

## **DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA PRESENTES EN MUESTRAS DE LOMO DE ATÚN, DE PECES (FAMILIA *ESCOMBRIDAE*), PROVENIENTES DE LA INDUSTRIA ATUNERA GUATEMALTECA.**

**Flores, H Pinagel, D**

Departamento de Química Orgánica, Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.  
Universidad de San Carlos de Guatemala.

### **1. RESUMEN**

Se determinó la concentración de histamina en 16 muestras de lomo de atún, siguiendo la metodología propuesta por Eerola y col. (2). Previo al análisis, se evaluó dicho método en los siguientes parámetros: límite de detección, cuantificación, linealidad, precisión y exactitud.

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

El estudio de la evaluación del método es satisfactorio, ya que cumple con los parámetros estadísticos evaluados; presentando buena repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, linealidad ( $r^2 = 0.9997$ ) y con límites de detección y cuantificación (2.50 y 8.35 mg/kg respectivamente) que están por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea en el Reglamento (CE) No. 2073/2005 (100mg/kg), por lo que queda demostrado que el método es preciso y exacto, apto para ser usado para la cuantificación de histamina en lomo de atún. Por último se concluyó que la concentración de histamina en la población del estudio, no exceden dicho límite.

---



## 2. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un país con muchos recursos hidrobiológicos, entre estos destaca el atún. Los peces de la familia *Escombridae*, entre los que se menciona el atún bonito (*Sarda sarda*) del Atlántico, atún patudo (*Parathunnus obesus*), atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y el albácora (*Thunnus alalunga*), se destacan por ser muy importantes dentro de la industria alimentaria guatemalteca, más específicamente relacionadas con el procesamiento de lomos de atún para exportación (5).

Las proteínas del pescado están formadas por aminoácidos que pueden hallarse libres. Uno de ellos es la histidina (1,4). La histamina es generada por la descarboxilación de la histidina, a través de enzimas provenientes principalmente de bacterias gram negativas (5). Normalmente, la histamina es un compuesto que se encuentra presente a bajas concentraciones de manera natural en peces, no constituyendo un peligro su consumo; sin embargo, su presencia en grandes cantidades es un indicativo de un proceso de deterioro, que se relaciona con una calidad sanitaria deficiente, elevada contaminación y/o condiciones inapropiadas durante el procesamiento y almacenamiento, que afectan la calidad alimentaria pudiendo provocar en personas sensibles una intoxicación (3, 4).

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

Este estudio tenía como objetivo principal, evaluar

un método normalizado para llevar a cabo la cuantificación de histamina en muestras de lomo de atún. Los resultados se compararon con el límite máximo permisible para histamina en atún, de 100 mg/kg, establecido en el Reglamento de la Unión Europea para la exportación del mismo al mercado internacional.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron al azar 16 muestras de un lote procesado, provenientes de la planta atunera más grande de Guatemala y la cuarta en tamaño de América Latina.

Se determinó la presencia y concentración de histamina, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), siguiendo la metodología propuesta por Eerola y col (2).

Para la extracción de histamina, fueron adicionados 20 mL de ácido perclórico 0,4M a 4 gramos de muestra homogenizada con un homogenizador Ultra-Turrax®. Posteriormente se centrifugó por 20 min a 4000 r.p.m, el sobrenadante fue filtrado con papel Whatman No.4.

Con la finalidad de formar un derivado fluorescente, 1 mL de extracto se alcaliniza con 200 µl de NaOH 2N. Se añaden 300 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturado y 2 mL de cloruro de dansilo (10mg/ml en acetona), manteniéndose a 46°C durante 45 min.

Transcurrido el tiempo se agregó 100µl de hidróxido de amonio concentrado. Se deja en reposo 30 min y se lleva a 5 ml con acetonitrilo. Se centrifuga durante 5 min a 4000 r.p.m. filtrándose el sobrenadante con papel filtro Whatman No. 4. La derivatización de los estándares de 1, 2, 5, 10, 20 mg/l para la calibración se hace por triplicado, siguiendo el procedimiento descrito para la muestra.



Se inyectaron 20 µl de cada extracto a un cromatógrafo líquido Agilent 1100, los cuales se detectaron en la salida de una columna Merck, RP-18 Lichrospher® de 12,5 cm de longitud por 4,5 mm de diámetro interno, tamaño de las partículas de sílica 5 µm. Se utilizó un detector UV-Visible modelo Agilent 1100, a una longitud de onda de 254 nm.

Para la separación cromatográfica se utilizó el siguiente gradiente a un flujo de 1 ml/min:

### Separación cromatográfica.

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

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

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

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

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

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

## 4. RESULTADOS

### Linealidad

En la Tabla I, se muestran los datos con los que se determinó la linealidad del método. A partir de estos datos estos datos se elaboró una curva de calibración (Gráfica I) y un análisis de varianza entre área y concentración de histamina, obteniéndose los siguientes resultados:

Ecuación de la curva de calibración:

$$y = 52.894x - 7.2827$$

$$r^2 = 0.9997$$

Donde:

y = Área de histamina

x = Concentración de histamina

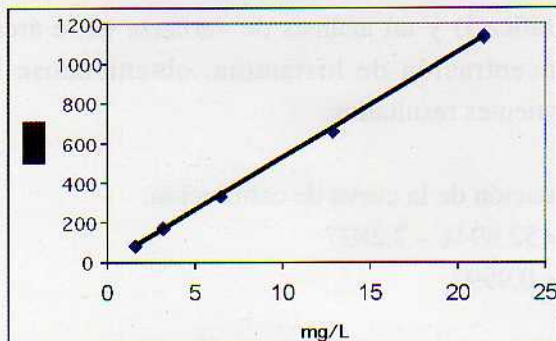
r<sup>2</sup> = Coeficiente de determinación



**Tabla I.**  
**Concentración de Histamina contra área**

Concentración (mg/L)	Área
1.609 4528	79.45 484
1.609 4528	80.38 767
1.609 4528	81.16 602
3.218 9056	167.8 9279
3.218 9056	167.9 0915
3.218 9056	168.0 0633
6.437 8113	330.3 2407
6.437 8113	330.2 9874
6.437 8113	330.2 8635
12.87 5622	664.7 8357
12.87 5622	662.3 0554
12.87 5622	660.7 0166
21.45 9371	1135. 38428
21.45 9371	1130. 69434
21.45 9371	1137. 20471

**Tabla No. 1**  
**Curva de Calibración**



**Tabla II.**  
**Análisis de varianza entre área y concentración de histamina**

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de d.s cuadrados	F	p
Regresión	1	2222443.27	2222443.27	43991.23319	2.4808E-24
Residuos	13	656.7618232	50.52014025		
Total	14	2223100.032			

**Exactitud**

Para determinar la exactitud del método, se usaron los mismos datos de linealidad y se generaron los siguientes resultados presentados en Tabla III:

**Tabla III.**  
**Tabla de resultados de la exactitud del método**

Concentración Teórica mg/L	Concentración Experimental mg/L	% Recup.	Media Área	Desviación E estándar de la media de la área	Coefficiente de Variancia
1.6094528	1.63 9847	102%	80.3361767	0.856751376	1.07%
1.6094528	1.65 7483	103%			
1.6094528	1.67 2198	104%			
3.2189056	3.31 1841	103%	167.93609	0.061377159	0.04%
3.2189056	3.31 2150	103%			
3.2189056	3.31 3988	103%			
6.4378113	6.38 2742	99%	330.303053	0.019226367	0.01%
6.4378113	6.38 2264	99%			
6.4378113	6.38 2029	99%			
12.875622	12.7 05983	99%	662.596923	2.056495927	0.31%
12.875622	12.6 59134	98%			
12.875622	12.6 28811	98%			
21.459371	21.6 03089	101%	1134.42778	3.3589289	0.30%
21.459371	21.5 14422	100%			
21.459371	21.8 37506	101%			
		Promedio	100.78%		
		Dev. St.	1.99%		

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

Hipótesis:	$H_0: \mu = 100\%$
Estadístico t:	1.52
Probabilidad t:	0.15076983

$p > \alpha$   $H_0$  no se rechaza



**Límite de detección y cuantificación**

**Tabla IV.**  
**Resultados del límite de detección y cuantificación**

	Concentración mg/L	Relación Señal/Ruido
Límite de detección	0.5000804	3.0
Límite de cuantificación	1.6700000	10.0

**Precisión**

**Tabla V.**  
**Resultados de la repetibilidad del método**

Muestra	Conc. mg/kg
R1	34.38
R2	34.92
R3	35.22
R4	35.58
R5	34.27
R6	34.90
R7	34.76
R8	35.11
R9	35.45
R10	34.45
Media	34.90
$\sigma$	0.45099919
% RSD	1.29%

**Reproducibilidad**

**Tabla VI.**  
**Resultados de la reproducibilidad del método**

Muestra No.	Analista No. 1 mg/kg	Analista No. 2 mg/kg	Media mg/kg	$\sigma$	RSD
1	51.2	51.1	51.1	0.129647	0.25%
2	49.6	49.1	49.3	0.365654	0.74%
3	51.8	51.8	51.8	0.035745	0.07%
4	50.0	49.8	49.9	0.136471	0.27%
5	50.8	50.3	50.5	0.347119	0.69%
6	50.2	49.9	50.0	0.182446	0.37%
7	48.1	48.5	48.3	0.316578	0.65%
8	50.3	50.3	50.3	0.037696	0.07%
9	51.8	51.6	51.7	0.125646	0.24%
10	51.0	51.3	51.1	0.227384	0.44%
MEDIA mg/kg	50.5	50.4			
$\sigma$	1.11	1.08			
RSD	2.21%	2.15%			

**Tabla VII.**  
**Prueba t para medias de dos muestras emparejadas**

	Analista No. 1	Analista No. 2
Media	50.4696243	50.3642693
Varianza	1.24086878	1.17240539
Observaciones	10	10
Coefficiente de correlación de Pears on	0.96006996	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	1.06809602	
P(T<=t) una cola	0.15664376	
Valor crítico de t (una cola)	1.83311336	
P(T<=t) dos colas	0.31328752	
Valor crítico de t (dos colas)	2.26215889	

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

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

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

**Resultados de las muestras de atún**

**Tabla VII.**  
**Concentración de histamina en las muestras de atún**

Muestra No.	Concentración mg/kg
1	*
2	*
3	*
4	*
5	*
6	*
7	*
8	*
9	*
10	*
11	*
12	16.19
13	*
14	*
15	*
16	*

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



## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

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

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

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

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

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

(correspondiente a 8.35mg/kg de histamina en atún) (Tabla IV.).

Los límites obtenidos para éste método son válidos, ya que están muy por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea en el Reglamento (CE) No. 2073/2005 para la exportación de atún al mercado internacional, donde establecen que la concentración del contenido de histamina en el atún no deberá superar 100mg/kg (7).

La precisión del método fue evaluada a través de la repetibilidad y reproducibilidad del mismo. La primera fue determinada por medio del análisis de 10 determinaciones de una misma muestra, obteniéndose una media, desviación estándar relativa y un coeficiente de variación (RSD), equivalente a 1.29% (Tabla IV.).

Según El Manual del Programa de verificación de métodos de la AOAC, las muestras medioambientales y de alimentos, pueden oscilar entre 2% y más del 20% y usando estas tablas se estima que el método deberá tener un coeficiente de variación entre 5.3 - 7.3%. Otro criterio de aceptación del coeficiente de variación de la repetibilidad del método, es por medio de la fórmula de Horwitz, donde se puede percibir que el coeficiente de variación de aceptación se encuentra entre 8 - 11%. A partir de estos dos criterios de aceptación se puede concluir que el método es repetible ya que está por debajo de ambos.

La reproducibilidad fue evaluada por medio de la determinación del análisis de las mismas muestras por dos analistas (Tabla VI.). Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de t de Student; dando como resultado que  $p > \alpha$ , lo que significa que la prueba de hipótesis no se rechaza,



lo que indica que no hay diferencia significativa entre los analistas y que si hay reproducibilidad entre ambos analistas. Esto muestra que el método no posee errores sistemáticos y que la variación del personal técnico no influirá los resultados obtenidos.

Los resultados de la concentración de histamina en las muestras (Tabla VII), muestran que 15 de 16 muestras, tienen una concentración de histamina por debajo del límite de cuantificación y solamente una muestra se logra cuantificar. A partir de estos resultados no es posible obtener la desviación estándar y el intervalo de confianza del 95% para la población; con lo que se concluye que la concentración de histamina en la población objetivo se encuentra muy por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea para la exportación de lomo de atún al mercado internacional y las muestras analizadas se considerarán aptas para la exportación, ya que ninguna supera el valor establecido de 100 mg/kg.

## 6. GRADECIMIENTOS

Se agradecen a las autoridades de la Escuela de Química, por las facilidades brindadas para la elaboración de la presente publicación, así como al Laboratorio Nacional de Salud por permitir realizar el trabajo experimental de dicha publicación.

## 7. REFERENCIAS

1. Ben, G.; Craven, C.; Ann, H. 1998. "Histamine formation in albacore muscle analyzed by AOAC and enzymatic methods". *J. Food Sci.* 83 (2): 210-214.
2. Eerola, S.; Hinkanen, R.; Lindfords, E.; Hirvi, T. 1993 "Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages". *Journal of AOAC International*, 76 (3): 575-577.
3. Freeman, b.a. 1988 "Microbiología de Burrows". 22 Ed. USA. Editorial Interamericana McGraw-Hill.
4. Huss H.H. 1999. "Evaluación de la calidad del pescado". Dinamarca. FAO documento Técnico de pesca 348.
5. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA), Universidad Rafael Landívar (URL) y Asociación Instituto de Incidencia Ambiental (IIA), 2006. "Perfil Ambiental de Guatemala: tendencias y reflexiones sobre la gestión ambiental". Guatemala, P 17-25.
6. Millán, R.; Izquierdo, P.; Allara, M.; et al. 2003. "Efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la calidad microbiológica y la producción de histamina en la Lisa (*Mugil curema*)". *Rev. Cient. FCV-LUZ*. Vol. 13, (5), 339-346.
7. Reglamento (CE) No. 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338 de 22.12.2005, p.11-14.