

ÍNDICE

I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
3.1 Proteínas	5
3.2 Aminas Biogénicas	5
3.2.1 Aminas biogénicas en pescado	6
3.2.2 Histamina	7
3.3 Análisis de aminas biogénicas	9
3.3.1 Reactivos de derivatización precolumna	11
3.3.1.1 Ortoftaldehído (OPA)	12
3.3.1.2 Cloruro de dansilo	13
3.4 Características del atún	14
3.5 La industria atunera de Guatemala	15
IV. JUSTIFICACIÓN	17
V. OBJETIVOS	18
VI. HIPÓTESIS	19
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VIII. RESULTADOS	25
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
X. CONCLUSIONES	34
XI. RECOMENDACIONES	35
XII. REFERENCIAS	36
XIII. ANEXOS	39

I. RESUMEN

Con el objetivo de cuantificar la concentración de histamina en muestras de lomo de atún, con un método normalizado y reconocido internacionalmente, se evaluó el método propuesto por Eerola *et al.* (6). La evaluación consistió en la determinación de los siguientes parámetros: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión y exactitud.

La metodología se basa en la extracción de histamina con ácido perclórico, a partir de una muestra homogenizada de atún, su derivatización con cloruro de dansilo y la separación cromatográfica mediante cromatografía líquida de alta resolución y posterior detección y cuantificación del producto de la derivatización con un detector UV a 254nm.

El estudio de la evaluación del método es satisfactorio, ya que cumple con los parámetros estadísticos evaluados; presentando buena linealidad ($r^2 = 0.9997$), con límites de detección y cuantificación (2.50 y 8.35 mg/kg respectivamente) que están por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea en el Reglamento (CE) No. 2073/2005 (100mg/kg), por lo que queda demostrado que el método es preciso y exacto.

Por último se concluyó que la concentración de histamina en la población del estudio, se encuentra por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea para la exportación al mercado internacional, por lo que el producto se considera apto para la exportación, ya que ninguna muestra superó este valor.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la globalización y los diferentes tratados de libre comercio, han forzado el desarrollo de normas nacionales e internacionales que velen por la buena calidad de los productos alimenticios que los consumidores pueden encontrar en el mercado, demandando cada vez más un mejor producto de las industrias alimentarias. Por esta razón se puede observar cómo estas industrias ponen cada vez más énfasis en el desarrollo de políticas de calidad, reducción en el uso de insumos y en la conservación del medio ambiente, preocupadas por asegurarles a sus consumidores un producto de gran calidad.

El pescado como alimento, constituye una de las principales fuentes de proteínas de alta calidad que el ser humano requiere para su alimentación. Los peces de la familia *Escombridae*, entre los que se menciona el atún bonito (*Sarda sarda*) del Atlántico, atún patudo (*Parathunnus obesus*), atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y el albácora (*Thunnus alalunga*), se destacan por ser muy importantes dentro de la industria alimentaria guatemalteca, más específicamente relacionadas con el procesamiento de lomos de atún para exportación.

Las proteínas del pescado están formadas por aminoácidos que pueden hallarse libres. Uno de ellos es la histidina, que en el transcurso del procesamiento y/o almacenamiento del producto es degradada por bacterias y enzimas formando la histamina (12).

La histamina es una amina biogénica que se relaciona con una calidad sanitaria deficiente, elevada contaminación y/o condiciones inapropiadas durante el procesamiento y almacenamiento, que afectan la calidad alimentaria pudiendo provocar en personas sensibles una intoxicación (8, 12).

Una elevada concentración de histamina puede ser detectada por medio de una evaluación organoléptica; sin embargo esta metodología no es suficiente cuando se requiere detectar los niveles más bajos que aún siguen siendo tóxicos para el ser humano; por esta razón se ha establecido maneras más exactas y seguras para su cuantificación, tales como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) con derivatización pre-columna con cloruro de dansilo (11,12).

No se disponía en Guatemala de un método normalizado y reconocido internacionalmente por los organismos oficiales de los países socios comerciales para la cuantificación de histamina, por esta razón, se justificó el desarrollo del presente estudio de esta toxina.

Este estudio tenía como objetivo principal, evaluar un método normalizado para llevar a cabo la cuantificación de histamina en muestras de lomo atún. Para ello se sometió el método a ensayos de linealidad, precisión, exactitud y se establecieron los límites de detección y cuantificación del mismo, para evaluar si las muestras de atún cumplen o no con el límite permisible establecido por la Unión Europea para la exportación del mismo al mercado internacional.

III. ANTECEDENTES

3.1 PROTEINAS

Las proteínas tienen una estructura molecular compuesta principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Sin embargo la mayoría de las proteínas también contienen algunos átomos de azufre, fósforo y otros elementos. Estas se encuentran en plantas y animales, lo que hace que estas moléculas sean esenciales para la vida terrestre.

Las proteínas son polímeros contruidos por monómeros denominados *aminoácidos*. Los aminoácidos son caracterizados por tener en su estructura molecular un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$).

Actualmente hay unos 22 diferentes aminoácidos reconocidos. De éstos, unos 10 son designados como *aminoácidos esenciales*, ya que no pueden ser sintetizados por el hombre o por los animales, sino que deben ser proporcionados como tales por los alimentos consumidos. Los restantes aminoácidos son sintetizables a base de otros aminoácidos y compuestos nitrogenados, y son designados como *aminoácidos no esenciales*.

Entre los aminoácidos esenciales más conocidos se encuentran: arginina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, triptófano, valina e *histidina* (24).

3.2 AMINAS BIOGENICAS

Cuando algunos aminoácidos son degradados por una descarboxilación, a través de enzimas provenientes principalmente de bacterias gram negativas, se obtienen las aminas biogénicas (8).

Ejemplos de aminoácidos que sufre esta transformación se presentan en la siguiente tabla:

Tabla No.1
Aminas biogénicas y aminoácidos precursores

Aminoácido	Amina Biogénica
Histidina	Histamina
Arginina	Agmatina
Lisina	Cadaverina
Ornitina	Putrecina
Tirosina	Tiramina

Normalmente, estos compuestos se encuentran presentes a bajas concentraciones de manera natural en ingredientes y/o alimentos no constituyendo un peligro su consumo; sin embargo, su presencia en grandes cantidades es un indicativo de un proceso de deterioro (27).

3.2.1 Aminas Biogénicas en Pescado

A lo largo de los últimos años se ha incrementado el número de alimentos de los que se tiene constancia que puedan contener cantidades importantes de aminas biogénicas. Entre los alimentos que más sufren de este problema se encuentra el *pescado y sus derivados*, los quesos curados, carne cruda y sus derivados (curados, en conserva y en semiconserva), la col fermentada, las bebidas alcohólicas fermentadas (vino, cerveza, sidra), el cacao y sus derivados, algunas frutas y hortalizas. En general, se trata de alimentos susceptibles de presentar una contaminación bacteriana durante los días previos a su consumo o transformación, o durante el proceso de fermentación (28).

Como se ha mencionado antes, los productos derivados de los peces resultan ser muy afectados por la contaminación de aminas biogénicas; esto se debe a que algunas especies de peces están entre los pocos animales que presentan histidina libre en los fluidos musculares. Estos fluidos en el pez hacen que el músculo del mismo sea un medio muy propicio para la formación bacteriana causante de la degradación de los tejidos musculares en una amplia variedad de aminas biogénicas, como resultado de la descarboxilación directa de los aminoácidos (14).

El contenido de aminas biogénicas en el pescado recién capturado, es prácticamente despreciable. A modo de ejemplo, en sardina fresca la histamina está presente en niveles menores a 5 mg/100 g, la cadaverina menor que 15 mg/100 g y la putrecina menor de 1 mg/100 g. Sin embargo, inmediatamente después que el pez es capturado, comienza el proceso de descomposición (9).

La carga bacteriana propia y aquella incorporada por los manejos post-captura dan como resultado una proliferación bacteriana, que resulta en la formación de las aminas biogénicas, la cual va aumentando al no implementarse las buenas prácticas de manufactura en el proceso de manipulación del pez. Cuando están presentes en carne fresca y procesada, las aminas biogénicas son indicadores de deficiente calidad sanitaria, elevada contaminación y condiciones inapropiadas durante el procesamiento y/o almacenamiento, que afectan la higiene alimentaria (14).

3.2.2 Histamina

La histamina es una amina biogénica, producto de la descarboxilación bacteriana del aminoácido L-histidina.

La histamina es un compuesto de presencia normal en el humano, considerado, además, como un potente vasodilatador, mediador importante de

reacciones alérgicas e inflamatorias inmediatas. Tiene un papel fundamental en la secreción de ácido gástrico y actúa como neurotransmisor y neuromodulador (2,17).

El nivel de histamina en la sangre normalmente es cercano a los 25mg/L. Cuando el nivel de histamina circulante es muy alto, se generan desequilibrios que alteran el estado normal de la persona, causando una intoxicación. Históricamente, esta intoxicación se denominó intoxicación por escómbridos debido a la frecuente asociación con peces de la Familia *Escombridae*, entre los que se incluye el *atún* (11).

El pescado como alimento, constituye una de las principales fuentes de proteínas de alta calidad que el ser humano requiere para su alimentación; por eso la intoxicación por histamina es un problema de alcance mundial en los países donde los consumidores ingieren pescado que contiene altos niveles de histamina. Es una enfermedad benigna, su período de incubación es muy corto (de pocos minutos a pocas horas) y la duración de la enfermedad es corta (pocas horas). Los síntomas más comunes son las alergias cutáneas, como el rubor facial o bucal, urticaria, o edema localizado, pero también puede verse afectado el tracto gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea), o pueden producirse complicaciones neurológicas (dolor de cabeza, hormigueo, sensación de quemazón en la boca) (11).

La razón de por que este tipo de alimentos es uno de los más susceptibles a la contaminación por histamina, se debe a que los mismos presentan histidina libre en los fluidos musculares, proporcionando un medio muy propicio para la formación bacteriana, como ya se mencionó. Entre las bacterias productoras de histamina se pueden mencionar ciertas *Enterobacteriaceae*, algunos *Vibrio* sp., y unos pocos *Clostridium* y *Lactobacillus* sp. Las productoras más potentes de histamina son *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alves*. Estas bacterias pueden encontrarse en la mayoría de los pescados, probablemente como resultado de una contaminación post-captura. Este tipo

de bacterias se desarrollan bien a 10°C, pero a 5°C el desarrollo se retarda considerablemente y existen estudios que mencionan que se puede inhibir la formación de histamina por debajo de 0°C (4, 16, 21).

Debe recalcar que una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que se provoque la enfermedad es muy alto, ya que la histamina es muy resistente al calor, y aunque el pescado se haya cocido, enlatado o haya sido sometido a cualquier otro tratamiento térmico antes de su consumo, la histamina no se destruye. Por esta razón la histamina es usada por las normativas internacionales como indicador de baja calidad de muchos productos pesqueros. Por ejemplo; la Unión Europea establece en el Reglamento (CE) No. 2073/2005, que los productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina (particularmente especies de pescados de las familias siguientes: *Escombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombrosidae*), no deberán presentar un contenido de histamina superior a 100 mg/kg (5,11, 24).

3.3 ANÁLISIS DE AMINAS BIOGÉNICAS

Los primeros estudios sobre la formación de aminas biogénicas se realizaron utilizando métodos espectrofluorométricos con los que solo se valoraban algunas aminas de forma individual. Sin embargo estos métodos tenían muchas deficiencias y en muchas ocasiones la información obtenida sobre la formación de aminas biogénicas era incompleta.

En estudios posteriores se ha utilizado la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) que permite determinar de forma simultánea todas las aminas presentes. La cromatografía de líquidos de alta eficacia con detección en UV o en fluorescencia es la metodología más utilizada para la determinación de aminas biogénicas en muestras de alimentos (1, 18, 19, 20)

Un inconveniente de la cuantificación de las aminas biogénicas por medio de la cromatografía líquida, es que la mayoría de los aminoácidos no contienen cromóforos adecuados para su detección, excepto a longitudes de onda muy cortas, cercanas a los 200 nm (18, 19, 20).

Como hay muchos compuestos que absorben a esta longitud de onda el análisis se vuelve muy complicado ya que pueden estar presentes muchas interferencias, como por ejemplo la mayoría de los disolventes y otros componentes de las muestras. Por esta razón en la mayoría de los casos, es necesario convertir la aminas biogénicas en derivados adecuados antes o después de la separación cromatográfica por medio de una reacción entre las aminas y un reactivo externo. Este procedimiento es denominado *derivatización* y existen dos variantes del mismo; derivatización pre- y post-columna.

El cloruro de dansilo y el ortoftaldehído (OPA) son los reactivos más utilizados. En el caso del cloruro de dansilo, la reacción se realiza antes de la separación cromatográfica y en el caso del OPA, la misma se puede hacer antes o después de la columna.

Las opiniones de investigadores sobre las ventajas relativas de la derivatización pre- o postcolumna, de aminoácidos serán determinadas por los requerimientos de la aplicación específica. Factores como la sensibilidad requerida en la detección, cantidad de muestra disponible, tipo de muestra, fuente de muestra, velocidad de análisis y reproducibilidad e incluso consideraciones económicas, influirán en la elección entre la derivatización pre- o postcolumna de aminoácidos.

Una gran desventaja del uso de la derivatización post-columna, es que se requiere de la adición de una o más partes adicionales al cromatógrafo líquido provocando un incremento el costo del análisis.

Una de las desventajas de la derivatización precolumna, es que una porción sustancial de todos los derivados, será idéntica (la parte del reactivo de derivatización). Las pequeñas diferencias entre las cadenas laterales de los aminoácidos derivatizados tendrán un efecto menor en el comportamiento cromatográfico del derivado, que en el caso del comportamiento cromatográfico de los aminoácidos solos. Sin embargo, ya que las derivatizaciones precolumna eliminan la necesidad de utilizar reactores post-columna costosos, la derivatización precolumna se está volviendo rápidamente el método de elección (18, 19, 20).

3.3.1 Reactivos de derivatización precolumna

Se han investigado diferentes reactivos de derivatización precolumna, pero ninguno ha podido alcanzar una aceptación universal debido a la amplia gama de matrices biológicas. Por esta razón, la elección del reactivo derivatizante de aminoácidos será determinada por los requerimientos de la aplicación específica. A continuación se describen los reactivos derivatizantes más utilizados para esta técnica.

3.3.1.1 Ortoftaldehído (OPA)

Este es uno de los reactivos de precolumna comúnmente más utilizados en la cromatografía líquida de alta eficiencia, para la determinación de aminoácidos primarios.

El OPA es un reactivo que no tiene fluorescencia natural, la desarrolla al reaccionar con funciones amino primarias, dando lugar a un derivado isoidolico como se muestra en la figura No.1. La reacción tiene lugar en medio acuoso a pH fuertemente alcalino en presencia de un agente reductor como el 2-mercapto-etanol, 3-mercapto-1-propanol o etanotiol para formar derivados altamente fluorescentes (18, 19, 20).

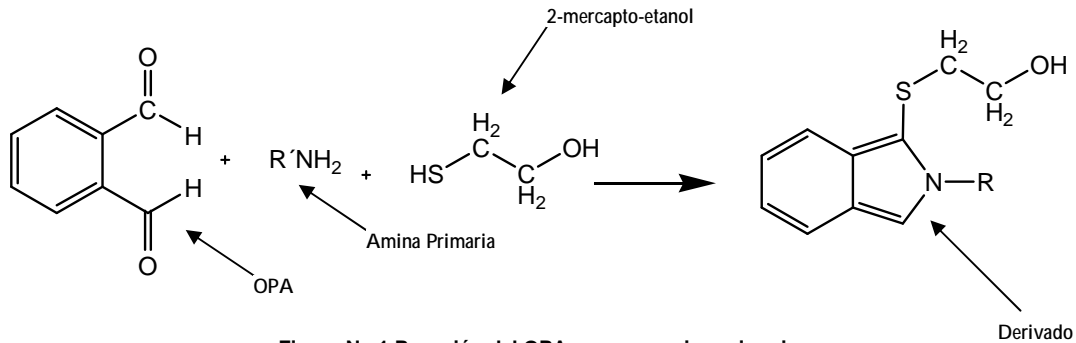


Figura No.1 Reacción del OPA con una amina primaria

Una de las ventajas que presenta este método de derivatización, es que la reacción es rápida (menos de 5 minutos), tiene alta especificidad y sensibilidad de la detección fluorescente, no hay necesidad de remover el exceso de OPA antes de la inyección de la muestra ya que el OPA por si solo no interfiere con la separación o la detección. Otra ventaja del mismo, es que puede emplearse tanto para la derivatización post-columna como para la pre-columna (18, 19, 20).

Sin embargo, este reactivo tiene la desventaja que forma un derivado inestable y por esta razón, es necesario tener una completa automatización de la reacción pre-columna controlando de manera muy precisa el tiempo de reacción. Al no controlar por completo estas condiciones, el método es fuertemente afectado a lo que se refiere reproducibilidad y sensibilidad (18, 19, 20).

3.3.1.2 Cloruro de dansilo

El cloruro de dansilo (cloruro de 5-N,N-dimetilamino-naftalen-1-sulfonilo) es un reactivo de derivatización bien conocido para la determinación de aminas primarias y secundarias. La reacción con el cloruro de dansilo y la amina, ocurre vía el mecanismo de sustitución nucleofílica (SN2), siendo esta una reacción concertada de un solo paso. El producto de derivatización es un dansilaminoácido según la reacción que aparece descrita en la figura No.2. (10,18).

Los aminoácidos derivados con este reactivo, son altamente fluorescentes por lo que se puede usar un detector de fluorescencia (FLD) para su cuantificación. También es posible detectar a los derivados de este reactivo en la región ultravioleta, por lo que hace posible de cuantificar a los mismos con un detector UV (18).

Los derivados de aminoácidos de este reactivo son altamente estables, fácilmente separables en el HPLC y detectables a muy bajas concentraciones. Sin embargo, en comparación con el OPA, los tiempos requeridos para llevar a cabo la dansilación oscilan, entre 12 horas a temperatura ambiente y cercano a los 60 minutos a 37-45°C. Otro inconveniente con esta reacción es que el derivado es fotosensible por lo que hay que evitar la exposición a la luz; requiere de la presencia de muchas sales, reactivos y además el costo del cloruro de dansilo es elevado (18, 19, 20).

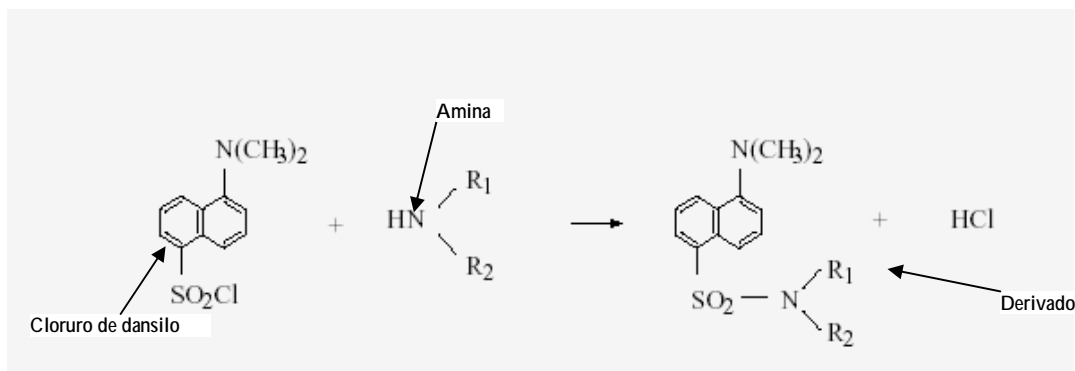


Figura No.2 Reacción de cloruro de dansilo con una amina

3.4 CARACTERÍSTICAS DEL ATÚN

Bajo el nombre de "atunes" se incluyen diversos tipos de peces de la familia de los Escómbridos (*Escombridae*), que viven en bancos próximos a la superficie en la mayor parte de las aguas del mundo y cuya carne es muy apreciada desde los tiempos más remotos. Algunos de estos peces pertenecen al género *Thunnus* y son considerados los verdaderos atunes, como el "atún aleta azul" (*Thunnus thynnus*), el "atún aleta amarilla" (*Thunnus albacares*) y la "albácora" (*Thunnus alalunga*), y hay otros cuyas características se consideran similares, como el "barrilete" (*Katsuwonus pelamis*) y el "bonito del Atlántico" (*Sarda sarda*); todos pertenecen a la familia de los escómbridos (*Escombridae*) (22).

Los *atunes* son peces con características morfológicas que les permiten ser buenos nadadores; tienen cuerpo fusiforme, cabeza pronunciada en forma de pirámide triangular y boca relativamente pequeña con respecto al desarrollo del cráneo. Las escamas que cubren su dura y muy resistente piel son pequeñas, poco evidentes y lisas; la piel está lubricada con un moco que reduce la fricción con el agua. La forma del cuerpo les permite nadar grandes distancias y alcanzar altas velocidades de hasta 70 kilómetros por hora (22).

Presentan dos aletas dorsales muy próximas, rígidas y robustas y una caudal fuerte con forma de arco terminado en dos zonas puntiagudas que le dan aspecto de media luna. Su coloración es típica de los peces pelágicos con el dorso azul oscuro y el vientre blanco plateado con reflejos irisados. Las aletas van del pardo al amarillo (22).

3.5 LA INDUSTRIA ATUNERA DE GUATEMALA

Guatemala dispone de costas marinas en el Océano Pacífico y en el Atlántico. Especialmente el Océano Pacífico es rico en recursos camaroneros y pesqueros. El “atún”, constituye el segundo producto de valor del sector hidrobiológico, pues el 34.5% pertenece a lomos de atún.

La privilegiada posición geográfica de Guatemala, más Certificaciones de Plantas Procesadoras otorgadas por la UE, ha facilitado el ingreso de este producto a ese mercado. Esto ha atraído inversión extranjera, que muchas veces procesa hasta el 80% del pescado desembarcado por las flotas pesqueras grandes, medianas, y pequeña escala (13).

Un ejemplo de ello, es una empresa ubicada en la costa sur rumbo a Puerto Quetzal (Rianxeira), quienes construyeron una planta procesadora para el recurso del atún que ha logrado captar no solo la producción nacional sino la de otros buques de bandera extranjera. Esta empresa estableció en Guatemala la planta procesadora de atún más grande y moderna de Centroamérica y la cuarta en tamaño de América Latina.

En el año 2006, se logró atraer a más de 20 buques atuneros. Debido a esto, la producción estimada a nivel nacional, para el año 2000 fue de una captura de 5560 toneladas métricas; para el año 2007 se contó con 8 embarcaciones para la captura de atún obteniendo un volumen por arriba de 12200 toneladas métricas, según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en ingles) y la Unidad de Manejo de la Pesca y Acuicultura (UNIPESCA), este último, ente rector de la pesca en Guatemala, responsable de administrar, conceder, autorizar y/o denegar la concesión de Licencias de Pesca Marítima (13).

Las especies de captura más comunes en Guatemala son: Atún bonito (*Sarda sarda*) del Atlántico, Atún Patudo (*Parathunnus obesus*), Atún Aleta Amarilla (*Thunnus albacares*) y el Albácora (*Thunnus alalunga*), las cuales se comercializan como pez vivo, en fresco o refrigerado según especie (excepto filetes); y finalmente, se puede comercializar como lomos de atún cocidos o congelados. Este último es el de mayor demanda en el mercado internacional (anexo 4).

Guatemala exporta el atún a varios países del mundo, sin embargo la Unión Europea como bloque es el mayor importador de este producto. Por esta razón la industria atunera guatemalteca enfoca el control de calidad del mismo para satisfacer las altas exigencias de dicho importador, rigiéndose por las siguientes normas:

- Reglamento (CE) No. 178/2002, por el que se establecen los principios generales sobre la inocuidad de los alimentos y la trazabilidad.
- Reglamento (CE) No. 852/2004 y reglamento (CE) No. 853/2004, sobre la higiene de los productos alimenticios y sobre las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, respectivamente.
- Reglamento (CE) No. 854/2004 y Reglamento (CE) No. 882/2004 sobre controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Reglamento (CE) No. 1935/2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.
- *Reglamento (CE) No. 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.*

IV. JUSTIFICACIÓN

Varias corporaciones europeas han invertido cerca de 45 millones de dólares en la industria atunera de Guatemala, para establecer una base regional de operaciones pesqueras, procesamiento y empaquetado de atún para exportación.

Estas inversiones han provocado un impacto socio-económico positivo en el país, haciendo que la industria atunera de Guatemala llegue a ser la más grande y moderna de Centroamérica y la cuarta en tamaño de América Latina.

Para que el producto pueda acceder al mercado internacional, se debe cumplir con requerimientos de calidad internacional. Uno de los parámetros de calidad es la determinación del contenido de histamina presente en el atún.

Controlar el contenido de dicha amina en el atún, es de suma importancia, ya que se trata de una amina biogénica que causa intoxicación al ser humano. Esta intoxicación afecta a diferentes alimentos pero es mucho más frecuente en el pescado y específicamente en aquellos del orden de los escómbridos al cual pertenece el atún.

Por lo anteriormente descrito, el estudio de esta toxina es de suma importancia y es necesario establecer si la misma se encuentra dentro de los rangos permitidos para que el atún guatemalteco pueda ser exportado al mercado de la Unión Europea.

La presencia y concentración de esta toxina es muy difícil de detectar, por lo que se requiere disponer de un método normalizado y reconocido internacionalmente por los entes oficiales de los países socios comerciales, para que entes nacionales puedan llevar a cabo un control oficial para determinar la concentración de esta toxina en muestras de atún de tal manera de facilitar el ingreso del producto al mercado internacional; por ésto y los anteriormente descrito se justificó la realización de esta investigación.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Determinar cuantitativamente, con un método normalizado y reconocido internacionalmente; los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún proveniente de la atunera más grande de Guatemala.

5.2. Objetivos Específicos

5.2.1 Evaluar un método normalizado para la cuantificación de histamina a través de su límite de detección, cuantificación, linealidad, precisión y exactitud.

5.2.3 Determinar si los valores de histamina en las muestras de lomo de atún están dentro de los límites permisibles para la exportación del mismo al mercado internacional.

VI. HIPÓTESIS

Por medio de la metodología propuesta por Eerola *et al.* (6), puede determinarse si la concentración de histamina en las muestras de lomo de atún provenientes de la industria atunera guatemalteca, no sobrepasa el límite permitido para la exportación del mismo al mercado internacional.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo de trabajo

En el estudio se define como “población atún de diversas especies provenientes de la atunera más grande de Guatemala, y como “unidad muestral” 4 gramos de lomo de atún.

7.2. Muestra y diseño de muestreo

Para la cuantificación de histamina, se seleccionaron al azar muestras de un lote procesado, provenientes de la planta atunera Rainxeira de Puerto Quetzal.

El número de muestras (n) se calculó estadísticamente por medio de la siguiente fórmula; siendo σ^2 la varianza y asumiendo un nivel de confianza (NC) de 95% = 1.96:

$$n = \frac{NC^2 \sigma^2}{\sigma^2/4} = 4 NC^2 = 16 \text{ muestras}$$

7.3. Medios

7.3.1. Humanos:

Estudiante: Harold Alexander Flores Quintana

Asesores: Licda. Diana Pinagel Cifuentes

Inga. María Gabriela Álvarez de la Cruz

Colaboradores: Personal Técnico y profesional del Área de Contaminantes de Ambiente y Salud (CAS) del Laboratorio Nacional de Salud (LNS).

7.3.2. Institucionales:

Laboratorio del Área de Contaminantes de Ambiente y Salud (CAS), del Laboratorio Nacional de Salud (LNS).

7.4. Materiales

7.4.1. Equipo:

1. Pipeta automática ajustable de 25-250, 100-1000 y de 500-2500 microlitros.
2. Balanza analítica.
3. Balanza semianalítica
4. Equipo de filtración a vacío "MILLIPORE" y microfiltros (0.45µm)
5. Equipo de filtración de agua (ultrapura).
6. pH-metro.
7. Homogenizador Ultra-Turrax.
8. Centrifuga (4000 RPM)
9. Agitador tipo Vortex.
10. Equipo de cromatografía líquida.

7.4.2. Cristalería:

1. Tubos de ensayo de 25 mL.
2. Tubos de ensayo de 10 y 25 mL con rosca.
3. Pipetas volumétricas de 10 y 20 mL.
4. Matraces aforados de 10, 25, 50, 100 mL .

7.4.3. Otros:

1. Filtros de papel de 11 y 15 cm de diámetro.

7.3.4. Reactivos:

1. Hidróxido de sodio para análisis.
2. Ácido perclórico 70-72% para análisis.
3. Acetato de amonio para análisis.
4. Agua Ultra pura
5. Acetonitrilo grado HPLC.
6. Cloruro de dansilo 99% Sigma.
7. Acetona para análisis.
8. Bicarbonato de sodio para análisis.
9. Hidróxido de amonio 30% para análisis.
10. Diclorohidrato de histamina min 99%.

7.5. Procedimiento

Se determinó la presencia y concentración de histamina, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siguiendo la metodología propuesta por Eerola y col. (6).

7.5.1 Preparación de la muestra y extracción:

Se pesan 4 gramos de muestra homogenizada en tubos centrifuga de 50 ml, se añaden 20ml de ácido perclórico 0.4M. Se homogeniza en Ultra-Turrax y se centrifugan durante 20 min a 4000 r.p.m. Se filtra el sobrenadante con papel filtro Whatman No.4.

7.5.2 Derivatización de muestra y estándares

Se toma 1 ml de extracto y se alcaliniza con 200 µl de NaOH 2N. Se añaden 300 µl de disolución saturada de bicarbonato de sodio y después 2 ml de disolución de cloruro de dansilo (10mg/ml en acetona), manteniéndose a 46°C durante 45 min. Para eliminar los residuos de cloruro de dansilo, se añaden 100µl de hidróxido de amonio concentrado. Se deja en reposo 30 min y se lleva a 5 ml con acetonitrilo. Se centrifuga durante 5 min a 4000 r.p.m. filtrándose el sobrenadante con papel filtro Whatman No.4. La derivatización de los estándares de 1, 2, 5, 10, 20 mg/l para la calibración se hace por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito para la muestra.

7.5.3 Separación cromatográfica

Se inyectan 20 µl de extracto al cromatógrafo líquido los cuales se detectan la salida de una columna Nucleosil® C18 a 254 nm. Para la separación cromatográfica se utilizó el siguiente gradiente a un flujo de 1 ml/min:

Tiempo (min)	Acetato de amonio 0.1M: Acetonitrilo (1:1)	Acetonitrilo
0	100%	0%
24	20%	80%
25	100%	0%
30	100%	0%

7.5.4 Análisis de datos

La detección y cuantificación de la histamina se realizó por comparación del tiempo de retención de la muestra y del estándar de referencia, obteniendo la concentración de histamina por medio de la curva de calibración de 5 puntos para el método cromatográfico mediante regresión lineal. Cada estándar se inyectó por triplicado, los cuales se aceptaron cuando la desviación estándar relativa de las áreas de los tres patrones utilizados en cada punto de calibración no superó un valor del 10%.

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de la recta se comprobaron mediante el coeficiente de determinación r^2 y un análisis de varianza para regresión.

Los límites de detección y cuantificación fueron determinados por el método basado en la relación señal/ruido. Para estimar los límites de detección y cuantificación se midió la magnitud del ruido realizando mediciones sobre la línea base de un cromatograma obtenido con un blanco de muestra, midiéndose su amplitud.

Generalmente se define el límite de detección como la concentración que origina una relación señal/ruido (S/R), igual a 3. El límite de cuantificación corresponde a una relación S/R de 10. La magnitud del ruido se multiplicó por el factor correspondiente a cada tipo de límite y se convirtió en una concentración mediante la curva de calibración.

La precisión del método se obtuvo de la repetibilidad de 10 determinaciones de la misma muestra, de las cuales se calculó un promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación del método. La reproducibilidad del método se obtuvo comparando datos de dos analistas realizando 10 determinaciones cada uno. Los datos obtenidos de estos parámetros fueron sometidos a un análisis de t de student evaluándose la homogeneidad de las varianzas.

La exactitud del método fue establecida con los mismos datos de linealidad, por medio del porcentaje de recuperación.

A las muestras de lomo atún se le cuantificó el contenido de histamina y se comparó con el límite permisible establecido por la Unión Europea para la exportación del mismo al mercado internacional.

VIII. RESULTADOS

8.1. Linealidad:

Tabla 8.1.1.
Concentración de Histamina contra área

Con estos datos se elaboró una curva de calibración; obteniéndose los siguientes resultados:

Ecuación de la curva de calibración: $y = 52.894x - 7.2827$
 $r^2 = 0.9997$

Donde:

Y = Área de histamina

X = Concentración de histamina

r^2 = Coeficiente de determinación

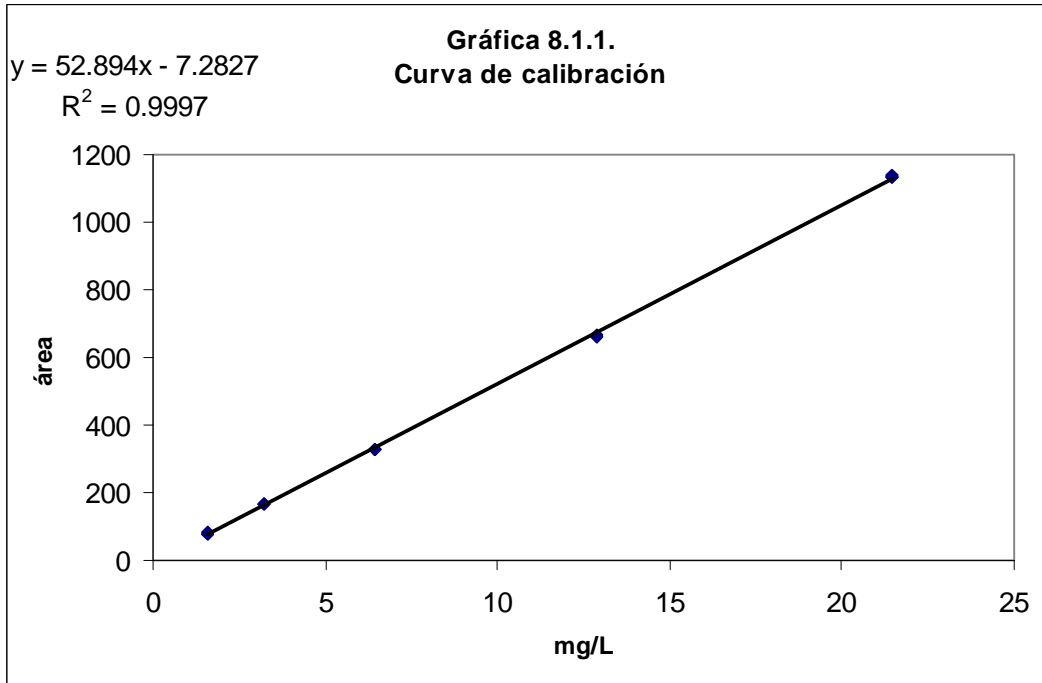


Tabla 8.1.2.

Análisis de varianza entre área y concentración de histamina

8.2. Exactitud:

Tabla 8.2.1.

Tabla de resultados de la exactitud del método

Con el promedio del porcentaje de recuperación se establece lo siguiente:

 $H_0: \mu$

$p > \alpha$ H_0 no se rechaza

8.3. Límite de detección y cuantificación:

Tabla 8.3.1

Resultados del límite de detección y cuantificación

8.4. Precisión:

Tabla 8.4.1
Resultados de la repetibilidad del método

σ

Tabla 8.4.2.
Resultados de la reproducibilidad del método

σ

Tabla 8.4.3.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Con la prueba t para medidas de dos muestras emparejadas se establece la siguiente hipótesis:

$$\mu = \mu$$

Como $p > \alpha$, H_0 no se rechaza, lo que indica que no hay diferencia significativa entre los analistas.

8.5. Resultados de las muestras de atún:

Tabla 8.5.1

Concentración de histamina en las muestras de atún

* = La concentración de la muestra está por debajo del límite de cuantificación del método
(1.67mg/L).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de que entes oficiales pudieran disponer de un método reconocido internacionalmente para la cuantificación de histamina; se evaluó el método propuesto por Eerola y col. (6), a través de su linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación.

De los datos presentados en la tabla 8.1.1. se obtienen resultados que demuestran que el método utilizado en ese rango de concentración es lineal.

El primer parámetro que demuestra esto, es la curva de regresión lineal, Gráfica 8.1.1., del cual se obtiene un coeficiente de determinación (r^2) de: 0.9997 a partir de las áreas dadas por el cromatógrafo y las concentraciones de histamina. Como este coeficiente es muy próximo a 1, la correlación entre la respuesta del cromatógrafo y la concentración de histamina es muy fuerte lo que indica que hay linealidad. Esto también se logró comprobar a través del análisis de varianza entre el área y la concentración de histamina de la tabla 8.1.2. donde se demuestra que existe una linealidad significativa ya que el análisis de la misma, muestra que $p < 0.00001$.

La exactitud del método fue determinada con los datos experimentales de la linealidad (tabla 8.2.1.), donde se compara las concentraciones experimentales contra las concentraciones teóricas, obteniéndose porcentajes de recuperación por cada punto de concentración. El promedio de dichos datos fue de 100.78% (tabla 8.2.1.)

Para evaluar si los datos obtenidos eran validos, los mismos fueron sometidos a un análisis de t de Student; dando como resultado que el valor de t de Student es superiores a su valor crítico entre el porcentaje de recuperación media y el 100%. Esto significa que el método tiene la exactitud requerida pudiéndose tomar el valor del porcentaje de recuperación como válido.

El límite de detección obtenido fue de 0.50mg/L (correspondiente a 2.5mg/kg de histamina en atún) y el límite de cuantificación fue de 1.67mg/L (correspondiente a 8.35mg/kg de histamina en atún) (tabla 8.3.1.).

Estos límites son los que definen la concentración más baja detectable y la concentración más baja cuantificable por el método. Dichos límites no tienen estipulado un valor aceptable o rechazable, pero dan información importante sobre el método ya que determina el alcance que éste pueda tener al analizar las concentraciones más bajas requeridas. Los límites obtenidos para éste método son válidos, ya que están muy por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea en el Reglamento (CE) No. 2073/2005 para la exportación de atún al mercado internacional, donde establecen que la concentración del contenido de histamina en el atún no deberá superar 100mg/kg. (5,11, 24)

La precisión del método fue evaluada a través de la repetibilidad y reproducibilidad del mismo. La primera fue determinada por medio del análisis de 10 determinaciones de una misma muestra, obteniéndose una media, desviación estándar relativa y un coeficiente de variación (*RSD*), equivalente a 1.29% (tabla 8.4.2). Este dato es el que indica las dispersiones de resultados obtenidos de una misma muestra y define si el campo es repetible o no.

No existe un criterio definido para aceptar o rechazar un *RSD*%. Esto dependerá de la técnica, de la calidad instrumental y del efecto de los componentes de la matriz de la muestra.

Según El Manual del Programa de verificación de métodos de la AOAC, las muestras medioambientales y de alimentos, pueden oscilar entre 2% y más del 20% y usando estas tablas se estima que el método deberá tener un coeficiente de variación entre 5.3 - 7.3% (anexo1, tabla 1). Otro criterio de aceptación del coeficiente de variación de la repetibilidad del método, es por medio de la fórmula de Horwitz, donde se puede percibir que el coeficiente de

variación de aceptación se encuentra entre 8 – 11% (anexo 1, tabla 2). A partir de estos dos criterios de aceptación se puede concluir que el método es repetible ya que está por debajo de ambos.

El segundo parámetro evaluado para la precisión del método, fue la reproducibilidad. Este fue efectuado por medio de la determinación del análisis de las mismas muestras por dos analistas (tabla 8.4.2.). Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de t de Student; dando como resultado que $p > \alpha$, lo que significa que la hipótesis no se rechaza, lo que indica que no hay diferencia significativa entre los analistas y que si hay reproducibilidad entre ambos analistas. Esto muestra que el método no posee errores sistemáticos y que la variación del personal técnico no influirá los resultados obtenidos.

Para la cuantificación de histamina en las muestras de lomo de atún, se seleccionaron al azar muestras de un lote procesado, proveniente de la planta atunera más grande de Guatemala. Los resultados obtenidos se muestran expresados en mg/kg en la tabla 8.5.1. Como se observa, 15 de 16 muestras, tienen una concentración de histamina por debajo del límite de cuantificación y solamente una muestra se logra cuantificar. A partir de estos resultados no es posible obtener la desviación estándar y el intervalo de confianza del 95% para la población; con lo que se concluye que la concentración de histamina en la población objetivo se encuentra muy por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea para la exportación de lomo de atún al mercado internacional y las muestras analizadas se considerarán aptas para la exportación, ya que ninguna supera el valor establecido de 100 mg/kg.

X. CONCLUSIONES

10.1. En la evaluación de linealidad del estudio, quedo demostrado que existe una linealidad significativa entre concentración de analito en lomo de atún y la respuesta instrumental en el rango de 1.61-21.46 mg/L.

10.2. Por medio de la prueba de hipótesis, se comprueba que el método planteado es exacto, confirmándose con porcentajes de recuperación satisfactorios.

10.3. Los límites de detección (0.50 mg/L) y cuantificación (1.67 mg/L) del método propuesto para el presente estudio, satisfacen las necesidades requeridas por el Reglamento (CE) No. 2073/2005.

10.4. Los coeficientes de variación obtenidos y la prueba de hipótesis en el estudio de precisión, indican que la repetibilidad y la reproducibilidad para el método planteado son satisfactorias, además se logra mostrar que el método no posee errores sistemáticos y que la aplicación del método por diferentes analistas no influye en los resultados obtenidos.

10.5. La concentración de histamina en las muestras analizadas es menor a la concentración establecida (100mg/kg) por el Reglamento (CE) No. 2073/2005 y las mismas se consideran aptas para la exportación, por lo que la hipótesis de la investigación es aceptada.

XI. RECOMENDACIONES

11.1. Utilizar el método evaluado para la determinación de histamina en lomo de atún.

11.2. Participar en pruebas de intercomparación de laboratorios para monitorear el comportamiento del método propuesto.

11.3. Determinar la incertidumbre del método.

XII. REFERENCIAS

1. Benitez Pacheco, I. 1999. "Determinación y Cuantificación de Aminas biogénicas por medio de cromatografía líquida de alta resolución en productos carnicos procesados, expendidos en la ciudad capital". 51p. Tesis de Licenciada en Química. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Química.
2. Bertram G. Katzung. "Farmacología básica y clínica"; Cap. 16. Histamina, serotonina y alcaloides del cornezuelo del centeno. Trad. Dr. Ignacio de Jesús Monteón Batalla. Novena edición en español. México. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. Pag. 261-264.
3. Bover, S.; Izquierdo, M.; Vidal, C. 2001. "Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar". Meat SCI. 57: 215-221.
4. Centeno S. y Rossianny R. 2005. "Evaluación microbiológica de pescados congelados producidos en Cumaná, Estado Sucre, Venezuela". Vol. 15 (no.2): p.168-175.
5. Diario Oficial de la Unión Europea. L 338. El Reglamento (CE) No. 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
6. Eerola, S.; Hinkanen, R.; Lindfords, E.; Hirvi, T. 1993 "Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages". Journal of AOAC International, 76 (3): 575-577.
7. Fox B.A. y Cameron A. "Ciencia de los alimentos, Nutrición y Salud". Trad. Carlos Alberto García. Cuba. Editorial LIMUSA. Pag. 52-53.
8. Freeman, B.A. 1988 "Microbiología de Burrows". 22 Ed. USA. Editorial Interamericana McGraw-Hill.
9. Galleguillos M. 1994. "Aminas Biogénicas — Nuevos Indicadores Químicos Utilizados Como Criterios De Calidad En Harina De Pescado".

- Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. FAO-México. No.16. p.269.
10. Groutas C. "Mecanismos de reacción en química orgánica". Primera edición. México, Editorial Interamericana McGraw-Hill, 2002. P 65-69.
 11. Huss H.H. 1999. "Aspectos de la calidad asociados con los productos pesqueros". Dinamarca. FAO documento Técnico de pesca 334.
 12. Huss H.H. 1999. "Evaluación de la calidad del pescado". Dinamarca. FAO documento Técnico de pesca 348.
 13. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA), Universidad Rafael Landívar (URL) y Asociación Instituto de Incidencia Ambiental (IIA), 2006. "Perfil Ambiental de Guatemala: tendencias y reflexiones sobre la gestión ambiental". Guatemala, P 17-25.
 14. Izquierdo, P.; Allara, M.; Torres, M.; G *et al.* 2004. "Aminas Biógenas y Crecimiento Bacteriano en Carne de Hamburguesas". *RC*, vol.14, (no.1): p.07-11.
 15. Izquierdo, P.; Allara, M.; Torres, G *et al.* 2004. "Evaluación Bacteriológica y contenido de histamina en pescado desmenuzado precocido en Venezuela". *Rev. Cient. FCV-LUZ*. vol. 14, (no.5): p. 467-473.
 16. Kerr, M.; Lawick, S.; Aguirre y Rayner C. 2002. "Effect of Storage Conditions on Histamine Formation in Fresh and Canned Tuna". Public Health Division. USA. P. 5-19.
 17. Lehninger A. "Principios de Bioquímica", 3ª ed. Barcelona España, Ediciones Omega SA, 2001. P 844 -845.
 18. Martínez, M.; Moctezuma C. 2006. "Espectrofluorimetría" 67 p. Universidad Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.
 19. Martínez Y. 2005. "Aportaciones de la química analítica a la resolución de diversos problemas medioambientales". 245 p. Universidad de Valencia. Facultad de Química. Departamento de Química Analítica.
 20. Meseguer Lloret S. 2004. "Métodos Quimioluminiscentes en Química Analítica". 252 p. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Química. Departamento de Química Analítica.

21. Millán, R.; Izquierdo, P.; Allara, M.; *et al.* 2003. "Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la calidad microbiológica y la producción de histamina en la Lisa (*Mugil curema*)". Rev. Cient. FCV-LUZ. Vol. 13, (5), 339-346.
22. Pesquería de atún. México. Sitio de Ciencia Vol. 2. Consultado el 1 de julio 2008. Disponible
<http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/oceano10.htm>
23. Pinillos, M.A.; Gomez, J.; Elizalde, J. *et al.* Intoxicación por alimentos, plantas y setas. *Anales Sis San Navarra*. [online]. [citado 2009-01-19], pp. 243-263. Disponible en:
<http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200015&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1137-6627.
24. Potter, Norman N. "La Ciencia de los alimentos". Unica Ed. México. Editorial HARLA, P.47-51.
25. Reglamento (CE) No. 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 338 de 22.12.2005, p.11-14.
26. Rodríguez Jonson, V. 2002. "Análisis de materias primas y evaluación de procedimientos de limpieza. En la compañía enlatadora nacional (CENSA). Costa Rica. 105p. Tesis Ingeniería en Biotecnología. Instituto técnico de Costa Rica (TEC). Escuela de Biología.
27. Tapia Salazar, M.; Cruz Suárez L. *et al.* Junio 2002. "¿Son las aminas biogénicas responsables de reducir el rendimiento del camarón azul?" Ciencia UANL, vol.5, p.165-172.
28. Tinajas Ruiz, A. 1998. "Intoxicación por Histamina". JANO EMC. España. Vol 55. No. 1269. p. 62.

XIII ANEXOS

13.1 Tablas de coeficiente de variación	41
13.2 Cromatograma de una curva calibración.....	42
13.3 Cromatograma de una muestra.....	43
13.4 Lomos de atún.....	44

13.1 ANEXO 1

Tabla 1
AOAC Peer Verified methods Program
Analyte recovery at different concentrations

Analyte %	Analyte ratio	Unit	RSD (%)
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1%	2.7
0.1	10-3	0.1 %	3.7
0.01	10-4	100 ppm	5.3
0.001	10-5	10 ppm	7.3
0.0001	10-6	1 ppm	11
0.00001	10-7	100 ppb	15
0.000001	10-8	10 ppb	21
0.0000001	10-9	1 ppb	30

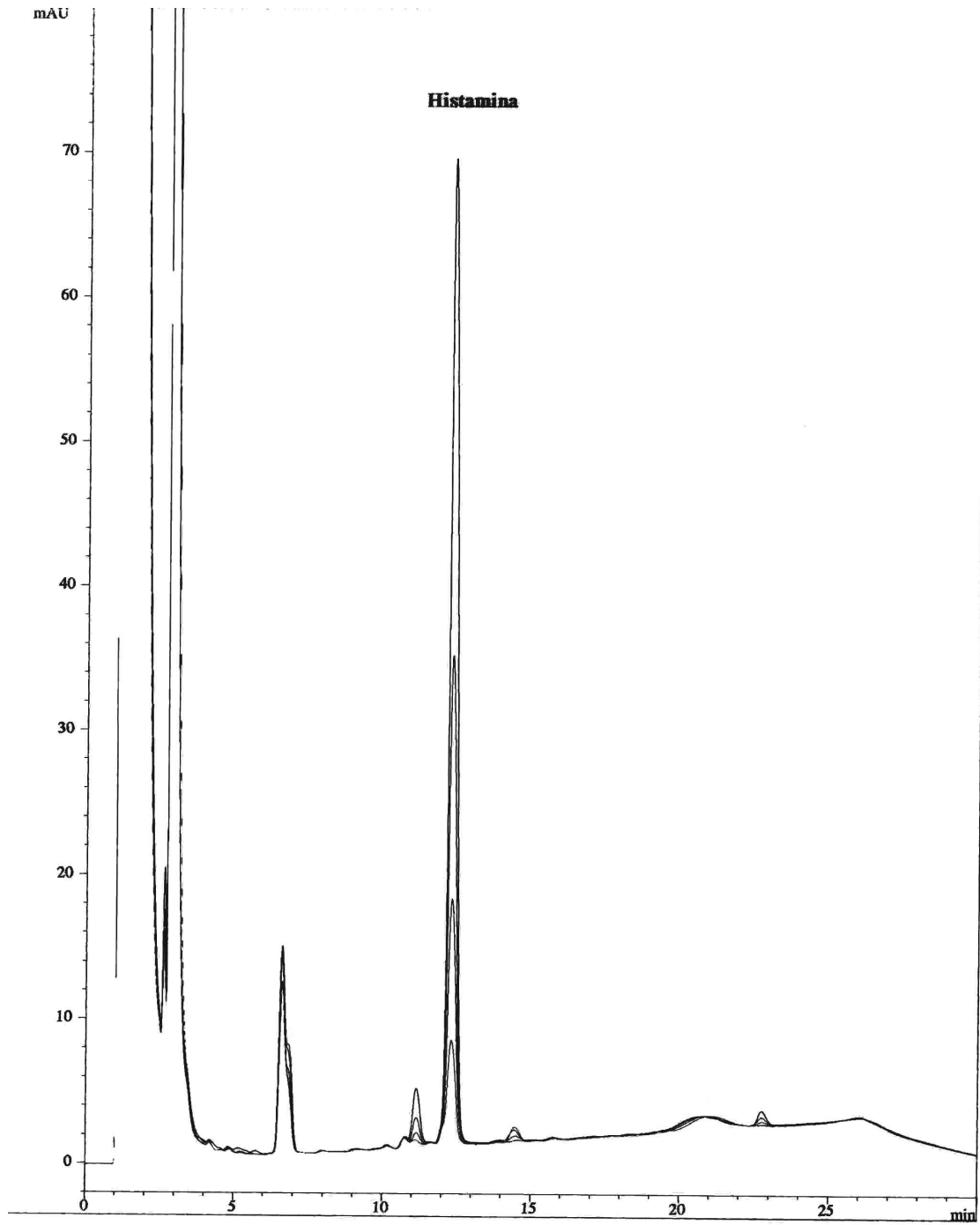
Tabla 2
Criterio empírico para aceptar RSD% o CV%
Según Fórmula Horwitz

$$RSD\% < 2^{(1-0.2 \log \frac{C\%}{100})}$$

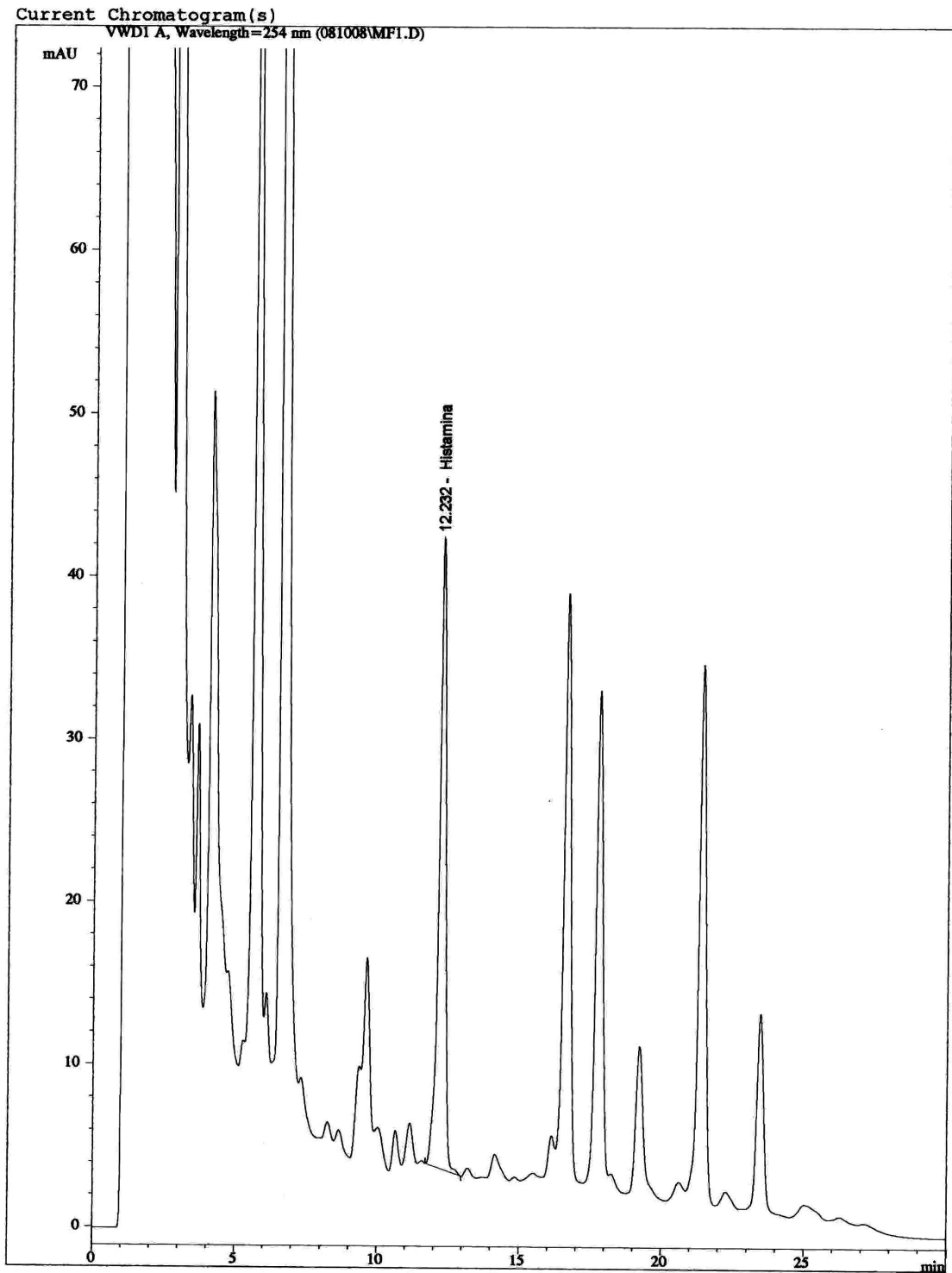
RSD%	Concentración	C%
3	10 %	10
4	1 %	1
6	0.10 %	0.1
8	100 mg/L	0.01
11	10 mg/L	0.001
16	1 mg/L	0.0001
23	100 µg/L	0.00001
32	10 µg/L	0.000001
45	1 µg/L	0.0000001

Donde: C es la concentración de la muestra expresada como potencia de 10.

13.2 ANEXO 2
Cromatograma de una curva calibración



13.3 ANEXO 3
Cromatograma de una muestra



13.4 ANEXO 4

Lomos de Atún Congelados

