

UNIVERSIDAD NACIONAL
Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE QUIMICA

**DETERMINACIÓN DE HISTAMINA EN PESCADO POR CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA.**

Natalia Villalobos Meneses

TUTOR:

Lic. Sandra León Coto

ASESORES:

Dr. Edwin Chaves Esquivel.

Dr. Ricardo Sánchez Murillo

Heredia

Diciembre, 2022

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado Licenciatura en Química Industrial.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACION

	NOMBRE	FIRMA
	Representante Dirección Escuela de Química, M.Sc. Víctor Alvarez Valverde	_____
	Representante Decanato de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, M.Sc. Roy Pérez Salazar	_____
Tutora	Lic. Sandra León Coto	_____
Asesor 1	Dr. Edwin Chaves Esquivel	_____
Asesor 2	Dr. Ricardo Sánchez Murillo	_____
Lector	Dr. Leonardo Mena Rivera	_____
Proponente	Natalia Villalobos Meneses	_____

RESUMEN

El objetivo de este trabajo de graduación fue determinar histamina por un método de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos en pescado fresco, que incluyó etapas de validación tanto técnico-científica como económica.

Se realizó una revisión bibliográfica de las metodologías de análisis de histamina en pescado fresco; desde determinaciones semicuantitativas de bajo costo y rápidas pero poco sensibles; hasta determinaciones cualitativas espectrofotométricas, electroquímicas, cromatográficas validadas y de costos variables.

Las etapas implicaron la selección y determinación de la naturaleza de la muestra, separación, extracción y ajuste de condiciones; se utilizó una fase móvil de acetonitrilo-agua, columna y precolumna amino de 5 μm x 250 mm x 4.6 mm, detector ultravioleta con arreglos de diodos a una longitud de onda de 210 nm.

En cuanto a los resultados de la validación se obtuvo un método selectivo, homocedástico con un rango lineal de 20.00 mg/kg a 200.00 mg/kg de histamina; la precisión instrumental y de método tienen un coeficiente de variación menor a 5.17 %. La exactitud promedio del método, valorada con respecto a la recuperación, fue de 88.92% con una incertidumbre expandida de ± 0.48 mg/L. Los límites de detección y cuantificación son 5.70 mg/kg y 19.20 mg/kg respectivamente. Asimismo, el método es robusto a variaciones leves de condiciones de análisis.

Posteriormente se determinó la rentabilidad comparando la metodología propuesta con la de AOAC International que es la que actualmente aplica el Servicio Nacional de Salud Animal; entre ellos el Valor Actual Neto y la Tasa de Retorno de Inversión las cuales fueron \$ 163 230 y 56 % respectivamente para la metodología desarrollada y \$ -67 512 y -21 % para la de la AOAC.

AGRADECIMIENTOS

A la Lic. Sandra León por su dirección durante la ejecución de este trabajo de graduación.

Al Dr. Edwin Chaves por su dedicación, enseñanza y disponibilidad.

Al bachiller David Barrantes Cerdas por su ayuda con los equipos e instrumentación y entrega para poder reiniciar este proyecto en un momento que en se creía perdido.

Al Dr. Ricardo Sánchez por su tiempo y consejos desinteresados.

A Ingrid Cerdas y Karla Rojas del Servicio y Salud Animal por su amistad y ayuda cuando inicié este proyecto en el Ministerio de Agricultura.

Al máster Rolando Sánchez Gutiérrez quien se convirtió en un asesor más.

DEDICATORIA

A Dios

**A mis abuelos que siempre
estuvieron pendientes de mis
estudios; mis padres, hermanas y
Doña Sandra que siempre me
alentaron a concluir este proyecto.**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
I. INTRODUCCION	1
1.1.1 Antecedentes y Justificación.....	1
1.2.1 Formación de la histamina.....	3
1.2.2 Influencia de la temperatura	4
1.2.3 Mecanismo de liberación de la histamina en el cuerpo humano	6
1.2.4 Toxicidad de la histamina	7
1.2.5 Límites de concentración permitidos.....	12
1.2.6 Metodologías para determinar histamina.....	13
1.2.7 Situación en Costa Rica de la determinación de histamina.....	14
1.2.8 Sobre la metodología propuesta	17
1.3 Objetivos	23
1.3.1 Objetivo general.....	23
1.3.2 Objetivos específicos	23
II. Metodología	24
2.1 Materiales y equipo.....	23
2.2. Método cromatográfico para el análisis de histamina	26
2.3. Validación	30
2.3.1 Criterios de aceptación	30
2.3.2 Selectividad.....	31
2.3.3 Linealidad	32
2.3.4 Cedasticidad	32
2.3.5 Precisión	33
2.3.6 Límites de Detección y Cuantificación	34
2.3.7 Veracidad.....	36
2.3.8 Robustez.....	39
2.4 Análisis económico	42
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1 Escogencia de condiciones de análisis	44

3.2.1 Selectividad.....	48
3.2.2 Linealidad	52
3.2.3 Cedasticidad	57
3.2.4 Precisión	57
3.2.5. Límites de Detección y Cuantificación	62
3.2.6 Veracidad.....	67
3.2.7 Robustez.....	70
3.3 Análisis económico	72
IV. CONCLUSIONES.....	83
V. RECOMENDACIONES	85
VI. REFERENCIAS.....	87
VII. ANEXOS	96
Anexo 1. Metodología para determinación de Histamina en productos Pesqueros por HPLC.....	96
Anexo 2. Cálculo de Absortividad Molar para un estándar de histamina con una concentración de 20 mg/L.....	101
Anexo 3. Cálculo para enriquecer muestras de Mahi – mahi de 3 mg/L partir de una disolución de 232 mg/L de histamina.....	102
Anexo 4. Cálculo de masa de histamina en muestra de pescado sin enriquecer para el cálculo de porcentaje de recuperación.....	103
Anexo 5. Cuadro cálculo de incertidumbres	103
Anexo 6. Análisis de datos para la Validación de la linealidad	104

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Efectos biológicos de la Histamina en el ser humano, dependiendo de la concentración en el plasma sanguíneo.....	8
Cuadro 2. Criterios de aceptación para el método estandarizado.....	18
Cuadro 3. Parámetros estandarizados y sus respectivas modificaciones para la determinación de la robustez del método	23
Cuadro 4. Diseño experimental para la comprobación de la robustez probada mediante la aplicación de siete cambios pequeños pero deliberados en el funcionamiento parámetros	30
Cuadro 5. Criterios para la interpretación del Valor actual neto y Tasa interna de retorno.....	39
Cuadro 6. Caracterización de la muestra con respecto al compuesto de interés para el desarrollo del método	40
Cuadro 7. Resultados de concentración y área para cálculo de linealidad de patrones de histamina....	52
Cuadro 8. Resultados del análisis ANOVA aplicados a la Ecuación 9	55
Cuadro 9. Precisión instrumental, de muestra de Mahi-mahi enriquecida a 3 mg/L con histamina	58
Cuadro 10. <i>Precisión instrumental de muestra de Mahi-mahi enriquecida a 18 mg/L con histamina</i>	59
Cuadro 11. Precisión del método para muestras de Mahi-mahi enriquecidas con histamina a 3, 18 y 27 mg/kg.....	60
Cuadro 12. Datos obtenidos para generar una curva de calibración para el cálculo de LD y LC.....	62
Cuadro 13. Límites de detección y cuantificación usando la ecuación cuando no hay corrección por blanco	66
Cuadro 14. Límites de detección y cuantificación usando la Ecuación cuando hay corrección por blanco.....	66
Cuadro 15. Porcentajes de recuperación de muestras de histamina enriquecidas a 3 mg/L y 18 mg/L	68
Cuadro 16. Valores de concentración resultantes de 8 muestras enriquecidas a 10 ppm.....	70
Cuadro 17. Efecto individual de cada parámetro en la robustez.	72
Cuadro 18. Comparación de costos de fase móvil por muestra requerida por las metodologías de la AOAC y de la propuesta para el análisis de una muestra de pescado.....	73
Cuadro 19. Comparación de costos de reactivos por muestra requeridos por las metodologías de	

la AOAC y de la propuesta para el análisis de una muestra de pescado	74
Cuadro 20. Costos de disolución de orto-Oftalaldehído requerida por muestra por la metodología de la AOAC para el análisis de una muestra de pescado	75
Cuadro 21. Comparación de costos de mano de obra requeridos por las metodologías de la AOAC y de la propuesta para el análisis de una muestra de pescado.....	76
Cuadro 22. Resumen de costos de análisis anuales requeridos por las metodologías de la AOAC y de la propuesta.....	77
Cuadro 23. Comparación de costos en equipo requerido por las metodologías entre la AOAC y la propuesta planteada.....	78
Cuadro 24. Determinación del Valor Actual Neto y Tasa Interna de Retorno para la metodología de la AOAC	79
Cuadro 25. Determinación del Valor Actual Neto y Tasa Interna de Retorno para la metodología propuesta en esta tesis	80
Cuadro 26. Programa de la bomba.....	99
Cuadro 27. Datos de muestras de histamina sin enriquecer para el cálculo del porcentaje de recuperación a 3 mg/L.....	103

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de Histamina a partir de la descarboxilación microbiana de la histidina	3
Figura 2. Pasos para el desarrollo del método para la determinación de Histamina	27
Figura 3. Esquema de procedimiento de preparación de muestra	29
Figura 4. Espectro de absorción de una disolución estándar de histamina de 20 mg/L en agua en espectrofotómetro UV-Vis con celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz	44
Figura 5. Cromatograma de un estándar de histamina de 20 mg/L con detector UV-Vis a 210 nm y columna Supelcosil LC-NH ₂ , 5 µm x 250 mm	46
Figura 6. Cromatograma de una muestra de Mahi-mahi con detector UV-Vis a 210 nm y columna Supelcosil LC-NH ₂ , 5 µm x 250 mm x 4,6 mm.....	48
Figura 7. Espectro de absorción resultante con detector de arreglo de diodos, de un estándar de Histamina de 20 mg/L.....	49
Figura 8. Espectro de absorción de la histamina, con detector de arreglo de diodos a partir de la muestra de Mahi-mahi.....	50
Figura 9. Espectro de absorción obtenido con detector de arreglo de diodos del segundo pico no identificado de la muestra de Mahi-mahi.....	51
Figura 10. Recta de regresión para la determinación de la linealidad del método de histamina	53
Figura 11. Curva de calibración para la determinación de la señal del ruido	63
Figura 12. Curva para la determinación de la desviación estándar causada por el ruido (Sbl).....	64

I. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes y Justificación

La histamina [1-metil-4-(β -amino-etil)-imidazol] es una amina biogénica, una base orgánica producida por las células vivas del cerebro, del hígado, de los pulmones, de los intestinos, inclusive de las células de la piel. En la naturaleza está en forma inactiva, pero es liberada en su configuración activa como consecuencia de una lesión o por reacciones antígeno/anticuerpo. La histamina es sintetizada fundamentalmente a partir del aminoácido histidina, por acción de la histidina-descarboxilasa y del 5-fosfato de piridoxal, como cofactor (Bevan, 1982).

La histamina se encuentra en mayor concentración en los basófilos y en las células cebadas que son leucocitos, identificables en diversos sitios del cuerpo y en los capilares. La histamina liberada de las células actúa en el aparato vascular produciendo dilatación de vasos y músculos lisos; además, estimula una mayor secreción de glándulas exocrinas del estómago y las vías respiratorias (Scherer, 1983). La histamina es un potente mediador de un gran número de reacciones biológicas, procesos fisiológicos y pato fisiológicos en casi todos los órganos y tejidos, también se le ha implicado claramente como un mediador primario de reacciones alérgicas de fase aguda (IBL International, 2012).

Muchos alimentos, entre ellos quesos, vinos, embutidos y pescado, contienen pequeñas cantidades de histamina que pueden ser fácilmente toleradas por el sistema digestivo que se encarga de metabolizar la histamina ingerida por medio de las enzimas *N*-metiltransferasa y diaminoxidasa hasta degradarse en *N*-metilhistamina e imidazol acetaldehído respectivamente; para ser eliminados por la orina.

Los mecanismos de degradación son insuficientes, desencadenando una intoxicación (Krishna *et al.*, 2013) si la cantidad de histamina es muy grande por ingestión, por ejemplo, en pescados en estado de descomposición. También son insuficientes si hay enfermedades gastrointestinales, presencia de alcohol en sangre, inhibición de alguna de estas enzimas por predisposición genética o efecto de fármacos.

Un mayor consumo de pescado, un aumento de la temperatura promedio del agua y la contaminación de las aguas de los mares, son factores que promueven un monitoreo superior de histamina en pescado. En Costa Rica se utiliza como metodología oficial el método fluorométrico de la AOAC 977.13 (AOAC International, 2022) que realiza el Servicio de Salud Animal (SENASA). Existen esfuerzos científicos en el desarrollo y la validación de métodos para su determinación orientados a reducir costos económicos mediante mejoras técnicas. El objetivo de este trabajo es utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta para determinar histamina de manera rápida, a un costo bajo y en cumplimiento de los estándares y los límites permitidos por los organismos regulatorios a nivel local y mundial.

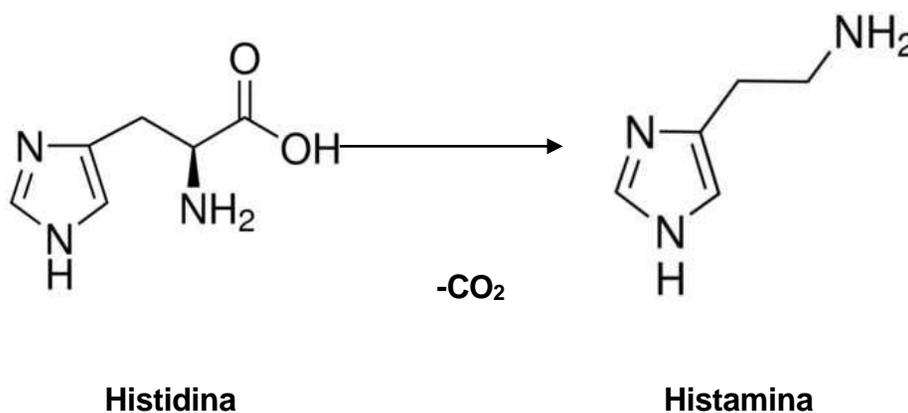
1.2 Marco Teórico

1.2.1 Formación de la histamina

Los peces escombroides y algunos no escombroides poseen grandes cantidades de histidina libre en su tejido muscular; mientras que la formación de histamina en alimentos proviene mayormente de la acción sobre la histidina de la enzima histidina-d Descarboxilasa (Figura 1), por lo que se considera una amina biogénica.

Figura 1

Formación de histamina a partir de la descarboxilación microbiana de la histidina



La histidina-d Descarboxilasa se encuentra en ciertas bacterias que residen en los órganos de la mayoría de los peces escombroides, sin causar ninguna distorsión aparente en el metabolismo. Las bacterias con mayor actividad de la histidina-

descarboxilasa incluyen a especies entéricas como *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* e *Escherichia coli*, así como de otras familias como *Clostridium*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Photobacterium* (Feng *et al.*, 2015).

El tipo de bacterias que actúa es particular en cada especie de pescado y varía de acuerdo con la zona geográfica, alimentación, estación climática, temperatura del agua, calidad del agua, manipulación y limpieza del punto de venta del pescado. Asimismo, la acción de la histidina-descarboxilasa depende de la temperatura, pH y de la concentración de sodio (Feng *et al.*, 2015).

Con la muerte del pez, los mecanismos de defensa ya no son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias productoras de histamina, las cuales empiezan a reproducirse y a producir histamina debido a la acción de la enzima histidina-descarboxilasa que actúa sobre la L-histidina (Food and Drug Administration, 2011).

1.2.2 Influencia de la temperatura

Las bacterias que conllevan a la formación de histamina son capaces de producirla en un rango muy amplio de temperatura. Según un estudio realizado por Hilmer *et al.* (1981), en un lapso de 24 horas, a 23.9 °C se empieza a producir histamina en prácticamente todo el cuerpo del pescado, con un nivel substancial (74.5 mg/100 g) en la parte posterior de la cabeza del pescado. En este estudio, la temperatura óptima para la producción de histamina fue 37.8 °C y se encontraron niveles desde (472 a 643)

mg/100 g. A temperaturas más altas, la formación de histamina decreció y a más de 43.3 °C la degradación del tejido del pescado fue extensa pero no se encontró niveles de histamina (Hilmer et al., 1981). En un estudio del 2007, se encontró que la histamina puede llegar a alcanzar concentraciones tóxicas en un lapso 2 horas a 3 horas de almacenamiento a 20 °C (Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

Una vez que la histidina-descarboxilasa ha entrado en actividad puede seguir catalizando la formación de histamina, aun cuando las bacterias no se encuentren activas; además la enzima puede estar activa a temperaturas cercanas de refrigeración. Esta enzima es más estable que las bacterias productoras de histamina a temperaturas de congelación y puede ser reactivada rápidamente después del descongelamiento. La producción de histamina puede continuar hasta en el almacenaje a temperaturas de congelación (FDA, 2011).

El congelamiento por un período de tiempo muy extenso (24 semanas) puede inactivar las bacterias encargadas de la producción de histamina. La cocción del pescado puede inactivar tanto a las bacterias responsables como a la histidina-descarboxilasa. Sin embargo, una vez que la histamina es producida, ésta no puede ser eliminada por calentamiento (incluyendo la esterilización) o por congelamiento. Después de la cocción es necesario que el pescado se vuelva a contaminar con bacterias para que se dé nuevamente la formación de histamina (FDA, 2011).

Ante la situación antes descrita es válido implementar medidas preventivas para disminuir la probabilidad de la formación de histaminas. Las medidas de control emergentes para retrasar la formación de aminas biogénicas incluyen: irradiación, envasado, modelado microbiano y el uso de aditivos alimentarios o conservantes. Estos métodos solo retrasan la formación de aminas biogénicas en alimentos principalmente a través de la inhibición de bacterias o la actividad de la enzima descarboxilasa responsable de la producción de aminas (Aishath et al., 2010). Por ejemplo, a temperaturas de almacenamiento menores o iguales a 0 °C la producción de histamina es insignificante. Por esta razón, un buen congelamiento y control de la temperatura del pescado, durante todas las etapas de almacenamiento y transporte, es el método de control más importante y práctico que puede ser aplicado (FDA, 2011). Para el caso del pescado, la producción de histamina se previene mediante la refrigeración del mismo durante las etapas de manipulación (Stoskopf, 1993).

1.2.3 Mecanismo de liberación de la histamina en el cuerpo humano

En el organismo humano la histamina se encuentra en pequeñas cantidades en todos los tejidos y fluidos corporales, siendo mayormente almacenada en su forma inactiva en los gránulos metacromáticos de la mayoría de las células y leucocitos basófilos. Después de la estimulación de los mastocitos y los basófilos, la histamina es liberada en forma explosiva en los tejidos adyacentes y en los fluidos corporales. En pacientes que padecen alergias de "tipo inmediato" como la fiebre de heno, asma alérgica, urticaria, neurodermatitis y anafilaxia; el enganche de los alérgenos (i.e., polen, hongos, polvo, ácaros y alimentos) a moléculas específicas de inmunoglobulina E (IgE),

conlleva la desgranulación explosiva de las células cebadas y la liberación de la histamina (IBL International, 2012). Es importante recordar que moléculas específicas de IgE, unidas a la superficie de los mastocitos y los basófilos representan a la inmunoglobulina producida en la terminal de las cadenas pesadas (H) de los anticuerpos que responden a reacciones alérgicas. Las moléculas de IgE son aquellas que controlan las reacciones alérgicas cutáneas y en otros tejidos. En personas con reacción alérgica del tipo mediado por anticuerpos, las concentraciones de IgE en suero son considerablemente altas (Hill et al., 1997).

La intolerancia alérgica y no alérgica a los fármacos, pinturas o cosméticos, así como a varios estímulos físicos como la luz, tacto, calor, frío, tensión o dolor también han sido implicados en la inducción de la liberación de histamina (Maintz et al., 2007).

1.2.4 Toxicidad de la histamina

En pequeñas dosis fisiológicas, la histamina es necesaria para el funcionamiento normal de los diferentes sistemas del cuerpo, como por ejemplo vasodilatación, neurotransmisión, secreción gástrica y a la vez es el principal mediador de los síntomas inmediatos en procesos alérgicos. Sin embargo, la ingestión de alimentos con altos niveles de contaminación con histamina puede derivar en una forma de envenenamiento. Como se trata de una intoxicación, el período de incubación es corto, en un rango desde inmediato hasta 6 horas a 8 horas después de la ingestión (Feng *et al.*, 2015).

Una gran variedad de síntomas puede desencadenarse por la intoxicación. Los más comunes son: salpullido, inflamación localizada, náuseas, vómito, dolor de cabeza, palpitaciones, picazón, diarrea y una sensación de quemadura en la boca. En algunos casos las manifestaciones se complican resultando en hipertensión, broncoespasmos, infarto al miocardio, disfunción refractora del miocardio y disnea (Feng *et al.*, 2015). La actividad biológica en el ser humano depende del nivel de histamina en el plasma (Cuadro 1), y para concentraciones dadas de histamina se ha determinado una secuencia de efectos en el organismo.

Cuadro 1

Efectos biológicos de la histamina en el ser humano en función de la concentración en el plasma sanguíneo

Concentración de histamina (ng/mg)	Efecto Biológico
0-1	Ninguna
1-2	Aumento de secreción gástrica
3-5	Taquicardia, reacciones en la piel
6-8	Disminución de la presión arterial
7-12	Posibles broncoespasmos
100	Paro cardíaco

Nota. Maintz et al. (2007)

El envenenamiento por histamina a menudo se confunde con una reacción alérgica a alimentos debido a la similitud de los síntomas; sin embargo, el envenenamiento por histamina se distingue por la falta de historial de reacciones alérgicas a los alimentos ingeridos sospechosos del envenenamiento, cantidad de

personas afectadas en el brote y las altas cantidades de histamina en los alimentos incriminados (Krishna *et al.*, 2013).

Existen cuatro tipos de receptores de histamina: H1, H2, H3 y H4. La inhibición de la liberación de histamina se lleva a cabo por medio de fármacos antihistamínicos (antagonista de los receptores), los cuales bloquean los receptores H1 y H2 de la histamina. Los receptores son moléculas biológicas que debido a sus características se enlazan con fármacos. Los receptores H1 y H2 son receptores adrenérgicos. Los receptores H1 participan en la estimulación histamínica de la contracción de músculos lisos en intestinos y bronquios; también producen rinitis y dermatitis alérgica. Los receptores H2 son los que participan en otras reacciones histamínicas como la estimulación de la secreción de ácido gástrico en animales y en ser humano, incremento de la frecuencia de contracciones en el músculo cardíaco, entre otras (Bevan, 1982). Actualmente, existen antihistamínicos H1 de primera, segunda y tercera generación según su efecto sedante:

De primera generación

Atraviesan la barrera hematoencefálica, deprimen el sistema nervioso central (SNC), produciendo sedación y tienen acciones anticolinérgicas (disminución de reactividad del músculo liso) (Goodman, 1996).

Según su composición química, pueden clasificarse como:

1. Etanolaminas: clemastina, dimenhidrinato, difenhidramina, doxilamina
2. Etilendiaminas: pirilamina, tripelenamina

3. Alquilaminas: maleato de clorfenamina, maleato de bromofeniramina
4. Piperazinas: clorhidrato de hidroxicina, pamoato de hidroxicina, clorhidrato de ciclizina, lactato de ciclizina, clorhidrato de meclizina
5. Fenotiazinas: prometazina

De segunda generación

Tienen poco efecto sobre el SNC al atravesar poco la barrera hematoencefálica, no tiene efectos anticolinérgicos o sedantes, no obstante en su uso se deberá tener en cuenta la posible interacción medicamentosa con otros depresores (Goodman, 1996).

Según su composición química, pueden clasificarse como:

1. Alquilaminas: acrivastina
2. Piperazinas: cetirizina
3. Piperidinas: terfenadina, astemizol, clorhidrato de levocabastina, loratadina, azatadina, fenindamina, ciproheptadina, difenilpiralina

Los antagonistas del receptor H₂ inhiben la producción de ácidos mediante la unión competitiva y reversible de los receptores de histamina H₂ en la membrana basolateral de las células parietales. En los Estados Unidos han existido en el mercado cuatro diferentes antagonistas de receptores H₂, los cuales difieren principalmente en su farmacocinética y propensión a interacción con otros fármacos, éstos son: cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina (Goodman, 1996).

Los países con la mayor cantidad de incidentes reportados con envenenamiento por histamina son: Japón, Estados Unidos y el Reino Unido. Un caso importante se

reportó en junio del 2017, cuando las autoridades sanitarias españolas retiraron varios lotes de atún fresco y congelado (aproximadamente 14000 kg) procedentes de la ciudad de Almería sospechosos de provocar una intoxicación alimentaria a más de 100 personas en todo el país por la presencia de elevados niveles de histamina (Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria, 2017). También, se han reportado casos en Austria, Bermudas, Canadá, China, Croacia, Egipto, Francia, Alemania, Indonesia, Israel, Noruega, Senegal, Suecia y Taiwán (Krishna *et al.*, 2013).

Peces representativos del suborden *Scombroidea* se han visto involucrados en el envenenamiento con histamina; el atún, el bonito y la macarela parecen ser las especies comúnmente más comprometidas, lo que podría deberse a dos razones: una al hecho de que estas especies son consumidas en mayores cantidades y segundo que en estudios se ha concluido que en esas familias de peces el contenido de histamina es mayor que el contenido de otras aminas biogénicas (Valverde, 1997).

En Estados Unidos, entre 1998 y 2012 las mayores fuentes de envenenamiento por histamina fueron el atún, dorado, marlín y salmón; proviniendo el 80 % de las intoxicaciones del atún y el dorado (Krishna *et al.*, 2013). En Japón, la mayor cantidad de casos se han presentado por el consumo de anchoas, atún y macarela (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012). En Costa Rica, la mayor fuente de envenenamiento local es el dorado (género *Coryphæna*). Según un estudio publicado por la Revista Costarricense de Salud Pública el dorado es la segunda especie más consumida por los costarricenses, después de la corvina (Zúñiga *et al.*, 2002).

1.2.5 Límites de concentración permitidos

Los niveles de histamina libre en el pescado fresco son prácticamente nulos, rondando concentraciones de 1 mg/kg (Hilmer et al., 1981). Concentraciones mayores a 50 mg/kg indican descomposición, aunque se puede llegar a concentraciones entre 200 mg/kg y 500 mg/kg antes de que se tenga una apariencia de que el pescado no está en buenas condiciones. Valores entre 100 mg/kg y 500 mg/kg pueden ser tóxicos; en consideración a la salud pública, en 1998, la FDA ha puesto 50 mg/kg en atún como concentración límite permitida (Beljaars et al., 1998).

La Unión Europea (UE) ha dispuesto los niveles máximos de tolerancia para el contenido de histamina en las especies *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, y *Coryhaenidae* en 100 mg/kg. De acuerdo con la legislación europea el contenido promedio de histamina en un grupo de nueve muestras de pescado fresco o enlatado no debe exceder 100 mg/kg. Dos muestras pueden contener niveles entre 100 mg/kg y 200 mg/kg, pero ninguna muestra puede tener más de 200 mg/kg (Beljaars et al., 1998).

La Comisión del Codex Alimentarius en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron desde 1995 que: “el producto no deberá contener más de 100 mg/kg de histamina” (Valverde, 1997). La FDA determinó como valor superior aceptable 50 mg/kg de histamina en pescado fresco. (FDA, 2011).

1.2.6 Metodologías para determinar histamina.

En los últimos años se ha investigado la determinación de histamina por otros métodos de análisis mediante tecnologías como la electroquímica, utilizando nano tubos de multiparedes de carbón (MWCNT) en conjunto con electrodos modificados de carbón vítreo (GCE) (Geto et al., 2014). En un estudio realizado en Etiopia con esta tecnología se obtuvieron muy buenos resultados como una precisión de 4.62 %, porcentaje de recuperación de 96.6 % a 102.9 % y límites de detección y cuantificación de 0.008 mg/L y 0.028 mg/L. Este método de análisis es ventajoso por su bajo costo instrumental y resultados de los parámetros anteriormente mencionados dentro del rango de aceptación de las instituciones regulatorias; sin embargo, requiere un alto grado de destreza y capacitación del personal que realiza las determinaciones. Otra desventaja es la cantidad de procedimientos para preparar los instrumentos como pulir, recubrir, estabilizar y volver a recubrir los electrodos y la preparación de los nanotubos (Geto et al., 2014).

Otras determinaciones estudiadas involucran aplicaciones biotecnológicas como el uso de biosensores a partir de genes sintéticos diseñados para la secuenciación de la histamina oxidasa (Rosini et al., 2014). En este método se determinó un límite de detección de 5 mg/kg; el cual es bastante alto comparado a metodologías desarrolladas con HPLC, pero el método es también sensible a dopamina y serotonina (Rosini et al., 2014).

Altieri et al., en el 2016 retoma el análisis de aminas biogénicas por HPLC realizando una derivatización con cloruro de dansilo y la post-determinación por HPLC en fase reversa, con detector de arreglo de diodos. Este método fue validado en un rango

de 10 mg/kg a 720 mg/kg, con un $r^2 = 0.9998$, % CV de entre 1.6 – 2.1 % para 122 y 233 mg/L respectivamente y límites de detección y cuantificación de 3 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. La principal desventaja es el tiempo de análisis; tanto para la preparación de la muestra como la determinación cromatográfica, puesto que la histamina tarda en eluir 19 minutos.

Otra propuesta es la de Nalazek-Rudnicka y Wasik quienes en 2017 desarrollaron y validaron un método para la determinación de aminas biogénicas por HPLC acoplado a detector de masas (LC-MS/MS), en vinos y cervezas obteniendo un rango lineal del orden de partes por billón, con parámetros de exactitud y repetibilidad fuera de los rangos permitidos para este tipo análisis según las entidades regulatorias (Nalazek-Rudnicka et al., 2017).

La espectrofotometría ha sido una de las técnicas utilizadas en la determinación de histamina en pescado; Chacón (1998) validó un método espectrofotométrico de bajo costo y valores de repetibilidad, exactitud, porcentaje de recuperación aceptables, pero no muestra evidencia de estudios de selectividad del método.

Entre las metodologías de análisis más tradicionales se encuentra la cromatografía de capa fina; sin embargo, aunque los costos por análisis son menores al HPLC, su sensibilidad es menor a otras metodologías como las mencionadas anteriormente (Zhihua et al., 2011).

1.2.7 Situación en Costa Rica de la determinación de histamina

Debido a las regulaciones concernientes a sustancias tóxicas, incluida la histamina, en la comercialización de productos marinos como algunos exportadores, particularmente en países tropicales en vías de desarrollo, han sido afectados por las pérdidas económicas que conlleva la devolución de pescado debido a su descomposición; además la falta de control aumenta el riesgo de que los productos contaminados sean destinados al consumo local.

En Costa Rica, generalmente, se cuantifica el nivel de histamina tanto en pescado para consumo local en caso de sospecha de intoxicación masiva relacionada, como en pescado para exportación e importación; sin embargo, el mayor número de análisis se realiza en productos exportables, por ser un requisito para el ingreso del producto en Estados Unidos y en los países miembros de la Unión Europea (J. Rojas, comunicación personal, 2018).

Actualmente, los análisis de histamina se realizan a pescado congelado o fresco en especies productoras de histamina; entero, eviscerado sin cola y sin cabeza, presentado en filetes, lomos y filetes empanizados. Incluye las sardinas, el atún en lomos precocidos, las tortas de pescado empanizadas crudas o cocinadas y el pescado ahumado o empacado al vacío. Las especies a las que se les realizan los análisis son especies escombroides como atunes y bonitos; no escombroides como sardinas, macarela, dorado, marlín, wahoo, gallo, escolar, jurel, entre otras.

El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) a través del Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) es la institución encargada de cuantificar la histamina en productos de importación, exportación y de consumo local en casos de intoxicación masiva. De 350 análisis realizados durante el 2017, 4.5 % excedieron el límite máximo permisible en Costa Rica y Estados Unidos (J. Rojas, comunicación personal, 2018).

El análisis se realiza mediante dos métodos, el primero con biosensor enzimático y el segundo, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). El método con biosensor enzimático tiene un rango lineal de 5 a 50 mg/kg con un límite de cuantificación de 5 mg/kg, es específico, selectivo y tarda 2 minutos en dar un resultado una vez aplicados los reactivos a la muestra. Sus principales limitaciones son económicas y operativas; la diversidad de soluciones y reactivos; la preparación con 12 horas de antelación de las mismas y el vencimiento de los reactivos de 3 días. (Salleres et al., 2016).

El método cromatográfico, utilizado en el SENASA para productos de exportación a la Unión Europea, está basado en el método fluorométrico oficial de la AOAC 977.13 (AOAC International, 2022) consiste en la separación cromatográfica por HPLC con derivatización post-columna con ortophtaldehído y detección por fluorescencia (Tracy et al., 1995). Este método tiene alta sensibilidad y reproducibilidad; pero consume gran cantidad de reactivos y disoluciones que se descomponen fácilmente y son utilizadas para la extracción, la fase móvil, la regeneración de columna, entre otros. El análisis

demanda múltiples procesos, trabajo, tiempo, costos de materiales y equipo con respecto a otras técnicas de análisis, incluida la desarrollada en esta tesis.

También la cromatografía de capa fina ha sido usada por SENASA, es de bajo costo pero baja sensibilidad como se mencionó con anterioridad

1.2.8 Sobre la metodología propuesta

En resumen, en las últimas décadas se han estudiado y aplicado distintas metodologías para la determinación de histamina en el pescado; desde determinaciones cualitativas y semicuantitativas de bajo costo y rápidas pero sensibles a cambios ambientales y poco exactas, hasta determinaciones espectrofotométricas, electroquímicas, biológicas y cromatográficas con parámetros de validación muy aceptables, otras con parámetros fuera de los rangos permitidos y con costos tanto bajos como altos.

La metodología empleada en esta propuesta de análisis se basó en la combinación de la experiencia profesional con el conocimiento disponible sobre metodologías publicadas y presentes en referencias bibliográficas, principalmente la propuesta por Altieri et al., (2016) en cuanto a la utilización de HPLC con detector de arreglo de diodos y la extracción de la muestra. Altieri et al., (2016) propuso una metodología que cumple con parámetros de validación muy estrictos como se mostrará en la discusión, pero que tiene la desventaja que requiere un tiempo de análisis muy extenso de 19 minutos. Es importante señalar que, para efectos de aplicar la metodología a muestras en procesos de monitoreo, es importante señalar que el costo de la mano de obra y reactivos en un análisis inciden fuertemente en el costo final del análisis. Este trabajo se propone cambiar

la columna C18 y la fase móvil compuesta por acetato de amonio 0.1 M y acetonitrilo utilizadas por Altieri por una columna y una fase móvil que aceleren el tiempo de retención, así como eliminar la derivatización de la muestra con cloruro de danzilo. Desde luego, no solo el tiempo es importante sino que se requiere someter el método a la validación, según normas y criterios internacionales.

También es imprescindible conocer algunas características de la muestra para desarrollar una metodología de determinación de histamina por HPLC. En el Cuadro 2 se muestran las principales características de una muestra de pescado fresco y sus biomoléculas. Esas características permiten la selección de las condiciones de la preparación de la muestra del apartado 2.2

Cuadro 2

Caracterización de la muestra con respecto al compuesto de interés para el desarrollo del método

Variable	Características de la muestra
Cantidad de compuestos presentes	Múltiples
Estructura química (funcionalidad) de los compuestos de interés	Aminoácidos, proteínas, aminas biogénicas
Peso molecular de los compuestos de interés	Menor a 200 g/mol
pKa de los compuestos de interés	Ligeramente básicos
Solubilidad de la fracción de interés	Soluble en agua y mezclas de metanol-agua
Rango de concentración de interés de los compuestos	1 mg/L a 100 mg/L

Con fundamento en lo anterior y las características físicas y químicas de las aminas biogénicas y del resto de la matriz, se debe separar una fracción de la muestra para proveer una solución libre de interferencias, apta para la inyección en la columna; en la que el disolvente de la muestra debe ser compatible con la fase móvil, sin afectar la retención de la muestra (Snyder et al., 1997). En el caso de las muestras de pescado, es preferible que su estado de subdivisión sea pequeño y homogéneo, que favorezca el proceso de extracción, debido al aumento en el área superficial de la muestra (Snyder et al., 1997). La extracción de las aminas biogénicas del resto de los componentes proteicos de la muestra, se realizó con un método rápido, sencillo y con pocos reactivos involucrados como es el método de Altieri et al., (2016) que consiste en utilizar una disolución de extracción de ácido perclórico (PCA) al 10 % que precipita las proteína.

Para la escogencia del detector se tomó en cuenta el trabajo realizado por Altieri et. al (2016) con un detector de arreglo de diodos (DAD). El detector ultravioleta con arreglo de diodos presenta una señal muy estable, la diferencia entre la señal de ruido y el pico de interés es por lo general bastante grande y es selectivo. Su principal ventaja es poder determinar la pureza de un analito o picos relacionados a impurezas durante la separación cromatográfica. El uso del DAD para demostrar la selectividad de un método es permitida por el Consejo Internacional de Harmonización (International Council for Harmonisation, 1995). Un requisito es que la sustancia a analizar tenga grupos cromóforos en el rango de longitud de onda de este detector, 185 nm a 900 nm.

La longitud de onda escogida debe proveer una absorbancia aceptable (mayor a 0.2 unidades de absorbancia, pero menor a 1.0) combinada con una buena transmitancia del disolvente (absorbancia menor a 0.1) (Snyder et al., 1997).

Para el análisis de linealidad aunque el proceso lógico consistiría en evaluar cuáles son los límites de concentración en los que el método analítico pierde su linealidad, normalmente se toma como punto de partida un intervalo de concentraciones ya establecido de acuerdo con la experiencia, el conocimiento analítico de la técnica empleada y en función del límite de cuantificación obtenido (AEFI, 2001).

El factor de resolución como medida de la separación entre dos picos se utiliza para determinar la capacidad del método para producir una respuesta para el analito de interés distinguible de todas las otras respuestas de los demás componentes de la muestra (AEFI, 2001).

La comprobación de si el método utilizado es homocedástico o heterocedástico en los niveles de concentración requeridos, se realizó con la prueba de Cochran, la cual consiste en seleccionar la varianza mayor y compararla con la sumatoria de todas las varianzas, incluyendo la máxima (Miller y Miller, 2002).

El Límite de detección (LD) lo define Skoog et al., (2001) como la concentración de analito que proporciona una señal 3 veces superior al ruido; asimismo, el Límite de cuantificación (LC) como la concentración 10 veces superior al ruido de fondo. La Asociación Española en concordancia con la IUPAC dispone que se puede calcular el LD y LC de un método a partir del conocimiento de la curva de calibrado (AEFI, 2001), desviación estándar de un blanco y el valor de la señal ruido.

Aunque la incertidumbre no es un parámetro de validación, es importante su determinación ya que cuando se da a conocer el resultado de la medición de una cierta cantidad física, es indispensable dar una indicación cuantitativa de la calidad del resultado, para que pueda tenerse una idea de su confiabilidad (Miranda, 2000). La incertidumbre combinada toma en cuenta la incertidumbre estándar tipo A más la incertidumbre tipo B proveniente de la regresión lineal, la curva de calibración, el factor de dilución, la resolución del cromatógrafo y la balanza analítica con la que se pesó la muestra. Asimismo la incertidumbre expandida es una cantidad que define un intervalo alrededor del resultado de una medición, y que se espera abarque una fracción grande de la distribución de valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando (Miranda, 2000).

Otra de las valoraciones es la robustez que se define como la susceptibilidad de un método analítico a cambios menores mediante la introducción deliberada de variaciones menores razonables por parte del laboratorio en las condiciones experimentales. Esas condiciones se pueden expresar como una lista de materiales de muestra, analitos, condiciones de almacenamiento, condiciones ambientales y / o de preparación de la muestra. Habitualmente se han utilizado variaciones de $\pm 10\%$ con respecto al valor nominal (Muscarella et al., 2007).

La precisión del método y la precisión instrumental están relacionadas inversamente con la dispersión de los datos, la cual se estima de manera absoluta por la desviación estándar y de manera relativa por el Coeficiente de Variación (Miller y Miller, 2002). En esta tesis se analizaron la precisión instrumental y del método según el criterio de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI, 2001).

La determinación de la veracidad en muestras biológicas debe ser realizada indirectamente utilizando el enriquecimiento de muestras reales a concentraciones conocidas. Se utilizó el criterio de aceptación y modelo propuesto por la AOAC (1998).

Desde un punto de vista económico el Valor Actual Neto (VAN) es un procedimiento que permite calcular el valor presente de un determinado número de flujos de caja futuros, originados por una inversión; entendiéndose por flujos de efectivo netos la diferencia entre los ingresos periódicos y los egresos periódicos (Brealey et al., 2011). Asimismo la Tasa Interna de Retorno (TIR) es la tasa de interés o rentabilidad que ofrece una inversión. Es decir, es el porcentaje de beneficio o pérdida que tendrá una inversión para las cantidades que no se han retirado del proyecto (Ehrhardt et al., 2007). Es una medida utilizada en la evaluación de proyectos de inversión que está muy relacionada con el valor actualizado neto (VAN). También, se define como el valor de la tasa de descuento que hace que el VAN sea igual a cero, para un proyecto de inversión dado (Ehrhardt et al., 2007).

El VAN y el TIR indican si es aconsejable o no aceptar el proyecto, tal como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3

Criterios para la interpretación del Valor actual neto y Tasa interna de retorno

Valor	Significado
VAN y TIR > 0	La inversión produce ganancias por encima de la rentabilidad exigida. Proyecto de inversión aceptado.
VAN y TIR < 0	La inversión produce pérdidas por debajo de la rentabilidad exigida. Proyecto de inversión rechazado.
VAN y TIR = 0	La inversión no produce pérdidas ni ganancias. Analizar si debido a otras razones estratégicas conviene llevar a cabo el proyecto.

Nota. Mascareñas (2008)

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar histamina por Cromatografía de Alta Resolución (HPLC) y Detección Ultravioleta con Arreglo de Diodos.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar el análisis de histamina utilizando HPLC sin empleo de la derivatización pre- o post-columna.
2. Validar el análisis de histamina según los estándares regulatorios.
3. Comparar el costo por muestra del método comparado con el método oficial utilizado por SENASA.

II. Metodología

3.1 Materiales y equipo

El presente trabajo de graduación se realizó en la Escuela de Química de la Universidad Nacional. Todos los equipos y los reactivos fueron provistos por la Escuela de Química, a excepción de la muestra de pescado que fue adquirida en un supermercado local.

A continuación, se detallan los materiales y equipos utilizados:

Equipo utilizado para análisis de histamina

- a. Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible marca Perkin Elmer; modelo Lambda 2s
 - Fuente de luz: Lámpara de Deuterio en el rango ultravioleta y tungsteno-halógeno para el rango visible
 - Detector: fotomultiplicador DAD serie 200
 - Celdas de cuarzo, 3.5 mL, 10 mm paso de luz

- b. Cromatógrafo líquido (HPLC) marca Perkin Elmer, modelo DAD serie 200 con la siguiente configuración:
 - Bomba Cuaternaria
 - Detector de arreglo de diodos (PDA)
 - Horno calentador de columna
 - Software de control y análisis por PDA

- c. Balanza analítica marca Sartorius, modelo TE214S

- d. Licuadora

Reactivos y disoluciones

Reactivos y materiales de extracción:

- Solución al 10 % de Acido Perclórico (PCA) a partir de ácido perclórico concentrado, grado ACS, marca JT Baker, CAS 2766-44
- Agua ultra pura grado uno, 18 μ ohms de resistividad
- Papel filtro Whatman, 0.22 μ m, código 1001075
- Papel filtro Whatman No. 3
- Embudos de plástico

Reactivos para fase móvil:

- Acetonitrilo, grado HPLC, marca JT Baker, CAS 75-05-8
- Agua grado uno, 18 μ ohms de resistividad y filtrada a través de membranas de 0.22 μ m.

Materiales para el estudio cromatográfico:

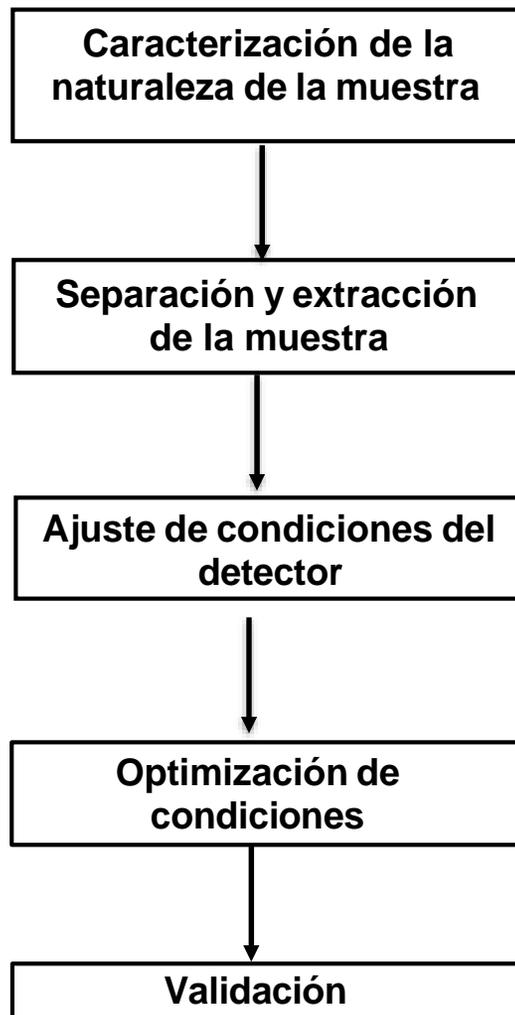
- Histamina dihidroclorhídrica, pureza \geq 99 %, marca Sigma, CAS 56-92-8 para la preparación de estándares
- Solución de ácido clorhídrico 0.1 mol/L
- Muestra de pescado Mahi-mahi
- Columna Supelcosil LC-NH₂, 5 μ m x 250 mm x 4.6 mm catálogo 58338

2.2. Método cromatográfico para el análisis de histamina

Como primer paso se determinaron las etapas fundamentales para poder desarrollar y validar la cuantificación de histamina como se muestra en la Figura 2

Figura 2

Pasos para determinación de histamina.



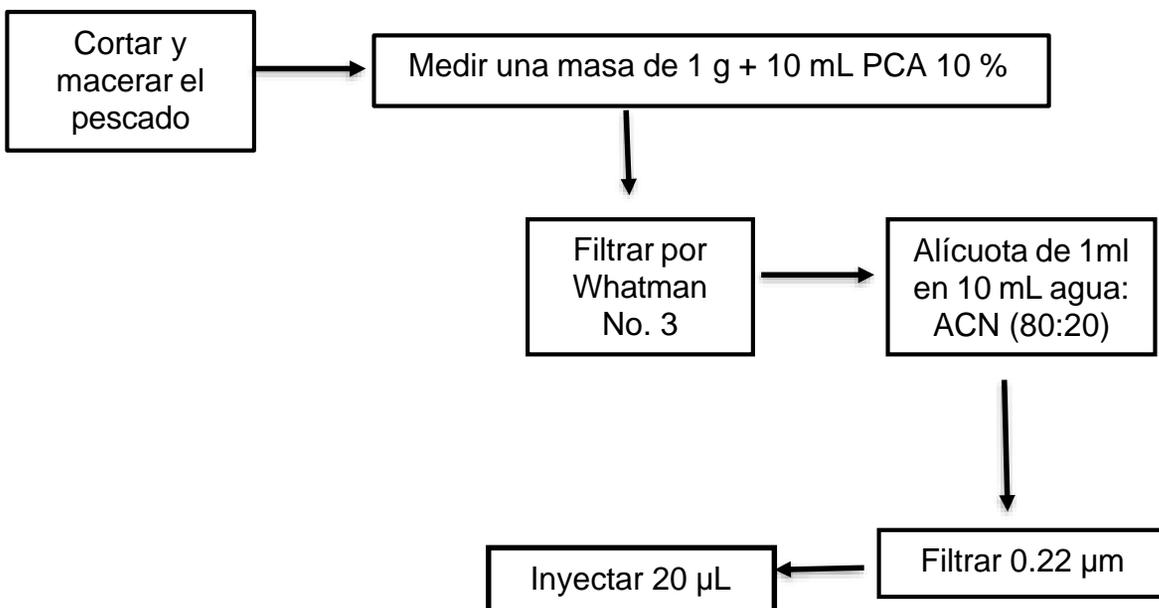
La homogenización de la muestra de pescado se realizó primero licuando la muestra para obtener partículas más pequeñas y después se maceró. Para la extracción de las aminos biogénicas del resto de los componentes proteicos se utilizó una disolución de extracción de ácido perclórico (PCA) al 10 % según (Minocha y Long, 2004).

Una vez eliminada la interferencia por proteínas, se procedió a filtrar la muestra con filtros de membrana de nylon de 0.22 μm , luego se diluyó la muestra en una disolución de agua y acetonitrilo (ACN) (80:20), misma fase móvil que será utilizada en el análisis cromatográfico, Figura 3.

Es importante indicar que el porcentaje promedio de humedad en Mahi-mahi es de 77 % (Quintero *et al.*, 2012); en todas las metodologías de las bibliografías analizadas inclusive los métodos oficiales de la AOAC no hacen mención al porcentaje de humedad de la muestra para el cálculo de concentración de histamina en pescado; en este trabajo se expresa la concentración de histamina en base húmeda.

Figura 3

Esquema de procedimiento de preparación de muestra



Escogencia de la longitud de onda del detector y condiciones cromatográficas.

Para encontrar la longitud de onda de mayor absorción de la histamina, se preparó una disolución patrón de 20.00 mg/L de histamina dihidroclorhídrica en agua (mejor disolvente para la histamina y que no absorbe luz) y se realizó un escaneo en la región ultravioleta con un espectrofotómetro UV-Vis entre 200 nm y 350 nm.

Definida la longitud de onda se procedió a realizar la separación cromatográfica de la histamina. En esta etapa se evaluaron dos columnas, se definieron las condiciones de la fase móvil, haciendo uso de un patrón de histamina de 20 mg/L y se determinó la simetría del pico y factor de capacidad de la columna.

2.3. Validación

Una vez que se desarrollaron las condiciones experimentales, se realizaron las pruebas de las variables con sus respectivos criterios de aceptación de manera descrita a continuación.

2.3.1 Criterios de aceptación

Se utilizaron como criterios de aceptación para los parámetros de validación los que se presentan en el Cuadro 4

Cuadro 4.

Criterios de aceptación para el método estandarizado

Parámetro medido	Criterio	Valores de referencia
Selectividad	Tiempo de retención Identidad del pico Cromatográfico Resolución Cromatográfica entre picos cercanos	TR ¹ Análisis del espectro de absorción ¹ >1.5 ¹
Linealidad	Ecuación de la recta Coeficiente de determinación (r ²) Análisis de FANOVA Prueba Shapiro-Wilk	y = ax + b ≥0,990 ¹ Rechazar H ₀ si p<0.05 ⁴
Cedasticidad	Prueba de Cochran	G _{exp} < G _{tablas} ¹ (α=0.05, K=5, n=3)
Precisión Instrumental	Coeficiente de variación (CV)	≤ 3.75 % (100 ppm) ² ≤ 5.18 % (10 ppm) ² ≤ 7.8 % (1 ppm) ²
Precisión del método	Coeficiente de variación (CV)	≤ 5.3 % (100 ppm) ² ≤ 7.3 % (10 ppm) ² ≤ 16% (1ppm) ⁵ ≤ 5.6 % (0.1%) ⁵
Límite de detección	Extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero	50 % del Límite Máximo de Residuos
Límite de cuantificación	Extrapolación de la recta de calibrado a concentración cero	
Veracidad	Porcentaje de Recuperación	≤90-107% (100ppm) ² ≤80-110% (10ppm) ²
Robustez	Desviación estándar de las diferencias	SDi<SD ³

Nota. ¹AEFI (2001); ²AOAC (1998); ³Karageorgou y Samanidou (2014);
⁴ Ramachandran y Tsokos (2021); ⁵Rivera y Rodríguez (octubre, 2010)

2.3.2 Selectividad

La selectividad para comprobar que el método utilizado diferencia el analito de interés de otras sustancias, se determinó dejando una muestra de Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) a 25°C, durante 3 días simulando condiciones para la aparición de posibles interferencias para después procesarla por triplicado. Las muestras junto con un estándar de histamina se analizaron por HPLC para comparar tiempos de retención y evaluar la capacidad de separación por medio del factor de resolución y post análisis por detector de arreglo de diodos.

Factor de Resolución (R_s)

El factor de resolución como medida de la separación entre dos picos (AEFI, 2001), se calculó de la siguiente manera:

$$R_s = C * \frac{t_{r1} - t_{r2}}{W_1 - W_2}$$

Ecuación 1. Fórmula factor de resolución

Donde:

R_s = factor de resolución

C = constante igual a 1.18

W_1 y W_2 = anchura de pico al 50% de la altura

tr_1 y tr_2 = tiempo de retención donde $tr_1 < tr_2$

2.3.3 Linealidad

Para el análisis de linealidad se realizaron 3 curvas de calibración con estándar de histamina a 5 niveles de concentración: (2, 3, 7, 12 y 20) mg/L (Anexo 1), con un total de 15 determinaciones ($n = 15$), esto según criterios de la AEFI (2001) para su posterior análisis estadístico el cual incluyó estimación de la ecuación de la recta, análisis de los coeficientes de regresión, análisis de varianza (ANOVA), estimación y valoración del coeficiente de determinación y normalidad de los residuales.

2.3.4 Cedasticidad

Se utilizó la prueba de Cochran (Ecuación 2) para determinar si el comportamiento del método utilizado es homocedástico o heterocedástico en los niveles de concentración requeridos, según Miller y Miller (2002).

$$G_{\text{exp}} = \frac{S_{I(\text{max})}^2}{\sum_{l=1}^k S_l^2}$$

Ecuación 2. Fórmula de la prueba de Cochran.

Donde

$S_{I(\text{max})}^2$ = Varianza mayor de los valores de y (respuesta en área)

S_i = Varianza de los valores de y (respuesta en área)

2.3.5 Precisión

Precisión instrumental

Se evaluó la precisión del instrumento mediante la determinación del coeficiente de variación a partir de una curva de calibración con patrones líquidos y del análisis de 7 repeticiones de una misma muestra enriquecida; o sea, 7 inyecciones de un mismo vial. Para asegurar esta precisión se realizaron 7 repeticiones, a 2 niveles de concentración, 3 mg/L y 18 mg/L; o sea 14 inyecciones y se determinó el coeficiente de variación a cada nivel de concentración.

Precisión del método

El ensayo de repetibilidad también se efectuó utilizando una curva de calibración con patrones líquidos y 9 alícuotas de una muestra de Mahi-mahi enriqueciendo tres de ellas a 3.00 mg/L, tres a 18.00 mg/L y tres a 27.00 mg/L. Cada una se pesó, preparó y analizó independientemente. El ensayo fue realizado por el mismo instrumento y el mismo analista.

2.3.6 Límites de Detección y Cuantificación

Para obtener los límites de detección y cuantificación del método se realizaron tres curvas de calibración, cada una a partir su propio estándar de histamina a cinco concentraciones distintas: (1, 2, 3, 4 y 5) mg/L. Después se aplicó un solo modelo de regresión con los 15 puntos.

Existen varias formas de calcular el Límite de detección (LD) y el Límite de cuantificación (LC). Una de ellas es a partir del conocimiento de la curva de calibración, desviación estándar de un blanco y el valor de la señal ruido en casos que no se realice corrección frente a un blanco, según lo señalan la IUPAC y (AEFI, 2001). Se expresa como:

$$CL = \frac{Y_{bl} + (K * S_{bl})}{(m * \sqrt{n})}$$

Ecuación 3. Fórmula para cálculo de límites de detección y cuantificación cuando no hay corrección por blanco

Donde:

CL = concentración de analito en el límite de cuantificación.

K = constante que usualmente se considera 10 para el LC e igual a 3 para el LD.

S_{bl} = desviación estándar correspondiente a la señal del blanco.

Y_{bl} = señal proporcionada por el ruido.

M = pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método.

Frente a la concentración de analito.

N = número de repeticiones por cada concentración.

Otra forma es hacer el cálculo con la Ecuación 4; que es una fórmula que se utiliza cuando hay corrección por un blanco (AEFI, 2001). En el caso de este trabajo se aplicaron ambas ecuaciones y se compararon los resultados.

$$CL = \frac{K * S_{bl}}{(m * \sqrt{n})}$$

Ecuación 4. Fórmula para cálculo de límites de detección y cuantificación cuando si hay corrección por blanco

CL = concentración de analito en el límite de cuantificación.

K = constante que usualmente se considera 10 para el LC e igual a 3 para el LD.

S_{bl} = desviación estándar correspondiente a la señal del blanco.

M = pendiente de la curva de calibrado obtenida al representar la respuesta del método.

Frente a la concentración de analito.

N = número de repeticiones por cada concentración.

2.3.7 Veracidad

Para la determinación de la veracidad se utilizó el porcentaje de recuperación como estimador. En el análisis de veracidad se prepararon por triplicado muestras no fortalecidas (blanco) y muestras frescas de Mahi-mahi fortalecidas para una concentración resultante de histamina de 3.00 mg/L y 18.00 mg/L en el equipo; valores que fueron escogidos de acuerdo al rango lineal y límite de cuantificación obtenidos. Las muestras fueron fortalecidas según el cálculo que se muestra en el Anexo 3

Para el cálculo matemático del porcentaje de recuperación se utilizó la Ecuación 5.

$$\textit{Porcentaje de recuperación} = \frac{X_m}{\mu} \times 100$$

Ecuación 5. Fórmula porcentaje de recuperación

Donde:

X_m = valor medio hallado

μ = valor aceptado como verdadero (3 mg/L y 18 mg/L)

(AEFI, 2001)

Incertidumbres

En el desarrollo de esta metodología se determinaron las incertidumbres estándar tipo A, tipo B y las incertidumbres combinada y expandida (Miranda, 2000).

La evaluación tipo A de la incertidumbre estándar se determinó de los valores de la concentración de 3 muestras enriquecidas a 3 ppm con X_k tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$u(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

Ecuación 6. Fórmula para incertidumbre tipo A

Donde:

u = incertidumbre estándar

x_i = cantidades de las mediciones

k = factor de cobertura

n = cantidad de mediciones independientes

(Miranda, 2000)

Para la determinar la incertidumbre combinada (Miranda, 2000) se utilizó la Ecuación 7.

$$u_c(m) = \sqrt{u_A^2(m) + u_B^2(m)} :$$

Ecuación 7. Fórmula de incertidumbre combinada

Donde

u_c = incertidumbre combinada

m = mesurando

u^2_A = incertidumbre estándar tipo A

u^3_B = incertidumbre estándar tipo B

(Miranda, 2000)

La incertidumbre expandida que se espera abarque una fracción grande de la distribución de valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando, se denota U y se obtiene al multiplicar la incertidumbre combinada $u_c(y)$ por un factor de cobertura k según la Ecuación 8.

$$U = ku_c(y)$$

Ecuación 8. Fórmula de incertidumbre expandida

Donde

U = incertidumbre expandida

$k = 2$ para un nivel de confianza de 95%

u_c = incertidumbre combinada

y = mesurando

(Miranda, 2000)

2.3.8 Robustez

En el presente trabajo la robustez se evaluó a través del diseño factorial elaborado por Youden y Steiner y aplicado por Karageorgou et al., (2014) en el cual se evaluaron los siguientes parámetros con sus respectivas modificaciones:

Cuadro 5

Parámetros estandarizados y sus respectivas modificaciones para la determinación de la robustez del método

Parámetro estandarizado		Parámetro modificado	
A	Disolución de extracción de la muestra: ácido perclórico al 10%	A	Disolución de extracción de la muestra: ácido perclórico al 9%
B	Filtrar muestra por Whatman #3	B	Filtrar muestra por Whatman #2
C	Dilución de la muestra en agua y acetonitrilo (80-20)	C	Dilución de la muestra en agua y acetonitrilo (75-25)
D	Filtración de eluente por filtro de 0.22 μm	D	No filtración del eluente
E	Acetonitrilo marca JT Baker	E	Acetonitrilo marca Merck
F	Agua 18 μohms de resistividad y filtrada	F	Agua destilada y filtrada
G	Flujo fase móvil pasos 2: 1.5 L/min	G	Flujo fase móvil pasos 2: 1.5 L/min

Se realizaron 8 ensayos para la evaluación de los 7 parámetros enriqueciendo a 10 ppm 8 muestras de pescado. En el primer ensayo no se realizó ningún cambio. El Cuadro 6 muestra el diseño experimental efectuado.

Cuadro 6

Diseño experimental para la comprobación de la robustez probada mediante la aplicación de siete cambios pequeños pero deliberados en el funcionamiento parámetros

Parámetro	Número de Ensayo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Disolución de extracción de la muestra	A	A	A	A	a	a	a	a
Filtración de la muestra	B	B	b	b	B	B	b	b
Dilución de la muestra	C	c	C	c	C	c	C	c
Filtración del eluyente	D	D	d	d	d	d	D	D
Marca de solvente de fase móvil	E	e	E	e	e	E	e	E
Calidad de agua de fase móvil	F	f	f	F	F	f	f	F
Flujo de fase móvil	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultados observados	S	t	u	v	w	x	y	z

El efecto de la totalidad de los parámetros sobre el método se calculó restando el valor promedio de la concentración de cada uno de los ensayos del 2 al 7 del valor promedio de la concentración del ensayo 1 y se aplicó la Ecuación 9.

$$S_{D_i} = \sqrt{2 \times \sum \left(\frac{D_i^2}{7} \right)}$$

Ecuación 9. Fórmula para cálculo de robustez

Donde

S_{D_i} = desviación estándar de las diferencias

D_i = diferencias de las concentraciones

(Karageorgou et al., 2014)

El efecto individual de cada uno de los parámetros sobre el método se determinó mediante una prueba de valor de *t*, aplicando la Ecuación 10.

$$t = \frac{\sqrt{n} \times |D_i|}{\sqrt{2} \times S.D.}$$

Ecuación 10. Fórmula valor de *t*

t = valor de *t*

n = número de repeticiones para cada ensayo

D_i = diferencias de las concentraciones

S.D = desviación estándar del método

(Karageorgou et al., 2014)

2.4 Análisis económico

El análisis económico consistió en la comparación del Valor Actual Neto (VAN), de la Tasa Interna de Retorno (TIR) y del costo del análisis por muestra entre la metodología propuesta en este trabajo de graduación y la metodología oficial realizada en el SENASA.

Para la determinación del costo del análisis por muestra se obtuvo la información de costos de reactivos, fase móvil, materiales varios de empresas distribuidoras de este tipo de componentes de laboratorio. También, se obtuvo la información del costo de mano de obra promedio de un laboratorista químico quien es usualmente el encargado de realizar este tipo de análisis. Todos estos datos se sumaron hasta lograr obtener el costo total por muestra para ambas metodologías.

Valor Actual Neto y Tasa Interna de Retorno

El Valor Actual Neto (VAN) (Brealey et al., 2011) fue calculado con la fórmula del VAN:

$$VAN = \sum_{t=1}^n \frac{V_t}{(1+k)^t} - I_0$$

Ecuación 11. Fórmula de VAN

Donde

Vt = representa los flujos de caja en cada periodo t.

I₀ = valor del desembolso inicial de la inversión.

N = número de periodos considerado.

K = tipo de descuento de 5%

(Ehrhardt et al., 2007).

A su vez la tasa interna de retorno TIR utiliza la fórmula la siguiente:

$$TIR = \frac{-I + \sum_{i=1}^n F_i}{\sum_{i=1}^n i * F_i}$$

Ecuación 12. Fórmula de TIR

Ft = flujos de dinero en cada periodo t

I = inversión realiza en el momento inicial (t = 0)

n = número de periodos de tiempo

(Ehrhardt et al., 2007).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

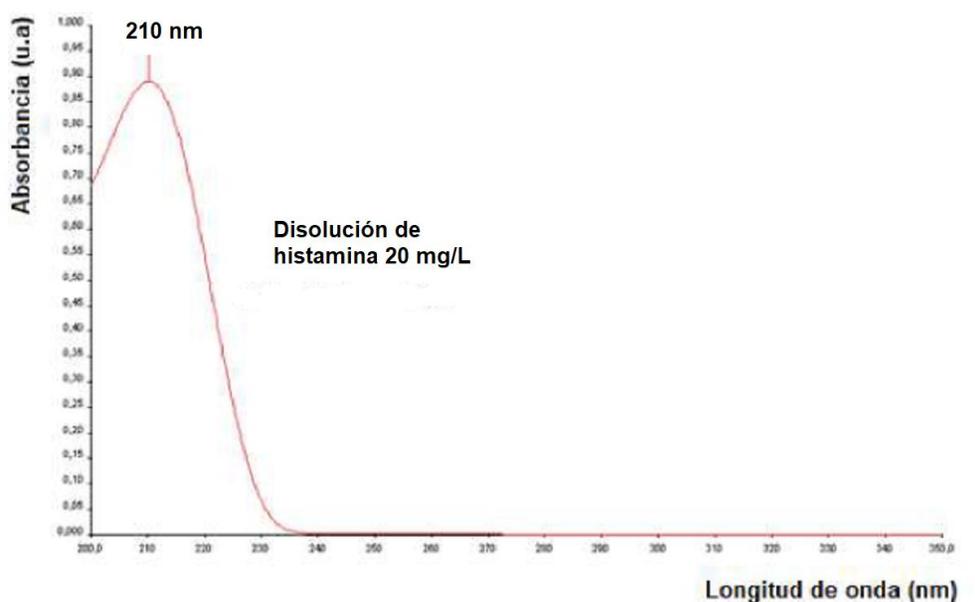
3.1 Escogencia de condiciones de análisis

Escogencia de la longitud de onda del detector y condiciones cromatográficas

La primera condición cromatográfica que se determinó fue la longitud de onda de mayor absorción de un estándar de histamina dihidroclorhídrica en agua en el espectrofotómetro ultravioleta, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2. La longitud de onda que presentó la mayor absorbancia en un barrido espectral fue 210 nm, resultando en 0.90 unidades de absorbancia, para una disolución de 20.00 mg/L de concentración de histamina (Figura 4).

Figura 4

Espectro de absorción de una disolución estándar de histamina de 20 mg/L en agua en espectrofotómetro UV-Vis con celda de cuarzo de 10 mm de paso de luz

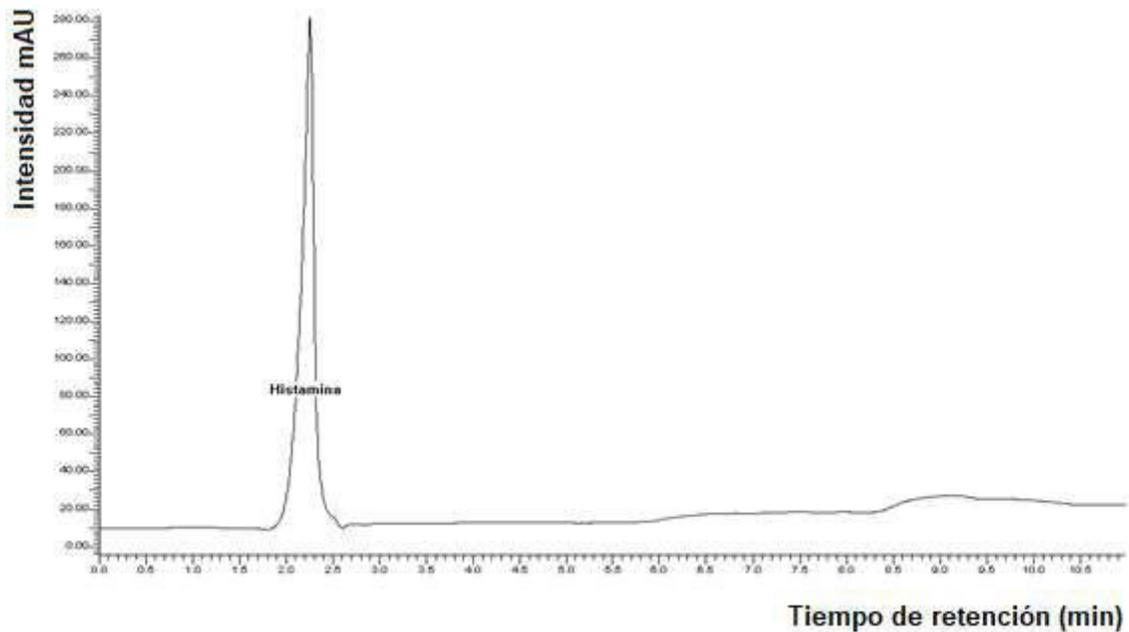


Durante el desarrollo de la fase experimental se realizaron las primeras pruebas con columna de fase reversa, C8, la cual es menos hidrofóbica que una C18 y puede utilizar mezclas de fases móviles polares en las que la histamina se disuelve (Skoog et al., 2001). Los resultados no fueron satisfactorios debido a que la retención de la histamina fue menor a un minuto, lo que no es recomendable (AEFI, 2001). Se debe tomar en cuenta que normalmente cuando hay existencia de histamina, también la hay de otras aminas y es necesario separarlas cromatográficamente; una retención menor a un minuto dificulta esta labor. Nalazek-Rudnicka y Wasik (2017) reportaron la elución de putrecina a los 15.28 min, histamina a los 15.78 min y cadaverina a los 16.03 min; o sea menos de 1 min entre ellas. Özogul et al. (2002) también reportaron tiempos de retención de menos de 20 segundos entre 2-feniltilamina e histamina.

Se experimentó luego con una columna con grupo funcional amino y se valoró la fase móvil compuesta por agua y acetonitrilo, la cual no absorbe a la longitud de onda escogida, 210 nm. Después de varias pruebas de gradiente de fase móvil, el mejor cromatograma resultante se muestra en la Figura 5; el cual es un cromatograma limpio con un tiempo de retención superior a un minuto con respecto al análisis con la columna C8, para un tiempo de retención de aproximadamente 2.25 min que es menor a 3.25 min, 15.78 min y 17.04 reportados por Özogul et al. (2002), Nalazek-Rudnicka y Wasik (2017) y Hockl et al. (2000) respectivamente.

Figura 5

Cromatograma de un estándar de histamina de 20 mg/L con detector UV-Vis a 210 nm y columna Supelcosil LC-NH₂, 5 μm x 250 mm x 4.6 mm



Se midió el factor de capacidad (k') mediante la Ecuación 13, obteniéndose un factor de capacidad de 1.3. Valores de k' menores a 1 indican que el pico eluye muy próximo a la señal del disolvente, pudiendo verse comprometida la selectividad. Valores mayores a 1 como el obtenido indican una mayor posibilidad de óptima resolución (AEFI, 2001).

$$k' = \frac{2.3 + 1}{1} = 1.3$$

Ecuación 13. Fórmula factor de capacidad

También se evaluó el factor de simetría mediante la Ecuación 14, resultando en una simetría igual a uno la cual indica una perfecta simetría (Masana, 2020).

$$As = \frac{7 + 7}{14} = 1$$

Ecuación 14. Fórmula factor de simetría

Escogencia las condiciones de preparación de la muestra

Las condiciones de extracción y manipulación de las muestras fueron escogidas en base a la investigación de naturaleza de la muestra y de referencias bibliográficas como es el caso de Altieri et al. (2016) como expuesto en el apartado 1.2.8 se Esas características permitieron la selección de las condiciones de la preparación de la muestra del apartado 2.2.

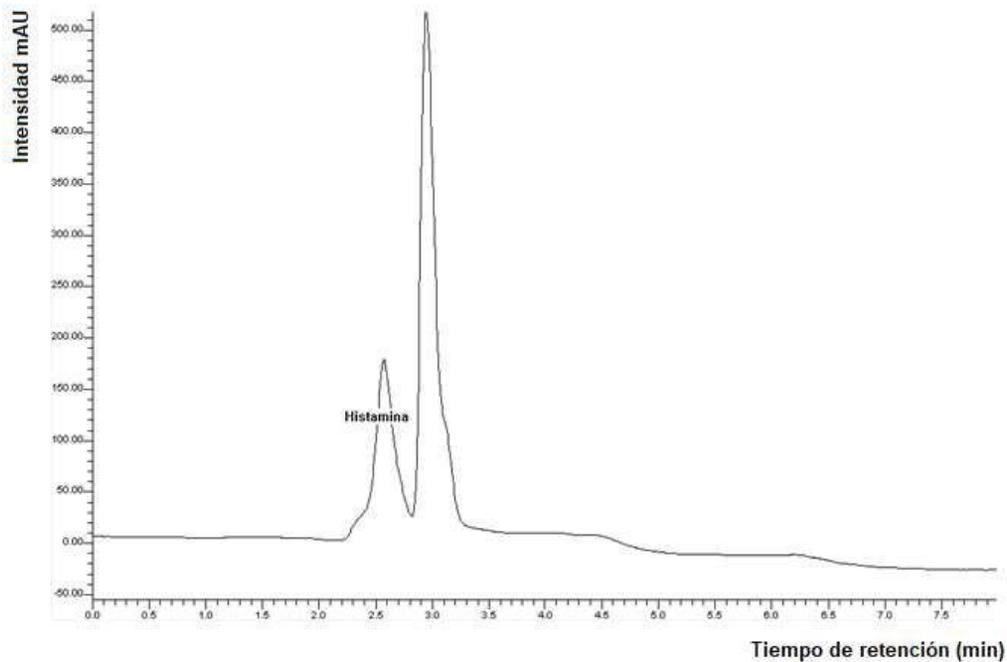
Después de escoger la condiciones de extracción y separación de histamina en una muestra de pescado, se procedió a la validación del procedimiento para determinar los límites de variabilidad aceptables que hacen un método utilizable para un analito en una matriz determinada; usando la instrumentación especificada y la muestra a analizar.

3.2.1 Selectividad

Esta prueba fue la primera que se realizó para conocer en qué grado la respuesta del método es única del analito y no de alguna interferencia. Un primer paso para asegurar la selectividad del método es comparar el tiempo de retención entre una muestra y un estándar de histamina. La Figura 6 presenta el cromatograma de una muestra inyectada de Mahi-mahi sometida 3 días a temperatura ambiente, con la intención de provocar la aparición de histamina, impurezas y otros posibles productos de degradación.

Figura 6

Cromatograma de una muestra de Mahi-mahi con detector UV-Vis a 210 nm y columna Supelcosil LC-NH₂, 5 μm x 250 mm x 4.6 mm

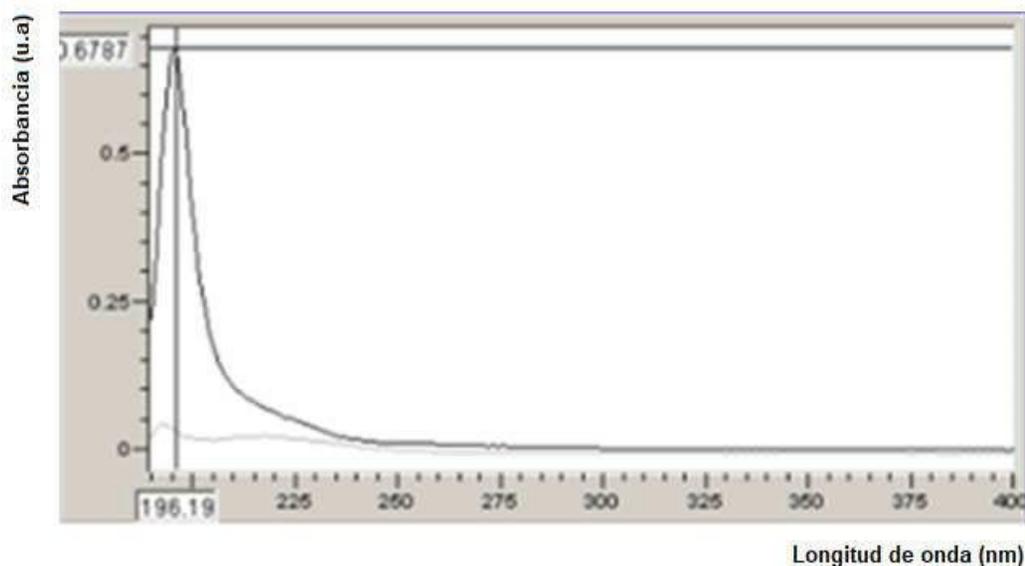


En el cromatograma anterior y en sus otras dos repeticiones aparecen dos picos bien definidos. El primer pico eluye a 2.2 min que es aproximadamente el mismo tiempo de retención del estándar de histamina de 20 mg/L (Figura 5) y el segundo no identificado, unos 30 segundos después y de una altura mayor.

Para este método cromatográfico no es suficiente el análisis de la correspondencia de los tiempos de retención entre el estándar y el pico de la muestra identificado como el analito. Para comprobar esta correspondencia en la Figura 7 se muestra el espectro de absorción de un estándar de histamina de 20 mg/L preparado específicamente para realizar este análisis por arreglo de diodos y comparar su espectro de absorción con los espectros de absorción de todos los picos de la muestra de Mahi- mahi de la Figura 6.

Figura 7

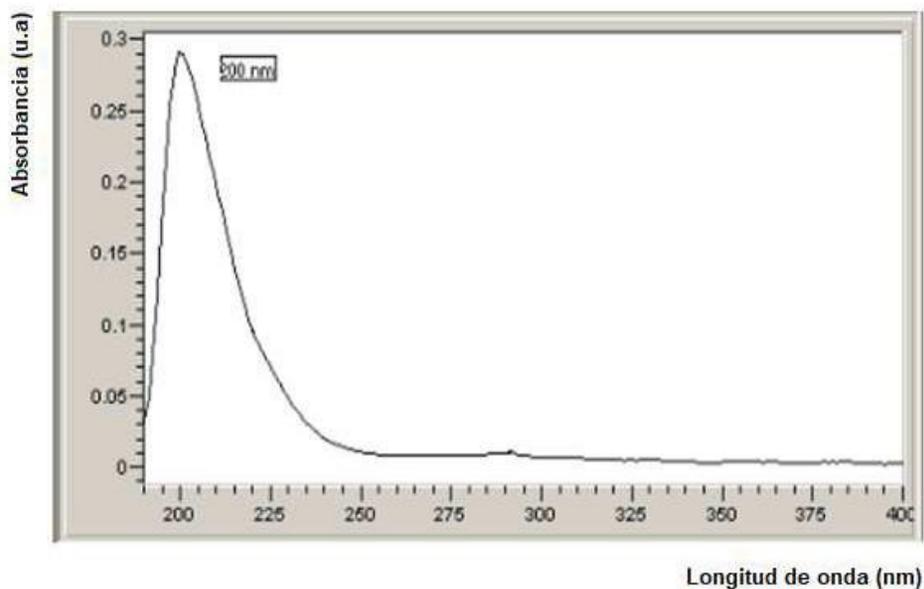
Espectro de absorción resultante con detector de arreglo de diodos, de un estándar de Histamina de 20 mg/L



Para la comprobación planteada en párrafo anterior, en la Figura 8 se observa el espectro de absorción correspondiente al pico que eluye a los 2.2 min, el cual concuerda con el espectro de absorción del estándar de histamina de la Figura 7 ambos obtenidos con detector de arreglo de diodos; se puede concluir que este primer pico es histamina. La forma de los dos espectros es la misma y su máximo de absorción varía solo en dos nanómetros, por lo tanto, está dentro de un rango aceptable.

Figura 8

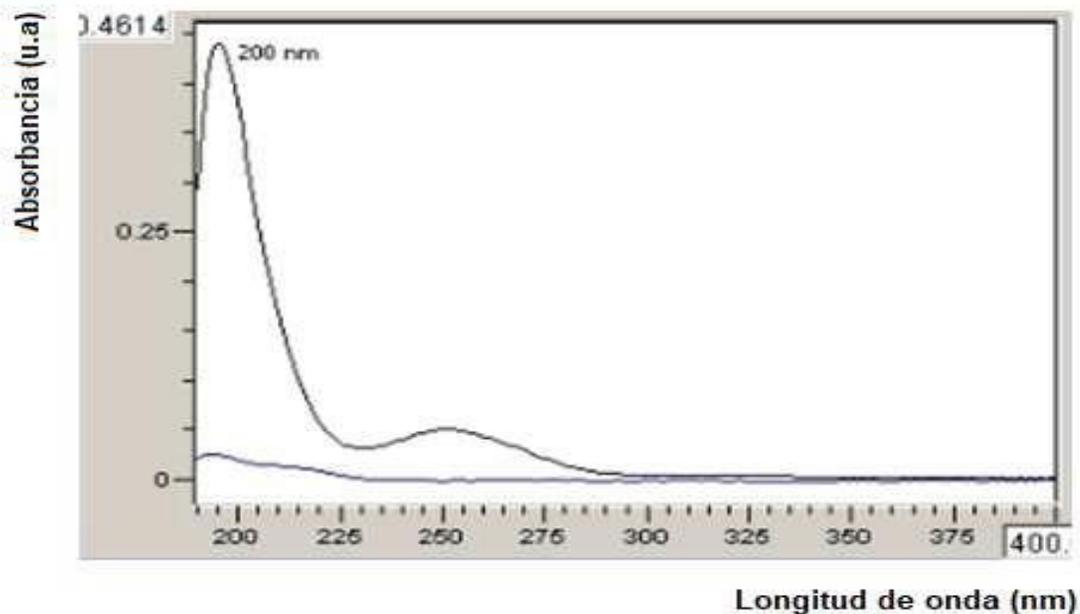
Espectro de absorción de la histamina, con detector de arreglo de diodos a partir de la muestra de Mahi-mahi



En la Figura 9 también obtenido del detector de arreglos de diodos aparecen dos máximos de absorción, 200 nm y 260 nm, que evidentemente es distinto al espectro de absorción de histamina de la Figura 7. Después de 3 días a temperatura ambiente, existen muchas sustancias que resultan de la descomposición de todos los tejidos del pescado. Existe una referencia de un estudio realizado por Du y otros en el que se analizaron varias aminas biogénicas y uno de los cromatogramas resultantes tiene gran similitud con el obtenido en este trabajo (Du et al., 2002).

Figura 9

Espectro de absorción obtenido con detector de arreglo de diodos del segundo pico no identificado de la muestra de Mahi-mahi



Complementariamente, se calculó el factor de resolución R_s por medio de la Ecuación 1 por la cual se obtuvo un factor de 1.48. Según la AEFI (2001), lo recomendable es que el factor de retención sea mayor a 1.5. Beljaars et al (1998) es la única metodología que menciona haber hecho esta determinación; sin embargo no da el dato obtenido y lo único que menciona es que se debe ajustar la fase móvil es caso de que el R_s sea menor a 1.5.

3.2.2 Linealidad

La linealidad determina la capacidad del método de dar resultados proporcionales a la concentración del analito en una muestra; entre otras cosas permite determinar el rango de concentración para las cuales el método es funcional. En el Cuadro 7 se muestran los tiempos de retención y las áreas para tres repeticiones de cada uno de los patrones de histamina dihidroclorhídrica. Los tiempos de retención de todas las repeticiones es muy similar, lo que indica una buena reproducción en todas las inyecciones.

Cuadro 7

Resultados de concentración y área para cálculo de linealidad de patrones de histamina

	Patrón 1 2.00 mg/L		Patrón 2 3.00 mg/L		Patrón 3 7.00 mg/L		Patrón 4 12.00 mg/L		Patrón 5 20.00 mg/L	
Rep	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área
1	2.32	73519.49	2.38	145620.50	2.34	336324.15	2.32	604440.74	2.32	884997.43
2	2.37	73253.09	2.36	143715.03	2.37	337042.69	2.32	592850.67	2.32	895345.65
3	2.33	73337.95	2.38	144577.59	2.37	336228.08	2.33	609247.62	2.34	870643.22
Media	2.34	73370.18	2.37	144637.71	2.36	336531.64	2.32	602179.68	2.33	883662.10

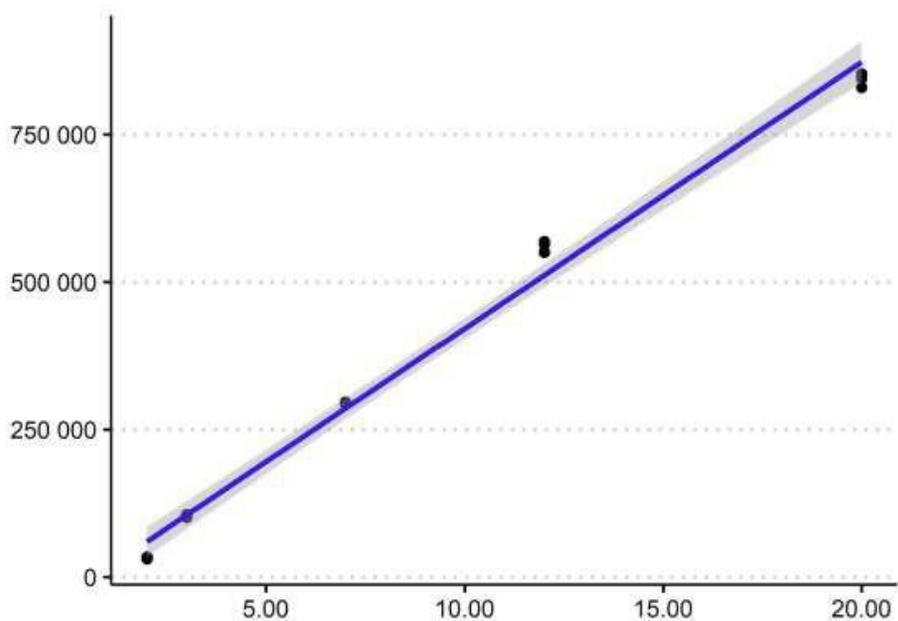
Nota. TR: tiempo de retención

En la Figura 10 se representa la recta de regresión lineal construida a partir de los datos del Cuadro 7.

Figura 10

Recta de regresión para la determinación de la linealidad del método de histamina

Area ($\pm 1 \mu\text{V/s}$)



Concentración ($\pm 0.13 \text{ mg/L}$)

Ecuación de la recta de regresión

En la recta de regresión lineal estimada $y = ax + b$, x es la concentración, y es la respuesta (unidades de área), a el valor de la pendiente, relacionado con la sensibilidad, y b el término independiente. La ecuación estimada de las tres curvas de calibración del sistema a partir de los datos experimentales que relacionan la concentración y el área de los diferentes patrones de histamina, son las siguientes:

$$y = 45\,160x - 30\,570$$

Ecuación 15. Recta de regresión lineal

Se debe considerar que la ecuación anterior es una estimación con base en la muestra observada de un modelo lineal teórico general representado por la Ecuación 16:

$$y = \beta X + \alpha$$

Ecuación 16. Modelo de ecuación de recta de regresión lineal

En este sentido, la linealidad del modelo teórico general debe probarse, para ello el coeficiente β deberá ser diferente de cero. Para este caso se requieren probar estadísticamente las hipótesis:

Ho: $\beta = 0$ (el modelo no es lineal)

Ha: $\beta \neq 0$ (el modelo es lineal)

Se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM Corporation, 2020) y se obtuvieron los resultados de la prueba F y la significancia como se aprecia en el Cuadro 8, para un grado de libertad de $\alpha = 0.05$.

Cuadro 8

Resultados del análisis F_{ANOVA} aplicados a la Ecuación 9.

Hipótesis	F	Significancia
H0: No existe relación lineal	1 323.531	< 0.0001
H1: Existe relación lineal		

El resultado de la ANOVA muestra que el modelo es significativo, por este caso significa que se debe rechazar la hipótesis de $\beta = 0$ y aceptar que el modelo es lineal $\beta \neq 0$, por lo que se concluye que hay proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta (E. Chaves, comunicación personal, 2020).

Coefficiente de determinación

El coeficiente de determinación r^2 tiene un valor de 0.9903, esto quiere decir que la variación del área varía prácticamente en la misma proporción que lo hace la concentración. El criterio de aceptación para productos de degradación es ≥ 0.990 por lo

que se acepta. En su tesis de grado Chacón (1998) obtuvo un coeficiente de determinación de 0.991 en su técnica por espectrofotometría, valor muy similar al obtenido en esta tesis. Por TLC, Zihua et. al (2011) reportaron un $r^2 = 0.999$ al igual que Nalazek-Rudnicka y Wasik (2017) por HPLC-MS. Altieri et al., (2016) por HPLC-DAD obtuvieron un $r^2 = 0.9998$ y Özugul et al., (2002) en su metodología por HPLC-UV obtuvieron un $r^2 = 0.984 - 0.991$.

Normalidad de los residuales

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para $\alpha=0.05$ arrojó un valor de $W = 0.9186$, p -valor = 0.1834, dado que el valor p es mayor a 0.05 la hipótesis nula se acepta y se comprueba que los datos tienen una distribución normal lo que permite predecir qué proporción de los datos están dentro de cierto rango (Miller y Miller, 2002).

Rango lineal

Las pruebas estadísticas realizadas confirman la linealidad del método en un rango de 2 mg/L a 20 mg/L; rango más estrecho en comparación con el rango de la metodología actual por HPLC llevada a cabo por SENASA de 0.1 mg/L a 15 mg/L (J. Rojas, comunicación personal, 2018) pero más sensible comparado al de Zihua et al., (2011) por cromatografía de capa fina de 200 mg/L a 600 mg/L. Hockl et al. (2000) reportan un rango lineal de 10-2000 pmol en HPLC-UV. Altieri et al. (2016) reporta un rango de 10 mg/kg a 720 mg/kg realizado con curvas de calibración en matrices sólidas de pescado.

3.2.3 Cedasticidad

Para determinar si la varianza de los errores del modelo de regresión lineal obtenido es constante a lo largo del tiempo o no; o sea el modelo es homocedástico o heterocedástico se utilizó la prueba de Cochran. El resultado de la prueba fue $G_{exp}=0.580$ ($p=0.155$) el cual, está por debajo del valor crítico aceptado para un nivel de confianza del 0,05 %, el cual es $G_{tablas}=0,683$ para una $n=3$, $k=5$. Esto indica que el modelo es homocedástico y por ende la desviación estándar de las mediciones no difiere estadísticamente en el rango lineal establecido al cambiar la concentración y se puede utilizar una regresión de mínimos cuadrados simples para obtener la Ecuación de mejor ajuste tal como se realizó (Miller y Miller, 2002). No se encontró referencia a este dato en ninguno de los demás estudios realizados contemplados en la revisión bibliográfica.

3.2.4 Precisión

Precision Instrumental

La precisión instrumental estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento y se determina, analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva y generando las mediciones correspondientes. Existen diferentes medidas estadísticas que permiten medir esta precisión, una de las más utilizadas es el coeficiente de variación de esas mediciones.

En los Cuadros 9 y 10 se muestran las áreas obtenidas de 7 inyecciones de dos muestras enriquecidas con histamina a 3.00 mg/L (muestra 1) y 18.00 mg/L (muestra 2) y preparadas según el apartado 2.2.5; los resultados de los coeficientes de variación para ambos son menores a los límites máximos permitidos por parte de la AOAC y AEFI para estos dos parámetros, por lo que todos los valores resultantes son aceptables. En

otros estudios lo que se reporta es la precisión del método también llamada repetibilidad

Cuadro 9

Precisión instrumental, de muestra de Mahi-mahi enriquecida a 3 mg/L con histamina.

De Ecuación de la recta de regresión				m = 45157	b = -30568
Factor de dilución = 10			Primera dilución = 0.01 L		
Replica	Masa muestra (g)	Masa muestra (kg)	Área de pico	Concentración en equipo (mg/L)	Concentración en matriz (mg/kg)
1	1.0142	0.001014	106538.00	3.04	299.37
2	1.0142	0.001014	101637.00	2.93	288.67
3	1.0142	0.001014	99833.00	2.89	284.73
4	1.0142	0.001014	106397.00	3.03	299.06
5	1.0142	0.001014	103483.00	2.97	292.70
6	1.0142	0.001014	98874.00	2.87	282.63
7	1.0142	0.001014	92450.00	2.72	268.61
Promedio	1.0142	0.001014	101316.00	2.92	287.96
Desviación std	0	0	4910.08	0.11	10.72
			CV	3.72	3.72

Cuadro 10

Precisión instrumental de muestra de Mahi-mahi enriquecida a 18 mg/L con histamina.

De Ecuación de la recta de regresión				m = 45157	b = -30568
Factor de dilución = 10			Primera dilución = 0.01 L		
Replica	Masa muestra (g)	Masa muestra (kg)	Área de pico	Concentración en equipo (mg/L)	Concentración en matriz (mg/kg)
1	1.0125	0.001013	800388.00	18.40	1817.42
2	1.0125	0.001013	820968.00	18.86	1862.43
3	1.0125	0.001013	783969.00	18.04	1781.51
4	1.0125	0.001013	796479.00	18.31	1808.87
5	1.0125	0.001013	857496.00	19.67	1942.32
6	1.0125	0.001013	830758.00	19.07	1883.84
7	1.0125	0.001013	864853.00	19.83	1958.41
Promedio	1.0125	0.001013	811860.00	18.88	1864.97
Desviación std	0	0	28773.64	0.68	67.64
			CV	3.63	3.63

Precisión del método

A diferencia de la precisión instrumental la precisión del método se evalúa mediante el coeficiente de variación entre muestras distintas de una misma concentración. Para efectos del presente estudio se procedió a analizar 9 muestras independientes de tres concentraciones distintas. El Cuadro 11 muestra los resultados para tres repeticiones de muestras de Mahi-mahi distintas, enriquecidas con una concentración de 3 mg/L, 18 mg/L y 27 mg/L con estándares externos.

Cuadro 11

Precisión del método para muestras de Mahi-mahi enriquecidas con histamina a 3, 18 y 27 mg/kg.

De Ecuación de la recta de regresión				m = 45157	b = -30568
Factor de dilución = 10			Primera dilución = 0.01 L		
Replica	Masa muestra (g)	Masa muestra (kg)	Área de pico	Concentración en equipo (mg/L)	Concentración en matriz (mg/kg)
1	1.1165	0.001117	107865.00	3.07	274.57
2	1.0244	0.001024	110465.00	3.12	304.88
3	1.0109	0.001011	105865.00	3.02	298.87
Promedio	1.0506	0.001051	108065.00	3.07	292.77
Desviación	0.0575	0.000057	2306.51	0.05	16.05
			CV	1.66	5.48
1	1.0365	0.001037	819845.00	18.83	188.32
2	1.0179	0.001018	758937.00	17.48	174.83
3	1.0374	0.001087	839973.00	19.28	192.78
Promedio	1.0306	0.001047	806251.67	18.53	185.31
Desviación	0.1110	0.000003	42193.51	0.93	9.34
			CV	5.04	5.04
1	0.9780	0.000978	1202649.00	27.31	273.09
2	0.9863	0.000986	1264863.00	28.69	286.87
3	1.0064	0.001006	1141190.00	25.95	259.48
Promedio	0.9902	0.000990	1202900.67	27.31	273.15
Desviación	0.0146	0.000014	61836.88	1.37	13.69
			CV	5.01	5.01

El coeficiente de variación para las muestras más concentradas es un poco menor que el de las muestras de más alta concentración lo que es el comportamiento esperado.

Los resultados son aceptados tomando en cuenta los criterios de la AOAC (1998) y Rivera y Rodriguez (2010) basados en los criterios de %CV de Horwitz de acuerdo a la concentración.

Algunos valores obtenidos por otras metodologías como la espectrofotometría son 14 % de coeficiente de variación para una concentración de histamina de 3 mg/L (Chacón, 1998) y 3.36 % de CV para 4 mg/L en la determinación por HPLC que realiza SENASA (J. Rojas, comunicación personal, 2018). En el análisis de histamina por electroforesis con microchip se obtuvieron 12.8 % y 11.6 % de CV para 43 mg/L y 187 mg/L respectivamente (Thredgold et al., 2015) y Altieri et al. (2016) reportaron un % CV de entre 1.6 – 2.1 % para 122 y 233 mg/L respectivamente. Otro punto importante es que los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el coeficiente de variación del método.

Según la Asociación Española, la expresión matemática que permite relacionar ambos coeficientes de variación es:

$$CV \text{ método} = CV \text{ instrumental} * \sqrt{2}$$

Ecuación 17. Relación entre coeficiente de variación instrumental y del método

En este caso el coeficiente de variación medio instrumental es 3.68; aplicando la Ecuación 17 se obtiene un coeficiente de variación del método de 5.20 que prácticamente coincide con el promedio el coeficiente de variación de 5.18 diferente de 4.75, obtenido experimentalmente. En el caso del Consejo Nacional de Armonización (ICH), no hay ninguna mención de la Ecuación 17 o similar que relacione directamente los valores de

precisión. En ambos casos el valor de precisión instrumental debe ser menor a la precisión del método (repetibilidad) (ICH, 2005).

3.2.5. Límites de Detección y Cuantificación

Se analizaron 5 patrones de histamina con los que se obtuvieron los datos del Cuadro 12. Las concentraciones utilizadas fueron (1.00; 2.00; 3.00; 4.00 y 5.00) mg/L.

Cuadro 12

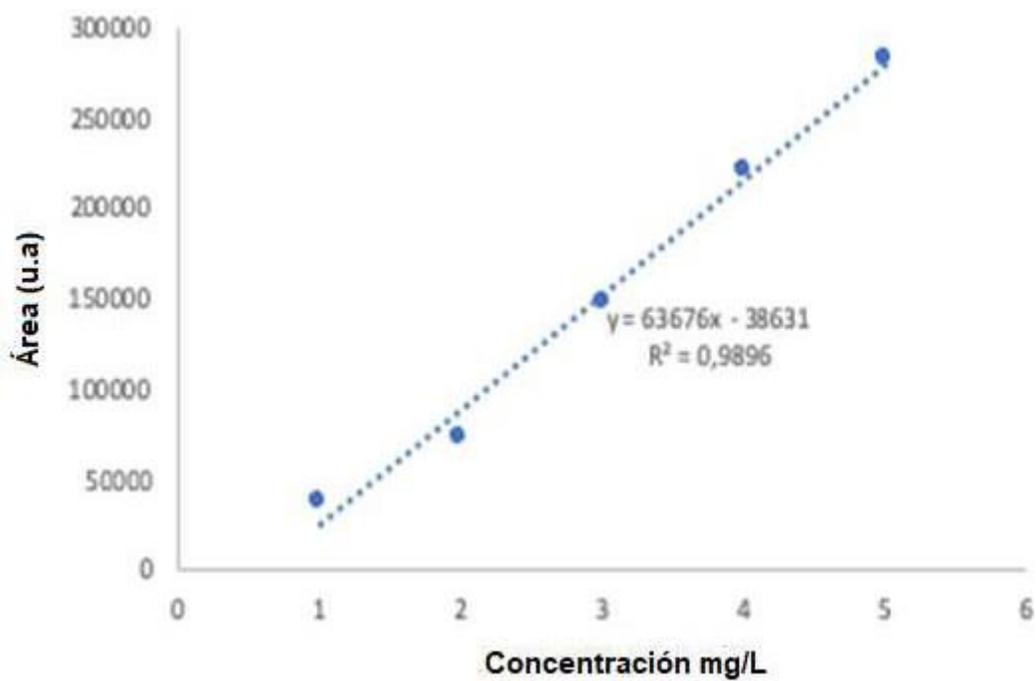
Datos obtenidos para generar una curva de calibración para el cálculo de LD y LC.

Concentración (mg/L)	Área (u.a)	Promedio Área (u.a)	Desviación estándar (u.a)
Blanco	4582.26	4555.21	705.45
	5246.75		
	3836.63		
1.00	39026.68	37228.52	1695.77
	37000.71		
	35658.18		
2.00	73050.97	73528.57	1791.76
	75510.74		
	72024.02		
3.00	148888.81	148216.33	4231.31
	146781.76		
	152978.42		
4.00	221659.29	221281.92	6236.48
	227321.14		
	214865.32		
5.00	284826.14	281734.02	8442.20
	272181.72		
	288194.19		

Con los resultados obtenidos se determinó una curva de calibración con los 5 niveles de concentración de histamina y área respectiva (Figura 11).

Figura 11

Curva de calibración para la determinación de la señal proporcionada por el ruido de fondo



Al extrapolar a cero la concentración de la recta de la Figura 11, se obtiene como señal de ruido la correspondiente al término independiente, es decir:

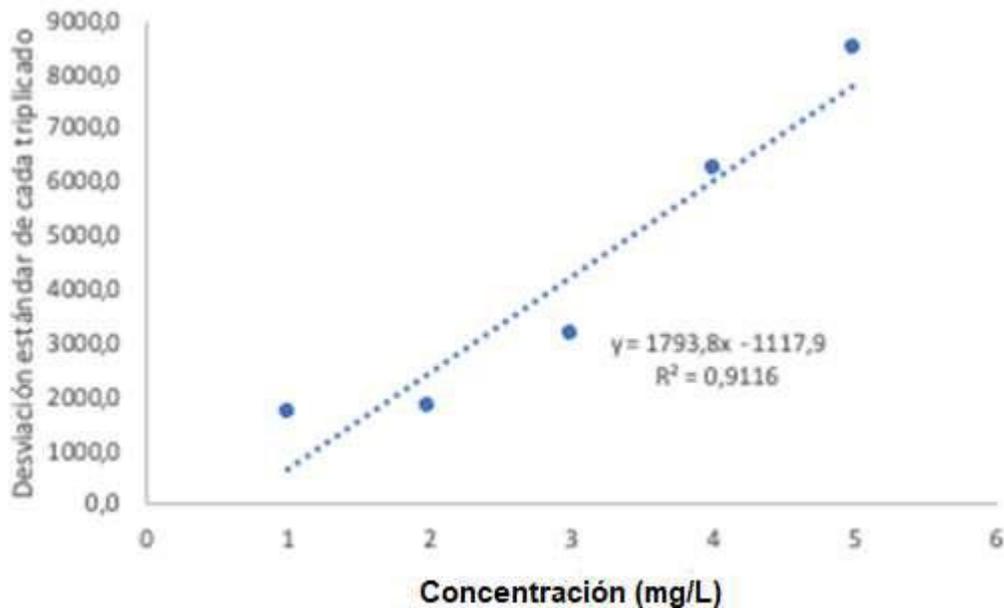
$$y = 0x - 38\,631$$

$$Y_{bl} = 38\,631$$

Después se calculó la desviación estándar dada por el ruido (S_{bl}), construyendo una recta en la que se graficó en el eje de las ordenadas las desviaciones estándar de las respuestas y en el eje de abscisas las concentraciones estudiadas (Figura 12).

Figura 12

Curva para la determinación de la desviación estándar causada por el ruido (S_{bl})



La Ecuación correspondiente a esta curva es:

$$Y = 1\,793.8x - 1\,117.9$$

$$R^2 = 0.9116$$

Se considera que la desviación estándar del ruido corresponde al valor de la ordenada en el origen de esta recta, o sea el valor de “y” cuando “x” es cero es:

$$Sbl = 1\,117.9$$

Una vez calculado el valor medio de la señal del ruido por extrapolación y la desviación estándar de ésta, se calculan los límites de detección de acuerdo a la Ecuación 3:

Cuadro 13

Límites de detección y cuantificación usando la Ecuación cuando no hay corrección por blanco.

	De curva de calibrado (mg/L)	En matriz (mg/kg)
LD	0.22	22.00
LC	0.26	26.00

Como expuesto en la sección de metodología los límites de detección y cuantificación también se pueden calcular usando la Ecuación 4. Al aplicarla se obtienen los siguientes resultados:

Cuadro 14

Límites de detección y cuantificación usando la Ecuación cuando hay corrección por blanco.

	De curva de calibrado (mg/L)	En matriz (mg/kg)
LD	0.06	5.70
LC	0.19	19.20

En el análisis por cromatografía propuesto se analizaron blancos como se expone en el Cuadro 13 por lo que se determina que 5.70 y 19.20 serán los resultados escogidos; sin embargo existe cierta proximidad en los resultados para los límites de cuantificación entre ambas metodologías de cálculo.

En otros trabajos se han obtenido valores más altos como con electroforesis con microchip de 0.43 mg/L y 0.69 mg/L de LD y LC (Thredgold, 2015) y 0.18 mg/L y 0.60 mg/L de LD y LC por espectrofotometría (Chacón, 1998). También se reportan valores más altos en TLC, 20 mg/L como límite de detección (Zhihua et. al, 2011) y por HPLC de 3 % y 10 % de LD y LC del límite más bajo propuesto por la regulación Europea para histamina en pescado (100 mg/L) (Altieri et. al, 2016).

3.2.6 Veracidad

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimentalmente encontrado (AEFI, 2001). Para determinar la exactitud en este tipo de muestras en las que no se puede preparar por separado la matriz de la muestra; la determinación se evaluó a través del porcentaje de recuperación de muestras fortificadas como lo indica la metodología del la sección 2.3.7.

Una vez obtenidas las concentraciones en todas las muestras se calculó la recuperación del método mediante la Ecuación 5. En el Cuadro 14 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos en miligramos debido a que se trata de muestras sólidas y en el Anexo 4 se muestran datos de las muestras sin fortalecer que se usaron en los cálculos.

Cuadro 15

Porcentajes de recuperación de muestras de histamina enriquecidas a 3.00 mg/L y 18.00 mg/L.

Fortalecimiento	Masa muestra fortalecida (g)	Masa analito añadida (mg)	Cantidad de analito en muestra (mg)	Cantidad de Analito recuperado (mg)	% Recuperacion
3.00 mg/L	1.0165	0.3048	0.3388	0.2389	78.37
3.00 mg/L	1.0244	0.3048	0.3469	0.2470	81.03
3.00 mg/L	1.0109	0.3048	0.3327	0.2328	76.37
Promedio	1.0173	0.3048	0.3395	0.2395	78.59
18.00 mg/L	1.0365	1.7990	1.91	1.81	100.80
18.00 mg/L	1.0179	1.7990	1.78	1.68	93.46
18.00 mg/L	1.0374	1.7990	1.96	1.8619	103.50
Promedio	1.0306	1.7990	1.88	1.7856	99.25

Valores aceptados para este tipo de análisis y rango de concentración de trabajo de 9 mg/L a 99 mg/L indican que el porcentaje debe estar en un rango de 80 % a 110 % (AOAC, 1998). Hockl et al., (2000) reportan un 81% para una concentración de 800 pmoles 115 % para 2.56 mg/L en el caso del análisis por espectrofotometría UV (Chacón, 1998). Por TLC Zhihua et al., (2011) reporta recuperaciones entre 93 y 98 % para un orden de 200 mg/kg a 600 mg/kg. Beljaars et al., (1998) utilizando el método de la AOAC por fluorescencia obtuvieron porcentajes de recuperación de 85-125% pero no indican en que rango de trabajo. Altieri et al., (2016) por HPLC con detector DAD obtuvo valores de 97-103%.

Incertidumbres

La incertidumbre de una medición es un parámetro asociado con el resultado de esa medición, que caracteriza la dispersión de los valores que se podrían atribuir razonablemente al mensurando.

En el Anexo 5 se muestran las incertidumbres estimadas para la concentración promedio de histamina. La incertidumbre tipo A es de ± 0.14 mg/L y se determinó con la Ecuación 6, mientras que las incertidumbres combinadas y expandidas fueron de ± 0.24 mg/L y ± 0.49 mg/L calculadas con las Ecuaciones 7 y 8 respectivamente y por lo tanto la concentración de histamina en pescado sería reportada de la siguiente manera:

$$Y = y \pm U$$

Donde

Y = concentración

U = incertidumbre expandida (± 0.49 mg/L)

El factor que más influye en la incertidumbre es el de los patrones de la curva de calibración, su contribución es de un 64% según el Anexo 5; lo cual es de esperarse ya que con lleva la mayor cantidad de procedimientos para su preparación. No se tiene datos sobre este parámetro en las referencias.

3.2.7 Robustez

La robustez indica que tan susceptible puede ser un método a pequeñas variaciones que se podrían obtener en su aplicación. Para su determinación en este trabajo se realizaron 8 ensayos por triplicado de 8 muestras enriquecidas a 10 ppm de acuerdo con los parámetros y sus modificaciones de los Cuadros 4 y 5. En el Cuadro 15 se muestran los valores resultantes de las concentraciones de dichos ensayos realizados y la desviación estándar de las diferencias (S_{Di}).

Cuadro 16

Valores de concentración resultantes de 8 muestras enriquecidas a 10 ppm

Ensayo	Parámetro	Concentración promedio	Diferencia concentración promedio – concentración ensayo 1 (D_i)	Desviación estándar de las diferencias (S_{Di})
1	Control	10.60	0.00	0.52
2	Disolución de extracción de la muestra	11.13	0.53	
3	Filtración de la muestra	11.02	0.41	
4	Dilución de la muestra	10.47	0.13	
5	Filtración del eluente	10.99	0.38	
6	Marca de solvente de fase móvil	11.01	0.40	
7	Calidad de agua de fase móvil	10.98	0.38	
8	Flujo de fase móvil	10.72	0.11	

Aplicando la Ecuación 9 la desviación estándar calculada de la diferencia S_{Di} es de 0.52 mg/L, correspondiente a un valor menor que la desviación estándar promedio del método determinada en el inciso 3.2.3 (0.81 mg/L). Este resultado demuestra que todos los factores seleccionados juntos no tienen ningún efecto sobre el resultado y que el método es robusto.

Por otro lado en el Cuadro 16 se muestran los resultados del impacto individual de cada uno de los siete parámetros en sus respectivos ensayos. Para todos los parámetros investigados el valor- t obtenido aplicando la Ecuación 10 se comparó con el valor de t -crítico a 2 colas a $n-1$ grados de libertad y 95% de confianza ($\alpha = 0.05$) el cual corresponde a 2.57.

Si el valor- t es mayor que t -crítico, el parámetro investigado mostraría una influencia significativa y el método no sería lo suficientemente robusto. En este caso el valor- t de todos los ensayos es menor a t -crítico por lo que se considera que el método no es afectado por ligeras variaciones de cada uno de los factores analizados. En todo caso el no filtrar el eluente por un filtro de 0.22 μm antes de ser inyectado en el cromatógrafo es la condición que más afecta la robustez. Como segunda condición de mayor afectación se encuentra el cambio de 10 % a 9 % de ácido perclórico en la disolución de extracción.

Aunque en otros estudios no se encontró referencia a este tema cabe destacar que es importante conocer cuales factores son los que más afectarían las determinaciones. Por ejemplo si no se filtra el eluente muy posiblemente se vería

comprometida la selectividad y veracidad del método.

Cuadro 17

Efecto individual de cada parámetro en la robustez

Ensayo	Parametro	Concentración promedio	Valor- <i>t</i> obtenido	<i>t</i> -critico de las tablas a un 95% de confianza	Resultado
1	Control	10.60	0.0000	2.57	No hay diferencias significativas
2	Disolución de extracción de la muestra	11.13	2.15		No hay diferencias significativas
3	Filtración de la muestra	11.02	1.69		No hay diferencias significativas
4	Dilución de la muestra	10.47	0.80		No hay diferencias significativas
5	Filtración del eluente	10.99	2.26		No hay diferencias significativas
6	Marca de solvente de fase móvil	11.01	1.97		No hay diferencias significativas
7	Calidad de agua de fase móvil	10.98	1.93		No hay diferencias significativas
8	Flujo de fase móvil	10.72	0.67		No hay diferencias significativas

3.3 Análisis económico

Para el análisis económico comparativo entre la metodología de la AOAC que realiza el SENASA y la metodología propuesta se tomaron en cuenta los gastos más representativos por muestra procesada por triplicado. Los rubros que se analizaron fueron los siguientes: costo de reactivos de fase móvil, reactivos y materiales para la

extracción de la histamina, horas laborales e inversión inicial en el cromatógrafo, columnas y resto de componentes cromatográficos.

En los cuadros 18 y 19 se muestran los gastos de fase móvil y materiales para extracción, sumando esos gastos para cada una de las metodologías se tiene una diferencia de \$ 5.84 por muestra. En la actualidad en SENASA, ente que analiza la mayor cantidad de muestras para determinar histamina, se analizan 50 muestras por mes, que representarían \$ 292 menos si se analizaran con la metodología propuesta en la tesis. En un año esa diferencia es de \$ 3 504.

Cuadro 18

Comparación de costos de fase móvil por muestra requerida por las metodologías de la AOAC y de la propuesta para el análisis de una muestra de pescado

Reactivo	Método AOAC			Reactivo	Método Tesis		
	Precio presentación original (950 mL)	Cantidad utilizada	Costo muestra cantidad utilizada		Precio presentación original (1000 mL)	Cantidad utilizada	Costo muestra cantidad utilizada
950 mL Buffer de fosfato de potasio							
K600 (K+, pH 6.00 fosfato/buffer acetato, isopropanol 950 mL)	\$ 65.00	21.6 mL	\$ 1.47	1000 mL Acetonitrilo	\$ 22.00	8.4 mL	\$ 0.18
Regenerador columna de potasio K 130 (KOH, KCl, isopropanol)	\$ 25.00	1.0 mL	\$ 0.025	1000 ml Agua	\$0.5	3.5 mL	\$ 0.00
Total Fase móvil para una corrida			\$ 1.50				\$ 0.18
Total Fase móvil por triplicado			\$ 4.50				\$0.54

Nota. (B. Villalobos, comunicación personal, 2021)

Cuadro 19

Comparación de costos de reactivos por muestra requeridos por las metodologías de la AOAC y de la propuesta para el análisis de una muestra de pescado Método AOAC

Reactivo	Precio presentación original	Cantidad utilizada	Costo muestra	Reactivo	Precio presentación original	Cantidad utilizada	Costo cantidad utilizada
5 g Patrón histamina dihidroclorhídrica ≥ 99 %	\$ 52.66	100 mg	\$ 1.00	Patrón histamina dihidroclorhídrica pureza ≥ 99 %	\$ 55.00	100 mg	\$ 1.05
1 000 mL Metanol	\$ 6.58	40 mL	\$ 0.26				
1 000 mL de solución de ácido clorhídrico al 0.1 mol/L	\$ 196.41	10 mL	\$ 1.96	10 ml solución de ácido perclórico ACS al 1 %	\$ 29.00	10 mL	\$ 0.29
100 Papel filtro, 0.22 µm	\$ 35.11	1	\$ 0.35	100 papel filtro, 0.22 µm	\$ 35.10	1	\$ 0.35
50 filtros de nylon, 0.22 um, 25 mm	\$ 329.50	1	\$ 6.59	50 filtros de nylon, 0.22 um, 25 mm	\$ 329.50	1	\$ 6.59
100 filtros de nylon, 0.22 um 47 mm	\$ 260.03	1	\$ 2.60	100 filtros de nylon, 0.22 um 47 mm	\$ 260.03	1	\$ 2.60
Total			\$ 12.76				\$ 10.88

En el caso de la metodología de la AOAC es necesario utilizar una disolución de o-Oftaldehído lo que incrementa el costo por muestra en \$ 27.27 (ver Cuadro 20) correspondientes a un tiempo de la corrida de 30 minutos por réplica con un flujo de 2 mL/min.

Cuadro 20

Costos de disolución de orto-Oftalaldehído requerida por muestra por la metodología de la AOAC para el análisis de una muestra de pescado

Reactivo	Precio Presentación Original	Cantidad Utilizada	Costo cantidad
5 g o-phtaldehído O-120, grado cromatográfico	\$ 180.00	100 mg	\$ 3.60
950 mL Diluyente OPA OD 104 (0.5 mol/L buffer borato de potasio)	\$ 67.00	950 mL	\$ 67.00
5 g Thiofluor, grado	\$ 152.00	2 g	\$ 60.00
526 mL Brij 30 %	\$ 115.00	3 mL	\$ 0.65
1 000 mL Metanol grado HPLC	\$ 6.80	10 mL	\$ 0.06
Total		963 mL	\$ 131.31
Volumen por tres corridas			200 mL
Costo por tres corridas			\$ 27.27

Nota. (B. Villalobos, comunicación personal, 2021)

En el tiempo de análisis de la muestra, desde la preparación de los reactivos hasta la corrida de las tres réplicas en el cromatógrafo también hay un ahorro de tiempo de 2.25 horas. Además, si se traduce ese tiempo a costo de mano de obra empleado por un laboratorista se pasa de un costo de \$ 11.89 a \$ 3.66 por muestra como se muestra en el Cuadro 20. Considerando que este análisis se hace una vez a la semana y se analizan 12 muestras por semana, el ahorro es de 27 horas y \$ 22.21 de mano de obra semanales.

Cuadro 21

Comparación de costos de mano de obra requeridos por las metodologías de la AOAC y de la propuesta para el análisis de una muestra de pescado

	Método AOAC- HPLC	Método Tesis
Etapas del proceso de análisis	Tiempo requerido	Tiempo requerido
Preparación de fase móvil	20 min	20 min
Preparación disolución o-ftalaldehído	35 min	0 min
Extracción de histamina de la muestra	50 min	20 min
Tiempo de análisis por cromatografía (programa de la bomba para una muestra)	30 min	7 min
Tiempo total de análisis	135 min	47 min
Tiempo total de análisis para tres corridas	195 min (3.25 horas)	61 min (1 hora)
Salario por hora de un laboratorista	\$ 3.53*	\$ 3.53*
Costo mano de obra por tiempo de análisis de una muestra	\$ 11.47	\$ 3.53

(Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, 2021)

Sumando todos los gastos por mano de obra, reactivos y materiales de ambas metodologías tenemos una diferencia de \$ 24 804, tal como lo muestra el Cuadro 21.

Cuadro 22

Resumen de costos de análisis anuales requeridos por las metodologías de la AOAC y de la propuesta

	Costos Método AOAC dólares	Costos Método Tesis
Fase móvil	\$ 4.50	\$ 0.54
Reactivos y materiales	\$ 12.76	\$ 10.88
Disolución de o-Oftaldehído	\$ 27.27	No se utiliza
Mano de obra por muestra	\$ 11.47	\$ 3.53
\$ Total	\$ 56.42	\$ 14.95
Total costos para 600 muestras anuales	\$ 33 600	\$ 8 970

Los cálculos de los costos de los insumos analizados en el Cuadro 22 muestran una diferencia de más de \$30 000 en equipo e instrumentación como inversión inicial entre la metodología de la AOAC utilizada por el SENASA y la propuesta en esta tesis. El método de la AOAC requiere de un detector de fluorescencia y un sistema de bombas y control de temperatura para realizar la derivatización post-columna que incrementan el costo de un sistema de cromatografía. En el caso del método de esta tesis esos instrumentos no son necesarios y además el detector ultravioleta requerido tiene un costo de unos \$ 8 000 menos que uno de fluorescencia lo que equivaldría a procesar 600 muestras; o sea la cantidad de muestras que procesa SENASA en un año.

Cuadro 23

Comparación de costos en equipo requerido por las metodologías entre la AOAC y la propuesta planteada

Método AOAC	Precio (dólares a noviembre 2018)	Método Tesis	Precio (dólares a noviembre 2018)
HPLC: bomba horno, detector fluorescencia, sistema post columna, software	\$ 65 900.00	HPLC: bomba horno, detector UV, software	\$ 31 350.00
Centrífuga refrigerada	\$ 7 715.00	Centrífuga	\$ 5 225.00
Columna ALKION K+, 4 µm x 150 mm	\$ 2 180.00	Columna LC-NH ₂ , 5 µm x 250 mm x 4.6 mm ID	\$ 1 250.00
Precolumna ALKION, 3 µm x 20 mm	\$ 430.00	Precolumna LC-NH ₂ , 5 µm x 40 mm x 4.0 mm ID	\$ 420.00
Balanza analítica	\$ 10 900.00	Balanza analítica	\$ 10 900.00
Licadora o procesador	\$ 120.00	Licadora o procesador	\$ 120.00
Total	\$ 87 245.00		\$ 49 265.00

Nota. (B. Villalobos, comunicación personal, 2021)

En los Cuadros 24 y 25 se muestran los datos y resultados del cálculo del Valor Actual Neto y la Tasa Interna de Retorno utilizando la herramienta de Excel basada en las ecuaciones 11 y 12 para ambas metodologías. En SENASA actualmente el costo del análisis por triplicado de histamina tiene un valor de \$ 61.53 (Servicio Nacional de Salud Animal, 2021) lo que significa que en un año donde se procesan 600 muestras los ingresos serían de \$ 36 922 a un tipo de cambio de 670 colones por dólar para las dos metodologías. Los gastos por materiales anuales son de \$ 33 600 para la metodología de la AOAC y \$ 8 970 para la metodología propuesta.

Para los cálculos se utilizó un período de 10 años que es el promedio de vida útil de un cromatógrafo; los ingresos y gastos por materiales se asumieron como constantes en ese período. Se agregó un gasto de mantenimiento de los equipos equivalente a un 2 % del valor de compra a partir del año 6 y se utilizó una rentabilidad exigida (COK) de un 5 %.

Cuadro 24

Determinación del Valor Actual Neto y Tasa Interna de Retorno para la metodología de la AOAC

Período	Inversión inicial	Ingresos anuales	Gastos anuales de materiales y mano de obra	Gastos anuales de mantenimiento	Flujo de caja anual
Año 0	\$ 87 245				\$ -87 245
Año 1		\$ 36 922	\$ 33 600		\$ 3 348
Año 2		\$ 36 922	\$ 33 600		\$ 3 348
Año 3		\$ 36 922	\$ 33 600		\$ 3 348
Año 4		\$ 36 922	\$ 33 600		\$ 3 348
Año 5		\$ 36 922	\$ 33 600		\$ 3 348
Año 6		\$ 36 922	\$ 33 600	\$ 1744	\$ 1 603
Año 7		\$ 36 922	\$ 33 600	\$ 1744	\$ 1 603
Año 8		\$ 36 922	\$ 33 600	\$ 1744	\$ 1 603
Año 9		\$ 36 922	\$ 33 600	\$ 1744	\$ 1 603
Año 10			\$ 33 600	\$ 1744	\$ 1 603
VAN			\$ -67 512		
TIR			-21 %		

Cuadro 25

Determinación del Valor Actual Neto y Tasa Interna de Retorno para la metodología propuesta en esta tesis

Período	Inversión inicial	Ingresos anuales	Gastos anuales de materiales y mano de obra	Gastos anuales de mantenimiento	Flujo de caja anual
Año 0	\$ 49 265				\$ -49 265
Año 1		\$ 36 922	\$ 8 970		\$ 28 152
Año 2		\$ 36 922	\$ 8 970		\$ 28 152
Año 3		\$ 36 922	\$ 8 970		\$ 28 152
Año 4		\$ 36 922	\$ 8 970		\$ 28 152
Año 5		\$ 36 922	\$ 8 970		\$ 28 152
Año 6		\$ 36 922	\$ 8 970	\$ 985	\$ 27 166
Año 7		\$ 36 922	\$ 8 970	\$ 985	\$ 27 166
Año 8		\$ 36 922	\$ 8 970	\$ 985	\$ 27 166
Año 9		\$ 36 922	\$ 8 970	\$ 985	\$ 27 166
Año 10		\$ 36 922	\$ 8 970	\$ 985	\$ 27 166
VAN			\$ 163 230		
TIR			56 %		

El resultado de VAN y TIR de la metodología de la AOAC del Cuadro 24 son \$ - 67 512 y -21 % respectivamente lo que indica que bajo este contexto y condiciones la utilización de esta metodología deja pérdidas (Mascareñas, 2008). El procesamiento de las muestras llevada a cabo por SENASA bajo esta metodología es una exigencia de la Comunidad Europea para los productos pesqueros de exportación y, por lo tanto, variar

las condiciones de equipo o materiales no es viable. Sin embargo, algunas recomendaciones que se podrían aplicar sería incrementar la tarifa de los análisis para aumentar los ingresos o negociar con los proveedores una disminución en el costo de los materiales especialmente el del α -Oftaldehído a cambio de un contrato de compra anual.

Por el contrario, el VAN y el TIR de la metodología propuesta (Cuadro 25) son positivos; un 56 % de TIR indica que por una inversión de casi \$ 50 000 en equipos, cada año se obtendría un ingreso de \$28 000. Bajo este escenario cualquier institución pública o privada podría ofrecer el servicio de determinación de histamina para productos de consumo local con una rentabilidad positiva; además se podría disminuir la tarifa del análisis.

Tanto el cálculo de VAN y el TIR tienen limitaciones. El VAN asume que todos los flujos se reinvierten a una misma tasa conocida y constante, dependiendo únicamente del riesgo del proyecto. Lo que implica suponer que el riesgo es constante, suposición incorrecta en la mayoría de los casos, puesto que el riesgo depende de la vida que le quede al proyecto y de la rentabilidad actual del mismo a través del efecto del apalancamiento operativo. Por tanto, la tasa de descuento varía con el tiempo y, además, es incierta (Mascareñas. 2008).

Por otro lado, la TIR no considera que los flujos de caja se reinviertan periódicamente a la misma tasa, sino a un tanto de rendimiento r , sobrestimando la capacidad de inversión del proyecto.

Otra limitación es la necesidad de proyectar los precios esperados a lo largo de todo el horizonte temporal del proyecto, tal cual se asume en esta tesis. En resumidas cuentas, las principales limitaciones del VAN surgen básicamente por realizar una analogía entre una cartera de bonos sin riesgo y un proyecto de inversión real (Mascareñas. 2008).

IV. CONCLUSIONES

Se logró proponer y validar un método para la determinación de histamina sin la utilización de la derivatización post columna. Esta metodología de análisis propuesta es una forma económica, sencilla, sensible y específica de determinar cuantitativamente el contenido de histamina comparado con las metodologías más costosas. Al comparar la metodología analítica de esta tesis con otros métodos como el fluorométrico, con pre o post derivatización, ya sea usando detectores ultravioleta-visible o de fluorescencia, se presentan varias ventajas:

- La muestra no requiere un pretratamiento complejo, solamente la separación con métodos físicos y con ácido perclórico de interferentes en la matriz como lo son las proteínas, grasas y otros.
- No es necesario el uso de reactivos y equipos para realizar la derivatización post columna que aumentan mucho los gastos operativos y de compra de equipos.
- Al tomar en cuenta los cromatogramas obtenidos para las muestras de pescado, se observan picos que presentan una simetría y resolución de 1, por lo tanto existe la posibilidad de poder identificarlos y cuantificarlos para el análisis de las otras aminos biogénicas o de los aminoácidos precursores de las mismas.

- El rango determinado para el método evaluado en este trabajo es de 20.00 mg/kg a 200.00 mg/kg de histamina; en este rango el método es lineal, selectivo con respecto a otros productos de degradación del pescado con una precisión instrumental y de método menores a 5.17 % de coeficiente de variación.
- La exactitud del método, medida en relación con la recuperación, tiene valores entre 78.59 y 99.25 %.
- Los límites de detección y cuantificación son 5.70 mg/kg y 19.20 mg/kg respectivamente, que son concentraciones muy bajas con respecto a la concentración permitida como límite máximo en los Estados Unidos (50 mg/kg); lo que hace viable el método como una opción más de cuantificación de histamina en pescado.
- El método es robusto a ligeros cambios en la preparación y separación de la muestra, en forma colectiva como individual de los parámetros modificados.
- El tiempo de análisis para una muestra por triplicado es de 1 hora comparado con 3.25 horas respecto a QUE? ; y el costo de mano de obra \$ 7.94 menor respecto a qué???por muestra.
- En las disoluciones y en los reactivos químicos por cada muestra analizada bajo el método de la AOAC se gastan al menos \$ 41.05 de más, comparado con realizar el análisis por el método propuesto en esta tesis.

- Existe una diferencia de más de 30 mil dólares en inversión inicial en materiales y equipos entre la metodología de la AOAC y la propuesta por esta tesis.
- El VAN y el TIR de la metodología propuesta son de \$ 164 744 y 56 %; mientras que para la metodología de la AOAC son de \$ -67 512 y -21 %.

V. RECOMENDACIONES

- Comprobar, si con esta misma metodología, se pueden determinar otras aminas biogénicas como putrecina, cadaverina, espermina, tiramina, entre otras.
- Limpiar entre cada inyección de muestra por lo menos un minuto la columna con la fase móvil y después de aproximadamente 3 inyecciones correr un blanco de muestra para verificar que no haya residuos en el sistema cromatográfico.
- Realizar pruebas de cambios de pH en la fase móvil con la intención de lograr una separación de la muestra más satisfactoria, de igual manera usar 200 nm como longitud de onda del detector.
- Realizar pruebas para comprobar la eficiencia de la extracción de la muestra, utilizando una mezcla de Etanol 75% / HCl 0.1 N como disolvente de extracción. Con este disolvente de extracción se obtuvieron los mejores

valores de recuperación de histamina en pescado fresco con respecto a otros solventes (Zarei *et al.*, 2014).

VI. REFERENCIAS

Altieri, I; Semeraro, A; Scalise, F; Calderari, I. y Stacchini, P. (2016). European official control of food: determination of histamine in fish. *Food Chemistry*, 211, 694-699.

Aishath, N; Flint, F; Flectcher, G; Bremer, P. y Meerdink, G. (2010). Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), R139-R150.

AOAC Official Method. (2022). *AOAC 977.13-2012 Histamine in Seafood. Fluorometric Method*. AOAC INTERNATIONAL.

AOAC Peer-Verified Method Program. (1998). *Manual on policies and procedures*. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. Autoedición.

Asociación Española de Farmacéuticos de las Industria. (2001). *Validación de métodos analíticos*. Autoedición.

Beljaars, P; Van Dijk, R. y Jonker, K. (1998). Liquid chromatography determination of histamine in fish, sauerkraut and wine: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 81(5), 991.

Bevan, J. (1982). *Fundamentos de farmacología*. (2^{da} ed). Harla S.A de C.V.

Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Scombroid fish Poisoning Associated with Tuna Steaks-Louisiana and Tennessee. *Mortality and Morbidity Weekly Report*, (56), 817-819.

Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria. (2017). *Brote de Intoxicación por Histamina en Pescado*. [https:// www. ciati.org/novedades-brote-intoxicacion-histamina-pescado.html](https://www.ciati.org/novedades-brote-intoxicacion-histamina-pescado.html)

Chacón, F. (1998). *Validación de un método espectrofotométrico en la determinación de histamina en atún fresco (Thunnus tunna)*. [Proyecto de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en tecnología de Alimentos]. Universidad de Costa Rica.

Du, W; Lin, C; Phu, A; Cornell, J; Marshall, M. y Wei C. (2002). Development of Biogenic Amines in Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*): Effect of Storage and Correlation with Decarboxylase-Positive Bacterial Flora. *Journal of Food Science*, 67(1), 292-301.

Ehrhardt, M; Brigham, E y Eugene, F. (2007). *Finanzas Corporativas*. Cengage Learning Editores.

Feng, C; Teuber, S y Gershwin, E. (2015). *Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review*. Springer Science+Business Media.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. Meeting Report, Rome Italy.

Food and Drug Administration. (2011). Scombrototoxin Histamine Formation. En FDA Guidelines, *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance* (7, pp.1-40). Autoedición.

Geto, A; Tesemma, M. y Admassie, S. (2014). Determination of Histamine in Fish Muscle at Multi-walled Carbon Nanotubes Coated Conducting Polymer Modified Glassy Carbon Electrode. *Synthetic Metals*, 191, 135-140.

Goodman, G. (1996). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. (9ª ed., Vol.I). Mc Graw - Hill Interamericana.

Isidre Masana. (2020). *Introducción y Consideraciones Prácticas en hplc/uhplc*. Agilent WTC Barcelona.

Hill, S; Ganellin, C; Timmerman, H; Schwartz, J; Shankley, N; Young, J; Shunack, W; Levi, R. y Haas, H. (1997). Classification of Histamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 49(3), 253-278.

Hilmer F; Derrick, Y. y Nip W. (1981). Histamine Formation and Honeycombing during Decomposition of Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at Elevated temperatures. *Journal Series of The Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources*, (2568), 9.

Hockl, P; Thyssen, S; y Libertun, C. (2000). An improved HPLC method for identification and quantification of polyamines and related compounds as benzoylated derivatives. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 23(5), 693-703.

IBL International. (4 de febrero de 2012). *Histamine Elisa (RE59221)*. http://www.iblinternational.com/media/catalog/product/R/E/RE59221_IFU_en_Histamine_ELISA_2014-04_sym3.pdf.

IBM Corporation. (2020). *IBM SPSS for Windows, Version 25*.

International Council for Harmonisation. (1995). ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. En ICH Harmonised Tripartite Guideline. *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. (4ta versión) European Medicines Agency.

Karageorgou, E; Samanidou, V. (2014). Youden test application in robustness assays during method validation. *Journal of Chromatography, A*, 1353.

Krishna, P; Ram, H; Bal Kumar, S. y Sam Kanta, R. (2013). Histamine in Foods: Its Safety and Human Health Implications. *Journal of Food Science Technology*, 8, 1-11.

Maintz, L, y Novak, N. (2007). Histamine and Histamine Intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1185–1196.

Masana, I. (2020). *Introducción y Consideraciones Prácticas en hplc/uhplc*. Agilent WTC Barcelona.

Mascareñas, Juan. (2008). *La Valoración de Proyectos de Inversión Productivos*. Social Science Research Network.

Miller James, N. y Miller Jane, C. (4^{ta} Ed). (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Editorial Pearson Educación.

Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. (septiembre 2021). *Lista de Salarios Mínimos por Ocupación Año 2020*. <http://www.mtss.go.cr/temas-laborales/salarios/lista-salarios.html>

Minocha, R. y Long, S. (2004). Simultaneous Separation and Quantification of Amino Acids and Polyamines of Forest Tree Tissues and Cell Cultures within a Single High-Performance Liquid Chromatography Run Using Dansyl Derivatization. *Journal of Chromatography*, (1035), 63-73.

Miranda, Javier. (2000). *Evaluación de la incertidumbre en datos experimentales*. Instituto de Física, UNAM.

Muscarella, M; Lo Magro, S; Palermo, C. y Centonze, C. (2007). Validation according to European Commission Decision 2002/657/EC of a confirmatory method for aflatoxin M1 in milk based on immunoaffinity columns and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 594(2), 257-264.

Nalazek-Rudnicka, K. y Wasik, A. 2017. Development and validation of an LC–MS/MS method for the determination of biogenic amines in wines and beers. *Monatsh Chem*, (148), 1685–1696.

Özogul, K; Taylor, D; Quantick, P y Özogul, Y. (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food and Technology*, (37), 515-522.

Quintero, B; Ramírez De León, J; Cortés, J; Sánchez, I; Ruelas, J. y Moreno, J. (2012). Contenido de Histamina y Calidad Microbiológica de Pescado Comercializado en Mazatlan, Sinaloa. *Revista Biotecnia*, (14), 3-12.

Ramachandran, K y Tsokos, C. (3^{er} Ed). (2021). Categorical data analysis and goodness-of-fit tests and applications. En Academic Press (Ed.) *Mathematical Statistics with Applications in R*. (pp 461-490). Autoedición.

Rivera, C y Rodríguez, M. (octubre, 2010). *Uso de la Ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-INMC-2006*. Simposio de Metrología 2010, México.

Rosini, E; Tonin, F; Vasylieva, N; Marinesco, S. y Pollegioni L. (2014). Evolution of histamine oxidase activity for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, (98), 739-748.

Rojas, J. 2018. Comunicación personal.

Salleres, S; Gonzalez, I; Arantzamendi, A; González, R; Aza, S. y Jaureguibeitia, A. (2016). Validation of the Biofish-300 HIS Enzymatic Biosensor for the Detection of Histamine in Fishery Products. AOAC Performance Tested Method **SM** 051604. *Journal of AOAC International*, 99(5),1338-1355.

Scherer, C. J. (1983). *Introducción a la Farmacología Clínica*. (2^{da} ed). Harla Harper S.A.

Servicio Nacional de Salud Animal. (2021). *Tarifario Análisis LANASEVE*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.senasa.go.cr/senasa/sitio/files/051211052407.pdf>

Skoog, D; Holler, F y Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. (5^{ta} ed). McGraw Hill Interamericana.

Snyder, L; Kirkland, J y Glajch, J. (1997). *Practical HPLC method development*. (2^{da} ed). John Wiley and Sons Inc.

Stoskopf, M. (1993). *Fish Medicine*. W.B. Saunders Company.

Thredgold, L; Ellis, A. y Lenehan, C. (2015). Direct detection of histamine in fish flesh using microchip electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Analytical Methods, Royal Society of Chemistry*, 7, 1802-1808.

Tracy, M; Pickering, M. y Verhuls, T. (1995). Cation Exchange Analysis of foods and Beverages for Biogenic Amines. *Food Testing and Analysis*, 1(3), 48-50.

Valverde, J.C. (1997). *Desarrollo y validación de un método para la determinación de histamina en pescado, utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa con detección ultravioleta*. [Trabajo final de graduación para optar el grado de Licenciatura en Química]. Universidad de Costa Rica.

Villalobos, B. 20121. Comunicación personal.

Zarei, A; Fazlara, A, Najafzadeh, H. y Zolfaghar, F. (2014). Efficiency of Different extraction Solvents on Recovery of Histamine from Fresh and Canned Fish. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, (1), 72-76.

Zhihua, T; Sato, M; Han, Y; Tan, Z; Toshiyasu, T. y Nakano, T. (2011). A Simple and Rapid Method for Histamine Analysis in Fish and Fishery Products by TLC Determination. *Food Control*, (22),1154-1157.

Zúñiga, A; Villalobos, M. y Víquez, K. (2002). Preferencias en la compra de pescado fresco en los supermercados de Heredia. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 11(21), 5-9.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Metodología para determinación de Histamina en productos Pesqueros por HPLC

A continuación se presenta lo que sería la metodología a seguir

1-ALCANCE

Este análisis se utiliza en especies productoras de histamina tales como: marlin, dorado, atún, macarela sardina.

2-OBJETIVO

Determinar histamina asociada a la descomposición de alimentos de origen marino en forma cuantitativa.

3-FUNDAMENTO TEÓRICO

La histamina se produce como resultado de la descarboxilación de la histidina libre, por la acción de enzimas bacterianas (descarboxilasas).

El principio de éste método se basa en la extracción de la muestra con ácido perclórico al 10%. El extracto es inyectado en un cromatógrafo líquido de alta resolución con detector ultravioleta y arreglo de diodos donde la muestra pasa a través de una columna polar, cuantificándose la histamina utilizando las áreas de la muestra y estándares externos.

4- PARÁMETROS

Concentración Detectable: 5.70 mg/kg

Concentración Cuantificable: 19.20 mg/kg

Concentración Máxima Permitida: 50 mg/kg

5- MATERIALES Y REACTIVOS

5.1 MATERIALES

Tabla de picar

Licuada

Balones de 10 ml y 100 ml
Filtros de polipropileno tipo disco para muestras de 0.22 μ m
Papel Filtro Whatman número 3
Pipetas varias
Probetas de 100 ml
Viales
Microjeringa 250 μ l
Balanza

NOTA: Lavar todos los contenedores plásticos y de vidrio con metanol antes de utilizarlos.

5.2 EQUIPO

Cromatógrafo líquido de alta resolución, con bomba cuaternaria.

Detector Ultravioleta Visible con Arreglo de Diodos, utilizando una longitud de onda de absorción de 210 nm

Columna Supelcosil LC-NH₂, 5 μ m x 250 mm x 4.6 mm

Celdas de cuarzo, 3.5 mL, 10 mm paso de luz

5.3 REACTIVOS

REACTIVOS Y MATERIALES DE EXTRACCION:

Solución al 10 % de Acido Perclórico (PCA) a partir de ácido perclórico concentrado, grado ACS, marca JT Baker, CAS 2766-44

Agua ultra pura grado uno, 18 μ ohms de resistividad

Solución de agua: ACN (80:20)

REACTIVOS PARA FASE MOVIL:

Acetonitrilo, grado HPLC, marca JT Baker, CAS 75-05-8

Agua grado uno, 18 μ ohms de resistividad y filtrada a través de membranas de 0.22 μ m.

Materiales para preparación de patrones de histamina

Histamina dihidroclorhídrica, pureza \geq 99 %, marca Sigma, CAS 56-92-8

Solución de ácido clorhídrico 0.1 N

5.4. ESTANDAR

SOLUCION STOCK : 100ppm Histamina

Pesar 10 mg de estándar en un balón de 100 ml, disolver y llevar al volumen con 0.1 N HCl.

SOLUCIONES DE TRABAJO de 2, 3, 7,12 y 20 ppm

Pipetear 2.0, 3.0, 7, 12 y 20 ml de la solución stock en balones separados de 100 ml y llevar al volumen con 0.1 N HCl.

8-PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

1. Tomar el pescado fresco, limpiarlo, quitar escamas y vísceras. Si el pescado es muy pequeño (menos de 15 cm) utilizar 5 - 10 peces. En caso de pescados grandes tomar muestra de 2.5 cm de grueso de tres secciones, de la parte de atrás de los pectorales, una parte que se encuentre en medio de la pieza anterior y el respiradero, y una porción detrás del respiradero. Quitarle los huesos. Para un pescado de tamaño intermedio quitar y descartar la cabeza, escamas, colas, tripas, agallas y huesos, filetear el pescado y obtener toda la carne y piel de la cabeza a la cola.

2. Pesar 10 g de la muestra en vasos de licuadora y homogenizar a baja velocidad ..

3. Pesar 1g de homogenizado y agregar 10 ml de solución de ácido perclórico al 10%, mezclar.
4. Filtrar por papel Whatman número 3
5. Tomar una alícuota de 1 ml y aforar a la marca con solución de agua: ACN (80:20).
6. Filtrar el supernante por un filtro de 0,22 μm y recoger en un vial.
7. Inyectar inmediatamente en el HPLC

9-CONDICIONES Y PARÁMETROS INSTRUMENTALES

Condiciones Analíticas:

Columna: LC-NH₂, 5 μm x 250 mm x 4.6 mm

Temperatura : 50 °C

Inyección: 20 μl

Parámetro Flujo : 1.5 ml/min

Fase Móvil: Agua y Acetonitrilo

Detección: Longitud de onda de 210 nm

Cuadro 26

Programa de la bomba

Paso	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	H₂O (% v/v)	CH₃CN (% v/v)
0	0.5	1.2	50	50
1	2.0	1.2	50	50
2	2.0	1.5	40	60
3	2.0	1.8	30	70
4	2.0	1.8	20	80

10- CÁLCULOS

Construya una curva de estándares de concentración de histamina vrs área de pico

Utiliza la ecuación $y = mx + b$

Donde,

y = Área del pico de la histamina

m = Pendiente de la curva

x = Concentración de histamina

b = Intercepto en el eje y

Medir el área del pico de interés y sustituir en la ecuación (y) para calcular la concentración (x) de la histamina.

Aplicar factor de dilución de: 10 y 0.01

11- EQUIPOS DE PROTECCIÓN

Gabacha

Mascarilla para solventes orgánicos y ácidos

Guantes de seguridad resistentes a solventes y ácidos

Anteojos de seguridad

12- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Villalobos, N. (2022). *Determinación de histamina en pescado por cromatografía líquida con detección ultravioleta*. [Proyecto de Graduación presentado a la Escuela de Química como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial]. Universidad Nacional.

Anexo 2. Cálculo de Absortividad Molar para un estándar de histamina con una concentración de 20 mg/L

-Conversión de partes por millón a molaridad

Masa molar de histamina dihidroclorhídrica = 184.07 g/mol

Concentración = 20 mg/L = 0.02 g/L

$$\frac{0.02 \text{ g/L}}{184 \text{ g/mol}} = 0.0001087 \text{ mol/L}$$

Concentración molar de $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl} = 0.0001087 \text{ mol/L}$

-Cálculo de la absortividad molar

$$\mathbf{A = \epsilon \cdot b \cdot c}$$

Ecuación 18. Formula de absortividad molar

Donde,

A = Absorbancia

ϵ = Absortividad Molar ($\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

b = ancho de paso de luz (cm)

c = concentración molar (mol/L)

Despejando:

$$\epsilon = A / b \cdot c$$

$$\epsilon = 0.9 / 1 \text{ cm} \cdot 0.0001087 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\epsilon = 8\,280 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Anexo 3. Cálculo para enriquecer muestras de Mahi – mahi de 3 mg/L partir de una disolución de 232 mg/L de histamina

$$V_1 = \frac{V_2 \cdot C_2}{C_1}$$

Ecuación 19. Formula de absortividad molar

V_1 = volume de disolución de 232 ppm necesaria

V_2 = 10 ml

C_2 = 3 mg/L

C_1 = 232 mg/L

Despejando $V_1 = 0.130$ ml

Anexo 4. Cálculo de masa de histamina en muestra de pescado sin enriquecer para el cálculo de porcentaje de recuperación

Cuadro 27

Datos de muestras de histamina sin enriquecer para el cálculo del porcentaje de recuperación a 3 mg/L

De Ecuación de la recta de regresión		m = 45157		b = -30568
Factor de dilución = 10			Primera dilución = 0.01 L	
Replica	Masa muestra (g)	Área de pico (u.a)	Concentración (mg/L)	Cantidad de histamina en muestra (mg)
1	1.0286	14582.26	1.00	0.1000
2	1.0213	15246.75	1.01	0.1015
3	1.0178	13836.63	0.98	0.0983
Promedio	1.0226	14555.21	1.00	0.1000

Anexo 5. Cuadro cálculo de incertidumbres

Factor	Incertidumbre estándar	Unidades	Valor promedio (muestras enriquecidas a 3 ppm)	Incertidumbre relativa	Incertidumbre relativa cuadrado	Porcentaje de contribución en la incertidumbre
Regresión lineal	0.008759642	mg/L	3.193	0.002743103	7.52461×10^{-6}	0.1
Patrones curva	0.195376738	mg/L	3.193	0.061182694	0.003743322	65.0
Factor dilución	0.011627016	mL	10	0.001162702	1.35188×10^{-6}	0.0
Resolución cromatógrafo	0.002886751		482631.13	5.98128E-09	3.57757×10^{-17}	0.0
Pesaje muestra	0.000500833	g	1.0403	0.0004814	2.31746×10^{-7}	0.0
Tipo A de las concentraciones de las muestras enriquecidas a 3 ppm del Cuadro 13	± 0.14	mg/L	3.193	0.044763636	0.002003783	34.8
				u combinada (U_c)	± 0.242277285	
				Expandida (U) k=2	± 0.4845545708	

Anexo 6. Análisis de datos para la Validación de la linealidad

```
#Cargando librerias a utilizar
#Previamente deben ser instaladas con el comando install.packages("nombre")
#Los comandos echo=false, warning=false, message=false, previenen que el código, mensajes
y
#adevertencias se impriman en el html, word o pdf, permitiendo visualizar solo los
#resultados o gráficos derivados.
library(readxl)
library(PerformanceAnalytics)
library(ggplot2)
library(grid)
library(dplyr)
library(RColorBrewer)
library(scales)
library(gridExtra)
library(ggthemes)
library(scales)
library(ggpubr)
library(tidyr)
library(chemCal)
library(tinytex)
library(knitr)
library(performance)
library(outliers)
```

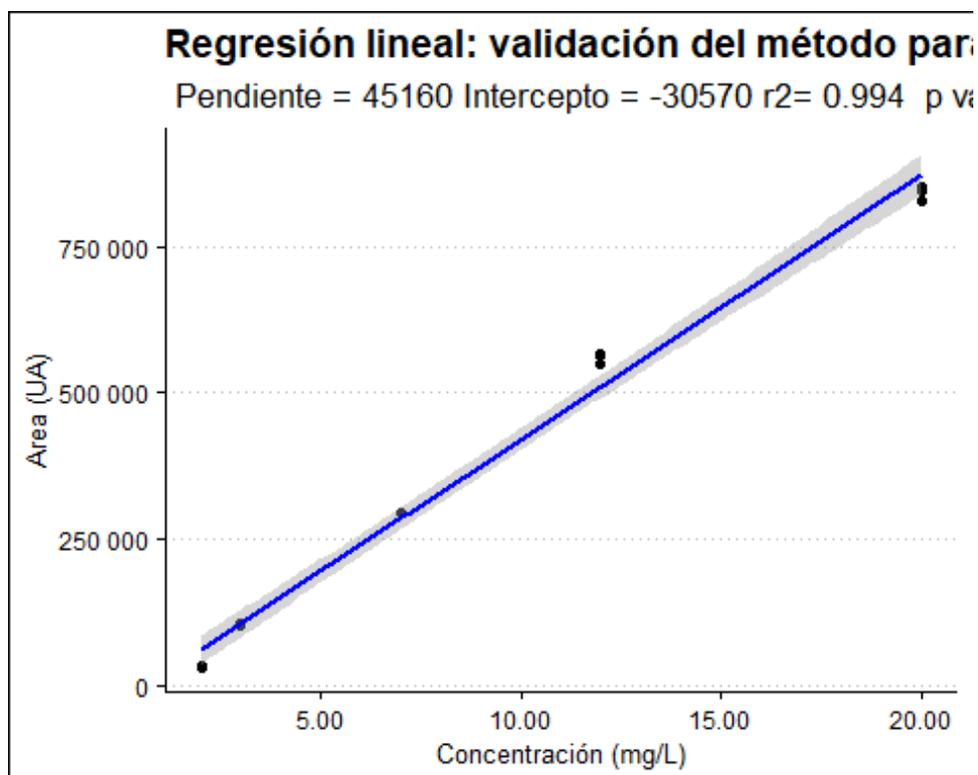
Determinación de parámetros de desempeño relacionados con el modelo de regresión:

linealidad,cedasticidad, Ld, Lc e incertidumbre

Determinación de linealidad

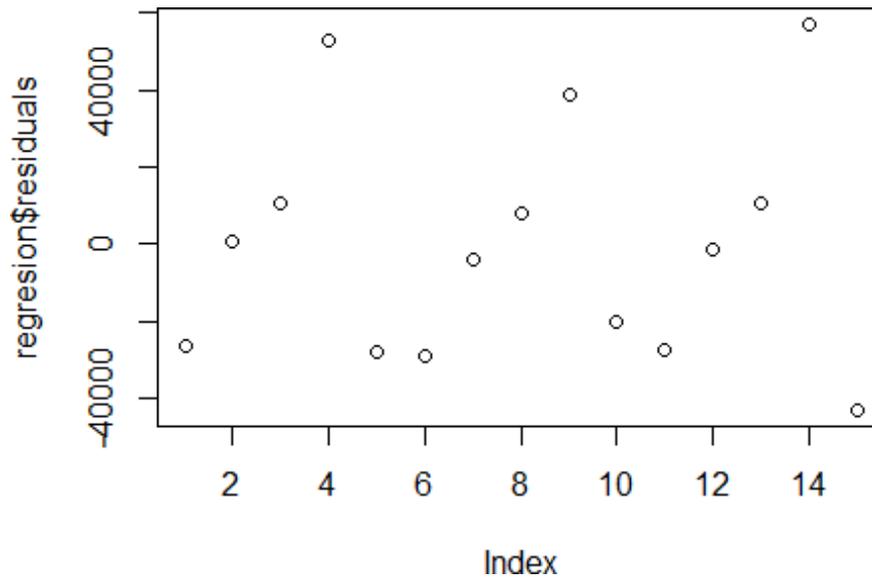
```
##
## Call:
## lm(formula = Area ~ Concentracion, data = nitlinealidad)
##
## Residuals:
##   Min     1Q  Median     3Q    Max
## -42899 -26884 -1291  10584  56964
##
## Coefficients:
##           Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)  -30568     13675  -2.235  0.0436 *
## Concentracion  45157      1242  36.353 1.84e-14 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 31830 on 13 degrees of freedom
```

Multiple R-squared: 0.9903, Adjusted R-squared: 0.9895
F-statistic: 1322 on 1 and 13 DF, p-value: 1.838e-14



Análisis de residuales para comprobación de supuestos estadísticos

Aleatoriedad de residuales



Sumatoria cercana a cero

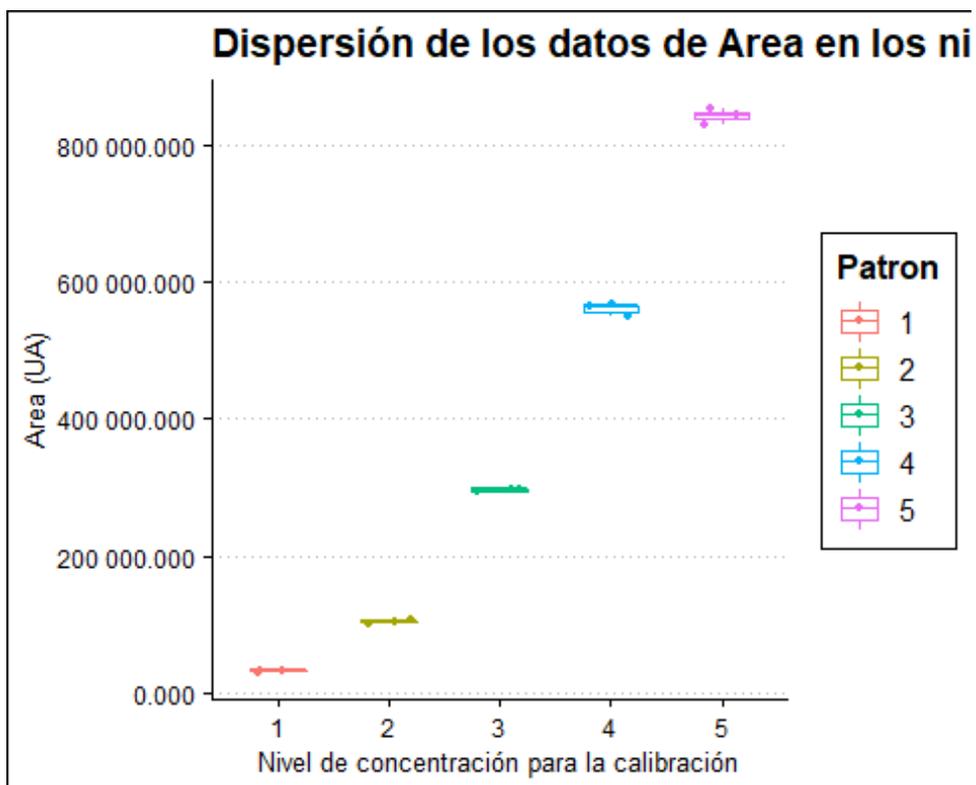
```
## [1] 2.728484e-11
```

Comprobación de la normalidad de los residuales mediante prueba Shapiro-Wilk

```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data: regresion$residuals  
## W = 0.9186, p-value = 0.1834
```

Determinación de la cedasticidad

```
##  
## Cochran test for outlying variance  
##  
## data: Area ~ Patron  
## C = 0.58004, df = 3, k = 5, p-value = 0.1555  
## alternative hypothesis: Group 5 has outlying variance  
## sample estimates:  
##      1      2      3      4      5  
## 1939102 4851893 2148416 90165817 136883406
```



Determinación de la incertidumbre por regresión lineal

```
## $Prediction
## [1] 11.36469
##
## $`Standard Error`
## [1] 0.4512816
##
## $Confidence
## [1] 0.9749346
##
## $`Confidence Limits`
## [1] 10.38975 12.33962
## [1] 0.97
```