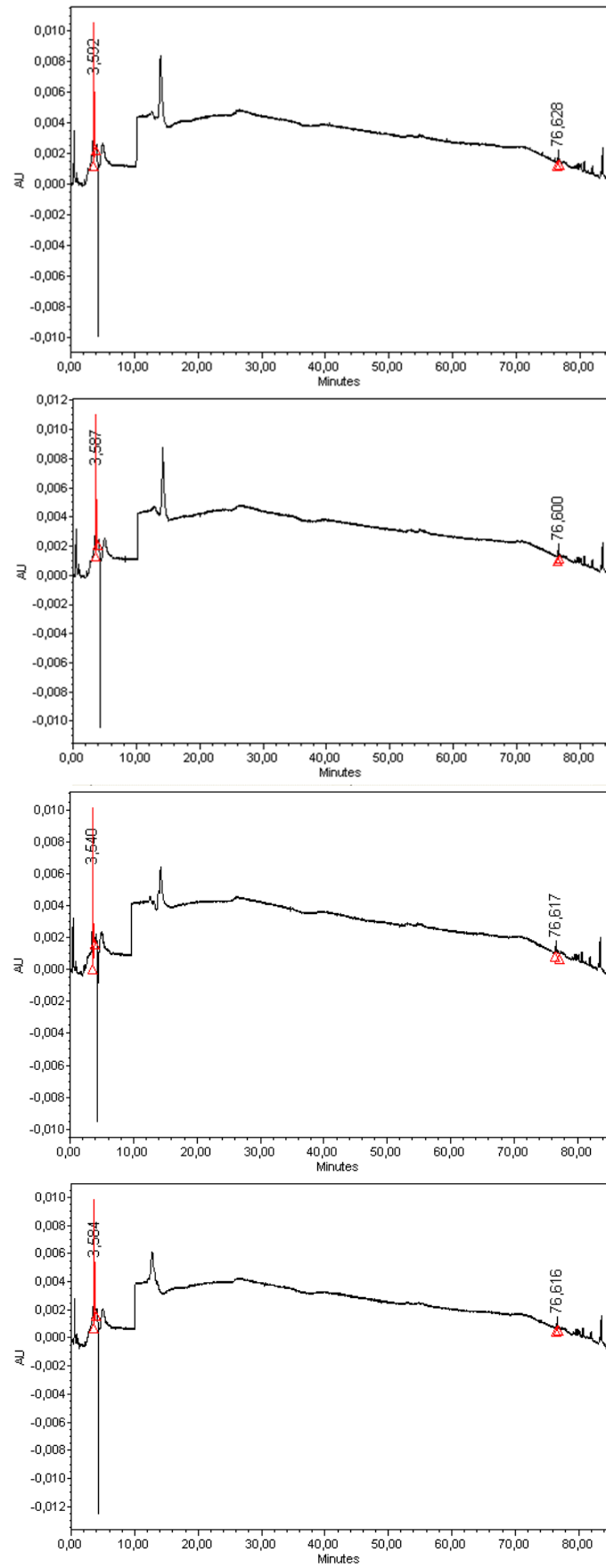


Fig. 13. Cromatogramas de queso Cabrales a los 5 días. En orden descendente: 10, 25, 37 y 60 °C.

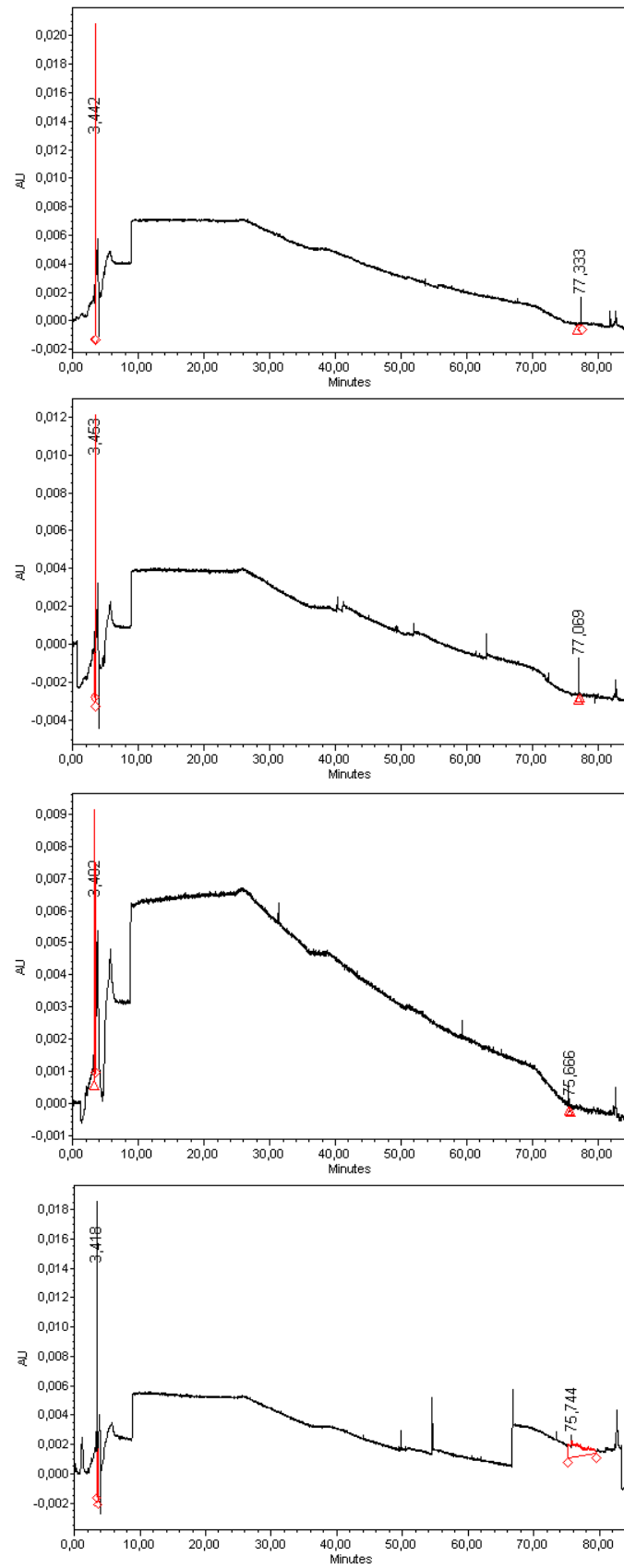


Fig. 14. Cromatogramas de queso Cabrales a los 10 días. En orden descendente: 10, 25, 37 y 60 °C.

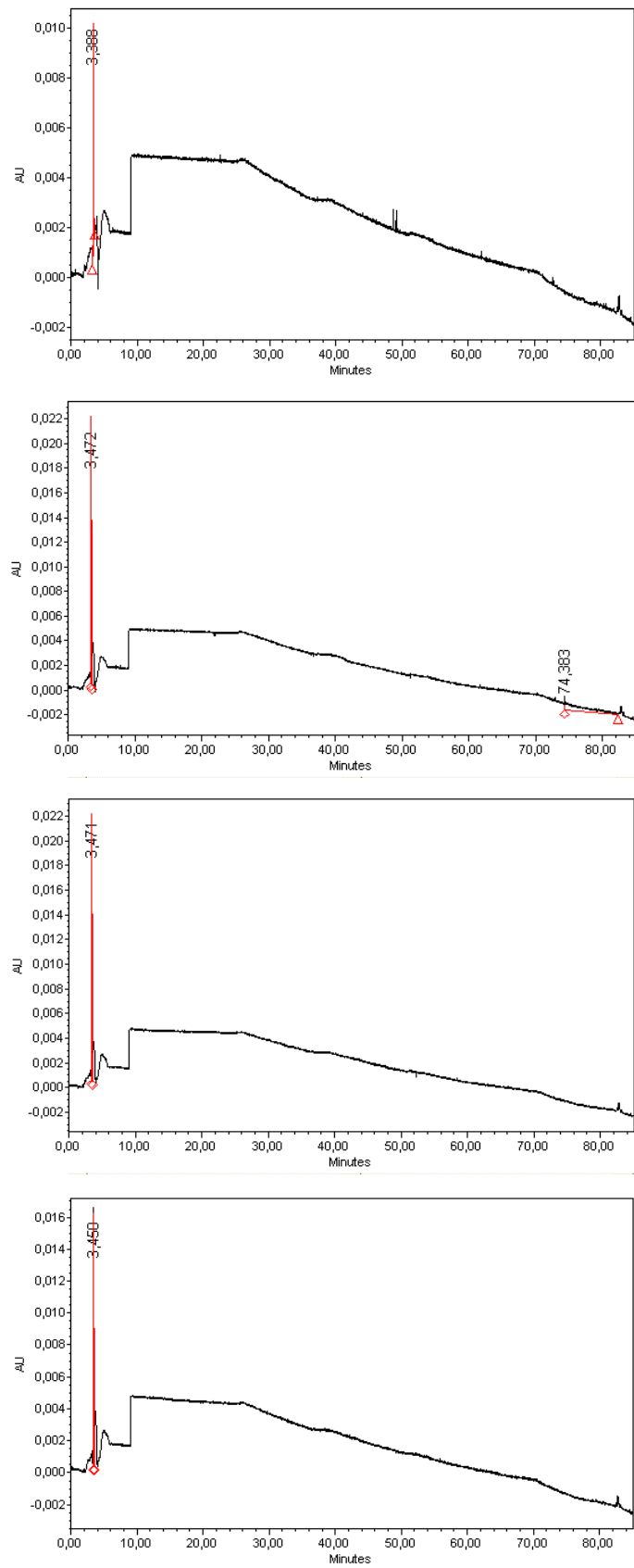


Fig. 15. Cromatogramas de queso Cabrales a los 21 días. En orden descendente: 10, 25, 37 y 60 °C.

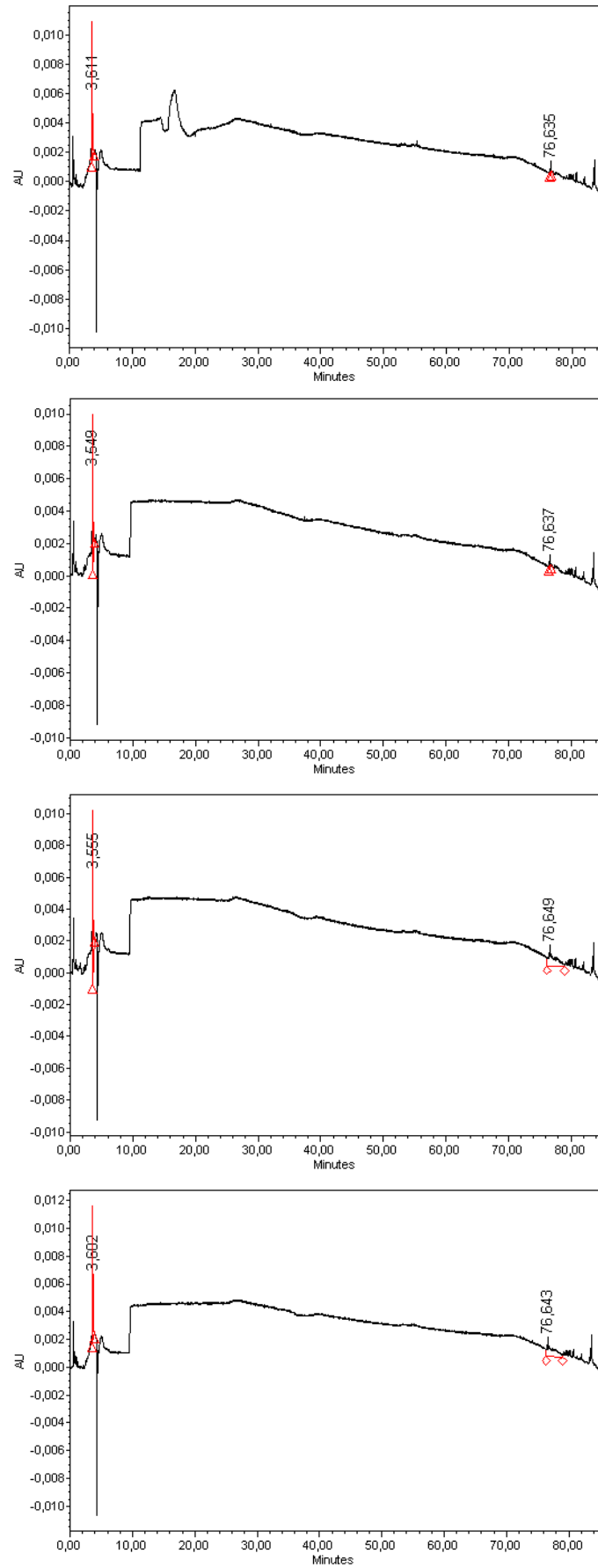


Fig. 16. Cromatogramas de queso Roquefort a los 5 días. En orden descendente: 10, 25, 37 y 60 °C.

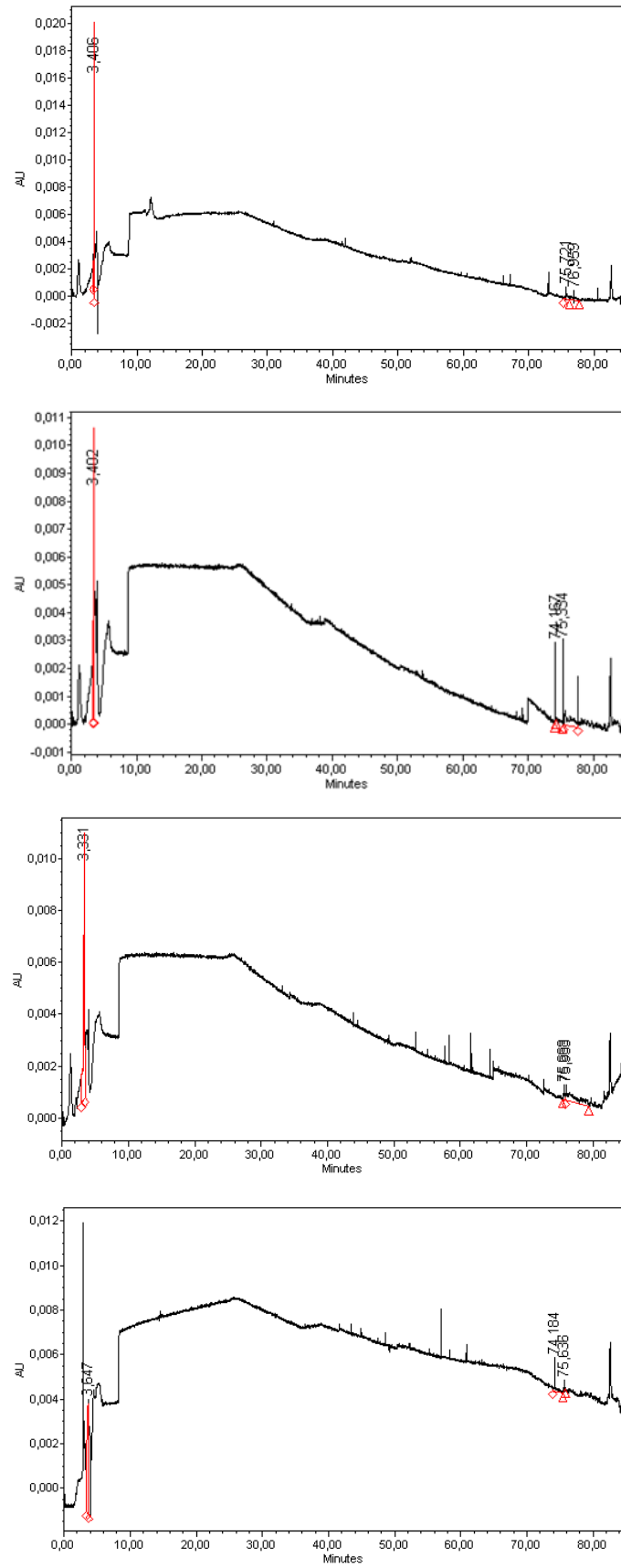


Fig. 17. Cromatogramas de queso Roquefort a los 10 días. En orden descendente: 10, 25, 37 y 60 °C.

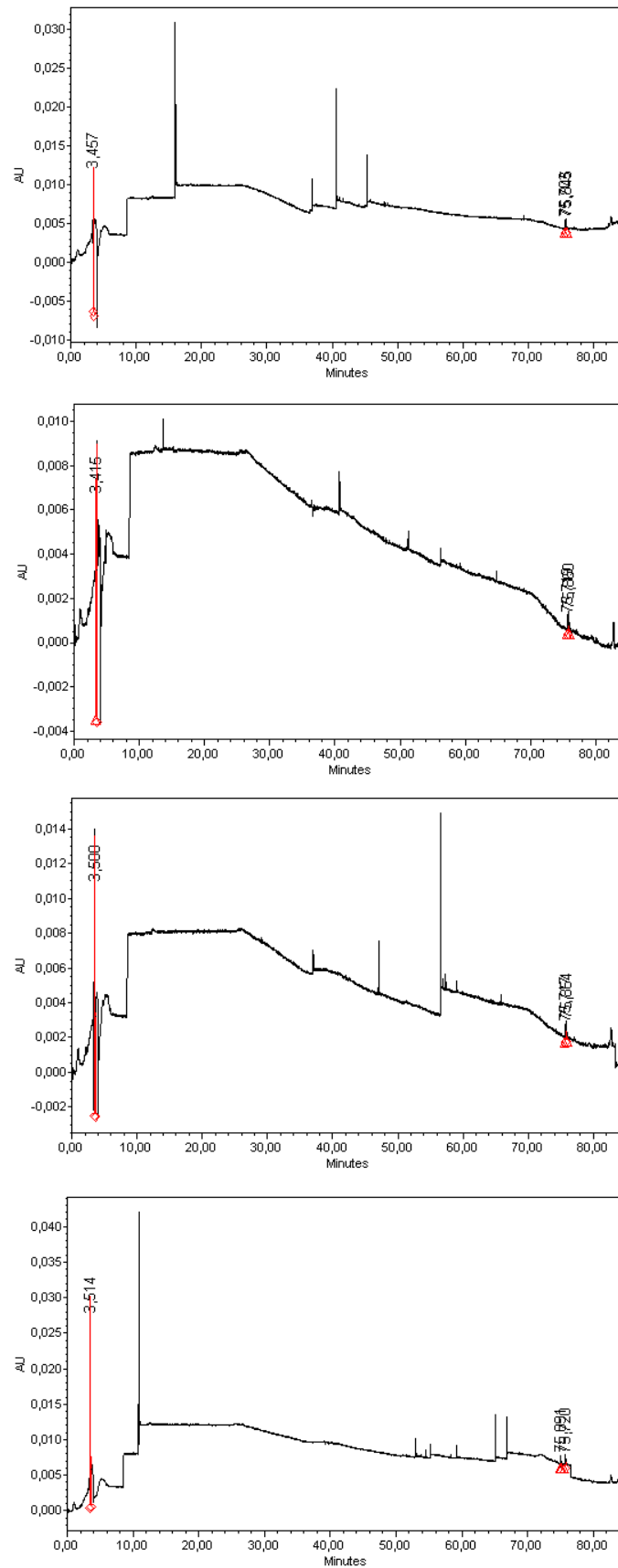


Fig. 18. Cromatogramas de queso Roquefort a los 21 días. En orden descendente: 10, 25, 37 y 60 °C.

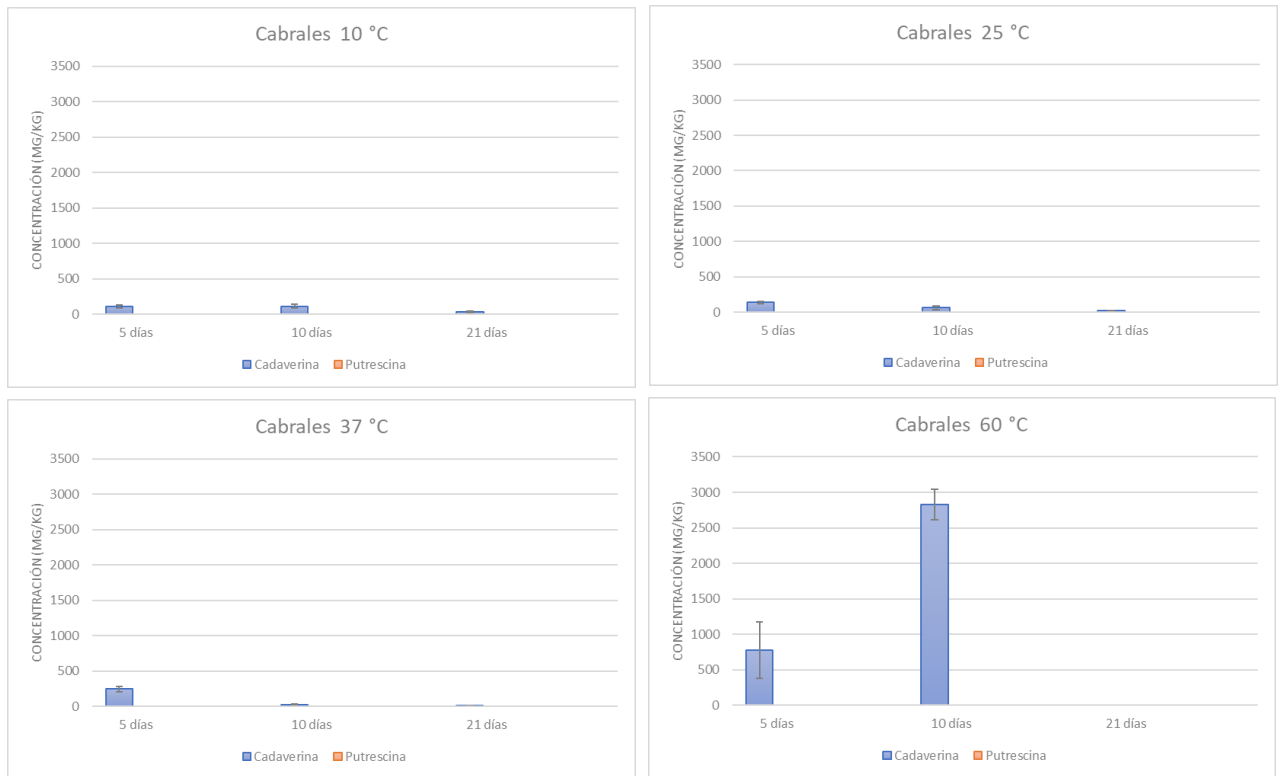


Fig. 19. Evolución de la generación de putrescina y cadaverina en queso Cabrales. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento. Todos los valores de concentración (eje vertical) están expresados en mg/kg de queso.

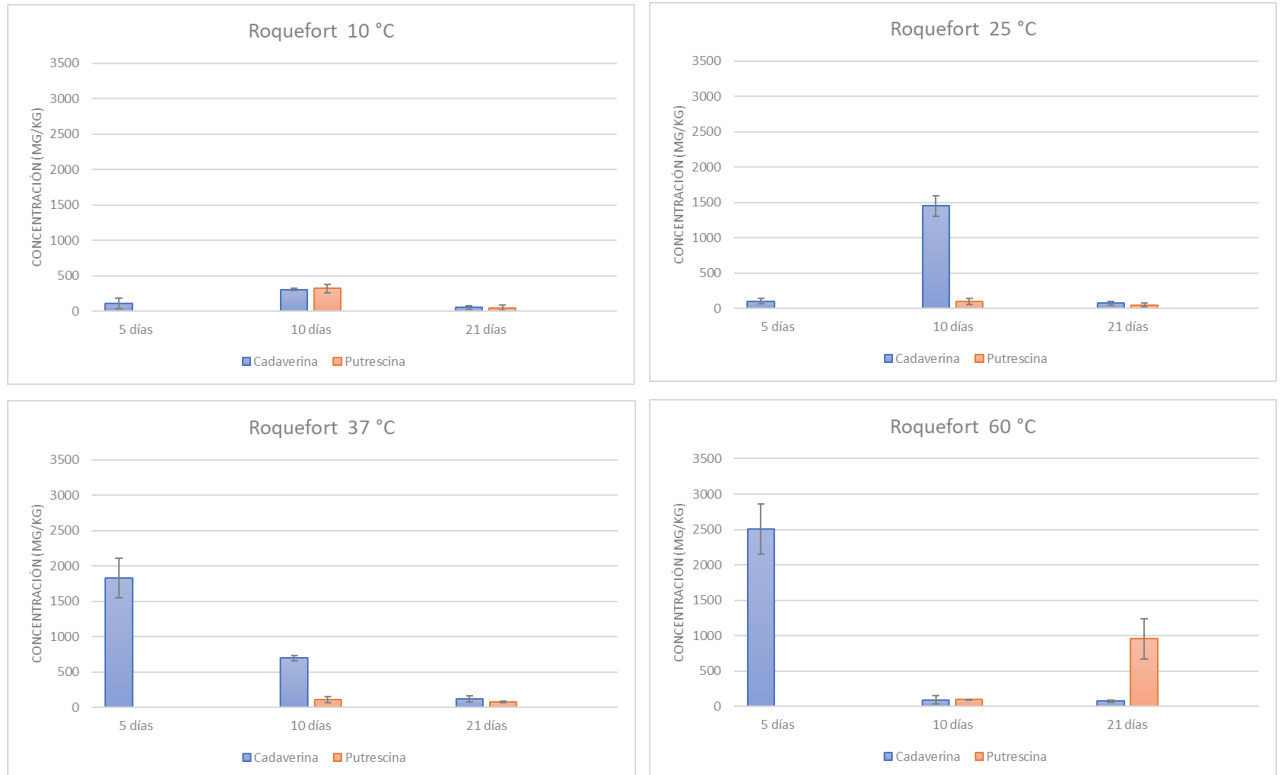


Fig. 20. Evolución de la generación de putrescina y cadaverina en queso Roquefort. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento. Todos los valores de concentración (eje vertical) están expresados en mg/kg de queso.

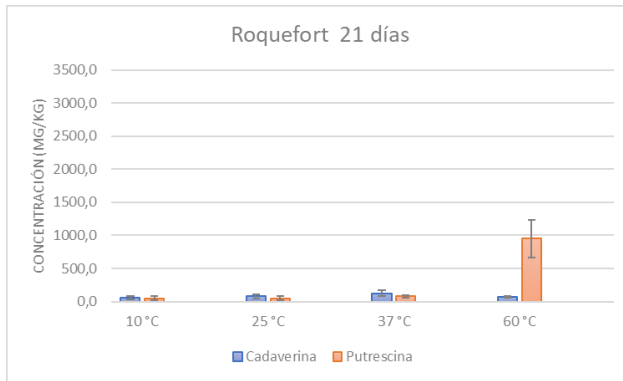
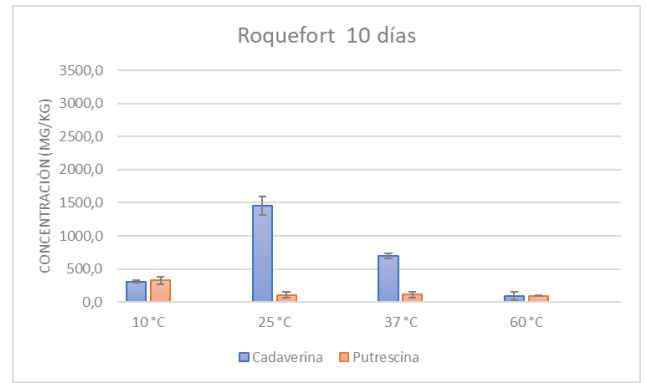
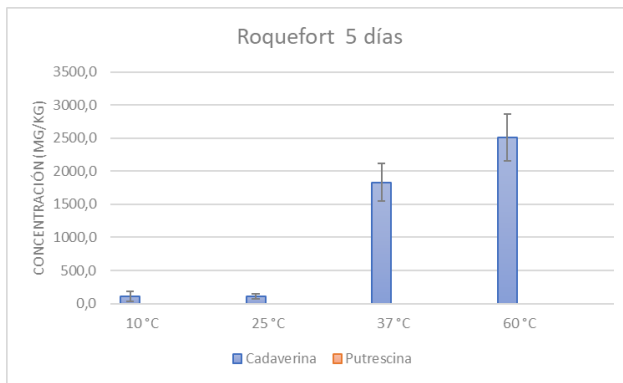


Fig. 21. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la generación de putrescina y cadaverina en queso Roquefort. Todos los valores de concentración (eje vertical) están expresados en mg/kg de queso.

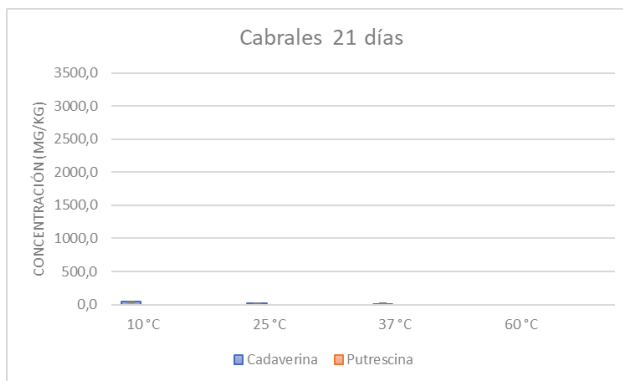
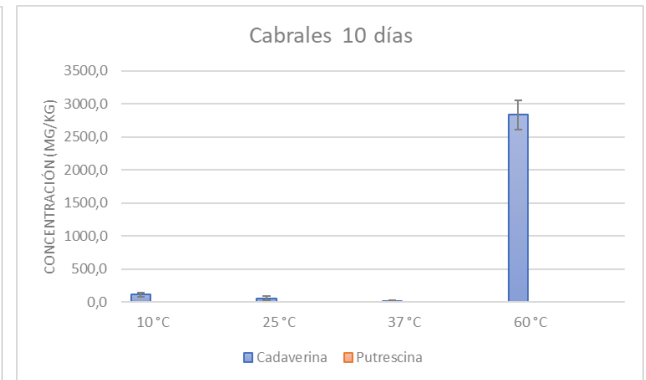
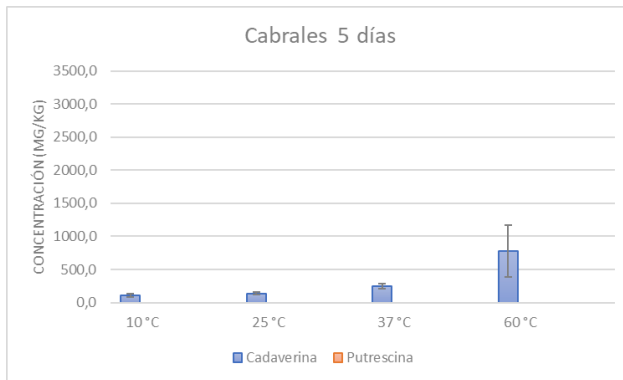


Fig. 22. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la generación de putrescina y cadaverina en queso Cabrales. Todos los valores de concentración (eje vertical) están expresados en mg/kg de queso.

Como puede observarse en los cromatogramas, en el queso Cabrales tan solo se detectó cadaverina, mientras que en queso Roquefort se detectaron tanto cadaverina como putrescina. Como se ha mencionado anteriormente, tanto en la elaboración de queso Cabrales como de queso Roquefort se utiliza *Penicillium roqueforti*. Por lo tanto, dado que en el queso Cabrales no se detectó putrescina a ninguna temperatura ni ningún tiempo, esto sugiere que la cepa fúngica en este queso no llegó a producir cantidades detectables de putrescina dentro del periodo de almacenamiento considerado. En este sentido, se ha reportado que las concentraciones de aminas biógenas en los quesos son dependientes de factores como la cepa de *Penicillium roqueforti* utilizada, las condiciones de maduración, el tiempo de maduración y la composición del queso. A todo esto, hay que considerar la posibilidad de contaminación bacteriana o fúngica, así como la respuesta diferente del microorganismo ante las temperaturas extremas, un pH inadecuado o una baja disponibilidad de oxígeno, entre otros factores. En cuanto a la concentración de cadaverina en el queso Cabrales, a 25 y 37 °C se alcanza el valor máximo relativo a los 5 días, mientras que a 10 y 60 °C se necesita más tiempo (10 días) para llegar a este valor. Además, a las cuatro temperaturas, se observa que a los 21 días la concentración de cadaverina se ve muy reducida. El máximo absoluto se alcanza, con diferencia, a 60 °C transcurridos 10 días. Estos resultados sugieren que el desarrollo de la diamina es dependiente del tiempo y la temperatura de forma relacionada. Mientras que temperaturas bajas (10 °C) requieren más tiempo (21 días) para la formación de la diamina, a temperaturas más elevadas (60 °C) la diamina se desarrolla en un menor tiempo (5 días) y después su concentración se reduce. A temperaturas intermedias, 25 y 37 °C, se favorece la formación a tiempos intermedios, 10 días.

En el queso Roquefort la producción de cadaverina presenta la misma tendencia que la observada para el Cabrales, pero difiere en algunos aspectos. A 37 y 60 °C se alcanza la concentración máxima relativa a los 5 días, mientras que a 10 y 25 °C se necesita más tiempo (10 días) para llegar a ella. Nuevamente, a las cuatro temperaturas se aprecia que a los 21 días la concentración de cadaverina ha sufrido un descenso. El máximo absoluto se alcanza a 60 °C pasados 5 días. Y en cuanto a la concentración de putrescina en el queso Roquefort, a los 5 días no se detectaron valores a ninguna temperatura, lo que parece indicar que se requiere un cierto tiempo de inducción en la producción de esta diamina por parte de la cepa fúngica. A 10, 25 y 37 °C se alcanza la concentración máxima relativa a los 10 días, que con el paso del tiempo (21 días) va descomponiéndose o degradando, por ejemplo, mediante un proceso oxidativo. Sin embargo, a 60 °C y a los 21 días se observa el valor máximo absoluto de putrescina en queso Roquefort. Este resultado podría indicar que la formación de putrescina está relacionada con la descomposición de la cadaverina, pudiéndose formar algún precursor químico que favorezca la generación de la primera a partir de la segunda.

Por lo anteriormente expuesto, se podría considerar que el contenido de ambas diaminas en las muestras de los quesos azules a diferentes temperaturas y tiempos sería en consecuencia resultado de un balance entre formación y descomposición de éstas. Ambos procesos ocurren a diferentes velocidades, dependiendo de las condiciones de almacenamiento, de modo que el tiempo necesario para alcanzar el máximo de concentración está afectado por la temperatura. Los procesos conducentes al descenso de la concentración de aminas podrían ser la oxidación enzimática, la degradación microbiana y la reacción de condensación con otros compuestos. La oxidación enzimática de las aminas biógenas puede ser catalizada por enzimas como las monoamino oxidasas (MAO) y las diamino oxidasas (DAO), que convierten las aminas biógenas en aldehídos correspondientes y juegan un papel importante en la eliminación

y desintoxicación de las aminas biógenas en el cuerpo humano (Vianello *et al.*, 2012). Por otro lado, la degradación microbiana de las aminas biógenas puede ser llevada a cabo por ciertas bacterias que tienen la capacidad de metabolizar y transformar las aminas biógenas en otros compuestos más estables, lo cual conectaría con la posibilidad de contaminación bacteriana. Y, además, las aminas biógenas también pueden reaccionar con otros compuestos presentes en los alimentos, como los ácidos orgánicos, para formar productos de condensación que pueden tener propiedades distintas (Medina *et al.*, 2003).

A modo de resumen, y por el posible interés sobre la formación de estas diaminas para su valorización en biopoliamidas, las concentraciones máximas de cadaverina observadas son: 2832,4 mg/kg a 60 °C a los 10 días en queso Cabrales y 2505,6 mg/kg a 60 °C a los 5 días en queso Roquefort. Por otro lado, la concentración máxima de putrescina observada en queso Roquefort es 952,8 mg/kg a 60 °C a los 21 días. Con estos resultados se puede concluir que, para todas las temperaturas ensayadas, la más elevada es la más apropiada para la producción de las dos diaminas biógenas.

4.3. Implicaciones con las regulaciones de seguridad alimentaria

Además de su interés para los posibles procesos de síntesis de biopoliamidas, el contenido de estas diaminas debe ser controlado por razones de seguridad alimentaria. De esta forma, se recomienda que las concentraciones de cadaverina y putrescina estén controladas en los alimentos, ya que niveles elevados pueden causar reacciones adversas para la salud de las personas y, sobre todo, pueden potenciar los efectos de aminas más tóxicas como la histamina y la tiramina.

A diferencia de la histamina y la tiramina, no existen datos disponibles sobre la respuesta a la dosis en humanos para la putrescina y la cadaverina, y solo se han realizado un número limitado de estudios en animales. Depende del tipo de alimento, pero concentraciones entre 850 y 1870 mg/kg en quesos pueden provocar envenenamiento por histamina, por lo que se podría considerar este rango como tóxico (EFSA, 2011). Las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO) pueden metabolizar varias aminas biógenas, lo que significa que la degradación de las aminas puede retrasarse en función de su número y concentración. A partir de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, se han propuesto dos teorías sobre la potenciación de la toxicidad de la histamina: la teoría de la inhibición competitiva, según la cual la ingesta oral simultánea de otras aminas, como la putrescina y la cadaverina, puede inhibir las enzimas desintoxicantes de aminas y, por lo tanto, bloquear el metabolismo de la histamina y la tiramina; y la teoría de la ruptura de la barrera, que sugiere que los potenciadores, como la putrescina y la cadaverina, pueden alterar la función de barrera física del intestino delgado y permitir la difusión de mayores cantidades de histamina hacia la circulación (EFSA, 2011).

Tomando como orientación el rango de las concentraciones en histamina consideradas tóxicas, se podrían destacar cinco concentraciones de las Figuras 19 y 20 que, además, son bastante más elevadas que el resto: 2832,4 mg/kg de cadaverina a 60 °C a los 10 días en queso Cabrales, 2505,6 mg/kg de cadaverina a 60 °C a los 5 días en queso Roquefort, 1831,4 mg/kg de cadaverina a 37 °C a los 5 días en queso Roquefort, 1451,3 mg/kg de cadaverina a 25 °C a los 10 días en queso Roquefort, y 952,8 mg/kg de putrescina a 60 °C a los 21 días en queso Roquefort. Estas concentraciones se deben

tener en cuenta por dos motivos: son lo suficientemente elevadas para poder resultar tóxicas y, por ende, son lo suficientemente elevadas para ser potencialmente útiles en la síntesis de biopoliamidas a partir de aminas biógenas (uno de los principales objetivos del estudio).

5. Conclusiones

El objetivo principal de este proyecto ha sido analizar y establecer las condiciones de almacenamiento más adecuadas para favorecer la formación de putrescina y cadaverina, dos diaminas biógenas presentes en dos tipos de quesos azules. Se han cuantificado con éxito las concentraciones de cadaverina y putrescina en queso Cabrales y queso Roquefort, después de someter las muestras a diferentes condiciones y periodos de almacenamiento. Por los resultados obtenidos, se ha concluido que la temperatura óptima para producir tanto cadaverina como putrescina de *Penicillium roqueforti* está en torno a los 60 °C, durante un tiempo variable según el tipo de queso y de diamina.

Por lo que respecta a la validación del método cromatográfico, los reactivos y el procedimiento experimental, se pueden considerar como adecuados. Sin embargo, se observó una elevada variabilidad de resultados y distintas tendencias, lo que sugiere cierta imprecisión en las medidas y la necesidad de realizar más repeticiones y/o una mejora del diseño del experimento. Aparte de las fuentes de error más comunes en el análisis HPLC, que pueden causar interferencias y picos no deseados que afectarán la precisión, reproducibilidad y exactitud de los resultados, también el diseño del propio experimento representa una potencial fuente de error. El estudio se diseñó para tomar medidas a cuatro temperaturas y tres tiempos diferentes; sin embargo, el lapso transcurrido entre las muestras puede haber sesgado la obtención de resultados más concluyentes. En lugar de medir a 5, 10 y 21 días, lo óptimo podría haber sido medir cada dos días o incluso uno. De esta forma, se podría saber con mayor seguridad en qué momento comienzan tanto a formarse como descomponerse la cadaverina y putrescina. También habría mejorado la precisión del estudio tomar más repeticiones de cada muestra, entre tres y cinco, para así disponer de un modelo estadístico completo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que para poder implementar estas mejoras es necesario invertir mucho más tiempo y recursos, principales limitaciones en esta clase de estudios.

Aunque las condiciones de almacenamiento de estos quesos no se llevan a cabo en estas condiciones, se ha establecido que cinco de los valores de concentración de estas diaminas podrían representar a la vez un problema de salud para las personas por su efecto potenciador de otras aminas, como la histamina y la triptamina. Por lo tanto, a nivel de seguridad alimentaria, estas condiciones de almacenamiento deben ser evitadas.

Finalmente, se puede concluir que los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores. Aunque las cantidades desarrolladas de diamina no sean elevadas, los desperdicios de los quesos azules almacenados en las condiciones aquí establecidos pueden representar una fuente para la obtención de cadaverina y putrescina que, posteriormente, se empleen para sintetizar biopoliamidas, materiales de mayor valor ("*upcycling*"). De esta forma, en un futuro, y de acuerdo con los principios de la nueva Bioeconomía Circular, los desperdicios de quesos azules, pescado o productos fermentados podrían ser empleados para desarrollar biopoliamidas de interés en aplicaciones como envases alimentarios altamente funcionales y completamente reciclables.

6. Referencias bibliográficas

1. ABBAS, A.; DOBSON, A.D.W. (2011). Yeasts and Molds | *Penicillium roqueforti*, en: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition). Elsevier, 772-775
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/penicillium-roqueforti#:~:text=Yeasts%20and%20Molds%20%7C%20Penicillium%20roqueforti&text=The%20fungus%20has%20the%20lowest.not%20above%2035%20%C2%B0C.>
2. AHMAD, W. (2019). Biogenic Amines Formation Mechanism and Determination Strategies: Future Challenges and Limitations. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50: 485-500
<https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1657793>
3. BELL, J. (2018). EU ambition to build the world's leading bioeconomy—Uncertain times demand innovative and sustainable solutions. *New Biotechnology*, 40: 25-30
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.06.010>
4. DÍEZ-PASCUAL, A. (2022). Biopolymer Composites: Synthesis, Properties, and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 2257
<https://doi.org/10.3390/ijms23042257>
5. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10): 2393
doi:10.2903/j.efsa.2011.2393
6. FEDERACIÓN NACIONAL DE INDUSTRIAS LÁCTEAS, FENIL <https://fenil.org/sector-lacteo-espana/>
7. FERNÁNDEZ, M. (2007). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. *Journal of Dairy Research*, 74: 276-282
<https://doi.org/10.1017/S0022029907002488>
8. GÓMEZ-ALONSO, S. (2007). Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 608-613
<https://doi.org/10.1021/jf062820m>
9. JAGUEY-HERNÁNDEZ, Y. (2021). Biogenic amines levels in food processing: Efforts for their control in foodstuffs. *Food Research International*, 144: 110341
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110341>
10. KHALID, A. (2021). Presence of Biogenic Amines in Food and Their Public Health Implications: A Review. *Journal of Food Protection*, 84: 1539-1548
<https://doi.org/10.4315/JFP-21-047>
11. KRAUSE, I. (1995). Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography*, 715: 67-79
[https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00578-B](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00578-B)
12. LAINEZ, M. (2018). Spanish strategy on bioeconomy: Towards a knowledge based sustainable innovation. *New Biotechnology*, 40: 87-95
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.006>
13. MEDINA, M.A. (2003). Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38: 23-59
<https://doi.org/10.1080/713609209>
14. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, MAPA, ESPAÑA
<https://www.mapa.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/innovacion-medio-rural/bioeconomia/>
15. OIV-OENO 457-2014 (2014). Método de determinación de las aminas biógenas en el vino por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fotodiodos.
<https://www.oiv.int/public/medias/1647/oiv-oeno-457-2014-es.pdf>
16. REDRUELLO, B. (2013). 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: 1029-1035
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>
17. SAKR, E. (2021). Food wastes as natural sources of lactic acid bacterial exopolysaccharides for the functional food industry: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189: 232-241
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.135>

18. SAR, T. (2022). Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review. *Science of the Total Environment*, 810: 152253 <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152253>
19. STATISTA <https://es.statista.com/estadisticas/600241/principales-productores-de-leche-de-vaca-en-el-mundo-en/#:~:text=La%20Uni%C3%B3n%20Europea%20fue%20la,segunda%20y%20tercera%20posici%C3%B3n%20respectivamente.>
20. USMANI, Z. (2022). Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. *Bioresource Technology*, 346: 126444 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126444>
21. VIANELLO, R. (2012). How are Biogenic Amines Metabolized by Monoamine Oxidases? *European Journal of Organic Chemistry*, 2012: 7057-7065 <https://doi.org/10.1002/ejoc.201201122>
22. WATERS (2001-2002). Waters 2695 Separations Module Operator's Guide. <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500269502rb.pdf>
23. WATERS (2001). Waters 2996 PDA Detector Operator's Guide. <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500023202rc.pdf>
24. WINNACKER, M. (2016). Biobased Polyamides: Recent Advances in Basic and Applied Research. *Macromolecular Rapid Communications*, 37: 1391-1413 <https://doi.org/10.1002/marc.201600181>
25. WÓJCIK, W. (2020). Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101: 2634-2640 <https://doi.org/10.1002/jsfa.10928>
26. ZIKMANIS, P. (2020). Production of biodegradable microbial polymers from whey. *Bioresources and Bioprocessing*, 7: 36 <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00326-6>