

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE
HISTAMINA EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

DIANA CAROLINA PANTOJA MORENO

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA: MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2019**

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE
HISTAMINA EN PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

DIANA CAROLINA PANTOJA MORENO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Médico
Veterinario**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA: MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2019**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores.

Artículo 1ro. del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Jorge Nelson López Macías
Jurado

Guillermo Arturo Cárdenas Caicedo
Jurado delegado

María Carmen López Joven
Directora

Katia Luz Andrea Benavides
Codirectora

San Juan de Parto, Octubre 2019.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos a:

Universidad Austral de Chile, por darme la oportunidad y grata experiencia de realizar mi intercambio internacional, y adicionalmente al laboratorio de Alimentos y Aguas perteneciente al Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad por permitirme el desarrollo de este trabajo.

Docentes de la Universidad de Nariño por brindarme sus conocimientos durante mis años de estudio

Reydored Umaña, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo y guiarme durante todo el proceso.

Raúl Cristi por todos los conocimientos brindados, su apoyo y confianza durante el desarrollo del trabajo.

PhD Carmen López Joven, por ser la guía de la metodología de trabajo.
Al laboratorio de Alimentos y Aguas de la Universidad Austral de Chile a todo su personal por acogerme y brindar su cariño durante el proceso.

DEDICATORIA:

A toda mi familia; mi padre Luis Antonio y mi madre Gladys por la constancia y esfuerzo realizados en mis años de crianza y a mis hermanas por su apoyo incondicional y ejemplo de virtudes y excelencia.

A mi sobrina Antonia con mucho cariño.

RESUMEN

Actualmente, la inocuidad alimentaria es un tema de gran importancia dentro de la cadena de los alimentos, es importante tener en cuenta que los alimentos de origen animal en especial los productos hidrobiológicos, como el pescado, se caracterizan por ser una fuente nutricional importante, pero con un tiempo de *vida útil* menor que otros alimentos. Múltiples factores pueden ser los causantes del deterioro de dichos productos incluso antes de que lleguen al consumidor final, obligando a las autoridades a ejercer un control estricto en la calidad del producto durante todas sus etapas. Las autoridades nacionales e internacionales son las encargadas de velar que dichos controles se acojan y cumplan con los parámetros establecidos en la normativa vigente, verificando la calidad mediante el análisis físico-químico y microbiológico del producto.

Uno de los parámetros químicos es el análisis de histamina, un indicador de la calidad del producto que se encuentra reglamentado a nivel internacional e influye directamente en el comercio nacional e internacional del producto. No obstante, en la actualidad, la inexistencia de un laboratorio de verificación oficial que cuente con la metodología implementada en el sur de Chile genera situaciones complejas en las muestras de control tipo exportación por incumplimiento de temperaturas en el transporte y recepción. Esta situación ha motivado al Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Universidad Austral de Chile a llevar a cabo la implementación del análisis de Histamina.

La matriz seleccionada para este estudio fue pescados Salmón tipo exportación merluza (*Merluccius*), salmón (*Salmo salar*, *Oncorhynchus kisutch*). Para lograr la ejecución del análisis de histamina se hizo necesario una validación metodológica de la prueba, para lograr objetividad u precisión en los resultados, el principal eje central fue la guía de validaciones de Sernapesca, entidad encargada del cumplimiento de estándares de calidad en productos hidrobiológicos a nivel nacional e internacional.

La metodología implementada se basa en la extracción con ácido tricloroacético y posterior cuantificación mediante cromatografía líquida con detección UV; la fase móvil utilizada es de acetonitrilo metanol agua. Con el método descrito en este trabajo se ha demostrado cuantificar de forma precisa histamina en menos de diez minutos de elución cromatográfica. La validación presentó resultados satisfactorios a con un rango de trabajo seleccionado 3-50 mg/L la linealidad es satisfactoria obteniendo un $r > 0,99$. La sensibilidad cromatográfica expresada con un límite de detección de 10 mg/Kg y un límite de cuantificación de 15 mg/Kg. La exactitud expresada como recuperación medida arrojó un 106,4 % y no hay existencia de sesgo con respecto al material de referencia certificado, precisión sin diferencia significativa evaluada con el test de Fisher.

Palabras clave: estandarización, histamina, cromatografía, pescado, alimento

ABSTRACT

Nowadays food safety is a very important issue which encompasses all factors that could affect quality's food and could trigger diseases transmitted by its consumption. Food safety involves whole food chain from primary production to final consumption, favours preventive measures to control the introduction of food contamination. Likewise, issues related to the preservation of food, consumer safety, economic development and trade in the agri-food industry are dealt at a transversal level. In this sense, it is important considered that products of hydrobiological origin, especially fish, are characterized as an important nutritional source, but with a shorter useful life than other foods.

Multiple factors could be the cause of deterioration of hydrobiological products, even before they reach final consumer, it forces authorities to control strictly product's quality during all its stages. National and international authorities are responsible for ensuring that these controls respect parameters established in current regulations, verifying quality through physical-chemical and microbiological analysis of products.

A chemical parameter to measure quality in hydrobiological products is the analysis of histamine, which is regulated according to the International standards and influences directly in national and international product's commerce. However, the absence of an official verification laboratory with the methodology implemented in southern Chile at this moment generates complex situations in export-type control samples due to non-compliance of transport and reception temperatures. This situation has motivated the Food and Water Laboratory of the Universidad Austral de Chile to implement the histamine analysis. The sample selected to this study was export type Salmon (*Merluccius*), salmon (*Salmo salar*, *Oncorhynchus kisutch*).

The methodology implemented is based on extraction with trichloroacetic acid and subsequent quantification by liquid chromatography with UV detection. The mobile phase used is acetonitrile methanol water. The method described in this study has been shown to accurately quantify histamine in less than ten minutes of chromatographic elution. The validation presented satisfactory results with a range of work selected 3-50 mg / L the linearity is satisfactory obtaining a $r > 0.99$. The chromatographic sensitivity expressed with a limit of detection of 10 mg / Kg and a limit of quantification of 15 mg / Kg. The accuracy expressed as measured recovery was 106.4%. There is no existence of bias with respect to the certified reference material, precision without significant difference, which was evaluated with the Fisher's test.

Keywords standardization, histamine, chromatography, fish, food.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCION	
1. FORMULACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	17
2. OBJETIVOS.....	199
2.1 OBJETIVO GENERAL	199
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	199
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1 CONTROL DE CALIDAD ALIMENTARIA	200
3.2 PARÁMETROS QUÍMICOS RELACIONADOS CON CALIDAD ALIMENTARIA 200	
3.2.1. Nitrógeno básico volátil total (NBVT).....	20
3.2.2. Trimetilamina TMA.....	21
3.2.3. Histamina y otras aminas biógenas.....	21
3.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA).....	24
3.4 REGULACIÓN	26
3.5 CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	277
3.6 IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA.....	28
3.7 VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA	29
4. METODOLOGÍA	31
4.1 MATERIALES	31
4.1.1 Normativas técnicas relacionadas.....	31
4.1.2 Procedimientos internos del laboratorio	31
4.1.3 Equipamiento.....	31
4.2 INFRAESTRUCTURA.....	31
4.3 MATRIZ DE ESTUDIO.....	32
4.3.1 Selección de la matriz.....	32
4.4 MÉTODO	32
4.4.1 Búsqueda y revisión de normas.....	32
4.4.2 Pruebas experimentales.	32
4.4.2.1 FASE 1 Extracción.....	33
4.4.2.2 FASE 2 Derivatización mediante reacción de dansilación.	33
4.4.2.3 FASE 3 Análisis cromatográfico y cuantificación de Histamina..	34
4.4.3 Creación del procedimiento para la cuantificación de histamina.....	35
4.4.4 Validación del método de análisis interno del laboratorio.	35

5.RESULTADOS.....	36
5.1 PRUEBAS EXPERIMENTALES.	36
5.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	37
5.3 CREACIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO.....	39
5.4 PARTICIPACIÓN EN EL INTERLABORATORIO “QUALITY IN MEAT ANALYSIS SCHEME” (QMAS).....	40
5.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	42
5.5.1 Selectividad y especificidad o sensibilidad.....	42
5.5.2 Linealidad.	45
5.5.3 Coeficiente de variación y correlación.	46
5.5.4 Definición de límites de detección y cuantificación.	47
5.5.5 Rango o Intervalo de trabajo.	48
5.5.6 Veracidad o Sesgo.	48
5.5.7 Recuperación o exactitud.....	49
5.5.8 Precisión..	50
5.5.8.1 Cálculo de los grados de libertad G1.	51
5.5.8.2 Cálculo de repetibilidad.....	52
5.5.8.3 Cálculo de la repetibilidad intermedia.....	52
5.5.8.4 Precisión intermedia.....	52
6. CONCLUSIONES	54
7. RECOMENDACIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flujograma del procedimiento técnico PT 41.....	35
Figura 2. Cromatograma de la fase experimental con las condiciones cromatográficas descritas en la norma chilena.....	37
Figura 3. Cromatograma de la fase experimental con modificaciones de solventes	39
Figura 4. Informe de resultados interlaboratorio ronda 265.....	41
Figura 5. Histograma para los valores de Z score referentes al valor verdadero.....	43
Figura 6. Cromatograma muestra blanco matriz.....	43
Figura 7. Cromatograma blanco matriz fortificado 5 mg/kg.....	42
Figura 8. Cromatograma blanco matriz fortificado 15 mg/kg.....	44
Figura 9. Curva linealidad para el patrón de histamina.....	45

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Gradiente de la bomba para solventes de HPLC.....	36
Tabla 2. Informe de resultados de análisis de muestra interlaboratorio.....	40
Tabla 3. Resultados del tiempo de retención para cada nivel en 10 repeticiones.....	44
Tabla 4. Áreas obtenidas de cada una de las concentraciones.....	45
Tabla 5. Media de los resultados para las concentraciones de la curva de calibración, desviación estándar y coeficiente de variación.....	46
Tabla 6. Áreas de lectura de las 7 muestras de blanco matriz y concentraciones en mg/L.....	47
Tabla 7. Resultados de las 6 réplicas analizadas correspondientes al material de referencia certificado.....	49
Tabla 8. Cálculo de recuperación fortificados en un nivel de 5 mg/L 15 mg/L 100 mg/L.....	49
Tabla 9. Cálculo de recuperación muestras fortificadas.....	50
Tabla 10. Resultado de la concentración obtenida en las diferentes lecturas realizadas a una misma muestra.....	51
Tabla 11. Resultado de la diferencia entre duplicados.....	53

LISTA DE ANEXOS

Anexo A PT 41 Cuantificación histamina por método instrumental, HPLC/DAD

Anexo B PO 13 Validación métodos de ensayo

Anexo C Selectividad y sensibilidad

Anexo D Linealidad

Anexo E Límites de detección y cuantificación

Anexo F Veracidad por sesgo

Anexo G Exactitud por recuperación

Anexo H Porcentaje de precisión

INTRODUCCIÓN

El término calidad se define, según la norma NCh ISO 9000¹, como el grado en el que un conjunto de características inherentes a un objeto cumple con los requisitos específicos según el sistema de gestión adoptado. Ahora, el control de calidad, en especial respecto a productos y servicios, se determina mediante la inspección de procesos para validar el acatamiento de los requisitos en el marco de un proceso de gestión, ello con el fin de satisfacer a los clientes, usuarios o consumidores. Adicionalmente, la verificación de este factor tiene un impacto en la comercialización de productos, así como en la salud del consumidor.

El control de la calidad de productos alimenticios, conforme a las normas internacionales aplicables establecidas por la Organización Americana para la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Comisión de Salud de la Unión Europea, se realiza mediante la inspección de distintos criterios químicos y microbiológicos. Dentro de los productos de origen animal, el pescado, como fuente alimenticia, requiere ser sometido a estrictos controles de calidad previos a su distribución para consumo, tanto a nivel nacional como para exportación.

Chile se encuentra situado dentro de los 10 países pesqueros más importantes del mundo. Según datos proporcionados por la FAO², el desembarque total en el año 2016 fue cercano a los 3,3 millones de toneladas, de las cuales 1,15 millones de toneladas provienen de la acuicultura (34,8%) y 2,16 millones de toneladas provienen de la pesca (65,2%). En el caso de otros países, como Colombia, se maneja un nivel de producción considerablemente más bajo, con datos de desembarque marítimo de peces de 31 mil toneladas en ese mismo año. Este gran volumen en Chile implica cumplir con altos estándares de calidad exigidos por los países de destino.

Los laboratorios de análisis se han visto impulsados por la necesidad de mejorar sus procesos y poder ser competitivos, optando a la implementación de metodologías más eficientes y valederas considerando que la mayoría de laboratorios actualmente están certificados por diferentes normas nacionales o internacionales.

La entidad encargada de regular los parámetros de calidad de productos para exportación en Chile es el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura - SERNAPESCA, cuya misión es contribuir a la sustentabilidad del sector y a la protección de los recursos hidrobiológicos y su medio ambiente, a través de una

¹ INN, Instituto Nacional de Normalización, Chile. Norma Chilena ISO9000:2015. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario.

² FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2018. p 224.

fiscalización integral y gestión sanitaria que influye en el comportamiento sectorial promoviendo el cumplimiento de las normas. La entidad en mención estableció el manual de Inocuidad y Certificación³ para los productos hidrobiológicos como la principal directriz para aquellos productos que intenten salir al mercado internacional. Por su parte, el encargado del control y la verificación de los productos alimenticios a nivel nacional es el departamento de Salud Pública del Ministerio de Salud (MINSAL).

En Colombia, el Ministerio de Protección Social⁴ es la entidad que establece el reglamento técnico sobre los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir los productos de la pesca mediante la Resolución 776 de 2008.

El incumplimiento de los criterios de calidad definidos por las autoridades competentes antes mencionadas puede generar alteraciones en la calidad de los productos que constituirán un riesgo para los consumidores, provocando en algunos casos las denominadas enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), entendida por la Organización Mundial de la Salud⁵ como cualquier enfermedad de naturaleza infecciosa o tóxica originada por la ingestión de alimentos o agua contaminados que afectan la salud del consumidor.

El Ministerio de Salud de Chile (MS de Chile) indica que para medir la calidad de los productos hidrobiológicos se utilizan diferentes parámetros, entre los cuales se encuentra la frescura que es evaluada con métodos sensoriales y engloban los cambios en las características de piel, ojos, branquias, pero tiene la desventaja de ser subjetiva. Adicionalmente a estos métodos se realizan controles específicos dentro de laboratorios, usando métodos bioquímicos y químicos para establecer estándares cuantitativos⁶. Dichos indicadores pueden ser comparados con niveles mínimos o máximos permitidos según la normativa nacional e internacional que los regule y son la mejor herramienta para evitar posibles brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos.

Uno de los métodos químicos establecidos para analizar los estándares cuantitativos de calidad es la determinación de histamina, en atención a que los

³ CHILE. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura - SERNAPESCA. Manual de inocuidad y certificación. Res. Ex. N° 5125 - 29.06.2016 [en línea] [citado el 14 Marzo 2018] Disponible en internet: <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=comcontent&view=article&id=2123&Itemid=1179>

⁴ COLOMBIA. Ministerio de la Protección Social. Resolución número 776. (marzo 6) Bogotá: Diario oficial, 2008.

⁵ ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. Nota descriptiva N°399. Bogotá: s.n., 2015.

⁶ CHILE. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura – SERNAPESCA, Óp. Cit., p.82.

brotos de intoxicación alimentaria causados por productos hidrobiológicos se relacionan frecuentemente con la presencia de toxinas estables al calor, como las biotoxinas y/o la histamina, según la información epidemiológica mundial analizada por la FAO⁷.

El Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Universidad Austral de Chile es el encargado de realizar los análisis microbiológicos y físico-químicos de los productos hidrobiológicos destinados a exportación en la zona sur del país. No obstante, la determinación de histamina no se ofrecía como un servicio en dicho laboratorio, lo que implicaba el traslado de las muestras al laboratorio de la zona central para el respectivo análisis, retrasando los procesos de exportación y poniendo en riesgo la integridad de las muestras.

Por lo anterior expuesto, la presente investigación propone la implementación de la metodología de determinación de histamina para el Laboratorio de Alimentos y Aguas de acuerdo con la NCh 2637/Productos hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas-Método HPLC con detector UV.INN 2001. En el proceso de implementación, frente a problemas específicos de lectura de resultados, surgió la necesidad de realizar una modificación en las fases del análisis. Ante el cambio en el procedimiento, se requirió una validación de la técnica empleada para demostrar que las especificaciones de desempeño del método cumplen con los parámetros exigidos por SERNAPESCA. El método propuesto corresponde a una modificación de la norma chilena oficial antes mencionada en búsqueda de mejora en el proceso de análisis, específicamente en los tiempos de retención del analito.

⁷ FAO – WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report. USA: s.n., 2013.

1. FORMULACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La seguridad alimentaria es un concepto importante que engloba todos los eslabones de la cadena alimentaria incluyendo al consumidor. La Organización Mundial de la Salud (OMS)⁸, se esfuerza por promover la disponibilidad de alimentos inocuos, sanos y saludables para toda la población, con el fin de mejorar la inocuidad de los alimentos y la seguridad nutricional.

Así mismo, la calidad alimentaria, se refiere a la apariencia estética, la frescura, o al grado de deterioro que haya sufrido un alimento, el cual puede involucrar aspectos de inocuidad como la ausencia de agentes peligrosos, bacterias, virus, parásitos o compuestos químicos. Hoy en día, la inocuidad alimentaria está adquiriendo cada vez mayor relevancia a nivel internacional y nacional, englobando las distintas etapas de la cadena productiva de alimentos de origen animal, vegetal como mineral.

Según Huss:

Los productos hidrobiológicos, dentro de ellos, el pescado, son excelentes alimentos desde el punto de vista nutritivo, pero tienen el inconveniente de ser altamente perecederos; por tanto, la manipulación y almacenamiento desde la cosecha hasta su consumo deben de ser los adecuados para no alterar los parámetros de calidad y evitar problemas en la salud del consumidor⁹.

Uno de los desafíos que actualmente se plantean los países para hacer frente a estos problemas es cumplir con los estándares de calidad exigidos internacionalmente, lo que permitirá a la industria nacional entrar en el comercio internacional que cada día está más globalizado y exigente en materia de inocuidad.

Las buenas prácticas de manipulación son indispensables para garantizar la calidad de los alimentos. Sin embargo, en ocasiones estas prácticas no se cumplen, produciéndose alteraciones con un rápido deterioro del producto que podría constituir un peligro para el consumidor.

El control y la verificación de los productos para consumo humano son reglamentados en cada país para cumplir estándares competitivos. En Chile la entidad que se preocupa de definir los estándares internos de calidad es el departamento de Salud Pública del Ministerio de Salud (MINSAL). Mientras que los estándares de calidad para las exportaciones a terceros países son definidos por Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA).

⁸ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. [en línea] [citado 2017-10-24] Disponible en internet: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/nutrition/es/

⁹ HUSS, H.H. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad: Laboratorio Tecnológico Ministerio de Pesca. Dinamarca: FAO Documento Técnico de Pesca, 1998.

Los laboratorios de control y verificación de la calidad son los encargados de verificar que los productos cumplen con los estándares requeridos, mediante el análisis de un número de muestras proveniente de un lote de producción, muestras que se someten a análisis de laboratorio cuyos resultados se describen en un informe que contiene el tipo de producto, los parámetros evaluados y las metodologías analíticas aplicadas. Uno de los parámetros de calidad determinados en peces destinados a consumo humano, es el nivel de histamina.

En Chile, el control y la verificación de productos hidrobiológicos de exportación está a cargo de tres laboratorios acreditados, dentro de los cuales se encuentra el laboratorio de Alimentos y Aguas de la Universidad Austral de Chile (UACH). Este último laboratorio no realiza el análisis de histamina, lo que es una limitante para las empresas del sector pesquero de la zona sur, como para el mismo laboratorio, ya que están obligados trasladar las muestras a otro laboratorio ubicado en la zona centro del país. Esta actividad genera retraso en la entrega de resultados y presenta inconvenientes en algunas épocas del año, como en la época estival, que provoca rechazos de los productos por demoras en los envíos y mal manejo de la muestra.

¿La metodología implementada en el laboratorio de Alimentos y Aguas, basada en la normativa chilena NCh 2637/2001, permite la cuantificación de histamina en productos hidrobiológicos?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología para la cuantificación de histamina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un método analítico para la cuantificación de histamina basada en la NCh 2637/2001 Productos hidrobiológicos. Determinación de histaminas y otras aminas biógenas- Método HPLC con detector UV.
- Elaborar un procedimiento técnico que describa todas las etapas del análisis desde el procesamiento de las muestras hasta la cuantificación mediante HPLC.
- Participar de un estudio interlaboratorio para demostrar competencia analítica y aportar resultados para la validación.
- Validar el procedimiento analítico y demostrar que cumple el propósito de cuantificar histamina en productos hidrobiológicos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 CONTROL DE CALIDAD ALIMENTARIA

La calidad alimentaria busca proteger la salud y el bienestar del consumidor y promover el desarrollo del comercio, haciendo énfasis en la prevención de los riesgos químicos y biológicos resultantes de la contaminación, adulteración o manejo inapropiado de los alimentos.

Con el fin de asegurar un sistema de control de los alimentos oportuno y eficaz, las autoridades nacionales encargadas de ejercer la vigilancia e inspección deben contar con normatividad actualizada y adecuada que reglamente los requisitos básicos para la garantía de la calidad, establezca los procedimientos administrativos e imponga los medios coercitivos necesarios para evitar el incumplimiento.¹⁰

Por su parte, los laboratorios de alimentos prestan el servicio de análisis químico y/o microbiológico, con el objetivo de identificar cualquier anomalía que represente un peligro potencial para la salud del consumidor. De este modo, contribuyen en el proceso de control y vigilancia de la calidad, mediante un análisis adecuado que arroje resultados confiables; análisis que requiere la utilización de pruebas de laboratorio debidamente implementadas y validadas.

El deterioro y descomposición de los alimentos se evidencia con la presencia de parámetros sensoriales como su color, olor, sabor, aroma; microbiológicos y químicos. Estas características o parámetros generales son analizados en los laboratorios de verificación y control oficial y confirman la calidad del producto de manera previa a su comercialización. Adicionalmente, el proceso de análisis conlleva un estudio de la inocuidad del producto, mediante la confirmación de la ausencia de contaminantes que puedan generar riesgo para la salud del consumidor.

3.2 PARÁMETROS QUÍMICOS RELACIONADOS CON CALIDAD ALIMENTARIA

Dentro de los cambios químicos inducidos por el crecimiento bacteriano que son aceptados para la verificación de la calidad en productos hidrobiológicos se encuentran los siguientes:

3.2.1. Nitrógeno básico volátil total (NBVT). Corresponde al nitrógeno proveniente de compuestos básicos volátiles nitrogenados. Corresponde a

¹⁰ FAO ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA Manual de control de los alimentos importados basado en el riesgo ROMA, 2017. [en línea] ISBN 978-92-5-309070-9 [citado 24-02-2019] Disponible en internet: <http://www.fao.org/3/a-i5381s.pdf>

compuestos de naturaleza no proteica solubles en agua. El término general incluye la medición de amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos), la dimetilamina (DMA; producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación) y la trimetilamina (TMA; producida por deterioro bacteriano) en su conjunto es una estimación del deterioro de la calidad de los productos hidrobiológicos¹¹.

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA)¹² de Chile los niveles máximos de NVBT para pescados no seláceos es 30mg/100g de nitrógeno básico volátil total (NBVT) y 70 mg/100g de NBVT para seláceos, y la normativa que reglamenta a los laboratorios para su correcta cuantificación es la NCh 2668/2001 (Productos hidrobiológicos: Determinación de nitrógeno básico volátil total (NBVT)

3.2.2. Trimetilamina TMA. Compuesto químico formado durante el proceso natural de degradación de los productos hidrobiológicos. Es usado como indicador de descomposición o pérdida de frescura. Su presencia en el pescado en deterioro es debido a la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA), el cual está naturalmente presente en el tejido vivo de muchas especies de pescados marinos y puede ser descompuesto a trimetilamina por ciertas bacterias que se producen naturalmente en la piel y en las entrañas de estos animales; la norma que reglamenta a los laboratorios para la cuantificación de TMA es la NCh 2757/2002 (Producto Hidrobiológico Determinación de nitrógeno de trimetilamina). Según FAO “La cantidad de TMA producida es una medida de la actividad de las bacterias de descomposición en la carne y, por lo tanto, es un indicador del grado de deterioro, siendo la causante del típico “olor a pescado”¹³.

3.2.3. Histamina y otras aminos biógenas. Son bases orgánicas de bajo peso molecular. Son compuestos alergénicos generados por la degradación de aminoácidos que están contenidos en pescados y otros alimentos los que al ser consumidos pueden causar reacciones alérgicas o cuadros de intoxicación. Pueden formarse exógenamente por un proceso donde las bacterias descarboxilan los aminoácidos y los convierten en su amina biógena correspondiente¹⁴, por ejemplo, la descarboxilación bacteriana de la histidina da origen a la histamina.

¹¹ Asociación con la Unidad de Apoyo para la Pesca Internacional y la Investigación Acuática, Evaluación no sensorial de la calidad del pescado SIFAR. USA: Torry Research Station. Documento técnico de pesca, p.92

¹² CHILE. Ministerio de Salud. Reglamento sanitario de los alimentos. Decreto N° 977. [Versión 25-05-2017]. S.I.: Diario Oficial, 1996.

¹³FAO, 2001.Ibíd.

¹⁴ ZHAI, H. et al. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China. En: Food Control 25, 1(2): 303 - 308. [en línea] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont>.

Cuevas expresa que: “La determinación de las aminas biógenas en un alimento destinado a consumo humano es importante por su toxicidad y también como indicador de la calidad de los alimentos”¹⁵.

Según Moreno “Las aminas biógenas más estudiadas por su capacidad toxicológica son la histamina, putrescina, cadaverina y tirosina. Otras aminas biógenas como triptamina, b-feniletilamina, espermina y espermidina también pueden estar presentes en los alimentos”¹⁶.

Según Roig-Saques y otros “En particular, la histamina se encuentra presente en cantidades más significativas en el pescado y sus derivados, pero también puede encontrarse en otros alimentos como el queso”¹⁷. En relación a esto, Santos afirma que sería el segundo producto alimenticio más comúnmente implicado en el envenenamiento por histamina, seguido por “la carne, el vino y los vegetales”¹⁸.

Según Cortazares y Calderón:

La intoxicación que se genera se conoce como "intoxicación histamínica" o intoxicación escombroidea, y es una intoxicación alérgica muy frecuentemente encontrada pero poco diagnosticada, debido a su alta variabilidad en la sintomatología de los individuos que la cursan. En el caso de los pescados, la intoxicación se da mayormente en ejemplares de la familia *Escombridae* como el atún, bonito, caballa, y no escombroides como la sardina, arenque y salmón¹⁹.

Para Emborg y colaboradores:

Las principales bacterias causantes de la descarboxilación de la histidina son *Vibrio* spp., algunos *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. y también la *Salmonella* sp. Pero

¹⁵ CUEVAS MANTECON, Sonia. Optimización de las condiciones de derivatización en la determinación de histamina mediante HPLC con detección fluorimétrica. España: Universidad de Burgos, 2016.

¹⁶ MORENO SANZ, Araceli. Biosensores electroquímicos para la detección de aminas biógenas. Trabajo de grado. Madrid – España: Facultad de Farmacia Universidad Complutense, 2017. p. 3.

¹⁷ ROIG-SAQUES, AX; MOLINA, AP. y HERNANDEZ-HERRERO, M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. En: European Food Research and Technology, 215, 2002, 1(2) 96-100. DOI 10.1007/s00217-002-0521-2

¹⁸ SANTOS, M. y SILLA, H, Biogenic amines: their importance in foods. En: International Journal of Food Microbiology. 1996. Vol, 29, Issues 2–3, 213-231. [citado el 7 mayo 2018] Disponible en internet: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)

¹⁹ CORTAZARES FIELD, J. y CALDERÓN CAMPOS, R. Escombroidosis, Intoxicación por Histamina. Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora, 2008; 25(2) 91-94. [citado el 7 abril 2018] Disponible en internet: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclinhosinfson/bis-2008/bis082i.pdf>

las bacterias aisladas en diferentes brotes de intoxicación corresponden a bacterias mesófilas como *Clostridium perfringens*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* y *Raoultella planticola*, al igual que *Morganella psychrotolerans*²⁰.

Según Lehane, L. y Olley “Algunos microorganismos pueden estar presentes en la flora microbiana normal de los peces vivos, pero la mayoría se derivan de la contaminación posterior a la captura, en la planta de procesamiento o en el sistema de distribución, y también, según el manejo en restaurantes y hogares”²¹.

Guergué-Díaz y colaboradores expresaron que: “La histamina como una amina endógena tiene numerosos efectos biológicos en la fisiología, entre los que destacan su acción vasodilatadora, respuesta alérgica inmediata tras activación de los receptores H1 y neurotransmisión por la activación de los H3”²².

Maintz y Novak afirman: “por otro lado, la formación de histamina exógena se da por la descarboxilación bacteriana en los alimentos, al ser consumida vía oral la cantidad necesaria para producir sintomatología clínica varía de una persona a otra”²³.

Estudios llevados a cabo por Taylor y Eitenmiller²⁴ mostraron que la intolerancia a la histamina y el envenenamiento fueron el resultado del desequilibrio de la histamina acumulada y la capacidad de degradación de la histamina por la enzima diamina oxidasa (DAO). Otro trabajo publicado por Santos y Silla²⁵, mostró que, en condiciones normales en humanos, las aminas exógenas se absorben de los alimentos, y la desintoxicación se da rápidamente por la acción de aminas oxidasas o por conjugación, pero en el caso de individuos mayormente sensibles a este tipo

²⁰ EMBORG, J; AHRENS, P. and DALGAARD, P. *Morganella psychrotolerans* - Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning. Danish Institute for Fisheries Research. Denmark. 2007, 1(2) 29-42. ISBN 978-87-7877-228-2

²¹ LEHANE, L. y OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. En: International Journal of Food Microbiology 58 2000, p. 1-3. [citado el 19 febrero 2018] Disponible en internet: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00296-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00296-8)

²² GUERGUÉ-DÍAZ DE CERIO, O; BARRUTIA-BORQUE, A. and GARDEAZABAL-GARCÍA, J. Escombroidosis: abordaje práctico. En: Actas Dermo-Sifiliográficas, 2016. 107(7) 567-571. [citado el 14 enero 2019] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.02.010>

²³ MAINTZ, Laura y NOVAK, Natalija. Histamina e intolerancia histamínica. The American Journal of Clinical Nutrition 2007. (1)1185-96 [Citado el 17 mayo 2019] Disponible en internet: http://www.deficitdao.org/docs/Histamina_e_intolerancia_histaminica.pdf

²⁴ TAYLOR, Steve y EITENMILLER, Ronald. Intoxicación por alimentos con histamina: toxicología y aspectos clínicos. En: Critical Reviews in Toxicology. 1986. 1(17)91-128. [citado el 12 agosto 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.3109/10408448609023767>

²⁵ SANTOS, M. y SILLA, H. Óp. cit, p. 223.

de alergénicos o cuando se consumen niveles demasiado altos, el proceso de desintoxicación se altera y las aminas biogénicas tienden acumularse en el cuerpo.

3.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS (ETA)

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un problema en la salud mundial, los brotes de ETA cobran mayor importancia cuando los alimentos son altamente perecederos. El pescado es un producto que debe conservar la cadena de frío con estricto rigor, de lo contrario las características organolépticas se alteran al igual que los procesos químicos relacionados a su descomposición.

Según el Ministerio de Salud de Chile (MS de Chile), “en Chile, las ETAS se mantienen bajo vigilancia de carácter universal, y de ser confirmada su notificación es inmediata y obligatoria. Esto se encuentra regulado por el Ministerio de Salud, en el Decreto Supremo 158 del año 2004”²⁶.

La información epidemiológica mundial analizada por la FAO²⁷ muestra que los brotes de intoxicación alimentaria causados por productos hidrobiológicos se relacionan frecuentemente con la presencia de toxinas estables al calor como las biotoxinas y/o la histamina.

La “intoxicación histamínica” es un envenenamiento que representa aproximadamente el 5% de todas las intoxicaciones alimentarias informadas en los Estados Unidos y aproximadamente el 40% de las intoxicaciones resultantes de la ingestión de pescado según informa FENG et al²⁸. Además, se piensa que la incidencia es más alta de la conocida actualmente, ya que muchos casos no se informan o no se diagnostican correctamente al tener una sintomatología limitada.

Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC-USA)²⁹, entre 1998 y 2012, los peces más frecuentemente implicados en las reacciones de

²⁶ CHILE. Ministerio de Salud. Aprueba reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. [en línea] [citado 2018-11-18] Disponible en internet: <http://www.leychile.cl/N?i=237770&f=>

²⁷ FAO – WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report. USA: s.n., 2013.

²⁸ TORTORELLA, Vincenzo; MASCIARI, Peppino. y PEZZI, Mario. Histamine Poisoning from Ingestion of Fish or Scombroid Syndrome, En: Case Reports in Emergency Medicine, 2014. Article ID 482531. [citado el 20 agosto 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1155/2014/482531>

envenenamiento por pescado con histamina en los EE.UU. fueron el atún (*Thunnus*), el pez dorado (*Coryphaena hippurus*), el escolar (*Lepidocybium flavobrunneum*), el salmón (*Salmo*), entre otros.

Guillier et al.³⁰ encontró que el pescado fresco con alto contenido de histidina en sus tejidos contribuye más al número de casos de intoxicación por histamina reportados en Francia, además, el meta-análisis realizado por Colombo et al.³¹ ratifica que el número de casos reportados hasta la fecha fue en gran parte por el consumo de especies que hoy en día están en estricto control sanitario por la Unión Europea.

Un estudio publicado por Harmeline et al.³² indicó que los síntomas aparecen entre pocos minutos a 2 horas después de comer, e imitan los síntomas de una alergia dependiente de IgE. Incluyen primero hinchazón de la cara, una sensación de inquietud, luego picazón con eritema de la cara y el tronco de aspecto urticariforme. Los síntomas digestivos incluyen náuseas, vómitos, calambres abdominales, inflamación y, a veces, diarrea.

Otro estudio publicado por Sánchez et al.³³ mostró que en algunos casos se ha requerido como tratamiento, la hospitalización y el tratamiento de shock anafiláctico.

3.4 REGULACIÓN

La Organización Americana para la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Comisión de Salud de la Unión Europea han establecido normas para el

²⁹ FENG, C; TEUBER, S. and GERSHWIN, M. Envenenamiento por pescado con histamina (escombroide): una revisión exhaustiva. En: *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2016 Vol.50; p.64-66. [citado el 16 septiembre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8467-x>

³⁰ GUILLIER L, A; THÉBAULT, F. GAUCHARD, M. POMMEPUY, A. GUIGNARD y P. MALLE. Un plan de muestreo basado en el riesgo para el monitoreo de la histamina en los productos pesqueros. *Revista de protección de alimentos* 2011, vol. 74, No. 2, p. 302-310.[citado el 16 septiembre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-234>

³¹ COLOMBO, Fabio; CATTANEO, Patrizia; CONFALONIER, Enrica and BERNARDI. Cristian Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2018, Vol. 58 (7): 1131–1151 [citado el 12 octubre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1242476>

³² HARMELIN, et al. Three cases of scombroid poisoning. En: *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 2018. 145(1), p. 29-32. [citado el 19 octubre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.07.007>

³³ SÁNCHEZ-G, et al. Scombroid fish poisoning: A potentially life-threatening allergic-like reaction En: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 100, 1997. Issue 3, p. 433 - 434. [citado el 14 mayo 2018] Disponible en internet: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70263-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70263-X)

control de calidad en productos alimenticios, como el Reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas (CE) N° 853/2004 del 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal y el Reglamento (CE) N° 2073-2005 que define los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios dentro del continente americano.

Dentro de la regulación normativa mencionada, la histamina es la única amina biógena para la que se han establecido los límites máximos. Para la Unión Europea³⁴ los límites establecidos son: m=100 mg/kg y M=200 mg/kg, y en un plan de muestreo es necesario 9 especímenes donde hay tres criterios de aceptación: (1) Un máximo de 2 podrían estar situados entre m y M; (2) Ninguno de los valores puede ser mayor de M; (3) Todos los valores son menores que "m". Las especies de peces reguladas son particularmente de las familias: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coriphaenidae, Pomatomidae, Scomberosocidae.

En este contexto normativo, el Codex Alimentarius, organismo intergubernamental abierto a todos los países miembros que en la actualidad cuenta con 165 países, sirve como base para la creación de políticas y normas que reglamentan la calidad de los productos alimenticios. Según Biji: "Como nivel indicador de descomposición e higiene y manipulación, los pescados no deberán contener más de 100 mg/kg de histamina"³⁵.

Por otro lado, en Chile el RSA³⁶, indica que los pescados frescos, frescos enfriados y congelados no deberán contener más de 200 mg/kg de histamina. En Colombia se dictamina los límites para las especies Bonito y atún según la Resolución número 776 de 2008³⁷, siendo el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA, por medio del Laboratorio Físicoquímico de Alimentos y Bebidas, la entidad encargada de vigilar e inspeccionar la aplicación del reglamento técnico sobre requisitos físicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir los productos de la pesca para consumo humano³⁸.

³⁴ EU/EC. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. En: Official Journal of the European Union, 2005. (1) 338: 1-26.

³⁵ BIJI, KB., et al. Aminas biogénicas en mariscos: una revisión. En: Revista de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2016. 53 (5), 2210-2218. [citado el 8 noviembre 2018] Disponible en internet: <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2224-x>

³⁶ CHILE. Ministerio de Salud. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto N° 977. Óp. Cit., p. 119.

³⁷ MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución número 776, Óp. Cit.

³⁸ MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución número 776, Óp. Cit.

Es importante tener en cuenta que si el producto ya presentó altos niveles de histamina, esta no se elimina con la cocción. Según Gutiérrez, et al. “La histamina es resistente al calor por lo que no se destruye con la cocción doméstica o comercial, por tanto, constituye el cuadro tóxico más frecuente asociado al consumo de productos marinos, siendo descrito en todo el mundo”³⁹.

3.5 CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

La cuantificación de histamina se ha realizado en el tiempo por varias metodologías entre ellas la Electroforesis Capilar Zonal (CZE), kits inmuno-enzimáticos y otras técnicas como los métodos colorimétricos, considerando a la cromatografía líquida como una técnica altamente precisa y sensible lo que permite cuantificar con exactitud los límites mínimos de regulación, además se puede aplicar a diferentes matrices en el control de calidad alimentaria.⁴⁰

La cromatografía, como indica Quattrocchi et al., es usada principalmente para la separación de los componentes de una muestra, mediante su distribución en dos fases: una estacionaria y otra móvil.⁴¹

Hay varios tipos de cromatografía para la determinación analítica de las aminas. Se ha propuesto la cromatografía de capa fina o la cromatografía de gases, pero la cromatografía líquida de alto resolución (HPLC), junto con distintas técnicas de detección, ha sido el método más utilizado en los últimos 30 años. Así mismo, la norma NCh 2637/2001 sugiere la aplicación de la técnica HPLC para la determinación de histamina en laboratorios de control oficial.

En la cromatografía líquida de alta resolución los componentes de una mezcla se mueven con la ayuda de una fase móvil o solvente, el proceso de separación se basa en diferencias de velocidad de migración entre los componentes de la fase móvil y la interacción con la fase estacionaria o columna⁴².

³⁹ GUTIÉRREZ, A. et al. Intoxicación por escombrotóxina. Presentación de siete casos en dos brotes familiares Scombroid fish poisoning Nota Clínica. En: Gaceta Médica de Bilbao. 2001. 98: 43-45 [citado el 5 noviembre 2018] Disponible en internet [https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(01\)74354-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(01)74354-5)

⁴⁰ ETIENNE Monique. Methodology for histamine and biogenic amines analysis. En: Seafoodplus traceability. 2006. project 6.3 [citado el 3 Marzo 2019] Disponible en internet <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6484/>

⁴¹ QUATTROCCHI, O. et al. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Edt. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires. Argentina. 1992. p. 407.

⁴² VALLS PUIG, J. Validación de metodologías de cromatografía líquida de alta resolución en alimentos. 2004.[citado el 11 septiembre 2018] doi.10.13140/RG.2.2.26411.85289.

Los factores que influyen en este proceso de separación incluyen características moleculares relacionadas con la adsorción (líquido-sólido), la partición (líquido-sólido) y la afinidad o diferencias entre sus pesos moleculares.

De acuerdo con Cuevas⁴³, la detección en el equipo de HPLC puede hacerse mediante la espectrofotometría de absorción molecular en el rango UV-visible y la espectrofotometría de fluorescencia molecular. Para este estudio se utilizará la primera técnica, en todo caso para cualquiera de las dos se necesitará de un paso previo de derivatización de las aminas, ya que las aminas por sí mismas no presentan grupos activos que originen absorción de radiación ni fluorescencia.

Cuevas⁴⁴ también afirma que las aminas biógenas no tienen suficiente absorción en los rangos de longitud de onda de UV-Visible por tanto se requiere un proceso de derivatización para su detección en los equipos de cromatografía. Se han reportado varios reactivos de derivatización como el orto- ftalaldehído (OPA) y el cloruro de dansilo, este último el más comúnmente usado en los últimos años, ya que sus derivados se pueden reconocer utilizando detectores como el de arreglo de diodos o DAD para este caso. Además de ser el más usado como reactivo de derivación en la determinación de aminas biógenas en productos alimenticios, principalmente se usa porque produce compuestos derivatizados estables.

3.6 IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA

La implementación de nuevas metodologías de ensayo de laboratorio requiere contar con bibliografía pertinente que ofrezca una base de conocimientos relacionados con el tema y verificar que se cuenta con los materiales y equipos necesarios para ejecutarla metodología, siguiendo una pauta de trabajo que permita cumplir objetivos.

Las directrices nacionales chilenas sugieren el uso de metodologías que han sido previamente aplicadas y ejecutadas como base para los procesos de implementación. Las normas chilenas nacionales son las principales herramientas para este tipo de procesos; estos documentos hacen parte de un sistema de regularización de técnicas de laboratorio que buscan cumplir con exigencias nacionales e internacionales.

La rigurosidad y exigencias de las prácticas de laboratorio se ciñen a la norma ISO 17025; requisitos internacionales que deben cumplir los laboratorios de ensayo oficiales para garantizar que el proceso de implementación cuente con los controles

⁴³ CUEVAS MANTECON, Sonia. Optimización de las condiciones de derivatización en la determinación de histamina mediante HPLC con detección fluorimétrica. España: Universidad de Burgos, 2016. P. 3

⁴⁴ CUEVAS MANTECON, Ibit., p. 4

y requisitos necesarios. Por ejemplo, los reactivos e insumos necesarios para la fase experimental deben contar con certificados de calidad y pureza, mientras que la compra de materiales de referencia necesarios debe acatar lo dispuesto en la norma NCh 2444. Of 2010.⁴⁵ Igualmente el control de ambiente y demás parámetros deben ser controlados según lo dispuesto en los procedimientos internos de cada laboratorio.

Una vez puesto en marcha el proceso de implementación, pueden presentarse situaciones no previstas en la norma aplicable que llevan a modificaciones en el proceso para que sea exitoso. Cuando este evento se presenta, surge la necesidad de un proceso de validación que de soporte a los resultados obtenidos en la fase experimental.

3.7 VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA

Según Duffau et al., la validación de una metodología “es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos”⁴⁶.

Entonces, el objetivo general de la validación es demostrar que los métodos son adecuados para el uso esperado, constituyéndose en una actividad fundamental para confirmar, experimentalmente, que el procedimiento es adecuado y los resultados obtenidos son verdaderos. Así, la validación obedece a la necesidad de demostrar competitividad analítica.

Adicionalmente, ésta etapa proporciona al laboratorio un grado de confianza y seguridad en los resultados que se obtienen y genera conocimiento sólido y experiencia en los detalles prácticos para llevar a cabo el método, incluyendo etapas críticas dentro del proceso.

Un método de ensayo normalizado es el que ha sido aprobado por un organismo de Normalización, como el INN en Chile, o por otras organizaciones reconocidas a nivel nacional e internacional. Dentro de un laboratorio, la metodología debe validarse cuando el método no es normalizado y/o corresponde a métodos nuevos, o cuando un método normalizado ha sufrido una modificación significativa según indica la Norma ISO/IEC 17025.⁴⁷

⁴⁵INN, Instituto Nacional de Normalización, Chile. NCh 2444. Of 2010. Términos y definiciones usados en relación con materiales de referencia o la que la reemplace.

⁴⁶DUFFAU, B. et al, Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Chile: Instituto Salud Publica Chile, 2010. p.21-53

⁴⁷ ISO/IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.

Existen diferentes guías de validación, por ejemplo Instituto Nacional de Normalización de Chile autoriza la norma NCh 2446. Of 1999⁴⁸ como parámetro para la validación de métodos de ensayos. Por otro lado la validación de análisis químicos para productos hidrobiológicos en Chile ha sido reglamentada por SERNAPESCA mediante el documento denominado “Guía de Validación de métodos analíticos”, mediante el cual se establecen los lineamientos de validación (métodos estadísticos) con fundamento teórico de guías internacionales, como la adoptada por la Comunidad Europea mediante norma CE/657/2002, EURACHEM “La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para validación de métodos y temas relacionados”, guías específicas (ISO), entre otras.

En la presente investigación, la validación de la técnica para la determinación de histamina en el Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Universidad Austral de Chile, surgió ante la modificación de la técnica aprobada por el Instituto Nacional de Normalización⁴⁹.en el proceso de implementación, especialmente el cambio en solventes que componen la fase móvil de la lectura en cromatografía, como se desarrollará adelante, y se rigió por el plan de validación de SERNAPESCA, institución de carácter nacional que entrega criterios ajustados a la normativa internacional, los cuales fueron adoptados y desarrollados por el laboratorio en el PO 13.Validación de Métodos de Ensayo (Anexo B).

⁴⁸ CHILE. Instituto Nacional de Normalizacion. NCh2446. Guía para la validación de métodos de ensayo - Principiosy conceptos generales. 1999

⁴⁹CHILE. Instituto Nacional de Normalización. NCh 2637/ Productos hidrobiológicos. Determinación de histaminas y otras aminas biógenas- Método HPLC con detector UV. INN. 2001.

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES

4.1.1 Normativas técnicas relacionadas.

La norma técnica utilizada como guía para la implementación es:

- CHILE. Instituto Nacional de Normalización. NCh 2637/ Productos hidrobiológicos. Determinación de histaminas y otras aminas biógenas- Método HPLC con detector UV. INN. 2001.

La norma se adquirió oficialmente mediante compra online al Instituto Nacional de Normalización, Chile.

4.1.2 Procedimientos internos del laboratorio. El laboratorio de Alimentos y Aguas cuenta con planes operativos (PO), dichos documentos proporcionan los parámetros necesarios para el aseguramiento de la calidad, los documentos necesarios son:

- PO 1 Manipulación de muestras de ensayo.
- PO 2 Equipos e instrumentos de medición y ensayo
- PO 8 Materiales, patrones y cultivos de referencia
- PO 10 Aseguramiento de la calidad de los ensayos
- PO 12 Implementación de ensayo

4.1.3 Equipamiento. Los equipos utilizados para el proceso de implementación en la presente investigación son los enlistados en el anexo A, además de equipos de uso común en laboratorio, se usó un equipo de cromatografía líquida con las siguientes características.

- Sistema HPLC con detector de Arreglo de diodos (DAD)
- Columna cromatográfica: Marca: GL Sciences. Relleno de columna: C18 3 µm. Dimensión de la columna: 4,6 x 150 mm

4.2. INFRAESTRUCTURA

El Laboratorio de Alimentos y Aguas perteneciente al Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, ubicada en la ciudad de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.

El laboratorio ofrece los servicios y el apoyo a la docencia desde 1976; además para cubrir la demanda de certificación de calidad sanitaria de alimentos de empresas productoras y entidades estatales y a nivel regional y nacional. El Laboratorio cuenta con la autorización para realizar la Verificación del Programa de Aseguramiento de Calidad (PAC) de productos hidrobiológicos de exportación, según convenio con el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). Adicionalmente, se encuentra

acreditado como Laboratorio de ensayos, por el Sistema Nacional de Acreditación del Instituto Nacional de Normalización (INN), según NCh-ISO 17025.

4.3 MATRIZ DE ESTUDIO

La matriz analizada fue un grupo de pescados de las especies: merluza común (*Merluccius gayi gayi*), merluza del sur o austral (*Merluccius australis*), salmón del atlántico (*Salmo salar*) coho o salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*), pertenecientes al Programa de Aseguramiento de la Calidad/PAC, programa de control sanitario que a partir de un análisis de peligros y control de puntos críticos, permite asegurar la calidad del producto final. Este programa se basa en la evaluación de riesgos y control de puntos críticos en el proceso productivo de acuerdo a la metodología Hazard Analysis and Critical Control Points HACCP. Los planes HACCP de la industria pesquera son aprobados y supervisados por Sernapesca, basándose en las normas del Codex Alimentarius y Comunidad Europea. Las muestras fueron escogidas aleatoriamente durante el periodo experimental.

4.3.1. Selección de matriz. Al momento de recepción de las muestras, se verificó la presencia e integridad de la cinta de embalaje. Se rotuló el producto con la clave o fecha de elaboración, número de muestra con su identificación, fecha y hora de muestreo y la temperatura de recepción.

La información obtenida hace parte del formulario oficial de envío de muestras de verificación para el programa de aseguramiento de la calidad.

4.4 MÉTODO

4.4.1 Búsqueda y revisión de normas. Se aplicó la norma chilena 2637/2001 Productos hidrobiológicos. Determinación de histamina y otras aminas biógenas- Método HPLC con detector UV como guía metodológica para el desarrollo de la fase experimental adicionalmente se revisaron metodologías actuales y validadas al respecto.

4.4.2 Pruebas experimentales. Se ejecutó la metodología en laboratorio dividiéndola en tres fases:

Fase 1 Extracción

Fase 2 Derivatización

Fase 3 Cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución

4.4.2.1 FASE 1 Extracción. Posterior a la recepción de la muestra, ésta se descongeló a temperatura ambiente y se homogenizó en procesadora de alimentos por aproximadamente 3 minutos.

Se pesaron 2.5 gr en un tubo de centrifuga de 50 ml y se adicionaron 10 ml de ácido tricloroacético, se agitó durante 30 minutos para descomponer la musculatura y lograr una desproteización de la muestra. Luego se centrifugó a 3000 rpm generándose un sobrenadante que se filtró a través de papel filtro Whatman N° 1.

Esta modificación se realizó con el fin de obtener un ultra filtrado libre de impurezas que interfieran en la lectura cromatográfica. Una vez se obtuvo el extracto se procedió a la reacción de dansilación. En casos donde no se podía realizar la lectura cromatográfica de inmediato el extracto se refrigeró.

4.4.2.2 FASE 2 Derivatización mediante reacción de dansilación. En un vial para cromatografía de 2 ml se agregaron en este orden:
100 µl del filtrado obtenido de la muestra y/o la solución estándar de la curva de calibración correspondiente.
400 µl de bicarbonato de sodio 0,25 M (pH 8 y 9)
200 µL de la solución de cloruro de dansilo
300 µL de acetona p.a

La reacción de dansilación requiere la aplicación de temperatura externa (40–70 ° C) Los viales cromatográficos se cerraron herméticamente y se incubaron durante 60 minutos a 60°C ± 2°C en estufa, controlada a 60°C.

Preparación de estándares. La solución stock de histamina fue preparada pesando 50 mg para disolver en un volumen total de 50 ml. Obteniendo una solución de 1000 mg de histamina por litro (mg/L).

Para la curva de calibración se prepararon los siguientes estándares: 3,125; 6,25; 12,5; 25; y 50 mg/ml. La curva de calibración se realizó en rangos agotados basados en la concentración de histamina regularizada a nivel nacional e internacional. Del proceso analítico se obtiene un área bajo la curva o peak del cromatograma.

La concentración de la histamina se obtuvo de la curva de calibración que corresponde a una curva de regresión lineal donde la concentración deseada se despeja de la ecuación en la recta de la siguiente forma:

$$A_m = C_m \times m + b$$

A_m = área de la histamina de la muestra

C_m = concentración de la histamina de la muestra en mg/kg, obtenida de la curva de calibración.

m = Pendiente

b = intercepto

Finalmente, para calcular la concentración de la histamina usamos la siguiente ecuación:

$$C = \frac{C_m \times 10}{g}$$

C= concentración de la histamina en mg/kg de la muestra
g= cantidad de muestra pesada en gramos

Posterior al cálculo de la concentración se hizo necesario la aplicación de un factor de corrección a la concentración final obtenida de la fórmula. Para obtener dicho factor se calcula un valor estimando teniendo en cuenta la recuperación de un fortificado versus un blanco. Este valor se aplica a la concentración de todas las muestras de matriz y su fin es estimar una posible pérdida de analito en el procedimiento⁵⁰. Lo anterior se define dentro del proceso como factor de corrección y se calcula para cada análisis.

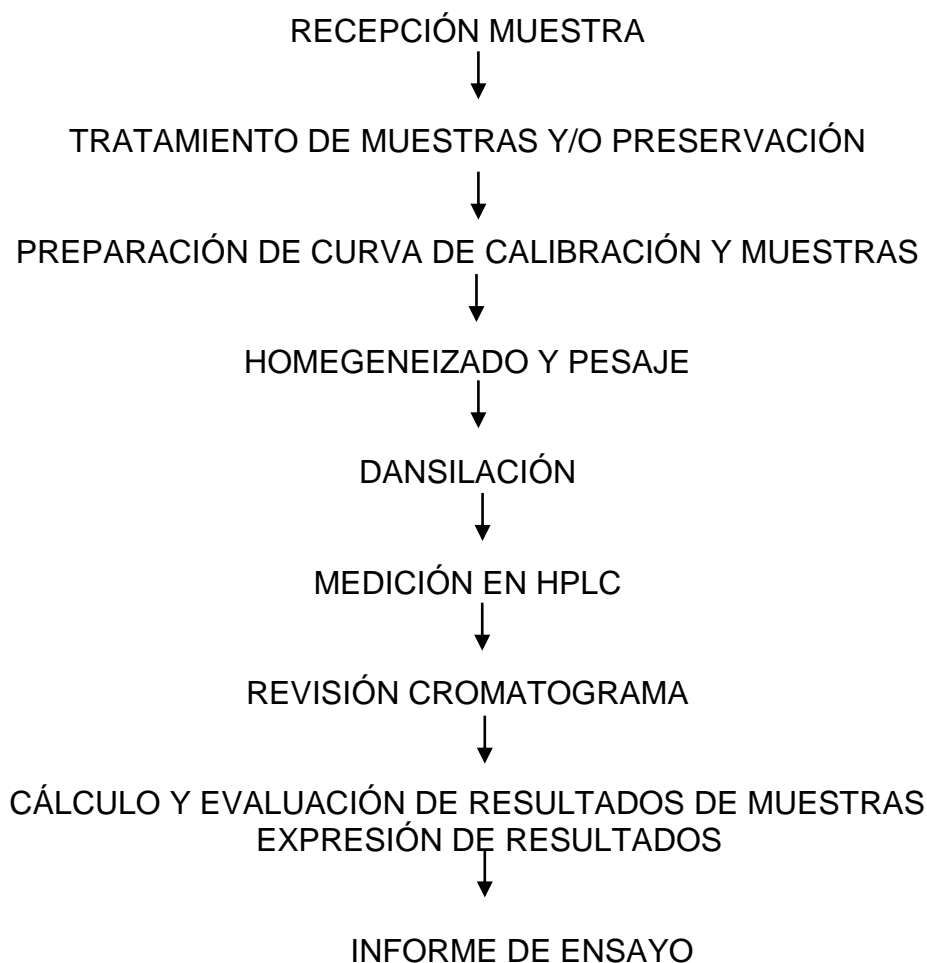
4.4.2.3 FASE 3 Análisis cromatográfico y cuantificación de Histamina. Una vez realizada la derivatización la muestra se trasladó a la columna cromatográfica para ser transportada con ayuda de un gradiente de solventes que poseen afinidad con la muestra, “fase móvil”. En este punto se da la separación de los componentes de la muestra.

Las sustancias que permanecen más tiempo en estado libre en la fase móvil avanzan más rápidamente mientras que las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y, por lo tanto, tardan más en salir o fluir. Siendo éste el principio fundamental de la cromatografía.

Finalmente, desde la columna, cada componente separado (incluida la histamina dansilada) pasan por el detector DAD, a una longitud de onda de 254 nm, y se emite energía logrando una señal que es traducida por el ordenador que entrega un cromatograma para determinar su cuantificación.

⁵⁰ Laboratorio de Alimentos y Aguas. UACH. Cuantificación histamina por método instrumental, HPLC/DAD. Procedimiento Técnico N° 4. Chile. 2018, p,1-9.

Figura 1. Flujograma del procedimiento



4.4.3 Creación del procedimiento para la cuantificación de histamina.

Se elaboró un documento con la descripción de todas las etapas relacionadas a la cuantificación de histamina. Realizando una descripción de la metodología, detallando el paso a paso desde la recepción de las muestras en laboratorio hasta el cálculo para la cuantificación del analito.

4.4.4 Validación del método de análisis interno del laboratorio. Se realizó un análisis estadístico (varianza, test t student, ANOVA) de los datos obtenidos en la fase experimental, aplicando los parámetros de la guía de validación interna del laboratorio documento PO 13 Validación métodos de ensayo Anexo B.

Los estimadores de la precisión del sistema instrumental son la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.), que permiten evaluar la incertidumbre (error aleatorio) en la estimación de la medida

5. RESULTADOS

5.1 PRUEBAS EXPERIMENTALES

Inicialmente, la fase experimental comenzó con las especificaciones que describe la norma chilena, incluyendo el tratamiento de las muestras, su extracción y derivatización, las condiciones cromatográficas indicadas en la norma corresponden a una fase móvil; Metanol/ agua y una gradiente que se indica en la tabla 1

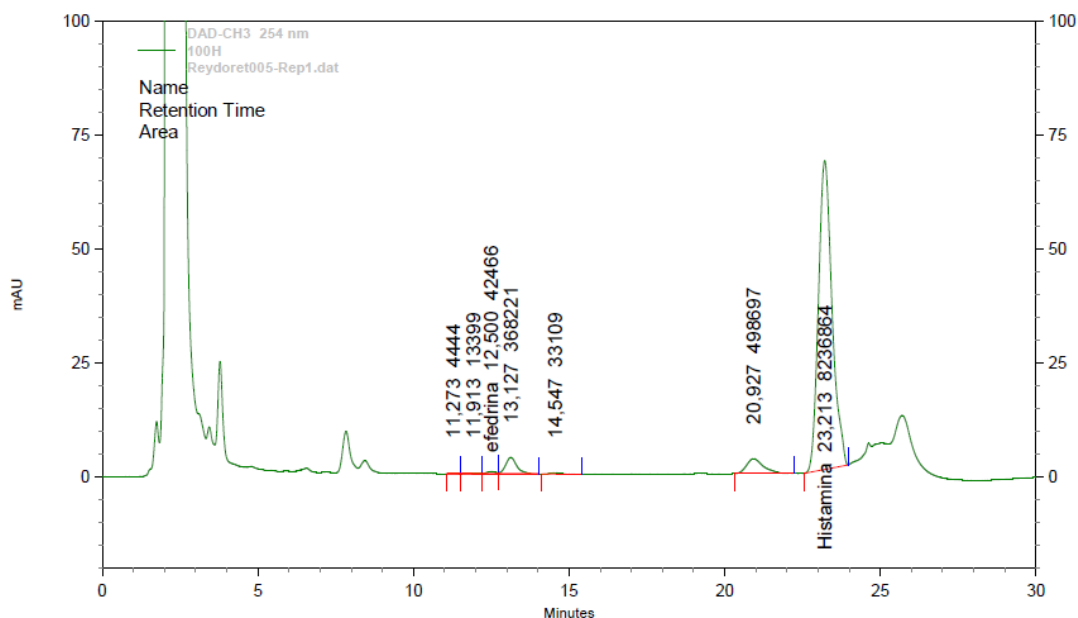
Tabla 1. Gradiente de la bomba para solventes de HPLC

Tiempo Min.	Metanol	Agua
0	70	30
20	75	25
20,1	100	0
22,0	100	0
22,1	70	30
30	70	30

Fuente: NCh 2637/ Productos hidrobiológicos. Determinación de histaminas y otras aminos biógenas- Método HPLC con detector UV. INN. 2001

Al realizar la medición se obtuvo un cromatograma con poca resolución del analito (Figura 2), un tiempo de retención cercano a los 23 minutos e interferencias después de la retención de la histamina, lo que no permitió una cuantificación exacta de la histamina.

Figura 2. Cromatograma de la fase experimental con las condiciones cromatográficas descritas en la norma chilena



Fuente: Resultado del Equipo HPLC HITACHI

Para Valls Puig, en el desarrollo de un método para HPLC, en la mayoría de los casos se intenta realizar la separación, y si no se tiene éxito, se continúa modificando aspectos tales como: columna, fase móvil o pH, lo cual conduce a numerosas pruebas de ensayo y error que no aseguran completamente separaciones eficientes, o picos simétrico⁵¹ Como es el caso se procede a modificar las condiciones cromatográficas para mejorar la resolución del analito en el cromatograma y finalmente se logran definir las condiciones cromatográficas más adecuadas.

5.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Como se explicó, para la preparación de la fase móvil, los solventes indicados, según la norma, únicamente son metanol y agua. Con esta fase móvil no fue posible calcular y cuantificar la histamina con exactitud. En consecuencia se procede a realizar una etapa experimental en búsqueda de mejorar las condiciones cromatográficas. Según la revisión realizada por ÖNAL, et al.⁵² las metodologías usadas para la determinación de aminas biógenas en distintas matrices en los últimos años se evidencia el uso de acetonitrilo, solvente que ha logrado mejorar

⁵¹VALLS PUIG, J. Op. Cit., p 13.

⁵² ÖNAL, A., TEKKELI, S. E. K., & ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. En: Food Chemistry. 2013. Vol.138(1), p.509–515. [Citado el 12 agosto 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.056>

las condiciones cromatografías en la lectura. Por esta razón y luego de realizar ensayos experimentales se concluyó que al adicionar acetonitrilo a la fase móvil se lograba mejorar la calidad de resolución y, además, se acortaba el tiempo de retención.

Bajo esta misma línea, Assis et al⁵³ realizó validación de método de HPLC cuantitativo con detección ultravioleta (HPLC-UV) para el estudio de aminas en carne de pechuga de pollo con una fase de acetonitrilo y agua de manera satisfactoria.

Existen metodologías que han sido implementadas exitosamente logrando determinar cuantitativamente histamina en matrices similares; es el caso de FLORES⁵⁴ que obtuvo resultados validos utilizando Acetato de amonio 0.1M: Acetonitrilo (1:1) Acetonitrilo en el análisis de productos de la industria atunera guatemalteca. Por otro lado, POBLETE⁵⁵ logró validar exitosamente una metodología utilizando una fase móvil en sistema isocrático con metanol/agua (75/25) en Salmón Coho Chileno.

Así, la fase móvil escogida es una alternativa para la implementación de metodologías de este tipo, la modificación propuesta en este estudio, se definió con la siguiente proporción:

Acetonitrilo 50%

Metanol 25%

Agua 25%

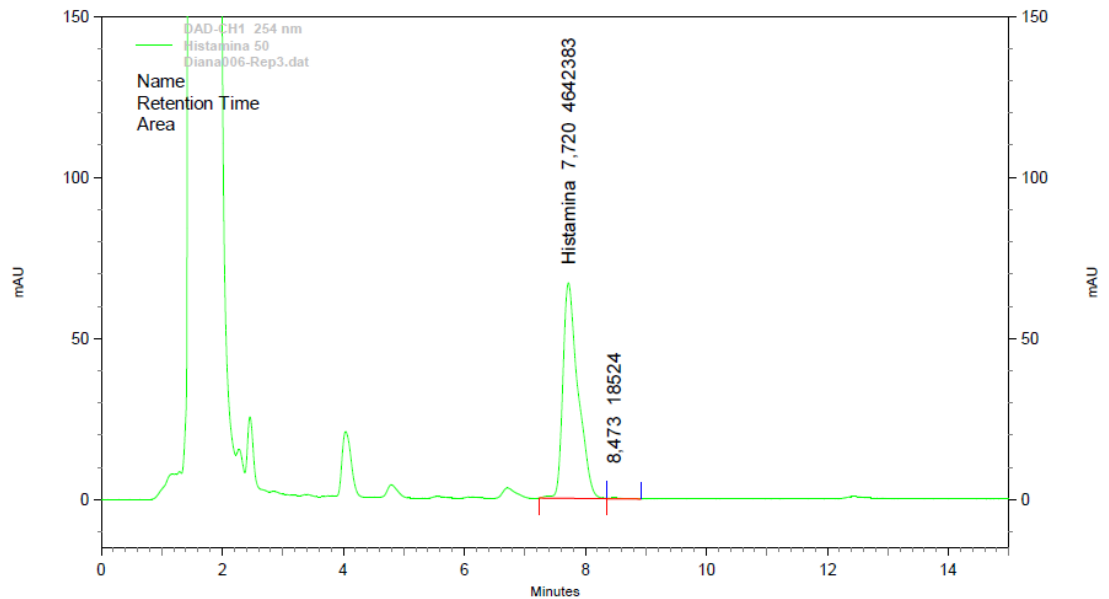
Finalmente el análisis cromatográfico fue realizado bajo condiciones isocráticas de la bomba a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La separación fue llevada a cabo a temperatura de horno de 35 grados centígrados, con un tiempo total de análisis de 20 min. La longitud de onda con mayor captación de señal fue 254 nm. El volumen de inyección fue de 20 µl por muestra. Previo a la inyección de las muestras la columna se equilibró durante 30 minutos con la fase móvil usada en el análisis. Con la modificación realizada se obtiene el siguiente cromatograma Figura 3

⁵³ ASSIS, D.C.S., et al. Validation of an HPLC-UV method for the identification and quantification of bioactive amines in chicken meat. En: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2016. Vol.68 n.3, p.805-813 [Citado el 12 marzo 2019] Disponible en internet: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8668>

⁵⁴ FLORES H, PINAGEL D. Determinación de los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún, de peces (familia Escombridae), provenientes de la industria atunera guatemalteca. En: Revista Científica de la facultad de ciencias químicas y farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala 2010. Vol. 19 n,1 p 11 – 17 [Citado el 14 abril 2019] Disponible en internet: <http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/qyf/article/view/7/3>

⁵⁵ POBLETE C. Cuantificación de histamina por HPLC y CZE en salmón coho, (*Oncorhynchus kisutch*) durante su almacenamiento refrigerado. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2005 [citado: 2019, mayo]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105418>

Figura 3. Cromatograma de la fase experimental con modificaciones de solventes



Fuente: Resultado del Equipo HPLC HITACHI

Los resultados de la modificación de la fase móvil evidenciaron mejoras en la calidad de la lectura cromatográfica, se observó una mejor resolución del peak, además el acortamiento de los tiempos de lectura lo que hace al método más eficiente.

5.3 CREACIÓN DEL PROCEDIMIENTO TÉCNICO

Una vez realizadas las pruebas experimentales en el equipo con las modificaciones de la metodología descritas, se hizo necesario la elaboración de un documento escrito o procedimiento técnico (PT) que detalle los cambios realizados en la metodología.

Para el laboratorio un PT es un documento interno que plasma cada uno de los pasos a seguir para la ejecución de un ensayo; de este modo se obtuvo el primer resultado de ésta investigación obteniendo el documento denominado “PT 41 Cuantificación histamina por método instrumental, HPLC/DAD” (Anexo A)

El PT 41 tiene como objetivo detectar y cuantificar histamina mediante el método de cromatografía líquida de alta resolución, HPLC. Dentro de su alcance y campo de acción este método es aplicable a productos hidrobiológicos frescos o procesados y harina de pescado y contempla las siguientes partes:

- Preservación, almacenamiento y procesamiento de muestras
- Metodología detallada para la cuantificación de histamina
- Preparación y acondicionamiento del equipo y adicionalmente los controles de calidad que se incluyen en cada set de análisis.

5.4 PARTICIPACIÓN EN EL INTERLABORATORIO “QUALITY IN MEAT ANALYSIS SCHEME” (QMAS)

El objetivo principal del Sistema de análisis de calidad en la carne (QMAS) es permitir que los laboratorios que realizan el análisis de productos de carne y pescado puedan monitorear su desempeño y compararlo con el de sus colegas. El QMAS también tiene como objetivo proporcionar información a los participantes sobre cuestiones técnicas y metodologías relacionadas con el examen químico y microbiológico de la carne.⁵⁶

El fin de la participación en el estudio interlaboratorio fue demostrar competencia analítica y aportar información para validar el método analítico propuesto. De acuerdo al reporte entregado el resultado es satisfactorio.

Tabla 2: Informe de resultados de análisis de muestra interlaboratorio.

En el estudio interlaboratorio la muestra recibida se procesó, y cuantifico según lo descrito en el procedimiento técnico Anexo A.

Identificación del material	Código asignado al laboratorio	Valor certificado mg/kg	Valor reportado, experimental mg/kg	Observación
Muestra Interlaborato Scheme: meat and fish (QMAS), Muestra 748	MT5268	99.73 mg/kg	99.15 mg/kg	Z score: -0.03

Características de la muestra interlaboratorio Tipo: filete de pescado

Especie: Merlucciidae

Código de participación asignado para el laboratorio: MT5268

El valor de los resultados fue reportado según el análisis de varias repeticiones realizadas para la misma muestra, llegando a un acuerdo para el reporte:

Valor reportado 99,15 mg/kg

⁵⁶ LGC Ltd. Laboratory of the Government Chemist. Scheme: Meat & Fish (QMAS) Round: 265. Main Report. Number 1, Issued 22 June 2018.

El valor certificado para la muestra se dio a conocer después de un mes aproximadamente de entregados los resultados. La figura 4 corresponde al reporte de resultados.

Figura4. Informe de resultados interlaboratorio ronda 265

Scheme: Meat & Fish (QMAS)

Round: 265

Sample: 748 - Fish based sample#

Analyte: Histamine

Lab ID	Method	Result (mg/kg)	z score
MT4184	Various	61.27	-2.23
MT4599	Various	105.00	0.31
MT4736	Various	79.10	-1.20
MT5097	Various	118.00	1.06
MT5128	Various	197.76	5.68
MT5129	Various	96.42	-0.19
MT5144	Various	77.42	-1.29
MT5148	Various	88.20	-0.67
MT5181	Various	179.82	4.64
MT5211	Various	119.43	1.14
MT5214	Various	103.00	0.19
MT5268	Various	99.15	-0.03
MT5365	Various	121.30	1.25
MT5487	Various	89.90	-0.57
MT5670	Various	99.66	0.00
MT5684	Various	68.50	-1.81
MT5708	Various	86.61	-0.76
MT5860	Various	88.00	-0.68
MT5878	Various	107.00	0.42
MT5886	Various	138.30	2.24
MT5887	Various	99.80	0.00
MT5902	Various	103.66	0.23
MT5988	Various	90.00	-0.56
MT5991	Various	97.00	-0.16
MT5995	Various	92.05	-0.45
MT6071	Various	135.00	2.04
MT6097	Various	70.00	-1.72
MT6117	Various	76.18	-1.37
MT6221	Various	107.40	0.44
MT6297	Various	117.00	1.00
MT6540	Various	187.32	5.08
MT6620	Various	217.18	6.81
MT6702	Various	100.00	0.02
MT6752	Various	111.00	0.65
MT6797	Various	310.19	12.20
MT6921	Various	341.33	14.01
MT6948	Various	98.00	-0.10

Fuente: archivo original Meat & Fish (QMAS)-265-Main Report

En el informe de resultados participaron 37 laboratorios, los cuales reportaron sus resultados individuales y a cada uno se le asignó un valor de z score, En el siguiente histograma (Figura 5) se grafica el valor de Z score en relación al valor medio consensuado como valor verdadero, se marca con rojo el rango donde se encuentra el valor asignado de z score para el laboratorio de Alimentos y Aguas.

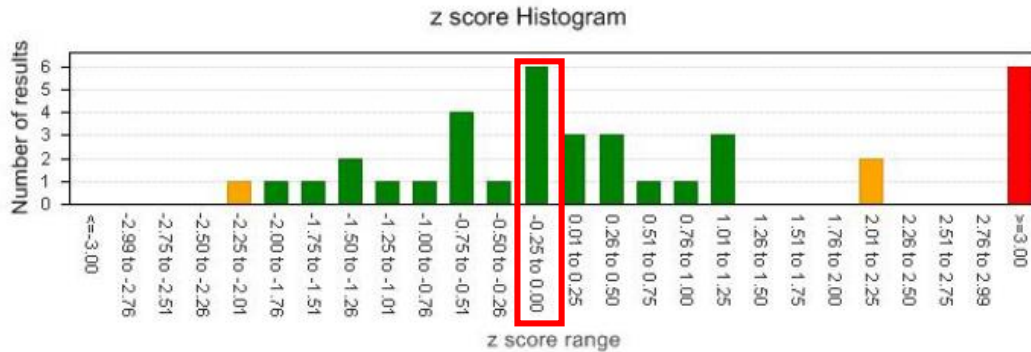
Figura 5. Histograma para los valores de Z score referentes al valor verdadero.

Scheme: Meat & Fish (QMAS)

Round: 265

Sample: 748 - Fish based sample#

Analyte: Histamine



Fuente: Archivo original Meat & Fish (QMAS)-265-Main Report

5.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

El proceso de validación corresponde a la etapa experimental donde se evalúan, optimizan y definen los parámetros relevantes que permitirán dar cumplimiento a los requerimientos técnicos establecidos dentro de un laboratorio, como ya se mencionó, el método normalizado para la cuantificación de histamina sufrió cambios metodológicos en el proceso de implementación, por lo tanto se hizo necesario realizar un proceso de validación de los resultados.

Para el proceso de validación interno del laboratorio se tuvo en cuenta el registro PO 13 Validación de métodos de ensayo (Anexo B), donde se detallan los parámetros que se analizaron para demostrar que el método de ensayo normalizado modificado por el laboratorio cumplió con los requerimientos técnicos para ser aprobado por la entidad fiscalizadora, SERNAPESCA para este caso en concreto.

El proceso de validación arrojó los siguientes resultados:

5.5.1 Selectividad y especificidad o sensibilidad. Es el grado en que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias.

Para determinar este parámetro se realizó la lectura de los estándares en concentraciones de 5 -15 mg/l de histamina, blancos reactivos y blancos matriz y materiales de referencia certificados con el fin de observar los cromatogramas y evaluar que el peak tenga el mismo tiempo de retención (Figuras 6, 7,8).

Figura 6. Cromatograma muestra blanco matriz.

Muestra: blanco matriz 1

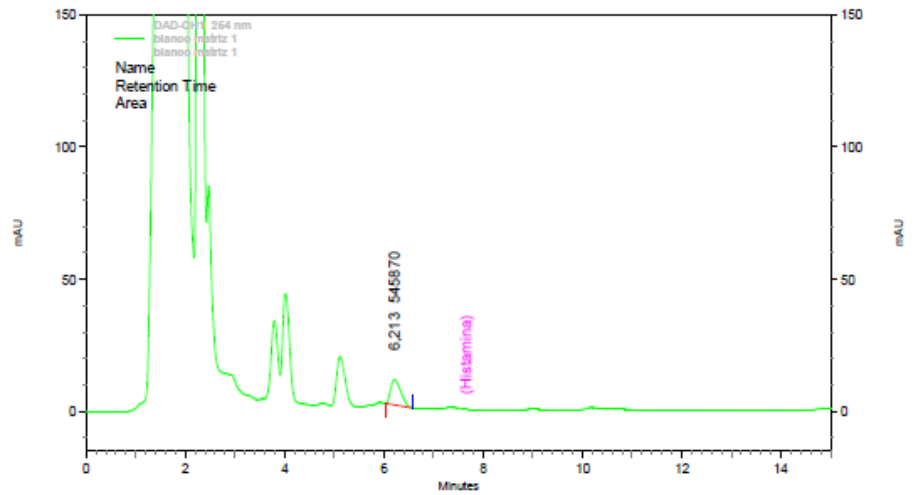


Figura 7. Cromatograma blanco matriz fortificado 5 mg/kg

Muestra: Bco Matriz 1 Fort 5

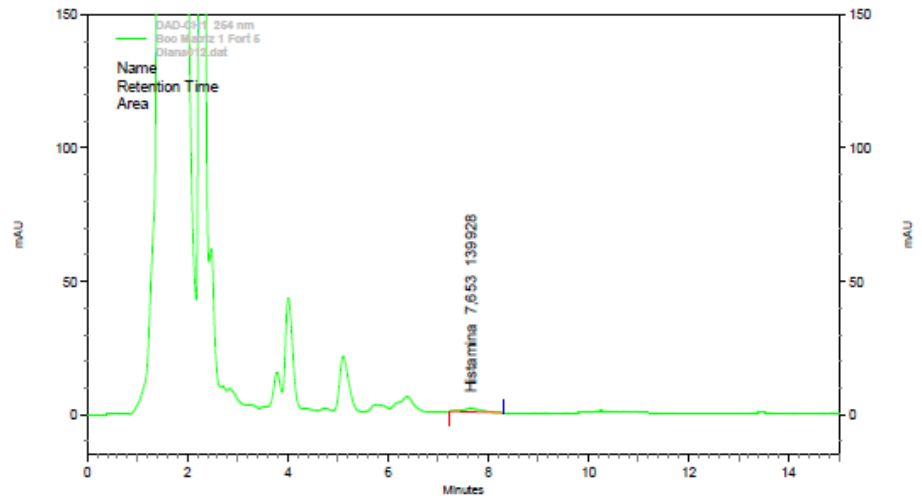
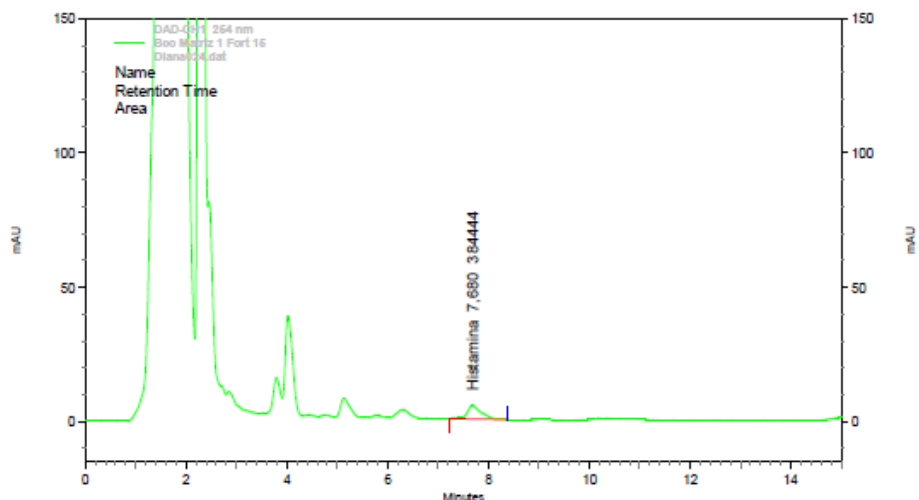


Figura 8. Cromatograma blanco matriz fortificado 15 mg/kg

Muestra: Bco Matriz 1 Fort 15



El ensayo se realizó en 10 repeticiones para cada punto obteniendo los siguientes resultados (Tabla 3). Los resultados de las lecturas se detallan en el anexo C.

Tabla 3. Resultados del tiempo de retención para cada nivel en 10 repeticiones

Mediciones de Blanco y Blancos fortificados	Tiempo de retención por cada repetición				
	Bco F 5 mg/kg	Bco F1 5 mg/kg	Bco F 100 mg/kg	Bco Matriz	Bco Reactivo
1	7,65	7,68	7,65	-	-
2	7,68	7,66	7,69	-	-
3	7,68	7,66	7,66	-	-
4	7,71	7,66	7,66	-	-
5	7,66	7,66	7,67	-	-
6	7,67	7,70	7,66	-	-
7	7,67	7,70	7,65	-	-
8	7,66	7,68	7,66	-	-
9	7,67	7,73	7,66	-	-
10	7,71	7,64	7,68	-	-
Promedio	7,68	7,68	7,66	-	-
DS	0,02	0,03	0,01	-	-

La señal del peak presente a los 7,7 minutos, concuerda en las 10 repeticiones y esta señal corresponde al patrón de histamina adicionado a las muestras. Es específica porque el peak solo está presente en muestras con analito sin presentar interferencias y tampoco se evidencio la formación de hombros. Se concluye que el

método es selectivo y específico, además la sensibilidad del método es adecuada para la determinación de histamina en la matriz utilizada.

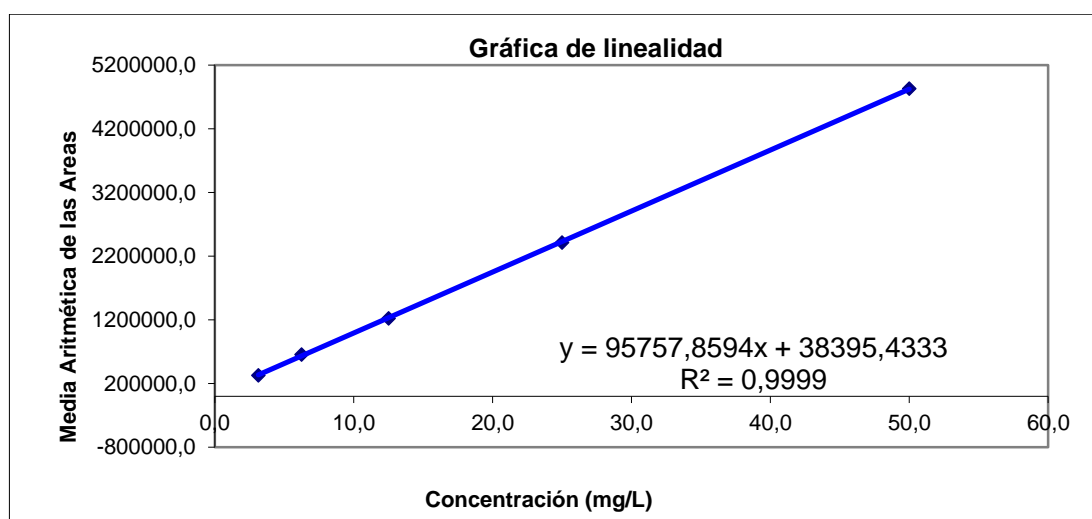
5.5.2 Linealidad. Para la determinación del parámetro de linealidad se usó una curva de calibración preparada en el rango de concentraciones: 3,125mg/l a 50 mg/l, usando un patrón de histamina se preparó una solución de madre de 1000 mg/l en ácido tricloroacético la cual fue diluida hasta conseguir las concentraciones de la curva de calibración (50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,125) mg/l.

Los cinco estándares preparados se inyectaron individualmente de menor a mayor concentración luego de la derivatización con cloruro de dansilo. Con las áreas obtenidas (tabla 4) y los valores teóricos de concentración se procedió a graficarlos y evaluar la linealidad mediante la regresión correspondiente (Figura 9).

Tabla 4. Áreas obtenidas de cada una de las concentraciones

Concentración (mg/L)	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5
50,00	4776179	4967320	4888166	4803182	4734018
25,00	2473762	2437182	2301403	2430578	2441914
12,50	1230339	1222449	1233047	1208312	1239764
6,25	622812	622893	613940	615593	814719
3,125	342219	334610	349638	316973	321587

Figura 9. Curva linealidad para el patrón de histamina.



Intercepto: 38395,43

Pendiente: 95757,85

R²: 0.9999

Para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999, el valor de r obtenido es mayor a esta cifra (0,9999) por lo tanto el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo, esto quiere decir que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta en el instrumento usado para su medición.

5.5.3 Coeficiente de variación y correlación. El coeficiente de variación %CV se obtuvo de la repetición de cada punto de la curva calculado en base a las áreas obtenidas

$$t = 219,036$$

Posterior se verificó que el coeficiente de correlación es estadísticamente igual o mayor a 0,99 obteniendo el valor t (student)

Para confirmar estadísticamente la correlación entre las variables obtenidas (Absorbancia) en función de las asignadas (concentración), se calculó la t- Student (tr) y se comparó con el valor crítico tabulado para n-2 grados de libertad y 99% de confianza, donde el valor de t calculado debe ser mayor al t tabulado.

El valor de t tabulado se obtiene de la tabla “t student” con (n-2) grados de libertad para un 99% de confianza y distribución de 1 cola.

Calculo de t tabulado o t crítico: $n-2 = (5-2=3)$

Valor para 3 grados de libertad para un 99% de confianza y distribución de una cola corresponde a 4.541 (Tabla 5). Ver Tabla T student en anexo B.

Tabla 5. Media de los resultados para las concentraciones de la curva de calibración, desviación estándar y coeficiente de variación

Concentración (mg/L)	Media Aritmética	Desviación estándar	Coeficiente de variación
50,0	4833773,0	93537,88	1,94
25,0	2416967,8	66702,64	2,76
12,5	1226782,2	12045,23	0,98
6,25	657991,4	87708,58	13,33
3,125	333005,4	13706,99	4,12
Pendiente	95758	t experimental	219,036
Intercepto	38395	t crítico (n-2) 99%	4,541
r²	0,9999		
r	1,0000	n	5

Según resultados prueba t student se confirma linealidad. Las curvas de calibración presentan linealidad mayor a 0,99 como coeficiente de correlación, los detalles de los cálculos se detallan en el anexo D.

5.5.4 Definición de límites de detección y cuantificación. Para obtener de los valores se realizó la lectura de 7 blancos matriz integrando en el cromatograma la señal ruido mínima detectada la cual se convirtió en concentración según el área obtenida y posteriori se calculó la desviación estándar (Tabla 6).

Tabla 6. Áreas de lectura de las 7 muestras de blanco matriz y concentraciones en mg/L

N°	Lectura Área (Blanco Matriz)	Concentración Blanco Matriz mg/L
Blanco Matriz 1	14960	2,411
Blanco Matriz 2	39307	3,404
Blanco Matriz 3	57406	4,142
Blanco Matriz 4	56859	4,120
Blanco Matriz 5	75691	4,888
Blanco Matriz 6	55531	4,066
Blanco Matriz 7	61726	4,319
Media Blancos (M)	51640,00	3,9073
Desviación estándar Blancos (S)	19379,2324	0,7904
3DS		2,3712215
10DS		7,9040718

El límite de detección LD es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de detección mínimo (LDM) es igual a la media de los blancos más 3DS

$$3 * DS_{Blancos}$$

$$3 * 0.7904$$

$$2,3712$$

Expresión:

$$LDM = \text{Media de blancos} + 3DS$$

$$LDM = 3,9073 + 2,3712$$

$$LDM = 6,28$$

Límite de cuantificación (LC) es la concentración más baja cuantificable en el método. Se determinó realizando la lectura de un mínimo de 7 muestras blanco que en su cromatograma indicaron un ruido en la señal. Para la media de estos valores,

se obtuvo la desviación estándar. El valor límite de cuantificación mínimo LCM, es igual a la media de los blancos más 10DS

$$10 * DS_{\text{blancos}}$$
$$10 * 0,7904$$
$$7,9040$$

Expresión:

$$LCM = \text{Media de blancos} + 10DS$$
$$LCM = 3,9073 + 7,9040$$
$$LCM = 11,81$$

Los valores de límite de detección y cuantificación consensuados en el laboratorio son:

Límite de detección: 10mg/Kg

Límite de cuantificación: 15 mg/Kg

Los límites obtenidos para este método son válidos, ya que se encuentran por debajo del límite permisible establecido por la Unión Europea y demás entidades nacionales reguladoras. Los detalles de los cálculos se detallan en el anexo E.

5.5.5 Rango o Intervalo de trabajo. El rango de trabajo se estableció con los intervalos de concentración inferior y superior del analito, dado por la curva de trabajo

Rango 3 mg/l – 50 mg/l

Cuantificado obtenemos que:

3 mg/l = 12 mg/kg aproximadamente

50mg/l = 200 mg/kg aproximadamente

Los detalles de los cálculos se detallan en el anexo E.

5.5.6 Veracidad o Sesgo. Para este procedimiento el sesgo se considerará como la diferencia entre el resultado del ensayo esperado y el valor de referencia aceptado del material de referencia (MR). El MR debe ser analizado al menos n=6 replicados independientes en condiciones de repetibilidad (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de las 7 réplicas analizadas correspondientes al material de referencia certificado.

Fecha análisis MR	Repeticiones	Concentración leída	Factor de corrección	Concentración corregida mg/Kg	Diferencia
Resultados	1	15,08	1,092	16,5	0,13
	2	14,58	1,092	15,9	0,68
	3	14,88	1,092	16,3	0,35
	4	14,67	1,092	16,0	0,58
	5	15,07	1,092	16,5	0,14
	6	15,32	1,092	16,7	-0,13
	7	15,44	1,092	16,9	-0,26

Promedio	16,39
DS	0,35

El valor aceptado para el MR es de $\pm 0,9$ y las diferencias en la lectura se encuentran en el rango de +0,68 y -0,26, por tanto, se concluye que en los datos no existe un sesgo estadísticamente significativo. Los resultados se detallan en el anexo F.

5.5.7 Recuperación o exactitud. El porcentaje de recuperación se determina para las muestras a las que se añadió una concentración conocida y se espera que la recuperación se acerque al 100% en la medición, los resultado expresan en el Anexo G.

El porcentaje de recuperación se calculó para cada uno de los niveles fortificados (5, 15, 100 mg/Kg) obteniendo 10 repeticiones y son expresados en la siguiente tabla (Tabla 8) y su respectivo análisis estadístico (Tabla 9)

Tabla 8. Cálculo de recuperación fortificados en niveles de 5, 15, 100 mg/Kg de Histamina

Cantidad Fortificada (mg/Kg)	Promedio Cantidad Recuperada mg/kg	% recuperación promedio	Desviación Estándar	Coefficiente Variación
5,0	5,57	112,7	11,40	0,10
15,0	15,35	102,3	9,14	0,09
100	103,65	104,2	4,10	0,04
Promedio de recuperación		106,4		

Tabla 9. Cálculo de recuperación muestras fortificadas

<i>Muestra (g)</i>	Cantidad Fortificada 5 (mg/Kg) Área	Cantidad Recuperada (mg/Kg)	Cantidad Fortificada 15 (mg/Kg) Área	Cantidad Recuperada (mg/Kg)	Cantidad Fortificada 100(mg/Kg) Área	Cantidad Recuperada (mg/Kg)
2,50	139928	4,91	384444	15,56	2245460	96,62
2,50	163158	5,92	370470	14,95	2489737	107,26
2,50	163408	5,93	354262	14,24	2482125	106,93
2,50	131814	4,55	366347	14,77	2419156	104,19
2,50	161177	5,83	375446	15,16	2361645	101,68
2,50	165744	6,03	414994	16,89	2526663	108,87
2,50	160812	5,82	392513	15,91	2322179	99,96
2,50	154140	5,52	356858	14,36	2353758	101,34
2,50	149942	5,34	443865	18,15	2519514	108,56
2,50	176265	6,49	336015	13,45	2464162	106,15
<i>PROMEDIO</i>		5,57		15,35		103,65

La estimación del porcentaje de recuperación del método corresponde al promedio de los porcentajes de recuperación calculados

% Recuperación=106,4%

Teniendo en cuenta que para la metodología el rango de recuperación aceptada es de 90-130%. La recuperación cumple con el parámetro.

5.5.8 Precisión. Según la guía de validación Sernapesca el modelo para la estimación de la precisión corresponde a un modelo lineal de efectos aleatorios, cuyos parámetros de precisión son obtenidos a partir de un análisis de varianza (ANOVA).

Se llevó a cabo el análisis de replicados de una única muestra correspondiente al extracto obtenido del material Inter-laboratorio bajo las distintas condiciones experimentales que se presentaron en el desarrollo de la técnica considerando el tiempo como el factor de estudio.

Estimando la precisión del método durante dos días no consecutivos obteniendo los siguientes resultados (Tabla 10):

Tabla 10. Resultado de la concentración obtenida en las diferentes lecturas realizadas a una misma muestra.

Repeticiones	Resultado Día 1	Factor	Concentración corregida mg/Kg	Resultado Día 2	Factor	Concentración corregida mg/Kg
1	89,51	1,09	97,75	91,39	1,09	99,80
2	92,31	1,09	100,80	82,08	1,09	89,63
3	88,07	1,09	96,17	93,99	1,09	102,63
4	91,62	1,09	100,05	89,78	1,09	98,04
5	92,47	1,09	100,98	93,52	1,09	102,12
6	89,10	1,09	97,29	81,88	1,09	89,41

Se realizó un análisis de varianza de los datos, ANOVA, aplicando lo descrito en la guía de validación de métodos Sernapesca, cuya descripción considera cálculos de medias de datos, procesamiento de los cuadrados de las medias de datos, cálculos de grados de libertad que permitirán usar adecuadamente la tabla estadística de Fisher, con la que se evaluará repetibilidad .

La forma de obtener cada valor se detalla en el anexo B y el cálculo de los mismos se detalla en el anexo H.

Tenemos que

Suma de cuadrados	210,28
Suma de cuadrados medios	10,84
Suma de cuadrados residuales	199,44

5.5.8.1 Cálculo de los grados de libertad GI. Considerando el número de datos usados para obtener el valor, se tiene los siguientes grados de libertad:

Cálculos de grados de libertad:

-Para datos totales: El total de datos es 12, por lo tanto $GI = 12 - 1 = 11$.

-Para media de datos: Son dos series de repeticiones, por tanto $GI = 2 - 1 = 1$.

-Para residuales: Corresponde a la diferencia entre los grados obtenidos anteriormente $= 11 - 1 = 10$.

Posteriormente se determinó la razón entre suma de cuadrados con sus grados de libertad:

Para datos totales:	19,11
Para media de datos:	10,84
Para residuales:	19,94

5.5.8.2 Cálculo de repetibilidad. Raíz cuadrada del grado de libertad de residuales, es decir raíz cuadrada para los residuales $11-1 = 10$

Raíz cuadrada de 10 = 3,16227766

Para el cálculo del F ratio se tiene en cuenta la razón entre los grados de libertad y de la media de los datos 10,841 y los grados de libertad de los residuales 19,944.

F ratio es 0,54 = $(10,841/19,944)$

Comparando con datos de la tabla Fisher para los grados de libertad 11 y 1 el valor F = 4,945

Se concluye que los datos no poseen diferencia significativa porque F experimental 0,54 es < que F de tabla 4,945.

5.5.8.3 Cálculo de la repetibilidad intermedia. Que corresponde a la raíz cuadrada de la diferencia entre la razón de media de los datos totales y la razón de residuales dividido por el número de repeticiones por serie de duplicados (6)

Razón de media de los datos totales = $(210,28/11)$ es =19,12

Razón de residuales de la media = $(10,84/1)$ 10,84

Repetibilidad intermedia = $\sqrt{(19,12-10,84)/6}$
= 1,2

5.5.8.4 Precisión intermedia. Raíz cuadrada de repetitividad al cuadrado + repetibilidad intermedia al cuadrado.

repetitividad al cuadrado es: 10

Repetibilidad intermedia al cuadrado es: 1,379

Precisión intermedia = $\sqrt{10+1,379}$
=3,37

Para establecer el rango de precisión aceptado entre duplicados se calcula con la siguiente formula

$$r = 2,28 * Sr$$

Donde Sr es la repetibilidad intermedia.

Los datos de precisión calculados se usaron para establecer criterios de aceptación entre duplicados y definir el límite de repetibilidad de la siguiente manera:

Se definió un criterio de aceptación del 95% esto indica que cuando se establece la máxima diferencia tolerable solo el 5% de los duplicados pueden estar fuera del límite. El factor 2,28 se relaciona con el grado de confianza del 95%

Límite de repetibilidad:	r = 2,28 * Sr	
Donde Sr es la repetibilidad intermedia	r=2,28 * 3,37	r=7,691132585

Tabla 11. Resultado de la diferencia entre duplicados

Resultado Día 1 mg/Kg	Resultado Día 2 mg/Kg	Diferencia entre duplicados
97,75	99,80	2,05
100,80	89,63	1,83
96,17	102,63	6,54
100,05	98,04	2,01
100,98	102,12	1,15
97,29	89,41	7,89

Se concluye que el método es preciso porque se determinó que entre los duplicados la diferencia máxima tolerable es de 7,69 como valor absoluto, la diferencia ente duplicados de la tabla 11 indicaron que el 95% de los datos no superan dicho valor. Por lo tanto, no existe diferencia estadística significativa y además se define que el valor máximo de diferencia entre duplicados para el método es de 7,7 absoluto, cuando se trabaje con magnitudes de concentración entre 80-105 mg/kg.

6. CONCLUSIONES

- El objetivo de implementar la técnica para la cuantificación de histamina fue alcanzado exitosamente, logrando que esta técnica asociada al control de la calidad alimentaria sea una herramienta más para el Laboratorio de Alimentos y Aguas que les permita desarrollar el programa de verificación de la calidad de productos locales tipo exportación, aportando al cumplimiento de las políticas de sanidad e inocuidad alimentaria.
- Durante el proceso de implementación en el Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Universidad Austral de Chile se hizo necesario modificar la metodología sugerida en relación con los componentes de la fase móvil. La modificación propuesta acorta el tiempo de retención en el equipo, característica que contribuye a disminuir costos en el análisis. En el procedimiento técnico PT 41, Anexo A, se concreta la adecuación realizada a la metodología, describiendo todas las etapas del análisis, desde el procesamiento de las muestras hasta la cuantificación mediante HPLC. Una vez la metodología fue modificada e implementada se sometió a un proceso de validación exitoso.
- Para el proceso de validación se contó con información importante obtenida de la participación en un estudio interlaboratorio “Quality in Meat Analysis Scheme” (QMAS) demostrando competencia analítica.
- La sensibilidad cromatográfica expresada mediante los límites de detección (10 mg/kg) y cuantificación (15 mg/kg) del método propuesto para el presente estudio, satisfacen las necesidades requeridas por la entidad de control oficial en Chile (SERNAPESCA), para dar cumplimiento a productos tipo exportación. La determinación de histamina en esta matriz no mostró interferencias en la lectura y no hay evidencia de sesgo con respecto al material de referencia certificado.
- La linealidad entre concentración de histamina y la respuesta instrumental en el rango de 3 - 50 mg/L, es satisfactoria obteniendo un $r > 0,99$. De acuerdo con los resultados obtenidos en la validación, se concluye que el método de ensayo Determinación de Histamina en Productos Hidrobiológicos mediante HPLC es específico con un tiempo de retención de 7,7 min, La exactitud del método se demuestra con una recuperación de 106,4% además es preciso al demostrar que no cuenta con diferencias significativas entre duplicados según el límite de repetibilidad medido y evaluado con el test de Fisher.

7. RECOMENDACIONES

- Montar controles de precisión y exactitud en el análisis rutinario posterior a la implementación de la metodología de determinación de histamina, con el fin de obtener resultados confiables y demostrar que el método de análisis se encuentra bajo control estadístico.
- Implementar este tipo de pruebas dentro de los laboratorios de control de calidad en Colombia permitiría dar cumplimiento estándares de calidad en el mercado internacional, permitiendo así el ingreso del país a nuevos mercados, también fortaleciendo los ya existentes contribuyendo de este modo al desarrollo de la economía nacional.
- A nivel académico, realizar estudios mediante la técnica de determinación de histamina en los laboratorios Universidad de Nariño, según normas internacionales, teniendo como referencia la modificación en los componentes de la fase móvil conforme se demostró en este estudio, con el objetivo de realizar futuros estudios que contribuyan al control de la calidad de productos hidrobiológicos de la región o nacionales destinados a consumo humano.

BIBLIOGRAFÍA

Asociación con la Unidad de Apoyo para la Pesca Internacional y la Investigación Acuática, Evaluación no sensorial de la calidad del pescado SIFAR. USA: Torry Research Station. Documento técnico de pesca, p.92

ASSIS, D.C.S., et al. Validation of an HPLC-UV method for the identification and quantification of bioactive amines in chicken meat. En: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2016. Vol.68 n.3, p.805-813 [Citado el 12 marzo 2019] Disponible en internet: <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8668>

BIJI, KB., et al. Aminas biogénicas en mariscos: una revisión. En: Revista de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2016. 53 (5), 2210-2218. [citado el 8 noviembre 2018] Disponible en internet: <http://doi.org/10.1007/s13197-016-2224-x>

CHILE. Ministerio de Salud. Aprueba reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. [en línea] [citado 2018-11-18] Disponible en internet: <http://www.leychile.cl/N?i=237770&f=>

----- . Reglamento sanitario de los alimentos. Decreto N° 977. [Versión 25-05-2017]. S.I.: Diario Oficial, 1996.

----- . Instituto Nacional de Normalización. NCh2446. Guía para la validación de métodos de ensayo - Principios y conceptos generales. 1999

CHILE. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura - SERNAPESCA. Manual de inocuidad y certificación. Res. Ex. N° 5125 - 29.06.2016 [en línea] [citado el 14 Marzo 2018] Disponible en internet: <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=comcontent&view=article&id=2123&Itemid=1179>

COLOMBIA. Ministerio de la Protección Social. Resolución número 776. (marzo 6) Bogotá: Diario oficial, 2008.

COLOMBO, Fabio; CATTANEO, Patrizia; CONFALONIER, Enrica and BERNARDI. Cristian Histamine food poisonings: A systematic review and meta-analysis. En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2018, Vol. 58 (7): 1131–1151 [citado el 12 octubre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1242476>

CORTAZARES FIELD, J. y CALDERÓN CAMPOS, R. Escombroidosis, Intoxicación por Histamina. Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora, 2008; 25(2) 91-94. [citado el 7 abril 2018] Disponible en internet: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bolclin/hosinfson/bis-2008/bis082i.pdf>

CUEVAS MANTECON, Sonia. Optimización de las condiciones de derivatización en la determinación de histamina mediante HPLC con detección fluorimétrica. España: Universidad de Burgos, 2016.

DUFFAU, B. et al, Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Chile: Instituto Salud Publica Chile, 2010. p.21-53

EMBORG, J; AHRENS, P. and DALGAARD, P. *Morganella psychrotolerans* - Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning. Danish Institute for Fisheries Research. Denmark. 2007, 1(2) p.29-42. ISBN 978-87-7877-228-2

ETIENNE Monique. Methodology for histamine and biogenic amines analysis. En: Seafoodplus traceability. 2006. project 6.3 [citado el 3 Marzo 2019] Disponible en internet <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6484/>

EU/EC. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. En: Official Journal of the European Union, 2005. (1) 338: 1-26.

FAO – WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report. USA: s.n., 2013.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura, Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma, 2018. p 224.

FAO ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Manual de control de los alimentos importados basado en el riesgo ROMA, 2017. [en línea] ISBN 978-92-5-309070-9 [citado 2019-02-24] Disponible en internet: <http://www.fao.org/3/a-i5381s.pdf>

FENG, C; TEUBER, S. and GERSHWIN, M. Envenenamiento por pescado con histamina (escombroide): una revisión exhaustiva. En: Clinical Reviews in Allergy and Immunology. 2016 Vol.50; p.64-66. [citado el 16 septiembre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8467-x>

FLORES H, PINAGEL D. Determinación de los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún, de peces (familia Escombridae), provenientes de la industria atunera guatemalteca. En: Revista Científica de la facultad de ciencias químicas y farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala 2010. Vol. 19 n,1 p 11 – 17 [Citado el 14 abril 2019] Disponible en internet: <http://www.revistasguatemala.usac.edu.gt/index.php/qyf/article/view/7/3>

GUERGUÉ-DÍAZ DE CERIO, O; BARRUTIA-BORQUE, A. and GARDEAZABAL-GARCÍA, J. Escumbroidosis: abordaje práctico. En: Actas Dermo-Sifiliográficas, 2016. 107(7) p. 567-571.[citado el 14 enero 2019] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.02.010>

GUILLIER L, A; THÉBAULT, F. GAUCHARD, M. POMMEPUY, A. GUIGNARD y P. MALLE. Un plan de muestreo basado en el riesgo para el monitoreo de la histamina en los productos pesqueros. Revista de protección de alimentos 2011, vol. 74, No. 2, p. 302-310. [citado el 16 septiembre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-234>

GUTIÉRREZ, A. et al. Intoxicación por escombrotóxina. Presentación de siete casos en dos brotes familiares Scombroid fish poisoning Nota Clínica. En: Gaceta Médica de Bilbao. 2001. 98: 43-45 [citado el 5 noviembre 2018] Disponible en internet [https://doi.org/10.1016/S0304-4858\(01\)74354-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4858(01)74354-5)

HARMELIN, et al. Three cases of scombroid poisoning. En: Annales de Dermatologie et de Venereologie, 2018. 145(1), p. 29-32. [citado el 19 octubre 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.07.007>

HUSS, H.H. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad: Laboratorio Tecnológico Ministerio de Pesca. Dinamarca: FAO Documento Técnico de Pesca, 1998.

INN, Instituto Nacional de Normalización, Chile. Norma Chilena 2444. Of 2010. Términos y definiciones usados en relación con materiales de referencia o la que la reemplaza.

ISO/IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.

Laboratorio de Alimentos y Aguas. UACH. Cuantificación histamina por método instrumental, HPLC/DAD. Procedimiento Técnico N° 4. Chile. 2018, p,1-9.

LEHANE, L. y OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. En: International Journal of Food Microbiology 58 2000, p. 1-3. [citado el 19 febrero 2018] Disponible en internet: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00296-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00296-8)

LGC Ltd. Laboratory of the Government Chemist. Scheme: Meat & Fish (QMAS) Round: 265. Main Report. Number 1, Issued 22 June 2018.

MAINTZ, Laura y NOVAK, Natalija. Histamina e intolerancia histamínica. The American Journal of Clinical Nutrition 2007. (1)1185-96 [Citado el 17 mayo 2019] Disponible en internet: http://www.deficitdao.org/docs/Histamina_e_intolerancia_histaminica.pdf

MORENO SANZ, Araceli. Biosensores electroquímicos para la detección de aminas biógenas. Trabajo de grado. Madrid – España: Facultad de Farmacia Universidad Complutense, 2017. p. 3.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. [En línea] [Citado 2017-10-24] Disponible en internet: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/nutrition/es/

------. Enfermedades Transmitidas por los Alimentos. Nota descriptiva N°399. Bogotá: s.n., 2015.

POBLETE C. Cuantificación de histamina por HPLC y CZE en salmón coho, (*Oncorhynchus kisutch*) durante su almacenamiento refrigerado. Memoria para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Santiago, Chile: Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2005 [citado: 2019, mayo]. Disponible en: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105418>

QUATTROCCHI, O. et al. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Edt. Artes Gráficas Farro. Buenos Aires. Argentina. 1992. p. 407.

ROIG-SAQUES, AX; MOLINA, AP. y HERNANDEZ-HERRERO, M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. En: European Food Research and Technology, 215, 2002, 1(2) 96-100. DOI 10.1007/s00217-002-0521-2

SÁNCHEZ-G, et al. Scombroid fish poisoning: A potentially life-threatening allergic-like reaction En: Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 100, 1997. Issue 3, p. 433 - 434. [citado el 14 mayo 2018] Disponible en internet: [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70263-X](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70263-X)

SANTOS, M. y SILLA, H, Biogenic amines: their importance in foods. En: International Journal of Food Microbiology. 1996. Vol, 29, Issues 2–3, 213-231. [Citado el 7 mayo 2018] Disponible en internet: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)

TAYLOR, Steve y EITENMILLER, Ronald. Intoxicación por alimentos con histamina: toxicología y aspectos clínicos. En: Critical Reviews in Toxicology. 1986. 1(17)91-128. [Citado el 12 agosto 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.3109/10408448609023767>

TORTORELLA, Vincenzo; MASCIARI, Peppino. y PEZZI, Mario. Histamine Poisoning from Ingestion of Fish or Scombroid Syndrome, En: Case Reports in Emergency Medicine, 2014. Article ID 482531. [Citado el 20 agosto 2018] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1155/2014/482531>

VALLS PUIG, J. Validación de metodologías de cromatografía líquida de alta resolución en alimentos. 2004.[citado. el 11 septiembre 2018] doi.10.13140/RG.2.2.26411.85289.

ZHAI, H. et al. Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern china. En: Food Control 25, 1(2): 303 - 308. [en línea] Disponible en internet: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont>.

ANEXOS