

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño y validación de un método analítico para la identificación y
cuantificación de histamina en carne de pescado

Trabajo de graduación presentado por María Sobeyda Rosito Batres para
optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala,

2017

Diseño y validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de histamina en carne de pescado

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



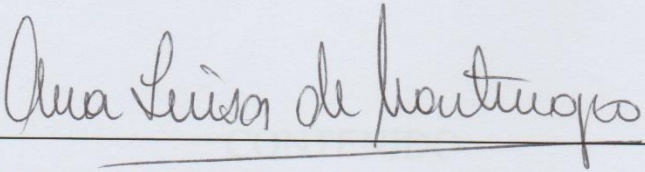
Diseño y validación de un método analítico para la identificación y
cuantificación de histamina en carne de pescado

Trabajo de graduación presentado por María Sobeyda Rosito Batres para
optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala,

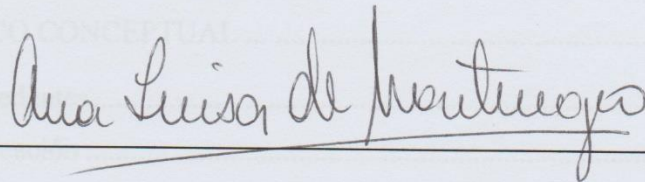
2017

Vo. Bo. :

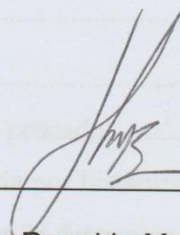
(f) 

Licenciada Ana Luisa Mendizabal Solé de Montenegro
Asesor

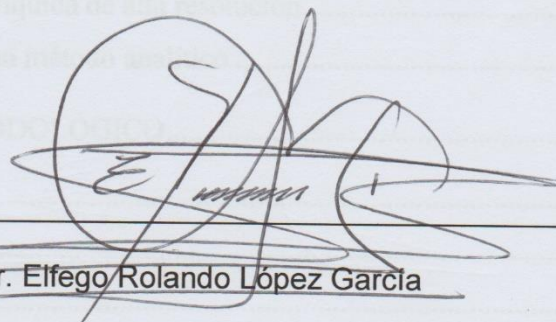
Tribunal Examinador:

(f) 

Licenciada Ana Luisa Mendizabal Solé de Montenegro
Asesor

(f) 

Dr. Herber Ronaldo Morales Estevéz

(f) 

Dr. Efege Rolando López García

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de junio de 2017.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICOS.....	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	2
A. Antecedentes	2
B. Justificación	4
C. Planteamiento del problema.....	5
D. Alcances y límites	5
III. MARCO TEÓRICO.....	6
A. Histamina	6
B. Histamina en carne de pescado.....	10
C. Intoxicación alimentaria por histamina.....	11
D. Métodos analíticos para la determinación de histamina en carne de pescado	13
E. Cromatografía líquida de alta resolución.....	16
F. Validación de un método analítico	17
IV. MARCO METODOLÓGICO.....	19
A. Objetivos	19
B. Población	19
C. Muestra	20
D. Procedimiento	20
E. Diseño de investigación.....	22
F. Análisis estadístico	23

V.	MARCO OPERATIVO	24
A.	Recabación y tratamiento de datos	24
B.	Recursos	24
VI.	RESULTADOS.....	26
A.	Especificidad.....	26
B.	Linealidad	26
C.	Repetibilidad y recuperación	27
D.	Límite de detección y límite de cuantificación	27
E.	Análisis de muestras	28
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	29
A.	Modificaciones en el método cromatográfico.....	29
B.	Validación del método analítico	29
VIII.	CONCLUSIONES	32
IX.	RECOMENDACIONES.....	33
X.	BIBLIOGRAFÍA	34
XI.	APÉNDICE.....	37
A.	Glosario.....	37
B.	Procedimiento para el lavado de cristalería	40
C.	Datos experimentales	41

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Distribución de los subtipos de los receptores de histamina y sus funciones fisiológicas	7
2	Comparación de los métodos más utilizados para la determinación de histamina	13
3	Información sobre los reactivos utilizados	25
4	Información sobre la cristalería y equipo utilizados	25
5	Tiempos de retención de soluciones estándar a diferentes concentraciones de histamina	26
6	Curva de calibración de soluciones estándar de histamina	26
7	Resultados de repetibilidad	27
8	Resultados de recuperación	27
9	Resultados de límite de detección y límite de cuantificación	27
10	Concentración de histamina en muestras de atún	28
11	Tiempos de retención y áreas de las 20 inyecciones de un blanco	43
12	Análisis de las 3 muestras de los 3 lotes analizados	43

LISTA DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICOS

Ilustraciones	Página
1 Estructura química de la histamina	6
2 Reacción entre el cloruro de dansilo y la histamina que produce el derivado detectable con detector UV o fluorescencia	15
3 Reacción entre el o-ftaldehído y la histamina que produce un complejo fluorescente	16
Gráficos	
1 Espectro 3D de histamina a una concentración de 1mg/mL	26
2 Curva de calibración de soluciones estándar de histamina	27
3 Comparación entre la histamina presente en la muestra y la muestra enriquecida a 12µg/mL	28
4 Cromatograma de solución estándar de histamina a 4 µg/mL	41
5 Cromatograma de solución estándar de histamina a 12 µg/mL	41
6 Comparación entre el espectro UV de una solución estándar de histamina y el espectro UV de las muestras de los lotes de atún analizados	42

RESUMEN

La histamina es un producto del metabolismo bacteriano que se forma en altas concentraciones en la carne de pescado debido a la falta de normas higiénicas y malas prácticas de almacenamiento del producto. La carne de pescado con altos niveles de histamina puede ocasionar una intoxicación alimenticia a las personas que la consumen. Actualmente, en el Laboratorio de Inocuidad de Alimentos del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala no se cuenta con un método para la cuantificación de histamina para asegurar que los productos se encuentren dentro de los límites permitidos para el consumo humano. Por ello, se desarrolló, estandarizó y validó un método analítico para la identificación y cuantificación de histamina presente en carne de pescado. La metodología consistió en una extracción con ácido perclórico, una derivatización pre columna con cloruro de dansilo, una detección y cuantificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta a 254 nm. El método desarrollado cumplió con las características de desempeño establecidas por organismos internacionales para los parámetros de validación, que son: especificidad, repetibilidad, recuperación, linealidad, rango, límite de detección y límite de cuantificación. Además, se analizaron muestras de lomo de atún utilizando el método validado y se determinó que cada una de ellas contenían menos de 50 mg/kg, siendo 100 mg/kg el límite permitido por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala. Por lo tanto, se comprobó que el método puede utilizarse para el monitoreo oficial de la histamina en los productos para consumo en Guatemala y con fines de exportación.

I. INTRODUCCIÓN

La histamina es un producto del metabolismo bacteriano que se forma en altas concentraciones en la carne de pescado debido a la falta de normas higiénicas y malas prácticas de almacenamiento del producto. El consumo del producto contaminado en el ser humano causa intoxicaciones que pueden ser confundidas con reacciones alérgicas. Actualmente en Guatemala, no se cuenta con un método validado en las instituciones gubernamentales para identificar y cuantificar su contenido en alimentos que son consumidos por la población, el cual es necesario para garantizar la calidad de almacenamiento y de manipulación de los mismos.

La histamina es una amina biogénica, que se forma a partir de la descarboxilación del aminoácido L-histidina. La síntesis de la histamina en la carne de pescado se debe a la actividad de la enzima histidina descarboxilasa de las bacterias presentes en ella. Esta enzima tiene poca actividad en las bacterias que forman parte de la microbiota de los pescados, por lo que las bacterias que afectan más a la producción de histamina son aquellas que se adquieren por malas prácticas higiénicas y malas prácticas de almacenamiento del producto cárnico durante su manipulación luego de su captura. Al almacenar los productos a temperaturas cercanas al punto de congelación poco después de capturarlos se inhiben la enzima histidina descarboxilasa y, por lo tanto, la concentración de histamina en la carne. Además, los tratamientos con altas temperaturas solo desnaturalizan la enzima, pero no disminuyen la histamina ya formada.

El producto de carne de pescado con altos niveles de histamina puede ocasionar una intoxicación alimenticia al consumidor del mismo. Esta intoxicación, se conoce como escombroidosis y se caracteriza por los siguientes signos: urticaria, erupciones de la piel, enrojecimiento, dolor de estómago, náusea, diarrea, sensación de dolor, disminución de la presión arterial, dificultad para respirar y taquicardia. La intoxicación puede tratarse con antihistámicos y la mayoría de pacientes presenta una recuperación total luego de 24 horas.

Para cuantificar el contenido de histamina en carne de pescado por medio de un método espectrofotométrico, es necesario desarrollar un proceso de extracción efectivo y formar un complejo que absorba en la región ultravioleta o fluorescente mediante una derivatización. Es por ello que en el presente trabajo se desarrolló y validó una metodología analítica para la cuantificación de histamina en productos de carne de pescado destinados para el mercado guatemalteco o con fines de exportación. La validación del método asegurará que los resultados obtenidos de la cuantificación del contenido en muestras de carne de pescado son confiables y reproducibles en las condiciones en que se trabaja en el Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes

La histamina en carne de pescado se forma por la descarboxilación bacteriana de L-histidina, que es un aminoácido que se encuentra libre o en proteínas en los tejidos de algunos de estos animales. La síntesis de histamina en carne de pescado se ve incrementada cuando no se cuentan con buenas prácticas de almacenamiento o no se tienen buenas prácticas higiénicas al manipular los productos. El consumo de productos con alta concentración de histamina puede causar una intoxicación alimenticia llamada escombroidosis. La cuantificación de la histamina en carne de pescado indica si el producto es seguro para los consumidores y es un indicador de la calidad del mismo. Por ello, en la actualidad, es importante determinar la cantidad de histamina en carne para conocer si esta cumple con los parámetros de la concentración establecida como segura por organismos internacionales y tiene la calidad necesaria para su exportación.

En la actualidad, se cuenta con varios métodos para determinar la cantidad de histamina en carne de pescado. La Comisión Europea utiliza el método de HPLC con una derivatización pre columna del extracto con cloruro de dansilo. Codex Alimentarius utiliza un método que consiste en una separación con cromatografía de intercambio iónico, luego una derivatización con ftaldehído y una detección por espectrometría de fluorescencia.

Por el potencial efecto tóxico de la histamina presente en la carne de pescado, se han desarrollado diferentes metodologías para cuantificar la histamina presente en los productos, entre ellos se pueden mencionar los siguientes estudios:

- En 1999, Ingrid Benitez en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala realizó un análisis de la determinación y cuantificación de las aminas biogénicas por medio de cromatografía líquida de alta resolución en productos cárnicos procesados, expendidos en la Ciudad de Guatemala. El método consistió en una extracción con ácido clorhídrico a partir de las muestras y una determinación HPLC con detector de fluorescencia realizando una derivatización pre columna con ftaldehído (Benitez, 1999).

- En el 2009 Min-Ki Kim, Jae-Hyung Mah y Han-Joon Hwang de la Universidad de Corea analizaron 41 especies de mariscos para determinar su contenido de aminas biogénicas. Analizaron la relación entre las condiciones de almacenamiento, la concentración de aminas biogénicas encontradas, el tipo de bacterias más encontradas en las muestras y la actividad de la histidina descarboxilasa en estas bacterias. El método utilizado para la cuantificación de las aminas biogénicas consistió en una extracción con ácido perclórico y el análisis por medio de HPCL con

detector UV realizando una derivatización pre columna con cloruro de dansilo (Kim, Mah y Hwang, 2009).

- En el 2010, Diana Pinagel de la Facultad de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala realizó un estudio de la determinación de niveles de histamina presente en muestras de lomo de atún que provenían de la industria atunera de Guatemala. El método empleado consistió en realizar una extracción de la matriz utilizando ácido perclórico y realizando la cuantificación por medio de HPLC con detector UV realizando una derivatización pre columna con cloruro de dansilo. Antes de la cuantificación, se realizó también, la validación del método analítico para la que se determinó la precisión, exactitud, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación (Pinagel, 2010).

- En el 2014, Guillermo Fabián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad San Carlos de Guatemala realizó un estudio en el que se determinaron los niveles de histamina en la carne de pescado dorado que se vendía en diferentes mercados municipales de la Ciudad de Guatemala. El método utilizado para la determinación fue ELISA utilizando el kit VERATOX en 42 muestras recolectadas en tres mercados municipales diferentes (Fabián, 2014).

- En el 2016, Altieri *et al* del Departamento de Seguridad Alimenticia y Salud Pública de Instituto Superior de Sanidad en Italia realizó la validación del método oficial europeo para la determinación de histamina en productos derivados del pescado utilizando el método de HPLC con detector UV con una dansilación como derivatización pre columna. Las características de especificidad, linealidad, exactitud y precisión encontradas en el método lo hacen aplicable como un método de control oficial (Altieri *et al*, 2016).

Las investigaciones anteriores utilizan diferentes metodologías de análisis para la cuantificación de la histamina en carne de pescado. En Guatemala, solo una de ellas ha sido validada en la Universidad San Carlos de Guatemala, pero no para una institución gubernamental. Por otro lado, la metodología aprobada por la Unión Europea fue recientemente validada en el Instituto Superior de Sanidad en Italia y se identificó que este método es aplicable para el control oficial de los productos cárnicos.

B. Justificación

Los altos niveles de histamina en carne de pescado pueden causar una intoxicación alimenticia conocida como escombroidosis. Esta se caracteriza por generar signos de: urticaria, erupciones en la piel, enrojecimiento, dolor de estómago, náusea, diarrea, sensación de dolor, disminución de la presión arterial, dificultad para respirar y taquicardia. Esta intoxicación, generalmente, no es grave, pero debe tratarse con antihistamínicos. Además, debe determinarse la etiología de la intoxicación, ya que puede confundirse fácilmente como una reacción alérgica por alimentos. La mayoría de pacientes presenta una recuperación total luego de 24 horas del tratamiento con antihistamínicos. Según el CDC, el 5% de las intoxicaciones por mariscos se debe a intoxicaciones de histamina; sin embargo, no se reportan correctamente los casos ya que se confunden fácilmente con reacciones alérgicas. En el 2009, esta intoxicación afectó a 1383 personas en Estados Unidos, de las cuales 59 necesitaron de hospitalización. No se tienen reportes de la epidemiología de esta enfermedad en Guatemala o Latinoamérica (CDC, 2009) (Macromatis y Quantick, 2002).

Actualmente, se ha priorizado desarrollar ensayos para la cuantificación de la histamina en mariscos con dos finalidades: establecer la calidad del producto para la exportación y determinar que es seguro para su consumo. La cuantificación de histamina puede reflejar las medidas higiénicas y de almacenamiento tomadas durante la manipulación del producto. Codex Alimentarius utiliza el método proporcionado por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC – Association of Official Analytical Chemists, por sus siglas en inglés) que consiste en determinar la histamina por medio de espectroscopia de fluorescencia con una cromatografía de intercambio iónico previa como método de separación. Sin embargo, la Comisión Europea utiliza el método de determinación de histamina por medio de cromatografía líquida de alta precisión con detector ultravioleta con una derivatización pre columna con cloruro de dansilo. Este último método, a pesar de ser el más utilizado, solo ha sido validado en pocos laboratorios, por lo que requiere de examinar el método fuera de los laboratorios de la Comisión Europea para lograr la validación en laboratorios internacionales para así mejorar la protección a la salud pública. En Guatemala, no se cuenta con un método validado en las instituciones gubernamentales para realizar esta cuantificación (Hungerford, 2010).

Por lo que se llevará a cabo la estandarización y validación de la metodología analítica para cuantificación de histamina en carne de pescado para garantizar que la técnica es selectiva y específica para la cuantificación de la misma en los productos guatemaltecos. La validación dará

confiabilidad que los productos cumplen con los parámetros de calidad internacionales respecto a la concentración de histamina y garantizará que son seguros para el consumo humano.

C. Planteamiento del problema

¿Utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta y derivatización pre columna utilizando cloruro de dansilo es posible obtener resultados confiables y reproducibles para la cuantificación de histamina en carne de pescado en productos para el mercado guatemalteco o con fines de exportación?

D. Alcances y límites

1. Alcances: desarrollar, estandarizar y validar un método analítico para la cuantificación y detección únicamente de histamina en carne de pescado por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta con una derivatización pre columna con cloruro de dansilo que pueda aplicarse a cualquier institución que presente el problema planteado.

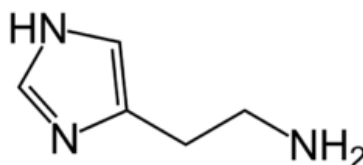
2. Límites: la metodología analítica propuesta cuantifica el contenido de histamina en carne de pescado obtenida del proceso de extracción descrito, en un rango de 50 – 350 mg de histamina en kg de carne de pescado.

III. MARCO TEÓRICO

A. Histamina

La histamina, 4 – (2-aminoetil) imidazol, es una molécula que puede dividirse en dos partes estructurales básica, una amina alifática con un pK_{a1} de 9.4 y un anillo de imidazol con un pK_{a2} de 5.8 (Jones, 2013).

Ilustración 1 – “Estructura química de la histamina”



1. Síntesis. La histamina es una amina biogénica, ya que es una molécula nitrogenada que se forma a partir de la descarboxilación de un aminoácido, en este caso la L-histidina. La síntesis de la histamina es catalizada por la L-histidina descarboxilasa y no puede generarse por otra ruta enzimática. La histidina descarboxilasa puede encontrarse en diversos tejidos del cuerpo, como, el sistema nervioso central, neuronas, mucosa gástrica, células parietales, mastocitos y basófilos. El rol en la salud, de la histamina, en estos diversos tejidos del cuerpo se debe a que interactúa con cuatro diferentes receptores. Una vez sintetizada, la histamina se almacena o inactiva rápidamente. La mayoría de la histamina hística se encuentra almacenada en forma de gránulos en los basófilos y mastocitos, de donde se libera en grandes cantidades durante diferentes estímulos (Shadid *et al*, 2010) (Katzung, 2012).

2. Receptores de histamina. La histamina es una molécula que produce una amplia variedad de efectos que dependen de su interacción con diferentes receptores que se encuentran en la superficie de las células blanco. Actualmente, se han identificado cuatro receptores de histamina, cada uno se distribuye de forma diferente en los diferentes sistemas del cuerpo (Ver Cuadro 1) (Shadid *et al*, 2010).

Cuadro 1 – “Distribución de los subtipos de los receptores de histamina y sus funciones fisiológicas”

Característica	Receptor H₁	Receptor H₂	Receptor H₃	Receptor H₄
Expresión del receptor	Altamente distribuido, principalmente en neuronas, músculo liso (vías respiratorias, vascular), sistema nervioso central, tracto gastrointestinal, hepatocitos, células endoteliales	Altamente distribuido, principalmente mucosa gástrica parietal, músculo liso, miocardio, mastocitos	Altamente expresado en neuronas histaminérgicas	Altamente expresado en la médula ósea y células hematopoyéticas periféricas (eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T CD4)
Señales intracelulares activadas	Ca ²⁺ ↑, cGMP, NF-κB, PLC↑, fosfolipasa A2 y D, cAMP, NOS	cAMP↑, Ca ²⁺ , proteína cinasa C, fosfolipasa C	Ca ²⁺ ↑, MAP cinasa ↑, inhibición de cAMP ↓	Ca ²⁺ ↑, MAP cinasa ↑, inhibición de cAMP ↓
Relevancia fisiológica	Ciclo del sueño, regulación térmica, memoria, aprendizaje, contracción del músculo liso	Neuroendocrino, secreción gástrica	Ingesta de alimentos, ciclo de sueño, liberación de otras aminas neurotransmisoras	Respuesta inmune
Relevancia patofisiológica	Reacciones alérgicas	Úlceras gástricas	Deterioro cognitivo, estudios en síndrome metabólico	Inflamación, reacciones inmunes

Abreviaciones: cAMP = adenosín monofosfato cíclico, cGMP = guanosín monofosfato cíclico, MAP = proteína cinasa activada por mitógeno, NF-κB = factor nuclear κB, NOS = óxido nítrico sintasa, PLC fosfolipasa C (Shadid *et al*, 2010)

3. Mecanismos de liberación de histamina.

a. Liberación inmunitaria. El principal mecanismo de liberación de histamina es por la respuesta a estímulos inmunitarios de los mastocitos y basófilos. La histamina es mediadora durante las reacciones alérgicas inmediatas, tipo I, en donde los basófilos y mastocitos son sensibilizados por medio de los anticuerpos IgE adheridos a sus membranas, que se desgranulan al ser expuestos a antígenos apropiados. Esta desgranulación causa la liberación de histamina, adenosina trifosfato (ATP) y otros mediadores. Durante las reacciones inmunitarias mediados por IgG o IgM también se libera histamina desde las células cebadas y basófilos. La histamina liberada tiene función moduladora en las reacciones inflamatorias e inmunes. Esta causa vasodilatación local, salida de mediadores de inflamación aguda y anticuerpos por medio de los receptores H₂ o H₃ (Katzung, 2012).

Además, la histamina puede modular su propia liberación y la de otros mediadores en algunos tejidos, como la piel y la sangre, por medio de los basófilos. En estos se ha observado un mecanismo de control por medio de la retroalimentación negativa mediada por receptores H_2 . Sin embargo, este mecanismo no se observa en los mastocitos del pulmón (Shadid *et al*, 2010).

b. Liberación química y mecánica. En este mecanismo, la liberación se da por fármacos como la morfina y tubocurarina. La histamina almacenada en los mastocitos se da sin la necesidad de desgranulación ni lesión (Katzung, 2012).

4. Efectos de histamina en el cuerpo

a. Sistema Nervioso. Las células nerviosas sensitivas a histamina están mediadas por el receptor H_1 y median el dolor y prurito. Estos receptores también intervienen en el envío de señales de la inspiración y espiración en las neuronas que interfieren con la respiración. Los receptores H_1 y H_3 tienen funciones en la saciedad y apetito. Por otro lado, los receptores H_3 presinápticos modulan la liberación de varios transmisores del sistema nervioso como acetilcolina y transmisores peptídicos en varias áreas del cerebro y nervios periféricos (Katzung, 2012).

b. Aparato Cardiovascular. La histamina causa una acción vasodilatadora directa en las arteriolas y esfínteres precapilares, por lo que disminuye la presión sistólica y diastólica y acelera la frecuencia cardiaca como reflejo. Además, por su interacción puede surgir hiperemia facial, sensación de calor y cefalea. El edema inducido por histamina se debe a que la actina y miosina se contraen en el interior de las células endoteliales y aumentan la permeabilidad de líquido y moléculas pequeñas, esto es también lo que causa la urticaria en la piel. Estos efectos de vasodilatación están mediados principalmente por el receptor H_1 , la estimulación directa del corazón se debe a los receptores H_2 . Entre los efectos de estimulación directa del miocardio se incluyen mayor contractilidad y aceleración del ritmo de descarga. Sin embargo, los principales efectos anafilácticos del sistema cardiovascular en los seres humanos se deben en su mayoría a otros mediadores y no a la histamina (Katzung, 2012).

c. Músculo liso bronquial. La histamina causa la broncoconstricción mediada por los receptores H_1 . En otras especies de mamíferos, como el conejo, se observa un efecto de broncodilatación que refleja que en sus vías respiratorias predomina el receptor H_2 (Katzung, 2012).

d. Músculo liso del tubo digestivo. La histamina contrae el músculo liso del tubo digestivo, que en altas dosis puede causar diarrea. Este efecto es mediado por los receptores H_1 (Katzung, 2012).

e. Otros órganos de músculo liso. En general, en el ser humano la histamina no produce efectos significativos en el músculo liso. Sin embargo, en mujeres embarazadas con reacciones anafilácticas se puede producir el aborto por consecuencia de las contracciones del útero debido a la liberación de histamina (Katzung, 2012).

f. Tejido secretor. La histamina es un estimulante de la secreción de ácido en el estómago y en menor magnitud, de la pepsina gástrica y la producción de factor intrínseco. Esto se debe a la activación de las células parietales del estómago por medio de los receptores H_2 . Esto causa una mayor actividad de adenililciclase, mayor concentración de cAMP e incremento en el calcio intracelular. La histamina también aumenta la secreción en el intestino delgado y el colon. Además, puede originar descargas de la médula suprarrenal (Katzung, 2012).

g. Efectos metabólicos. Se ha demostrado en ratones, que el bloqueo del receptor H_3 intensifica la ingesta de alimentos y disminuye el consumo de energía, con lo que se origina la obesidad. También se observó resistencia a la insulina y mayores concentraciones de leptina en sangre. Actualmente, no se ha comprobado que estos receptores tengan una función similar en los humanos (Shadid *et al*, 2010) (Katzung, 2012).

h. Respuesta triple. La histamina causa la respuesta característica de rubor, edema y eritema, seguida por una sensación de prurito. Esto se debe a su interacción con las células del músculo liso, el endotelio de capilares y las terminaciones nerviosas sensitivas. En esta respuesta pueden participar los receptores H_1 , H_2 , y H_3 (Katzung, 2012).

i. Otros efectos mediados por receptores histamínicos. Se ha observado que la estimulación de las terminaciones nerviosas por medio de los receptores H_1 y H_3 pueden contribuir a la sensación de dolor (Katzung, 2012).

5. Metabolismo y excreción. La histamina se excreta como molécula intacta en un 3%. El otro 97% es metabolizado antes de la excreción, el metabolismo de la histamina está regulado por dos vías que involucran las enzimas: histamina $N^$ -metiltransferasa y diamina oxidasa. La histamina $N^$ -metiltransferasa metaboliza entre un 50 – 80% de la histamina a N -metil histamina, que luego es transformada por la monoamino oxidasa en ácido N -metilimidazol acético. La diamino oxidasa metaboliza entre un 15 – 30% de la histamina a ácido imidazol acético. El ácido N – metilimidazol acético y el ácido imidazol acético son metabolitos que pueden excretarse en la orina (Shadid *et al*, 2010).

B. Histamina en carne de pescado

1. Formación. La histamina en los alimentos se produce por la descarboxilación de la L-histidina catalizada por la enzima histidina descarboxilasa de las bacterias que crecieron en ellos. La L-histidina se encuentra en los alimentos como parte de las proteínas, pero también se encuentra como un aminoácido libre en los tejidos de algunos pescados, como el atún. La histidina de las proteínas presentes en el pescado puede liberarse por medio de proteólisis autolítica o bacteriana (Slorach, 1991).

La histidina descarboxilasa se encuentra en varias especies de bacterias. Sin embargo, en el caso de la producción de histamina en el pescado se encuentran diferencias significativas en las especies que producen la mayoría. Las bacterias más importantes son entéricas como, *Proteus morgani*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*. Las bacterias del género *Lactobacillus* son las que afectan mayormente a los quesos. Estas pueden producir histamina en un corto periodo de tiempo a temperaturas mayores de 15°C. La formación de histamina depende principalmente de la temperatura a la cual se mantiene el pescado entre la pesca y su consumo o tratamiento para enlatar o empacar. Los tratamientos de calor (ahumado, asado, entre otros) matan las bacterias que contienen la histidina descarboxilasa y además inactivan la enzima que es lábil a altas temperaturas. Sin embargo, estos tratamientos no destruyen la histamina previamente formada, por lo que esta de igual forma llegará al consumidor. La cantidad de aminas en el producto puede cambiar el olor y sabor del mismo, sin embargo, altas concentraciones de histamina pueden formarse antes de que estos cambios puedan ser percibidos (Slorach, 1991).

2. Límites. La histamina no es en sí misma una molécula tóxica, pero al consumirse en altos niveles puede causar una intoxicación. En el pescado recién atrapado los niveles de histamina son generalmente menores a 10 mg/kg, pero en el pescado procesado que no ha sido almacenado correctamente en refrigeración los niveles pueden cambiar ampliamente. En los productos que se han almacenado de buena manera, las concentraciones son por lo general, menores a 50 mg/kg. La determinación de los límites de histamina que son tolerados en un producto es complicada, ya que la toxicidad no depende únicamente de la presencia de histamina sino de otros compuestos y de la idiosincrasia de cada consumidor. En el caso de la histamina, una ingesta de 5 – 10 mg puede ocasionar efectos en pacientes sensibles, 100 mg induce una toxicidad media y 1000 mg es altamente tóxica. Otros autores señalan que 8 – 40 mg de histamina causan toxicidad leve, de 40 – 100 mg toxicidad intermedia y por encima de 100 mg toxicidad severa (Stadnick y Dolatowski, 2010).

a. Límites legales. Con base en diferentes estudios, la Unión Europea estableció que los niveles de histamina deben ser menores a 100 mg/kg en los pescados crudos y por debajo de 200 mg/kg en pescados salteados de las familias Scombridae y Clupeidae. Sin embargo, la Agencia de Drogas y Alimentos (FDA – Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) acepta una concentración no mayor a 50 mg/kg. La FDA tomó esta decisión porque la concentración de histamina encontrada puede variar incluso entre diferentes partes del pescado, por lo que al encontrar 50 mg/kg deben tomarse medidas para asegurar que el resto del lote no tenga mayor concentración (Stadnick y Dolatowski, 2010) (Steadman, 1999).

En Guatemala, según el Acuerdo Ministerial 0271 – 2010 se estableció que por cada lote de atunes deben tomarse nueve muestras del músculo dorsal para su análisis. El valor medio del límite máximo residual de histamina debe ser inferior a 100 ppm o mg/kg. En dos de las muestras se pueden tener valores superiores a 100 mg/kg, pero deben ser inferiores a 200 mg/kg. Ninguna muestra puede tener un valor superior de 200 mg/kg de histamina. En el país se utilizan los mismos niveles de regulación que en la Unión Europea

3. Medidas para controlar la formación de histamina. La mayoría de las bacterias productoras de histamina en carne de pescado son mesofílicas, por lo que las temperaturas bajas controlan efectivamente su crecimiento. Por ello, la medida más importante para el control de la formación de histamina es asegurar que el producto se somete a enfriamiento lo antes posible después de ser capturado y se mantiene así hasta que se consume o se somete a tratamiento de calor (Steadman, 1999) (Slorach, 1991).

La formación de histamina también depende de la naturaleza y cantidad de bacterias presentes en el pescado. Las bacterias productoras de histamina proceden principalmente del manejo del producto y no de la microbiota normal del mismo. Por lo que, al mejorar las prácticas higiénicas en la cadena de manejo del producto, puede reducirse la contaminación y así, la formación de histamina (Steadman, 1999) (Slorach, 1991).

C. Intoxicación alimentaria por histamina.

Escombroidosis es el nombre de la intoxicación alimentaria que se origina luego de consumir pescado con un alto nivel de histamina. No se ha logrado establecer una relación entre la dosis de histamina y la respuesta, ya que la administración de la histamina pura a las mismas dosis no produce los mismos efectos tóxicos. Se ha sugerido que en el pescado se pueden encontrar productos potenciadores que disminuyen el umbral de la dosis necesaria de histamina para crear

una intoxicación. Un mecanismo sugerido es que se encuentran moléculas que inhiben las enzimas de diaminoxidasa y la histidina metiltransferasa, las que están encargadas del metabolismo de la histamina en el cuerpo. Muchos otros mecanismos toxicológicos se han propuesto, sin embargo, ninguno de ellos ha sido comprobado (Hungerford, 2010).

1. **Epidemiología.** Se estima que un 50% de las intoxicaciones alimentarias por mariscos en Estados Unidos se debe a los elevados niveles de histamina en los productos. A pesar de ello se cree que este dato está subestimado, ya que no siempre se realiza un análisis eficaz de la causa de los casos de intoxicaciones. En años recientes se ha observado que los casos de escombroidosis no han disminuido a pesar del aumento en las medidas higiénicas, las regulaciones establecidas por los entes regulatorios y un aumento en la educación para incrementar la conciencia pública (FAO, 2013).

2. **Síntomas.** Los síntomas de la escombroidosis se presentan normalmente entre 10 a 60 minutos después del consumo del pescado. Los síntomas son variables, pero pueden incluir: adormecimiento oral, cefalea, mareos, palpitaciones, presión arterial baja, taquicardia, dificultad para respirar y sed. Los síntomas más característicos son aquellos que asemejan a la alergia, como: urticaria, erupciones, enrojecimiento e hinchazón. Entre los signos y síntomas menos frecuentes se encuentran: ansiedad, náusea, vómitos, dolor abdominal y diarrea. La severidad de los síntomas dependerá de la cantidad de histamina ingerida y de la sensibilidad del paciente hacia ella. Para poder diferenciar rápidamente la escombroidosis de una alergia se debe tomar en consideración lo siguiente: registros previos de alergia al mismo alimento, verificar si hay similitud de síntomas en personas que consumieron los mismos alimentos y, por último, un análisis de los niveles de histamina en los alimentos consumidos (Slorach, 1991) (FAO, 2013).

3. **Tratamiento.** Los pacientes presentan una recuperación total luego de 24 horas, el tratamiento consiste en la administración de antihistamínicos, generalmente antagonistas de los receptores de histamina H₁ o H₂. En casos leves los síntomas desaparecen rápidamente por lo que no siempre es necesario la administración de medicamentos. Raramente, se observan complicaciones cardíacas o respiratorias severas en donde sea necesario el tratamiento para choque anafiláctico (Taylor, 1986) (Macromatis y Quantick, 2002).

D. Métodos analíticos para la determinación de histamina en carne de pescado.

La determinación de histamina en carne de pescado se realiza por dos fines principales. El primero, es por su potencial riesgo toxicológico y el segundo es porque su cuantificación se utiliza como un indicador de la calidad de estos alimentos. El índice de aminas es un indicador de las condiciones higiénicas durante la manipulación de los productos, este se basa en las concentraciones de las aminas biogénicas (entre las que se incluyen: histamina, tiramina, putrescina y cadaverina) en la carne de pescado. Sin embargo, el índice de aminas no reemplaza un análisis microbiológico, ya que no todas las especies de bacterias tienen la capacidad de descarboxilar aminoácidos (Stadnick y Dolatowski, 2009).

En relación a otras toxinas más peligrosas encontradas en los mariscos, la histamina cuenta con mayor variedad de métodos de detección. Para la cuantificación de histamina pueden utilizarse métodos simples y económicos como cromatografía de capa fina (TLC – Thin Layer Chromatography, por sus siglas en inglés) y métodos más complejos que involucran la cromatografía líquida de alta resolución (Ver Cuadro 2) (HPLC – High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) (Hungerford, 2010).

Cuadro 2 – “Comparación de los métodos más utilizados para la determinación de histamina”

	Método por HPLC	Método espectroscopia de fluorescencia	ELISA
Tiempo necesario para un análisis	1 – 2 horas	1 hora	1 hora
Equipo	HPLC	Espectrofluorómetro	Espectrofluorómetro
Límite de cuantificación	1.5 – 5 mg/kg	1.5 µg/kg	2 – 5 mg/kg

(FAO, 2013)

El paso crítico en la metodología es la extracción de la histamina que se dificulta por la complejidad de la matriz, que es la carne de pescado. El análisis también se dificulta por la presencia de compuestos interferentes, como aminoácidos libres y otras aminas biogénicas. Por ello, la mayoría de métodos de separación utilizan la cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa, en donde la histamina es detectada en base a esquemas de derivatizaciones pre columna con el fin de producir moléculas fluorescentes o cromóforos fuertes que pueden detectarse utilizando un detector UV. Otros métodos de separación incluyen cromatografía de intercambio iónico, electroforesis capilar y cromatografía de gases con detector de masas con esquemas de derivatización pre columna (Hungerford, 2010) (Stadnik y Dolatowski, 2009).

1. Método por espectroscopía de fluorescencia. Para poder cuantificar la histamina en la carne por este método, primero se realiza una extracción con metanol. Luego el extracto debe someterse a cromatografía de intercambio iónico para poder remover otros aminoácidos que son moléculas interferentes. Luego la histamina separada se hace reaccionar con ftaldehído y se mide la fluorescencia del producto obtenido. Esto se hace porque por sí sola, la histamina tiene poca absorbancia o fluorescencia. Este es el método de elección de la Codex Alimentarius y por la AOAC (AOAC – Association of Official Agricultural Chemists, Asociación Químicos Agrícolas Oficiales por sus siglas en inglés). Una de las ventajas de utilizar ftaldehído, es que la reacción es rápida, el producto fluorescente se obtiene en cuestión de minutos. Sin embargo, una de las desventajas consiste en que el complejo fluorescente tiene baja estabilidad por lo que deben analizarse las muestras poco después de completar la reacción (Hungerford, 2010) (Rawles y Flick, 1996).

2. Métodos enzimáticos. En la actualidad, se busca un método que pueda ser fácilmente validado en diferentes laboratorios y que permita un análisis más rápido, por ello se han empezado a utilizar métodos enzimáticos porque son altamente selectivos y pueden ser automatizados. Uno de estos métodos utiliza la diaminoxidasa, que degrada la histamina presente en la muestra y produce peróxido de hidrógeno. Luego se utiliza cristal violeta junto con peroxidasa para detectar el peróxido de hidrógeno a 596 nm. También, puede utilizarse histamina oxidasa para cuantificar la histamina en base al consumo de oxígeno originado. Además, existen kits de análisis en los que se utilizan histamina deshidrogenasa, histamina – N - metiltransferasa o anticuerpos selectivos para utilizar en Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA - Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay, por sus siglas en inglés) (Hungerford, 2010) (Taylor, 1986) (Rawles y Flick, 1996).

3. Métodos cromatográficos.

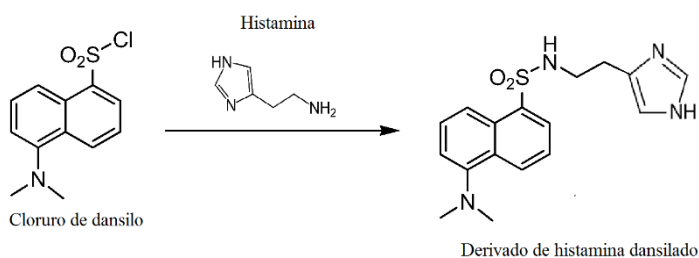
a. Cromatografía de capa fina. Concentraciones bajas de histamina pueden determinarse por medio de cromatografía de capa fina. El método consiste en agregar cloruro de dansilo a las muestras con histamina para crear complejos fluorescentes que pueden ser separados. Este método tiene la ventaja que son económicos, pero no se utilizan en la determinación de histamina en alimentos (Rawles y Flick, 1996).

b. Cromatografía de gases. La cuantificación por medio de este de método requiere la conversión de histamina en un derivado volátil para que este pueda ser separado. Esto se puede

realizar con derivados de heptafluorobutiril o de trimetilsilil utilizando un detector de ionización de llama. Al utilizar cromatografía de gases se pueden tener los problemas de elución incompleta de las columnas y se obtienen señales asimétricas. Al igual que en la cromatografía de capa fina, este método ha sido muy poco utilizado en la cuantificación de histamina en alimentos (Taylor, 1986) (Rawles y Flisick, 1996).

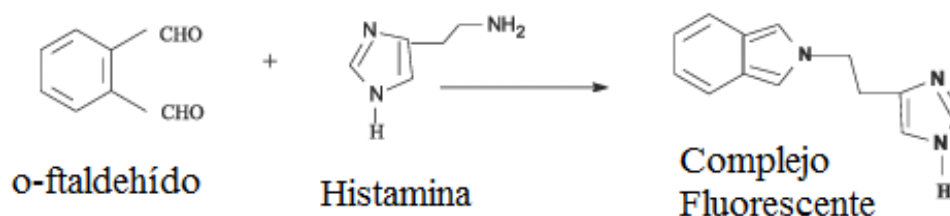
c. Cromatografía líquida de alta resolución. La histamina se cuantifica generalmente por medio de HPLC con una derivatización pre o post columna que permite su medición por su absorbancia en los rangos de la luz ultravioleta o por fluorescencia. Los métodos que utilizan una derivatización pre columna con cloruro de dansilo (Ver Ilustración 2) generalmente utilizan un gradiente de elución para lograr separar todos los productos dansilados. También pueden desarrollarse métodos que utilizan derivatización pre o post columna que utilizan ftaldehído (ver Ilustración 3) y los complejos se detectan con detector de fluorescencia. Una de las ventajas de utilizar cloruro de dansilo para la derivatización es que los complejos formados son estables, por lo que puede utilizarse un sistema automatizado para la cuantificación. Por otro lado, entre las desventajas de utilizar cloruro de dansilo se encuentra que los complejos formados son altamente sensibles a la luz, por lo que deben mantenerse aislados de la luz y además la reacción para que se forme el compuesto fluorescente puede tardar varias horas a temperatura ambiente (Hungerford, 2010) (Rawles y Flisick, 1996).

Ilustración 2 – “Reacción entre el cloruro de dansilo y la histamina que produce el derivado detectable con detector UV o fluorescencia “



(Lázaro y Conte, 2013)

Ilustración 3 – “Reacción entre el o-ftaldehído y la histamina que produce un complejo fluorescente”



(Lázaro y Conte, 2013)

El método predilecto para la cuantificación de histamina en carne por la Comisión Europea es por HPLC con una dansilación como derivatización pre columna, principalmente porque su desempeño es adecuado. Sin embargo, este método ha sido validado únicamente de manera interna, por lo que se requieren de estudios entre varios laboratorios que demuestren que el método es robusto (Hungerford, 2010).

E. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución se basa en la separación de componentes de una mezcla con base en sus interacciones con la fase estacionaria y la fase móvil. Esta es la más utilizada actualmente porque permite la separación de cualquier compuesto soluble en fase líquida y por lo tanto permite la utilización de temperaturas bajas. Además, los cambios en la fase móvil pueden optimizar las separaciones pues estos modifican las interacciones entre los componentes y la fase móvil y estacionaria (Skoog, West y Holler, 2005).

Los cromatógrafos utilizan accesorios especiales para eliminar los gases disueltos y las partículas en suspensión de los disolventes que conforman la fase móvil. Esto se debe a que las burbujas de gas y las partículas pueden interferir con el funcionamiento del detector. Es por ello que se utilizan sistemas de filtración y pre columnas para eliminar las partículas suspendidas y desgasificadores para eliminar los gases disueltos. Los disolventes pueden utilizarse mediante elución isocrática, cuando la composición de la fase móvil permanece constante, o mediante elución por gradiente, en donde la composición de la fase móvil varía con el tiempo. Para que la fase móvil logre pasar a los caudales necesarios a través de la columna empacitada con partículas de diámetros inferiores a 10 μm se utilizan bombas para alcanzar la presión necesaria (Skoog, West y Holler, 2005).

La pre columna se utiliza con el fin de alargar la vida útil de la columna. Luego de la pre columna, la fase móvil y la muestra pasan a través de la columna que está empaquetada con partículas de tamaño pequeño (Skoog, West y Holler, 2005).

Los detectores más utilizados en la cromatografía líquida de alta resolución son: fluorescencia, índice de refracción, refractor de luz, espectroscopía de masas y absorbancia ultravioleta (Skoog, West y Holler, 2005).

Según la polaridad relativa de fase estacionaria y fase móvil utilizadas se puede hablar de cromatografía de reparto de fase normal y cromatografía de reparto de fase reversa, siendo esta última la más utilizada, se calcula que se usa en un 75% de los métodos. La cromatografía de fase normal utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar. La cromatografía de fase reversa utiliza una fase móvil polar, como agua, metanol o acetonitrilo, y una fase estacionaria apolar, con empaquetamientos de octil y octodecilsiloxano. En las separaciones cromatográficas se utiliza, generalmente, una fase estacionaria ajustada a la polaridad del analito y una fase móvil con polaridad diferente para lograr separaciones con tiempos de retención óptimos (Skoog, West y Holler, 2005).

F. Validación de un método analítico

La validación de los métodos analíticos se hace con el fin de demostrar que el procedimiento es apto para el propósito que fue diseñado. Así puede asegurarse que los resultados que se obtienen son siempre reproducibles, confiables y seguros incluso cuando son realizados por diferentes operarios en equipos similares. Al validar se está asegurando la calidad del proceso y de la metodología realizada. Antes de validar un método analítico es importante asegurarse que el equipo a utilizar haya sido previamente calificado (ICH, 2005).

La validación se obtiene luego de realizar pruebas de las características de validación. Estas características son: especificidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, rango y robustez (McPolin, 2009).

1. **Especificidad.** La especificidad consiste en la capacidad del método de evaluar el analito a pesar de la presencia de componentes que pueden encontrarse normalmente en la muestra, estos pueden incluir impurezas y productos de degradación (McPolin, 2009).

2. **Precisión.** La precisión de un método analítico se expresa como la cercanía o el grado de dispersión entre las mediciones obtenidas de las muestras múltiples de una muestra homogénea. Esta se expresa como la desviación estándar o coeficiente de variación. Se puede ver afectada por

errores aleatorios, como las fluctuaciones por el ruido, y errores sistemáticos en el método, equipo u operador. La precisión mide la reproducibilidad del método (McPolin, 2009).

La precisión puede expresarse como repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetitividad expresa la precisión cuando el método se evalúa en las mismas condiciones en un intervalo pequeño de tiempo. La precisión intermedia se expresa cuando se realizan mediciones en días diferentes, por diferentes analistas y equipo diferente. La reproducibilidad se expresa como la precisión entre laboratorios en estudios colaborativos para estandarización de metodologías (McPolin, 2009).

3. **Exactitud.** La exactitud puede expresarse como la cercanía entre el valor aceptado o valor de referencia con el valor encontrado. Este indica la desviación entre el valor obtenido y el valor verdadero, se puede expresar como el porcentaje de recuperación y se ve afectado por los errores sistemáticos (McPolin, 2009).

4. **Límite de cuantificación.** El límite de cuantificación se define como la menor cantidad de analito dentro de una muestra que puede ser determinado con una precisión y exactitud adecuada. Este se utiliza para la determinación de impurezas y productos de degradación (McPolin, 2009).

5. **Límite de detección.** El límite de detección se define como la menor cantidad de analito dentro de la muestra que puede ser detectada con un intervalo de confianza determinado, pero no necesariamente puede ser cuantificada en un valor exacto (McPolin, 2009).

6. **Linealidad.** La linealidad es la capacidad de un método, dentro de un rango determinado, de obtener resultados directamente proporcionales con la concentración de analito en la muestra (McPolin, 2009).

7. **Rango.** El rango de una metodología analítica es el intervalo entre la concentración máxima y mínima de analito en que la que puede demostrarse que los resultados tendrán un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad (McPolin, 2009).

8. **Robustez.** Un método analítico es robusto si las mediciones no se ven afectadas por pequeñas variaciones en los parámetros de los métodos, esto indica que los resultados son confiables durante el uso normal del método (McPolin, 2009)

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Generales

- a. Desarrollar y estandarizar un método para la identificación y cuantificación de histamina presente en carne de pescado por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta mediante una derivatización pre columna con cloruro de dansilo.
- b. Validar la metodología para la cuantificación de histamina en carne de pescado por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta mediante una derivatización pre columna con cloruro de dansilo
- c. Generar información científica que facilite la identificación y cuantificación de histamina presente en carne de pescado

2. Específicos

- a. Determinar el límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango del método analítico utilizado para la cuantificación de histamina en carne de pescado
- b. Establecer una metodología confiable para la cuantificación de histamina en carne de pescado en Guatemala.
- c. Evaluar el contenido de histamina en muestras de carne de pescado obtenidas por el Ministerios de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA)

B. Población

La población estudiada son los productos de carne de pescado presentes en el mercado guatemalteco y aquellos que están destinados para la exportación.

C. Muestra

Consiste en seleccionar al azar nueve muestras de carne de pescado de tres lotes en el mercado guatemalteco o destinado a la exportación. Todas las muestras recolectadas de un lote se homogenizan y se toman para analizar cinco gramos del producto.

D. Procedimiento

El procedimiento para desarrollar y validar la metodología para la cuantificación de histamina en carne de pescado se dividió de la siguiente manera:

1. Preparación de reactivos.

a. Solución stock de histamina. Disolver 80 mg de dihidrocloruro de histamina en 50 mL de agua purificada. Para obtener una concentración de 1mg/mL. Esta solución puede almacenarse a 4°C durante un mes durante el cual continúa siendo estable.

b. Solución de cloruro de dansilo. Disolver 10 mg de cloruro de dansilo en 1 mL de acetona. Realizar una solución fresca cada vez que se lleve a cabo un análisis. Mantener la solución protegida de la luz.

c. Fase móvil.

1) Acetato de amonio 0.1 M. Disolver 7.7 g de acetato de amonio en 1000 mL de agua purificada. Filtrar la solución utilizando un filtro de 0.45 µm.

2) Acetonitrilo. Filtrar el solvente utilizando un filtro de 0.45 µm.

2. Extracción y preparación de la muestra de carne de pescado. Cortar las muestras en pequeños pedazos y homogenizar en procesadora de alimentos. Pesar 5 g de la muestra homogenizada y agregarle 10 mL de ácido perclórico 0.4 M.. Centrifugar la muestra por 10 min a 3000 rpm y filtrar el sobrenadante. Repetir la extracción con 10 mL de ácido perclórico 0.4M y mezclar con un vortex antes de centrifugar. Combinar los sobrenadantes y ajustar a 25 mL con ácido perclórico 0.4 M.

3. Derivatización de la muestra y estándares. Diluir diferentes cantidades de la solución stock con ácido perclórico 0.4 M para obtener concentraciones de trabajo desde 2.0 – 14.0 µg/mL. Luego, realizar la derivatización como se menciona a continuación

A 1 mL de extracto agregar 200 µL de hidróxido de sodio 2N y 300 µL de solución saturada de bicarbonato de sodio. Agregar 2 mL de solución de cloruro de dansilo y transferir a un baño de calentamiento a 40°C por 45 minutos. Remover los residuos de cloruro de dansilo agregando 100

μL de hidróxido de amonio al 25%. Después de 30 minutos, ajustar con 5 mL de acetonitrilo: acetato de amonio 0.1M (1:1) y filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 μm .

4. Condiciones cromatográficas

- a. Columna: Eclipse Plus C18 5 μm , 4.6 x 100 mm
- b. Gradiente de elución con acetato de amonio 0.1M a pH 7.9 y acetonitrilo. Iniciar con un gradiente de 50% de acetonitrilo y 50% de acetato de amonio de 0.1 M y finalizar con 90% de acetonitrilo luego de 19 minutos.
- c. Flujo de fase móvil: 1mL/min
- d. Volumen de inyección: 20 μL
- e. Longitud de onda del detector: 254 nm

5. Parámetros de validación.

- a. Límite de detección. Inyectar 20 veces el blanco este debe tener una razón entre la señal y el ruido de 3:1. Calcular la desviación estándar de cada grupo.
- b. Límite de cuantificación. Inyectar 20 veces el blanco esta debe tener una razón entre la señal y el ruido de 10:1. Calcular la desviación estándar de cada grupo.
- c. Linealidad. Inyectar tres veces cada concentración de las soluciones estándar de (5.0, 20.0, 40.0, 60.0 y 75.0 $\mu\text{g/mL}$). Por el método de mínimos cuadrados determinar la ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de determinación. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.990
- d. Exactitud. Inyectar por triplicado cada una de las soluciones patrón con las siguientes concentraciones: 20.0, 40.0 y 60.0 $\mu\text{g/mL}$. Obtener el porcentaje de recuperación y la desviación estándar relativa. El porcentaje de recuperación debe estar entre 95 – 105% para cada una de ellas.
- e. Precisión (repetibilidad). Inyectar seis veces las soluciones patrón con concentración de 20.0, 40.0 y 60.0 $\mu\text{g/mL}$. Obtener el porcentaje de coeficiente de variación, que debe ser menor a 5% para cada una de ellas.
- f. Especificidad. La especificidad se realiza al confirmar la identidad de histamina, esto se hace al comparar los tiempos de retención entre las muestras, los estándares de la curva de calibración y un blanco (control negativo). Se obtiene la diferencia porcentual entre las medias de ambas.
- g. Rango. Verificar que haya exactitud, precisión y linealidad aceptable en el intervalo entre la concentración máxima y mínima trabajada en la linealidad.

E. Diseño de investigación

Por sus características el estudio presentado es un estudio observacional prospectivo que se divide en las siguientes fases:

1. Revisión bibliográfica de la información publicada acerca de la identificación y cuantificación de histamina en carne de pescado

2. Definición del tema de trabajo: Diseño y validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de histamina en carne de pescado

3. Definir la metodología analítica a validar

4. Desarrollo del método analítico. El método de análisis se desarrolló al analizar soluciones patrón realizadas con un estándar primario de dihidrocloruro de histamina. Luego se realiza el método de extracción de histamina a partir de la matriz, que es carne de pescado, y su cuantificación a partir de ese extracto.

5. Validación del método analítico. Consiste en evaluar los parámetros requeridos para la validación de métodos analíticos según lo determinado por la ICH en el 2005. Entre estos se incluyen: límite de cuantificación, límite de detección, precisión (reproducibilidad), exactitud, linealidad, rango, robustez y especificidad. Estos consisten en realizar diferentes inyecciones de las soluciones patrón a concentraciones conocidas para poder determinar indicadores estadísticos de la metodología analítica propuesta.

6. Análisis de los parámetros de validación. Consiste en aplicar estadística descriptiva e inferencial, en algunos parámetros, para lograr concluir si el método analítico propuesto para la determinación de histamina en carne puede ser validado. Esto quiere decir que los resultados obtenidos al utilizarlo son confiables y reproducibles.

F. Análisis estadístico

El análisis estadístico para determinar si la metodología analítica cumple con los parámetros para ser validada se realizó en el programa de Excel 2016 con el complemento de Análisis de datos.

Los parámetros estadísticos descriptivos necesarios son: media, desviación estándar, desviación estándar relativa, porcentaje del coeficiente de variación y porcentaje de recuperación. Las herramientas de estadística inferencial necesarias son: estimación de mínimos cuadrados, diferencia de medias, t de student e intervalo de confianza con un $\alpha = 0.05$.

1. Media aritmética. La media aritmética de la suma de los valores de todas las observaciones divididas por el número total de datos (Skoog, West y Holler, 2005).
2. Desviación estándar. La desviación estándar es una medida de dispersión que indica cuánto se alejan los valores del promedio en una distribución (Skoog, West y Holler, 2005).
3. Desviación estándar relativa. La desviación estándar relativa es la desviación estándar expresada como porcentaje (Skoog, West y Holler, 2005).
4. Coeficiente de variación. El coeficiente de variación expresa la razón entre desviación estándar y la media aritmética en forma de porcentaje. Esta se utiliza para analizar el grado de variabilidad de los datos (Skoog, West y Holler, 2005).
5. Porcentaje de recuperación. El porcentaje de recuperación. Indica la razón entre el valor medio medido y el valor teórico que es la cantidad de analito añadido. Este se utiliza para expresar la exactitud (Skoog, West y Holler, 2005).
6. Método de mínimos cuadrados. El método de mínimos cuadrados es el análisis de regresión lineal que permite generar la ecuación de la recta. En donde los coeficientes de correlación y determinación indican que tanto se acercan los datos obtenidos al modelo matemático (Skoog, West y Holler, 2005).
7. Prueba t de student. La prueba t de student se aplica cuando la población sigue una distribución normal. Este se utiliza para analizar una hipótesis nula para determinar si dos sets de datos son significativamente diferentes entre ellos (Skoog, West y Holler, 2005).
8. Intervalo de confianza. El intervalo de confianza es el rango de datos en el que se estima que estará cierto valor desconocido con una probabilidad determinada. Este se calcula a partir de los datos obtenidos de una muestra y se utilizan para estimar el valor de una población (Skoog, West y Holler, 2005).

V. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de datos

La recabación y el tratamiento de datos se llevó a cabo por medio del software ChemStation que es el utilizado por el cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1100 Series. Este analiza las señales enviadas por el detector. A partir de este software se obtienen las áreas correspondientes al estándar de histamina y a la histamina presente en la muestra para poder construir la curva de calibración y obtener las estadísticas descriptivas e inferenciales.

B. Recursos

1. Humanos

Autora: María Sobeyda Rosito Batres

Asesora: Licda. Ana Luisa Mendizábal

Colaboradores: Dr. Herber Morales

Dr. Élfego Rolando López

2. Institucionales

Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada de la Universidad del Valle de Guatemala.

Laboratorio de Inocuidad del Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones del Ministerios de Agricultura, Ganadería y Alimentación.

Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria

3. Materiales

a. Materiales y suministros

Cuadro 3 – “Información sobre los reactivos utilizados”

Reactivo
Estándar de dihidrocloruro de histamina
Cloruro de dansilo
Ácido perclórico
Hidróxido de sodio
Bicarbonato de sodio
Hidróxido de amonio
Acetona
Acetonitrilo
Acetato de amonio
Agua desionizada

b. Mobiliario y equipo

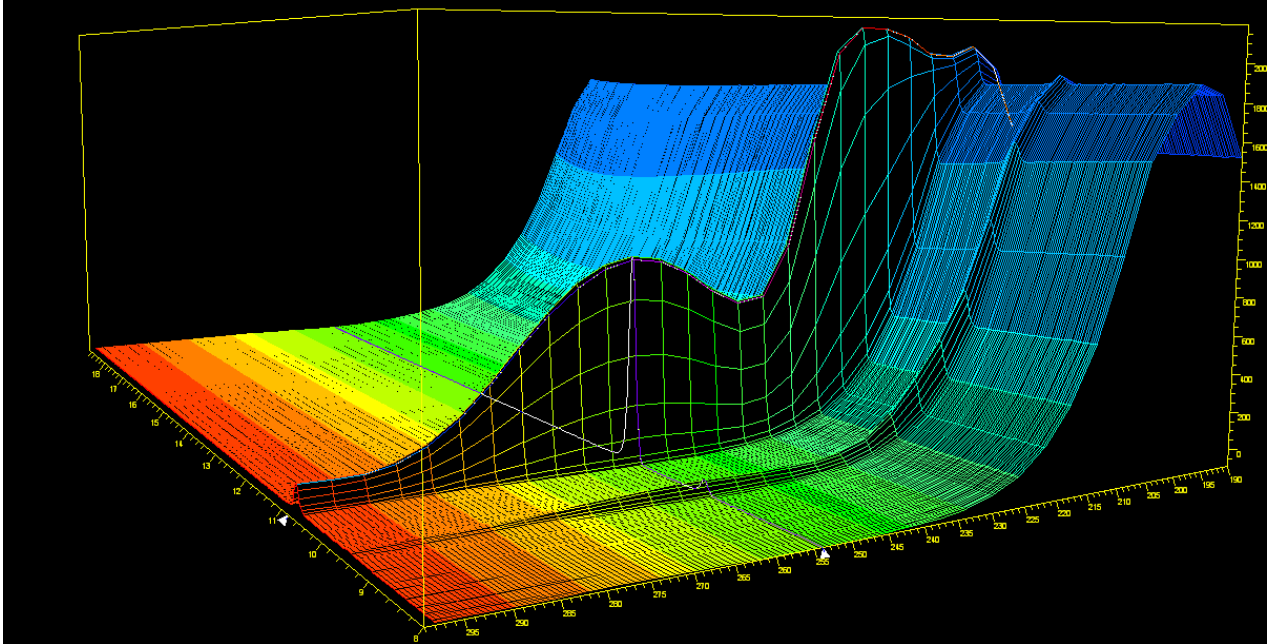
Cuadro 4 – “Información sobre el equipo y cristalería utilizado”

Equipo	Cristalería
Cromatógrafo líquido de alta resolución	Balones aforados de 25, 50 y 100 mL
Centrífuga	Pipetas volumétricas de 2, 4, 5 y 6 mL
Baño térmico	Beakers de 50 y 100 mL
Homogenizador de alimentos	Viales de 2 mL
Filtros de 0.45 μ m	
Pipeta automática	
Potenciómetro	
Balanza analítica	

VI. RESULTADOS

A. Especificidad

Gráfico 1 – “Espectro 3D de histamina a una concentración de 1 mg/mL”



En este gráfico se muestra que la absorción máxima de la histamina se encuentra a 254 nm y es por ello que se realiza la cuantificación a esta longitud de onda. Además, se observa que en el minuto 10.760 eluye únicamente la histamina.

Cuadro 5 – “Tiempos de retención de soluciones estándar a diferentes concentraciones de histamina”

No. de Inyecciones	Tiempo de retención promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación
6	10.760 min	0.038	0.355%

Valor esperado: Coeficiente de variación menor a 2%

B. Linealidad

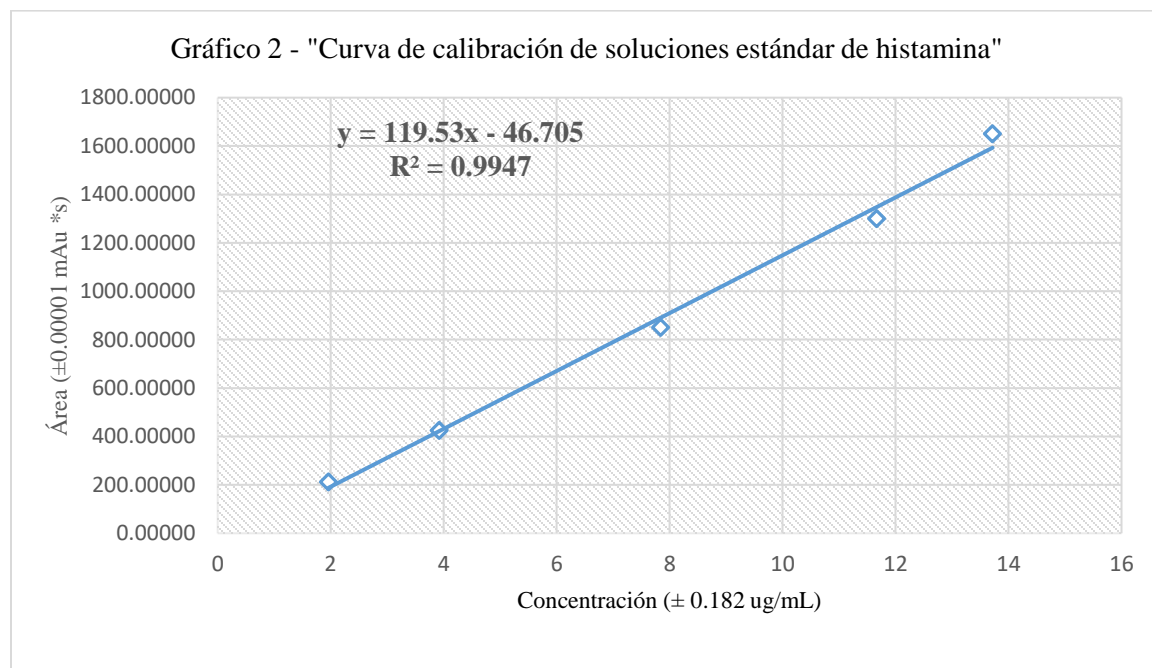
Cuadro 6 – “Curva de calibración de soluciones estándar histamina”

Concentración ($\pm 0.182 \mu\text{g/mL}$)	Área ($\pm 0.00001 \text{ mA*s}$)
1.960	212.16312
3.919	425.32624
7.839	851.42871
11.664	1300.97873
13.719	1650.30497

$$\text{Área} = 119.53268 \pm 5.04755 * [\text{Concentración}] - 46.70461 \pm 45.42141$$

Coefficiente de correlación (r): 0.99733

Valor esperado: Coeficiente de correlación (r) mayor a 0.990



C. Repetibilidad y recuperación

Cuadro 7 – “Resultados de repetibilidad”

Concentración (±0.182 µg/mL)	Área promedio (±0.00001 mA*s)	Desviación estándar	Coefficiente de Variación (%)	Número de inyecciones
3.919	425.80123	2.18102	0.50%	6
7.839	858.65464	2.46449	0.29%	6
11.664	1311.19414	3.74322	0.29%	6

Valor esperado: Coeficiente de variación menor a 11%

Cuadro 8 – “Resultados de recuperación”

Concentración (±0.182 µg/mL)	Área promedio (±0.00001 mA*s)	Recuperación	Número de inyecciones
3.919	439.97283	103.88%	3
7.839	848.65464	95.56%	3
11.664	1293.82280	96.15%	3

Valor esperado: Recuperación entre 80% – 110%

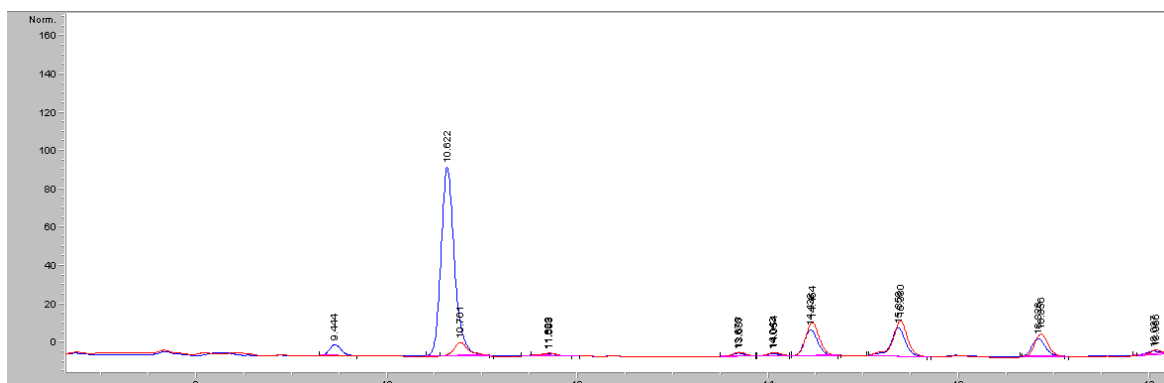
D. Límite de detección y límite de cuantificación

Cuadro 9 – “Resultados de límite de detección y límite de cuantificación”

	µg/mL	Relación señal/ruido
Límite de detección	0.056	3
Límite de cuantificación	0.169	10

E. Análisis de muestras

Gráfico 3 – “Comparación entre la histamina presente en la muestra y la muestra enriquecida a 12 μ g/mL”



En azul se observa el cromatograma de la muestra enriquecida y en rojo se observa el cromatograma de muestra sin enriquecer

Cuadro 10 – “Concentración de histamina en muestras de atún”

Lote	Concentración de histamina (mg/kg de atún)	Número de inyecciones
1	<50	3
2	<50	3
3	<50	3

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Modificaciones en el método cromatográfico

Se realizaron modificaciones en el método propuesto por Altieri et al 2016, con el fin de mejorar las lecturas de las muestras. El buffer de acetato de amonio sufría de crecimiento microbiológico al día siguiente de haberlo preparado. Esto se solucionó al adicionar 1 mL de azida de sodio 0.05% por cada 500 mL de buffer preparado. Al realizar esto se aumentó la vida útil del buffer de 1 día a 7 días. Además, no se utilizó el estándar interno de 1,7 – diaminoheptano ya que no se logró obtenerlo; sin embargo, se obtuvieron resultados repetibles sin necesidad de utilizarlo.

Por otro lado, las soluciones de estándar de histamina se almacenaron a 4°C por 15 días ya que luego de este tiempo se observó que las áreas de los estándares disminuían. Al inyectar una solución de 8 µg/mL en el día de su preparación esta alcanzó un área de 430.69582 mAU *s, una semana después el área disminuyó en un 1.16%, en la segunda semana el área disminuyó en un 2.86% comparada con el área inicial y en la tercera semana se observó una disminución del 10.46% comparada con el área inicial.

Por otro lado, las muestras derivatizadas no son estables a temperatura ambiente, ya que luego de 3 días de haberlas preparado al volver a inyectarlas estas disminuyen el área de la histamina en al menos un 15%.

B. Validación del método analítico

1. Especificidad. La separación cromatográfica de la histamina dansilada se logró con una elución en gradiente. La elución del analito se observó en 10.760 ± 0.038 minutos en las soluciones estándar y en las muestras a los 10.757 ± 0.005 minutos. Para garantizar la identidad de la histamina se comparó el espectro UV de estándares y el de las muestras y se aseguró que estos coincidieran. Además, en los gráficos de tres dimensiones obtenidas por el detector de arreglo de diodos no se observan picos de otras sustancias que eluyeran en el tiempo de retención cercano a la histamina, por lo que no hay otros compuestos de degradación o metabolitos presentes en la carne de pescado que interfirieran con la elución de la histamina. El coeficiente de variación en el tiempo de retención del analito es de 0.355%, lo que es menor al 2.00 %, lo que demuestra que el método es específico para la determinación de histamina en la matriz de carne de atún.

2. Linealidad y rango. Se analizó la linealidad de la histamina en un rango de 2 - 14 µg/mL que equivalen desde 50 – 350 mg/ kg de carne de pescado. En este rango que se observó que el

coeficiente de determinación fue de 0.9973, lo que demuestra que los datos de área de la histamina cumplen con el modelo lineal en un 99.73% de los casos. Al ser el coeficiente de determinación mayor a 0.99, se cumple con los parámetros de la ICH de validación. Además, el rango de linealidad evaluado incluye los límites establecidos por la Unión Europea y por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, por lo que el método es adecuado para el análisis de histamina en pescado con el objetivo de realizar controles oficiales.

En este caso, la curva de calibración no se forzó a pasar por el cero debido a que el análisis estadístico mostró que el error estándar del intercepto es mayor que el intercepto de y . Por lo tanto, en estas condiciones es posible tener un intercepto de y en la curva de calibración (Dolan, 2009).

3. Repetibilidad y recuperación. Se analizó la repetibilidad realizando 6 inyecciones de 3 concentraciones de histamina diferentes. A partir de esto se obtuvo un coeficiente de variación de 0.29 – 0.50%. En la AOAC y la ecuación de Horwitz, se establecen diferentes coeficientes de variación aceptables en base a la concentración del analito dentro de la matriz, al estar trabajando en partes por millón se permite un RSD% de hasta 11% (AOAC, 2011). A partir de este criterio se puede concluir que el método es repetible y preciso ya que el coeficiente de variación está por debajo del permitido.

La recuperación se analizó por medio del método de adición de estándar a tres diferentes concentraciones, de 4 – 12 $\mu\text{g/mL}$ a muestras de atún. Las recuperaciones obtenidas trabajando estas tres concentraciones en triplicado fueron de 95.56 – 103.88%. El criterio de aceptación de la AOAC de acuerdo a la concentración de analito trabajada permite una recuperación de 80 – 110%. Como los resultados se encuentran dentro de este rango se puede concluir que el método es exacto.

4. Límite de detección y límite de cuantificación. El límite de detección y de cuantificación se obtuvieron a partir del análisis de la desviación estándar de 20 inyecciones del blanco y la pendiente de la curva. El límite de detección obtenido fue de 0.056 $\mu\text{g/mL}$, que equivalen a 1.39 mg/kg y el límite de cuantificación obtenido fue de 0.169 $\mu\text{g/mL}$ que equivalen a 4.21 mg/kg. Estos límites son válidos ya que están muy por debajo del límite establecido por la Unión Europea y el MAGA en donde se establece que la concentración de histamina en atún debe ser menor a 100 mg/kg.

5. Robustez. Se realizaron pruebas para implementar el método utilizando otra columna y otro equipo de HPLC. Sin embargo, en ambos casos la presión de la bomba cuaternaria se elevó por encima de los 400 bar, principalmente por el flujo y la naturaleza de la fase móvil. Por lo que no pudo completarse la prueba de robustez dentro del laboratorio en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

6. Análisis de muestras. Se analizaron tres lotes diferentes de atún y tres lomos de cada uno de esos lotes. En las muestras se tuvo un tiempo de retención promedio de 10.757 ± 0.0505 min. Para comprobar que la sustancia eluyente en ese tiempo era histamina, se utilizó el detector de arreglo de diodos para comparar el espectro UV del estándar de histamina, con el de la sustancia eluyente. Los dos espectros coincidían en las nueve muestras analizadas, por lo tanto, puede concluirse que sí había presencia de histamina en las muestras.

La concentración de histamina presente en los tres lotes fue menor a 50 mg/kg. La concentración de las muestras se encontró por debajo del punto mínimo de la curva de calibración y por debajo del límite establecido por el acuerdo Ministerial, por lo que no es necesaria su cuantificación a este nivel. Sin embargo, las muestras si se encontraban por encima del límite de cuantificación.

Según el Acuerdo Ministerial 0271-2010 las muestras de un lote deben tener una concentración promedio menor a 100 mg/kg y ninguna muestra debe tener una concentración mayor de 200 mg/kg. Por lo tanto, los tres lotes analizados cumplen con las especificaciones del Acuerdo Ministerial 0271 – 2010, son inocuos para el consumo humano y pueden ser exportados al mercado internacional.

VIII. CONCLUSIONES

A. Se desarrolló un método para la identificación y cuantificación de histamina en carne de atún, por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta con arreglo de diodos previo a una derivatización pre columna, se cumplieron con los parámetros de validación de: identificación, linealidad, rango, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

B. El método cumplió con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud en un rango de 2.0 – 14 $\mu\text{g/mL}$, que equivalen a 50 – 350 mg de histamina/ kg de carne de atún. Estas concentraciones cumplen con los requerimientos establecidos por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación para aprobar como seguro el producto. Por lo que los resultados obtenidos demuestran que el método es apto para el monitoreo oficial de la carne de atún.

C. Se comprobó la presencia de histamina en los tres lotes de lomo de atún, la identificación de histamina se logró al comparar el tiempo de retención y el espectro UV de la muestra y la solución estándar. La concentración de histamina presente en los tres lotes es menor a 50 mg/kg, por lo que cumplen con las especificaciones establecidas por el Acuerdo Ministerial 0271-2010 del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación y por lo tanto son aptos para la exportación y para el consumo humano.

IX. RECOMENDACIONES

A. Desarrollo de pruebas de robustez ya sea aplicando el método, en otro equipo, realizando las pruebas con otro analista o en otro laboratorio para asegurar que estos factores no afectan los resultados del método y que este es confiable independientemente de estas variaciones.

B. Utilización la columna Eclipse Plus C18 5 μm de 4.6 x 10 mm, ya que se observó que al cambiar de columna la presión de la bomba cuaternaria se elevaba por encima de los 400 bar. Si se debe trabajar con otra columna, el flujo de fase móvil debe adaptarse a las dimensiones de esta.

C. Conservación de la cadena de frío en las muestras de atún analizadas para inhibir la síntesis de histamina y así evitar obtener falsos positivos.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Acuerdo Ministerial no. 0271-2010: Programa nacional de monitoreo para la detección de histamina en carne de atunes y dorado en establecimientos. Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, Guatemala. 4 págs.
- Altieri, I *et al.* 2016. «European official control of food: determination of histamine in food products by a HPLC – UV DAD method». *Food Chemistry*, Italia. XI (2016): 694 – 699.
- AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods*. 2011 Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Estados Unidos. 30 págs.
- Corning Incorporated Life Sciences. 2009. Suggestions for Cleaning Glassware. Estados Unidos. 7 págs.
- Delgado, Nayla. 2012. *Calificación de instalación y operación de equipos de fabricación de productos farmacéuticos*. Tesis de la Universidad Simón Bolívar, Venezuela. 163 págs.
- Dolan, John. 2009. «Calibration Curves, Part I: To b or not to b?». *LCGC North America*, Estados Unidos. XXVII (3): 224 – 230.
- Fabián, Guillermo. 2014. *Determinación de los niveles de la biotoxina histamina en la carne de pescado dorado (Coryphaena hippurus) de venta en tres mercados municipales de la Ciudad de Guatemala*. Tesis de Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 47 págs.
- Epidemiologic Reports of Scombroid Fish Poisoning. 2009. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Estados Unidos. 3 págs.
- Fabián, Guillermo. 2014. *Determinación de los niveles de la biotoxina histamina en la carne de pescado dorado (Coryphaena hippurus) de venta en tres mercados municipales de la Ciudad de Guatemala*. Tesis de Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 47 págs.
- Hungerford, James. 2010. «Scombroid Poisoning: A review». Estados Unidos, *Journal of the International Society of Toxinology*. LVI (2010): 231 – 243.

- Jones, Reuben. 2013. *Histamine and Anti – Histaminics: Part I Histamine. Its chemistry, metabolism, physiological and pharmacological actions*. Estados Unidos, Springer Science & Business Media. págs. 9 - 13.
- Katzung, Bertram. 2012. «Histamina, serotonina y alcaloides del cornezuelo». En *Farmacología Básica y Clínica*. México, The McGraw Hill Companies. págs. 274 - 277.
- Kim, Min-Ki; Mah, Jae-Hyung y Hwang, Han-Joon. 2009. «Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish». *Food Chemistry*, Corea. CXVI (2009): 87 – 95.
- Lázaro, César y Conte, Carlos. 2013. «Métodos cromatográficos para determinar aminas biogénicas en alimentos de origen animal» Brazil, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. L (6): 430 – 446.
- Macromatis, Panos y Quantick, Peter. 2002 «Histamine Toxicity and Scombroid Fish Poisoning: A Review». En *Seafoods – Quality, Technology and Nutraceutical Applications* de Cesarettin Alasalvar. Berlín, Springer – Verlag. págs. 89 – 105.
- McPolin, Oona. 2009. «Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis». Reino Unidos, *Mourne Training Services*. págs. 1 – 12.
- Pinagel, Diana. 2010. *Determinación de los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún, de peces (Familia Escombridae), provenientes de la industria atunera guatemalteca*. Tesis de la Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala. 43 págs.
- Polonini, H *et al.* 2010. «Development os Standarized Procedure for Cleaning Glass Apparatus for Analytical Laboratories». *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, Brasil. XXXII (1): 133 – 136.
- Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products*. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italia. 138 págs.
- Rawles, Dafne y Flick, George. 1996. «Biogenic amines in fish and shellfish». *Advances in Food and Nutrition Research*, Estados Unidos. XXXIX (1996): 329 - 365

- Shahid, Mohammed *et al.* 2010. «Biological and Pharmacological Aspects of Histamine Receptors and Their Ligands». En *Biomedical Aspects of Histamine: Current Perspectives* de Nancy Khadoru, Rahat Ali Khan y Trivendra Tripathi. Estados Unidos, Springer Science & Business Media. págs. 61 - 94.
- Skoog, Douglas, West, Donald y Holler, James. 2005. *Fundamentos de Química Analítica*. Editorial Reverté, España. 833 págs.
- Slorach, S. 1991. págs. «Histamine in Food» En *Histamine and Histamine Antagonists* de Börje Uvnäs *et al.* Berlín, Springer – Verlag. págs. 511 – 515.
- Stadnick, Joanna y Dolatowski, Zbigniew. 2010. «Biogenic amines in meat and fermented meat products». *Food Science and Human Nutrition*, Polonia. IX (3): 251 – 263.
- Steadman, John. 1999. «Assessment of risk arising from food alterations during transport, storage and preservation». En *International Food Safety Handbook: Science, International Regulation and Control* de Kees van der Heijden *et al.* Estados Unidos, Marcel Dekker. págs. 323.
- Taylor, Steve. 1986 «Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects». *CRC Critical Reviews in Toxicology*, Estados Unidos. XVII (2): 91 – 128.
- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 2005. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1). 17 págs.

XI. APÉNDICE

A. Glosario

1. Amina biogénica: biomolécula que contiene uno o más grupos aminos, esta se forma principalmente por la descarboxilación de aminoácidos por el metabolismo de microorganismos. Entre las principales aminas biogénicas se encuentran: histamina, tiramina, cadaverina y putrescina (Stadnick y Dolatowski, 2009).

2. Anticuerpos: glicoproteínas que se encuentran en fluidos corporales del humano cuya función es identificar y marcar elementos extraños, como bacterias y virus, que luego puedan ser atacados por el sistema inmunitario (Katzung, 2012).

3. Antihistamínicos: fármaco que actúa antagonizando los receptores de histamina, bloqueando así la acción de la misma. Se utilizan para reducir los síntomas de las alergias y reducir la secreción de ácido clorhídrico para el tratamiento de úlcera péptica (Katzung, 2012).

4. Bacterias mesófilas: bacterias que tienen mayor velocidad de crecimiento a temperaturas entre 25 – 40°C (Steadman, 1999).

5. Basófilos: leucocitos responsables de la reacción inflamatoria durante la respuesta inmune, como anafilaxia, asma y dermatitis atópica. Estos producen y secretan histamina, serotonina y heparina (Shadid et al, 2010).

6. Calificación: acción que demuestra y documenta que un sistema o equipo está instalado y funcionando correctamente y produce los resultados esperados. La calificación de equipo consiste en una serie de ensayos para asegurar que el mismo cumpla con especificaciones de instalación, diseño y operación (Delgado, 2012).

7. Cromatografía de reparto de fase reversa: cromatografía en la que se utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar (Skoog, West y Holler, 2005).

8. Derivatización: técnica química en la que un compuesto se transforma en otro con una estructura química similar, este tiene nuevas propiedades que facilitan su separación y cuantificación (Skoog, West y Holler, 2005).

9. Elución por gradiente: elución en la que la fase móvil cambia su composición a través del tiempo (Skoog, West y Holler, 2005).

10. Escombroidosis: intoxicación alimentaria que se origina por consumir pescado con altos niveles de histamina. Los síntomas característicos son: mareos, cefaleas, taquicardia, dificultad para respirar, urticaria, erupciones y enrojecimiento (CDC, 2009).

11. Extracción: procedimiento por el que se separa un compuesto químico de una matriz por su solubilidad en un solvente determinado (Hungerford, 2010).

12. Histamina: molécula orgánica compuesta de una amina alifática y un anillo imidazol involucrada en respuestas inmunes e inflamatorias y en el funcionamiento del sistema digestivo (Jones, 2013).

13. Histidina: aminoácido esencial de los seres humanos cuyo grupo funcional es un anillo imidazol, se encuentra presente en productos lácteos, carne, pollo y pescado principalmente (Jones, 2013).

14. Índice de aminas: índice basado en las concentraciones de aminas biogénicas que indica las condiciones higiénicas durante la manipulación de la carne de pescado (Stadnick y Dolatowski, 2009).

15. Mastocitos: granulocito responsable de reacciones alérgicas y anafilaxis. Estos son ricos en histamina y heparina (Shadid et al, 2010).

16. Matriz: todo componente de la muestra que no es el analito (Skoog, West y Holler, 2005).

17. Prurito: síntoma común de las reacciones alérgicas que se caracteriza por irritación de la piel que provoca picazón (Slorach, 1991).

18. Reacción anafiláctica: reacción alérgica grave, en todo el cuerpo generada por un alérgeno, este se une a un anticuerpo IgE, lo que desencadena una cascada de transducción de señal que puede llegar a la liberación de histamina (Katzung, 2012).

19. Retroalimentación negativa: es el sistema de retroalimentación en el cual se responde en dirección opuesta al estímulo. Este se emplea cuando sube la temperatura del sujeto, sube la presión arterial del sujeto, entre otras (Katzung, 2012).

20. Tiempo de retención: es el tiempo que toma el soluto en atravesar la columna. También, se refiere a la suma del tiempo en que el soluto permanece en la fase estacionaria y en la fase móvil (Skoog, West y Holler, 2005).

21. Validación: sistema que establece evidencia con alto grado de seguridad que un proceso conduce a resultados de calidad consistente y dentro de especificaciones determinadas. Para ello se evalúan los parámetros críticos que intervienen durante el proceso (Delgado, 2012).

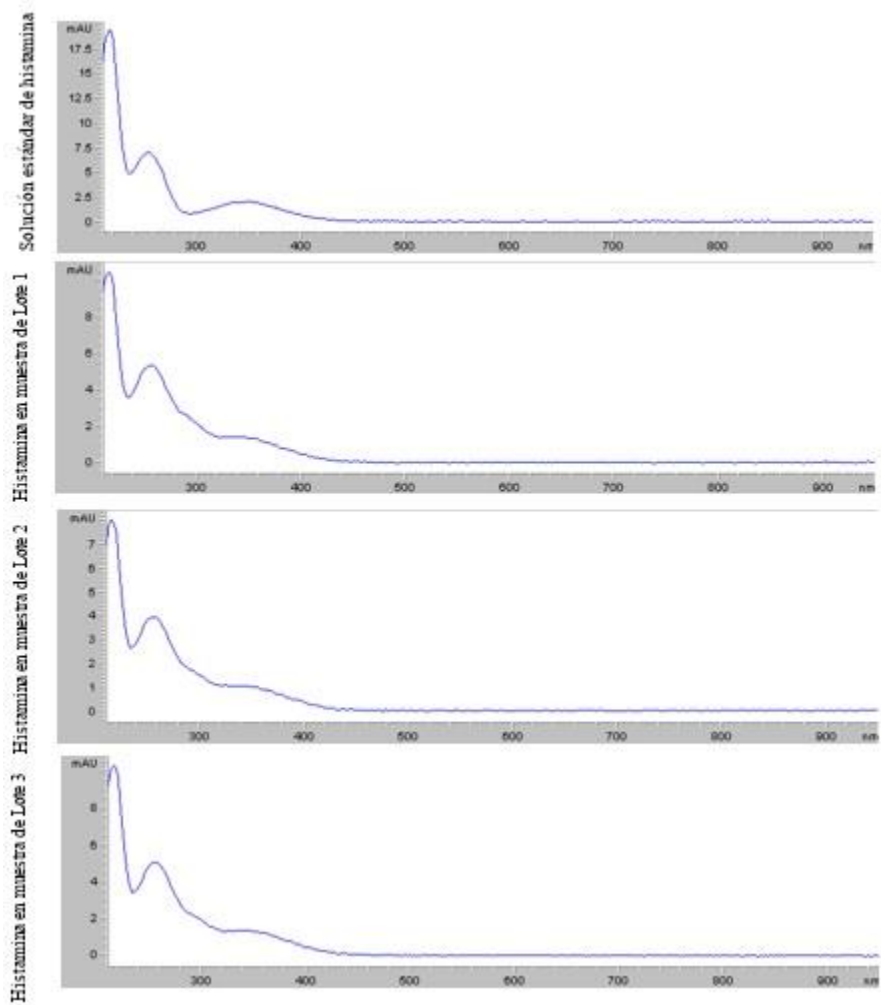
B. Procedimiento para el lavado de cristalería

1. Sumergir la cristalería en una solución de agua jabonosa.
2. En cuanto sea posible, utilizar un cepillo para restregar con una solución de detergente todas las superficies de la cristalería.
3. Enjuagar la cristalería con agua de chorro, permitir que el agua llene el interior de la cristalería y deságüelos para asegurar que todos los residuos de detergente sean eliminados. Realice este paso seis veces.
4. Enjuague la cristalería utilizando agua desionizada al menos tres veces.

Para asegurar que la cristalería fue correctamente lavada después de su uso, agregar 5 mL de ácido perclórico 0.1 M y dejar que este recorra toda la superficie de la cristalería. Recolectar el ácido y realizar el mismo proceso de derivatización que los estándares. Por último, realizar una lectura de esa muestra para asegurar que no se observen lecturas de histamina en la cristalería.

(Polonini *et al*, 2010) (Corning Incorporated Life Sciences, 2009)

Gráfico 6– “Comparación entre el espectro UV de una solución estándar de histamina y el espectro UV de las muestras de los lotes de atún analizados”



Cuadro 11 – “Tiempos de retención y áreas de las 20 inyecciones de un blanco”

	Tiempo retención blanco (± 0.001 min)	Área blanco (± 0.00001 mAU *s)
	10.790	13.55495
	10.777	13.42754
	10.763	16.29454
	10.770	14.28963
	10.760	11.78266
	10.781	15.97580
	10.772	12.79216
	10.776	14.89043
	10.779	11.70284
	10.744	16.98006
	10.794	12.52976
	10.769	12.01183
	10.779	12.04405
	10.772	17.66805
	10.768	11.41229
	10.762	11.63918
	10.779	14.14279
	10.772	11.17861
	10.758	11.58784
	10.769	12.04066
Promedio	10.772	13.39728
Desviación Estándar	0.011281564	2.014966283
Coefficiente de Variación (%)	0.104733365	15.0401108

Cuadro 12 – “Análisis las 3 muestras de los 3 lotes analizados”

	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	Tiempo de retención	Área	Tiempo de retención	Área	Tiempo de retención	Área
	10.761	83.14268	10.763	60.52900	10.759	55.34230
	10.754	79.89696	10.772	59.44010	10.744	58.44671
	10.757	81.55192	10.752	59.59962	10.751	56.90451
Desviación Estándar	0.004	1.62297	0.010	0.58806	0.008	1.55222
Promedio	10.757	81.53052	10.762	59.85624	10.751	56.89784
Coefficiente de Variación	0.033	1.99062	0.093	0.98246	0.070	2.72808