

DETERMINACIÓN POR HPLC DE HISTAMINA, TIRAMINA Y PUTRESCINA EN
LAS ESPECIES TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y TILAPIA
(*Oreochromis niloticus*) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO.

ANGELA KATHERINE ARGOTTY SALAZAR

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2016

DETERMINACIÓN POR HPLC DE HISTAMINA, TIRAMINA Y PUTRESCINA EN
LAS ESPECIES TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y TILAPIA
(*Oreochromis niloticus*) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO

ANGELA KATHERINE ARGOTTY SALAZAR

Trabajo de grado presentado al Comité Curricular y de Investigaciones del
Departamento de Química como requisito parcial para optar al título de Químico.

Director:
Juan José Lozada Castro.
Doctor en Química Analítica

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2016

“Las ideas y conclusiones aportados en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

Juan José Lozada Castro

Director

William Fernando Hidalgo
Jurado

David Arturo Perdomo
Jurado

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque solo con su consentimiento es posible la realización de toda obra.

A mis padres Omar Argotty y Gloria Salazar, mi hermana Ximena Argotty y mi novio Andrés Felizzola por su apoyo y amor incondicional.

Al Doctor: Juan José Lozada Castro, por la dirección de mi trabajo de grado.

Al Químico: David Arturo Perdomo, por la asesoría, espacio y el apoyo incondicional brindado durante el tiempo de ejecución de la investigación.

A la Química Farmacéutica Lucy Bravo por la asesoría y orientación en el desarrollo de esta investigación en el laboratorio de Salud Pública.

A la Doctora Elisabeth Trujillo, Directora del Instituto Departamental de Salud de Nariño, por permitirme formar parte de su Institución.

A todos mis compañeros del Laboratorio del Instituto Departamental de Salud de Nariño, por su amistad y colaboración durante la ejecución del proyecto.

A la Universidad de Nariño por el aporte de los recursos en equipos y personal requeridos para el desarrollo de la investigación y por permitirnos culminar con nuestros estudios de pregrado.

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales de La Universidad de Nariño (VIPRI) por la financiación de este trabajo.

A los profesores del Departamento de Química por haber aportado en la formación académica.

A los grupos de Investigación Estudios de Sistemas Contaminantes y Salud Pública de la Universidad de Nariño, por el apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación.

Al Químico Giovanni Eraso, por su asesoría en la parte instrumental de la investigación

A Jessica, Natalia, Angélica, Maritza, Giovanni, Erwin, Franklin, por los lazos de amistad y hermandad a lo largo de este camino.

DEDICATORIA

*Somos seres en formación y solo con esfuerzo lograremos
cumplir nuestros sueños y alcanzar nuestras metas.*

Dedico este trabajo de grado:

A Dios, quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A Mis padres Omar Argotty y Gloria Salazar, mi hermana Ximena Argotty, y mi novio Andrés Felizzola por su apoyo, consejos, comprensión, amor y ayuda en los momentos difíciles.

A Mi familia, la cual me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y mi coraje para conseguir mis objetivos.

Ángela Argotty

RESUMEN

Se desarrolló y validó una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa (RP-HPLC) para la determinación de las Aminas Biogénicas (ABs) histamina, tiramina y putrescina en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*). Los procesos de extracción, derivatización y análisis cromatográfico de ABs fueron optimizados aplicando diseños experimentales de superficie de respuesta. De esta manera, la extracción de las ABs se realizó sobre piel y músculo de pescado con ácido tricloroacético al 6% y el extracto obtenido fue sometido a reacción con 15 μL del derivatizante cloruro de benzoilo, a 20°C durante 40 min. El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna analítica C18 (Agilent, 250mm x 4,6mm, 5 μm); con un sistema de elución en gradiente compuesto por metanol: Agua, a un flujo de 0,8 mL min⁻¹; una temperatura de columna de 30°C y una longitud de onda de 230 nm. La validación del método analítico se realizó bajo los criterios de aceptación de la decisión de la comisión Europea del 12 de agosto de 2002. La metodología desarrollada y validada demostró ser lineal, precisa, específica y exacta en los rangos de 1-50; 1-175 y 1-125 mg.L⁻¹ con porcentajes de recuperación entre 94,08 a 99,69 %; 94,72 a 98,70% y 85,50 a 87,94 % para putrescina, histamina y tiramina respectivamente y coeficientes de variación menores al 5%. Ocho muestras de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y ocho de tilapia (*Oreochromis niloticus*) fueron analizadas, determinando putrescina con un valor de 0,402 \pm 0,071 mg.g⁻¹ en una muestra de trucha. Las aminas biogénicas histamina y tiramina, no se detectaron en las muestras analizadas.

ABSTRACT

Analytical method was developed and validated for reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP- HPLC) to the determination of Biogenic Amines (BAs) putrescine, histamine and tyramine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). The optimization of procedures of extraction, derivatization and chromatographic analysis of BAs were performed through application of response surface experimental design. The extraction of BAs was performed on skin and muscle of fish with 6% trichloroacetic acid (TCA 6%) and the extract obtained was reacted with 15 μL of derivatizing benzoyl chloride at 20°C for 40 min. The chromatographic analysis were performed using a C18 analytical column (Agilent 250mm x 4,6mm x 5 μm), gradient elution system consisting of methanol: water with a flow rate of 0,8 mL min^{-1} , a column temperature of 30°C and a wavelength of 230 nm. The validation of analytical method was developed using the acceptance criteria of the European Commission on August 12, 2002. The methodology developed and validated proved to be linear, precise, specific and accurate into ranges of 1-50; 1-175; 1-125 mg.L^{-1} , with recovery percentages in a range of 94,08 to 99,69%; 94,72 to 98,70%; and 85,50 to 87,94% for putrescine, histamine and tyramine respectively and variation coefficients less than 5%. Eight samples of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and eight samples of tilapia (*Oreochromis niloticus*) were analyzed, determining putrescine with a value of $0,402 \pm 0,071 \text{ mg.g}^{-1}$ in one sample of trout. The biogenic amines as histamine and tyramine were not detected in the samples analyzed.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	24
1. OBJETIVOS	26
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
2. ESTADO DEL ARTE	27
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	30
3.1 AMINAS BIOGÉNICAS (ABs).....	30
3.1.1 Clasificación de las aminas biogénicas	30
3.1.2 Origen y formación de las aminas biogénicas	31
3.1.3 Importancia de las aminas biogénicas.....	32
3.1.4 Factores que influyen en la formación de aminas biogénicas	36
3.1.5 Aminas biogénicas en pescado	39
3.1.6 Legislación del contenido de aminas biogénicas en pescado	39
3.2 GENERALIDADES DE LAS ESPECIES TRUCHA (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) y TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO	47
3.2.1 Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	47
3.2.2 Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	48
3.3 PROBIÓTICOS USADOS EN LA PRODUCCIÓN ACUÍCOLA.....	49
3.4 DEFICIENCIAS TÉCNICAS SANITARIAS EXISTENTES EN LOS EXPENDIOS DE PRODUCTOS ACUÍCOLAS EN LA CIUDAD DE PASTO	50
4. METODOLOGIA.....	52
4.1 CONSIDERACIONES GENERALES.....	52
4.2 LOCALIZACIÓN	52
4.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	52
4.3.1 Equipos	52
4.3.2 Material de laboratorio.....	53
4.3.3 Reactivos y Solventes	53
4.3.4 Estándares	53
4.4 MONTAJE DEL MÉTODO.....	54

4.4.1 Preparación de las soluciones estándar de aminas biogénicas	54
4.4.2 Preparación de las soluciones estándar de trabajo de aminas biogénicas	54
4.4.3 Evaluación del proceso de derivatización.....	54
4.4.4 Identificación y verificación de los picos cromatográficos de cada derivado.....	55
4.4.5 Determinación de condiciones cromatográficas de análisis	55
4.4.6 Optimización del sistema cromatográfico para el análisis de ABs.....	57
4.4.7 Condiciones cromatográficas finales	57
4.4.8 Optimización del proceso de derivatización de ABs	57
4.4.9 Condiciones Finales del proceso de derivatización de ABs.	59
4.4.10 Evaluación del proceso de extracción de ABs.....	59
4.4.11 Optimización del proceso de extracción de ABs	60
4.4.12 Condiciones finales del proceso de extracción de ABs	60
4.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	60
4.5.1 Rango Lineal y Linealidad	61
4.5.2 Evaluación del efecto matriz.....	61
4.5.3 Linealidad	61
4.5.4 Selectividad	62
4.5.5 Sensibilidad	62
4.5.6 Precisión.....	63
4.5.7 Intervalos de Confianza para tiempos de retención	63
4.5.8 Exactitud.....	63
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64
4.7 DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGENICAS (PUTRESCINA, HISTAMINA Y TIRAMINA) EN TRUCHA ARCOIRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO	64
4.7.1 Determinación de los puntos de muestreo	64
4.7.2 Tamaño muestral	64
4.7.3 Procedimiento de muestreo	65
4.7.4 Pre- tratamiento de la muestra	66
4.7.5 Análisis de muestras	66
4.7.6 Identificación y cuantificación	68

5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
5.1	EVALUACIÓN DEL PROCESO DE DERIVATIZACIÓN	69
5.2	IDENTIFICACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS.....	71
5.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISIS	72
5.3.1	Selección del flujo óptimo de la fase móvil.....	72
5.3.2	Ajustes de la composición de la fase móvil	73
5.4	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	78
5.5	OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DERIVATIZACIÓN	84
5.6	EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.	92
5.7	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN	93
5.8	VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO	95
5.8.1	Evaluación del rango dinámico lineal (RDL).....	96
5.8.2	Evaluación del efecto Matriz	98
5.8.3	Linealidad.....	100
5.8.4	Selectividad.....	104
5.8.5	Sensibilidad.....	105
5.8.6	Precisión	106
5.8.7	Intervalos de confianza para tiempos de retención	107
5.8.8	Exactitud	108
5.9	DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGENICAS (PUTRESCINA, HISTAMINA Y TIRAMINA) EN TRUCHA ARCOIRIS (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Y TILAPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO	108
	CONCLUSIONES	111
	PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	113
	RECOMENDACIONES.....	114
	BIBLIOGRAFÍA.....	115
	ANEXOS.....	124

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Efectos fisiológicos y potenciales toxicológicos de aminas biogénicas....	33
Tabla 2. Algunos ejemplos de Índices de calidad basados en la presencia de aminas biogénicas en carne y productos cárnicos.....	35
Tabla 3. Estudios de Formación de aminas biogénicas durante el almacenamiento de pescado a diferentes temperaturas.....	39
Tabla 4. Requisitos fisicoquímicos para productos de la pesca.....	40
Tabla 5. Reactivos más empleados en la derivatización de aminas biogénicas	43
Tabla 6. Procedimientos para el análisis de aminas biogénicas en muestras de alimentos.	45
Tabla 7. Probióticos comercializados en el mercado para uso en acuicultura	50
Tabla 8. Gradiente 1 programado para el análisis de ABs.....	56
Tabla 9. Gradiente 2 programado para el análisis de ABs.....	56
Tabla 10. Gradiente 3 programado para el análisis de ABs.....	56
Tabla 11. Factores a evaluar en la optimización del sistema cromatográfico para el análisis de ABs.	57
Tabla 12. Factores y niveles del diseño factorial de screening 2^3 para la optimización del proceso de derivatización de ABs	58
Tabla 13. Factores y niveles del diseño DCC 2^2 para la optimización del proceso de derivatización de ABs	59
Tabla 14. Factores y niveles del diseño factorial 3^2 para la optimización del proceso de extracción de ABs	60
Tabla 15. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs (a 50 y 100 mg.L ⁻¹), mediante HPLC- DAD.....	71
Tabla 16. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de putrescina, histamina y tiramina mediante elución isocrática.	72

Tabla 17. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs en las condiciones de análisis según el gradiente 1.....	76
Tabla 18. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs en las condiciones de análisis según el gradiente 2.....	76
Tabla 19. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs en las condiciones de análisis según el gradiente 3.....	76
Tabla 20. Diseño experimental establecido para la optimización cromatográfica. .	79
Tabla 21. Variables respuestas, para la optimización del proceso de optimización de las condiciones cromatográficas mediante HPLC-VWD.	79
Tabla 22. Valores óptimos de las condiciones cromatográficas de análisis.....	83
Tabla 23. Diseño experimental multifactorial de optimización del proceso de derivatización con sus respectivas variables respuestas, mediante HPLC-VWD. .	87
Tabla 24. Diseño experimental para la optimización del proceso de derivatización con sus respectivas Variables respuestas, mediante HPLC-VWD.	90
Tabla 25. Valores óptimos para las condiciones del proceso de derivatización	91
Tabla 26. Resultados de la evaluación del factor tiempo de agitación en el proceso de derivatización de ABs (50mg.L ⁻¹) mediante HPLC-VWD.	92
Tabla 27. Porcentajes de recuperación obtenidos con cada uno de los métodos de extracción evaluados para la determinación de ABs en 5 g de muestra.....	93
Tabla 28. Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción, mediante HPLC-VWD.	94
Tabla 29. Valores óptimos para las condiciones del proceso de extracción de ABs.	95
Tabla 30. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de ABs	96
Tabla 31. Análisis de varianza para la evaluación del efecto matriz en el análisis de putrescina, histamina y tiramina.....	100
Tabla 32. Estimadores de regresión para putrescina, histamina y tiramina.....	102
Tabla 33. Análisis de varianza para probar la significancia estadística del modelo ajustado para cada AB.....	104
Tabla 34. Parámetros de eficiencia para la separación Cromatográfica.....	104

Tabla 35. LD y LC del método para putrescina, histamina y tiramina	105
Tabla 36. Comprobación experimental del LD y LC del método para cada AB. ..	105
Tabla 37. Intervalos de confianza al 95,0% para tiempos de retención de las ABs (n =162)	107
Tabla 38. Exactitud evaluada a partir de los porcentajes de recuperación de cada AB en matriz.	108
Tabla 39. Contenido de putrescina, histamina y tiramina en las especies trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) y tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) comercializadas en la ciudad de Pasto.	109

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura molecular de las principales Aminas Biogénicas	31
Figura 2. Esquemas de las reacciones de formación de Histamina, tiramina y putrescina a partir de sus aminoácidos precursores.....	32
Figura 3. Factores que influyen en la formación de Aminas Biogénicas en productos cárnicos.....	36
Figura 4. Reacción entre cloruro de benzoilo y putrescina bajo condiciones alcalinas (condensación Schotten-Baumann).....	44
Figura 5. Trucha Arco Iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	47
Figura 6. Tilapia Roja (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	48
Figura 7. Cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1200.....	53
Figura 8. Métodos evaluados para el proceso de derivatización de ABs.....	54
Figura 9. Muestras de trucha arcoiris y tilapia obtenidas de los 8 establecimientos de pesca.	65
Figura 10. Tratamiento previo de las muestras de pescado para el análisis de aminas biogénicas por HPLC-UV.	66
Figura 11. Imágenes del proceso de extracción de putrescina, histamina y tiramina en las muestras de pescado.	67
Figura 12. Imágenes del proceso de derivatización y análisis de putrescina, histamina y tiramina en las muestras de pescado.	67
Figura 13. Diagrama de flujo de los procesos usados para la preparación y tratamiento de las muestras de pescado en el análisis de putrescina, histamina y tiramina.	68
Figura 14. Cromatograma obtenido para para putrescina, histamina y tiramina (100 mg.L ⁻¹) derivatizadas con el método 1, y analizadas mediante HPLC-PDA (λ=254nm).....	69

Figura 15. Cromatograma obtenido para para putrescina, histamina y tiramina (100 mg.L ⁻¹) derivatizadas con el método 2, y analizadas mediante HPLC-PDA (λ=254nm).....	69
Figura 16. Reacción de derivatización entre putrescina y cloruro de benzoilo.	70
Figura 17. Reacción de derivatización entre histamina y cloruro de benzoilo.....	70
Figura 18. Reacción de derivatización entre tiramina y cloruro de benzoilo	70
Figura 19. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis isocrático para putrescina, histamina y tiramina (50 y 100 mg.L ⁻¹), mediante HPLC-VWD....	71
Figura 20. Curva de Van Deemter para putrescina a 50 mg.L ⁻¹ , mediante HPLC-VWD.	73
Figura 21. Representación gráfica de los gradientes empleados en el análisis de putrescina, histamina y tiramina.....	74
Figura 22. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente 1, mediante HPLC-VWD, (λ=254nm).	75
Figura 23. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente 2, mediante HPLC-VWD, (λ=254nm).	75
Figura 24. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente 3, mediante HPLC-VWD, (λ=254nm).	75
Figura 25. Gráficos de Pareto representando la influencia de los factores estudiados sobre las respuestas en el análisis cromatográfico de Putrescina.	80
Figura 26. Gráficos de Pareto representando la influencia de los factores estudiados sobre las respuestas en el análisis cromatográfico de Histamina	80
Figura 27. Gráficos de Pareto representando la influencia de los factores estudiados sobre las respuestas en el análisis cromatográfico de Tiramina.	81
Figura 28. Gráfico tridimensional de superficie de respuesta para el DCC 2 ³ aplicado para la optimización del proceso de análisis cromatográfico.....	83
Figura 29. Cromatograma obtenido para el análisis de ABs en condiciones óptimas de operación instrumental, mediante HPLC-VWD.....	83
Figura 30. Cromatograma para el proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina con presencia de señales interferentes.....	84

Figura 31. Cromatograma para Ácido benzoico a una concentración de 10 mg.L ⁻¹	84
Figura 32. Cromatograma para Cloruro de Benzoilo a una concentración de 10 mg.L ⁻¹	85
Figura 33. Esquema general del mecanismo de la reacción de Schotten-Baumann.	86
Figura 34. Cromatograma obtenido para el proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina con 0,5 mL de NaOH.	86
Figura 35. Cromatograma obtenido para el proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina con 2 mL de NaOH.	87
Figura 36. Gráficos de Pareto estandarizadas para el diseño factorial 2 ³ para la optimización del proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina. ..	88
Figura 37. Esquema de la reacción de apertura del anillo imidazol al reaccionar histamina con cloruro de benzoilo.....	89
Figura 38. Gráfico tridimensional de superficie de respuesta para el DCC 2 ² aplicado para la optimización del proceso de derivatización	90
Figura 39. Cromatograma obtenido en condiciones óptima de derivatización para la mezcla de ABs (50 mg.L ⁻¹), mediante HPLC-VWD.	91
Figura 40. Cromatograma obtenido en condiciones óptimas de derivatización para la mezcla de ABs (50 mg.L ⁻¹), mediante HPLC-VWD.	92
Figura 41. Gráfico tridimensional de superficie de respuesta para el diseño 3 ² aplicado en la optimización del método de extracción.	94
Figura 42. Curva de regresión para putrescina en el rango 0,5-195 mg.L ⁻¹	97
Figura 43. Curva de regresión para histamina en el rango 0,5-195 mg.L ⁻¹	97
Figura 44. Curva de regresión para tiramina en el rango 0,5-195 mg.L ⁻¹	97
Figura 45. Evaluación del efecto matriz mediante comparación de rectas de calibrado (Área vs concentración) para putrescina, histamina y tiramina	99
Figura 46. Curvas de Calibración para Putrescina, Histamina y Tiramina en el rango lineal.	101
Figura 47. Cromatograma con concentraciones correspondientes al LD para putrescina, histamina y tiramina.....	106

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo A. Fórmulas matemáticas para el cálculo de parámetros cromatográficos	124
Anexo B. Estadístico W de Shapiro-Wilk para prueba de Normalidad aplicada a la optimización de condiciones cromatográficas en el análisis de ABs.....	125
Anexo C. Estadístico W de Shapiro-Wilk para prueba de Normalidad aplicada a la optimización de condiciones de derivatización de ABs.....	125
Anexo D. Estadístico W de Shapiro-Wilk para prueba de Normalidad aplicada a la optimización de condiciones de extracción de ABs	126
Anexo E. Métodos de extracción evaluados para la determinación de ABs.	126
Anexo F. Cromatogramas obtenidos para los análisis individuales de Putrescina, Histamina y tiramina a una concentración de 100 mg.L ⁻¹	127
Anexo G. Espectro de absorción para putrescina, histamina y tiramina a una concentración de 5 mg.L ⁻¹	128
Anexo H. Curvas de calibración del método (Concentración vs Área) a niveles bajos de concentración para Putrescina, Histamina y Tiramina.	129
Anexo I. Curvas de calibración del método (Concentración vs Desviación estándar) a niveles bajos de concentración para Putrescina, Histamina y Tiramina.	130
Anexo J. Precisión de las ABs en términos de repetibilidad.	131
Anexo K. Precisión de las AB en términos de Precisión Intermedia.	134
Anexo L. Cromatograma para la muestra de pescado de la especie trucha arcoiris con niveles de putrescina 0,402 ± 0,071 mg.g ⁻¹ , mediante HPLC-VWD.....	135

ABREVIATURAS

A	Área de los picos cromatográficos
	Factor de selectividad
ABs	Aminas Biogénicas
AAL	Aminoácidos libres
al.	Colaboradores
ANOVA	Análisis de varianza
As	Factor de asimetría
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de químicos para la excelencia analítica)
°C	Grados Centígrados
CV	Coefficiente de Variación
C18	Octadecil
CFR	Cromatografía en fase reversa
CIC	Cromatografía de Intercambio Catiónico
DCC	Diseño central compuesto
Et ₂ O	Éter dietílico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GC	Cromatografía de Gases
G	Gravedad
H	Altura equivalente de platos teóricos
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alternativa
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta
HPLC-VWD	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detector ultravioleta de longitud de onda variable
HPLC-PDA	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detector de arreglo de diodos
IDSN	Instituto Departamental de Salud de Nariño
INS	Instituto Nacional de Salud
k'	Factor de capacidad
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
MeOH	Metanol
NaOH	Hidróxido sódico
ND	No detectado
pH	potencial hidrógeno
Ppm	Partes por millón

%R	Porcentaje de recuperación
Rs	Resolución
R	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de determinación
SD	Desviación Estandar
t_R	Tiempo de retención
W	Ancho de pico cromatográfico

GLOSARIO

Analito: Sustancia que debe ser detectada, identificada y/o cuantificada y los derivados de la misma que se formen durante el análisis.

Analito estándar: Analito de contenido y pureza conocidos y certificados que se utiliza como referencia en el ensayo.

Anova: El análisis de varianza, también conocido como ANOVA, es el análisis estadístico en el cual se compara más de dos medias entre sí.

Blanco matriz: Matriz que no contiene el analito de interés u objetivo para el método seleccionado.

Blanco Reactivo o testigo reactivo: Es la solución que contiene todos los reactivos usados en los mismos volúmenes y concentraciones, que son utilizados en el procesamiento de la muestra. Este blanco debe seguir todos los pasos indicados en la técnica y ayuda a detectar trazas de contaminación provenientes del material o reactivos usados.

Coefficiente de Variación (CV): Desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje.

Coefficiente de Variación de Horwitz (CVh): Es el coeficiente de variación definido por W. Horwitz, a través de la ecuación obtenida de un estudio estadístico. En dicho estudio, Horwitz después de reunir una serie de datos (provenientes de 150 ensayos de interlaboratorios organizados por AOAC), observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por los diferentes laboratorios, aumentaban a medida que disminuía la concentración del analito.

Condiciones de repetibilidad: Condiciones en las que un mismo operador obtiene resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo.

Condiciones de reproducibilidad: Condiciones en las que operadores diferentes obtienen resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de ensayo, en laboratorios diferentes y con equipos diferentes.

Criterios de aceptabilidad: Exigencias de una característica de funcionamiento o comportamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados confiables.

Ensayo: Operación técnica realizada de acuerdo a un procedimiento específico, que consiste en la determinación cualitativa y/o cuantificación de una o más características (propiedades o analitos) en un determinado producto, proceso o servicio.

Determinación del blanco de la muestra: Procedimiento analítico completo aplicado a una porción de ensayo de una muestra que no contiene el analito.

Determinación del blanco de reactivo: Procedimiento analítico completo aplicado sin la porción de ensayo o utilizando una cantidad equivalente de disolvente adecuado en lugar de la porción de ensayo.

Especificidad: Capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.

Exactitud: Grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado.

Intervalo de trabajo: Es el intervalo entre el nivel más bajo y más alto de concentración que ha sido demostrado que puede ser determinado con la precisión y exactitud requeridas para una determinada matriz.

Límite máximo permitido (LMP): Nivel máximo o tolerancia establecida para un analito en una reglamentación.

Matriz: Es el tipo de sustancia compuesta (líquida, sólida, gaseosa) que puede o no contener al analito de interés, ejemplo: matriz de alimento, matriz ambiental, etc.

Material de muestra enriquecido: Muestra enriquecida con una cantidad conocida del analito que debe detectarse.

Método cuantitativo: método analítico que determina la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico de unidades apropiadas.

Muestra de ensayo: Muestra preparada a partir de una muestra de laboratorio y de la que se tomarán porciones de ensayo.

Muestra de laboratorio: Muestra que se prepara y se envía a un laboratorio para una inspección o un ensayo.

Nivel: Es la concentración de una sustancia de interés en una solución estándar o matriz. Generalmente, se habla en términos de nivel de concentración.

Plan de Validación: Documento tipo protocolo en el cual se definen las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método.

Precisión: Grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas). La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación estándar de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación estándar menor es la precisión.

Precisión Intermedia: Precisión obtenida en un mismo laboratorio y en condiciones estipuladas (predeterminadas) —relativas, por ejemplo, al método, los materiales de ensayo, los operadores y el entorno— separados por largos intervalos de tiempo justificados.

Prueba t Student: Esta prueba permite comparar las medias de dos grupo de datos y determinar si entre estos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas.

Recuperación: Porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico. Este factor se determina durante la validación si no se dispone de material de referencia certificado.

Repetibilidad: Precisión en condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad: precisión en condiciones de reproducibilidad.

Sesgo: Diferencia entre el resultado del ensayo esperado y un valor de referencia aceptado.

Varianza: Es una medida de dispersión definida como el cuadrado de la desviación estándar.

Veracidad: grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad se expresa normalmente como sesgo.

INTRODUCCIÓN

Uno de los municipios de mayor producción piscícola en el Departamento de Nariño es San Juan de Pasto, en donde la comercialización y el consumo de especies como la trucha arco iris y tilapia ha crecido rápidamente¹. Si bien la producción y comercialización de especies piscícolas ha tenido un crecimiento paulatino, las condiciones para desarrollar la actividad en la región presentan debilidades, debido al empleo de técnicas sanitarias deficientes durante la captura, transporte, manipulación y conservación del producto acuícola^{2,3}.

Las deficiencias tanto en la cadena de producción como en la manipulación de los productos acuícolas dan pie a una gran contaminación bacteriana que en conjunto con la microflora del pescado y a la susceptibilidad de estos productos al ataque microbiano, facilitan la descomposición *postmortem* de la especie, dando origen a unas biotoxinas llamadas aminas biogénicas (ABs), las cuales son compuestos orgánicos nitrogenados formados como producto del metabolismo y/o actividad de organismos vivos⁴, que en altas concentraciones pueden provocar infecciones e intoxicaciones alimentarias, consideradas como enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), además de algunas enfermedades crónicas como la hipertensión y esclerosis múltiple⁵, lo que representan un inminente riesgo para la salud de la población consumidora.

Según el Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN), en el Departamento de Nariño se han presentado un gran número de ETA's, especialmente en los años 2004, 2005 y 2008 con 437, 707 y 415 casos respectivamente, la mayoría de las cuales, han estado relacionados con malas prácticas de higiene personal, materias primas contaminadas y pérdida de cadena de frío. El informe más reciente, demuestra que en el 2013 se reportaron 22 casos de ETA's, de los cuales 4 estuvieron relacionados con el consumo de productos de la pesca⁶.

¹ HERNÁNDEZ, Iván. Plan de manejo sanitario con distribuidores de pescado y mariscos en el municipio de San Juan de Pasto. San Juan de Pasto, **2001**, p.12-15.

² *Ibid.*, p. 15.

³ BASTIDAS, Luis, *et al.* Evaluación sanitaria de la calidad microbiológica de productos acuícolas en la ciudad de San Juan de Pasto. *En: Centro de estudios en salud*. Noviembre, **2005**, vol. 1, no.6, p. 22-32.

⁴ ÖNAL, Arma an. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *En: Food Chemistry*. Enero, **2007**, vol. 103, no. 4, p. 1475-1486.

⁵ FAROKHI, Mehrdad, *et al.* Multiple Sclerosis and Related Disorders. *En: Science Direct*. Noviembre, **2014**, vol. 3, no. 6, p. 746.

⁶ SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA. Eventos de notificación epidemiológica semanal (ENOS) por municipios. [en línea]. Pasto-Nariño. [citado el 03 de mayo de 2014]. Disponible en <<http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/vigilancia-y-eventos-de-interes/942-informe-enos-por-municipios-a-semana-14-a-05-04-2014>>

En alimentos como el pescado, es relevante identificar y cuantificar el contenido de ABs, para cumplir con los requerimientos de consumo y/o para dar un indicador del grado de descomposición del alimento⁷. Lo anterior, resalta la importancia de disponer de métodos analíticos fiables, exactos y reproducibles que permitan determinar y/o cuantificar la presencia de ciertas sustancias indeseables en los productos alimenticios. La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), es una herramienta que ha permitido y facilitado desarrollar estudios y evaluaciones muy importantes en la determinación de ABs en muestras biológicas.

El presente estudio que se ejecutó en la línea control y contaminación de alimentos del grupo de investigación de sistemas contaminantes (GIESIC) del programa de química de la Universidad de Nariño y se desarrolló en convenio con el Instituto Departamental de Salud de Nariño, consistió en la implementación de un método analítico por HPLC para la determinación simultánea de las aminas biogénicas putrescina, histamina y tiramina en las dos especies de mayor producción y consumo en el municipio de Pasto: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*).

⁷ ÖNAL. Op. Cit., p. 1484.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar y cuantificar el contenido de histamina, tiramina y putrescina en las especies trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) comercializadas en la ciudad de pasto.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-) Extraer las aminas biógenicas (histamina, tiramina y putrescina) en piel y músculo de las especies trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) mediante extracción sólido-líquido.
-) Identificar y cuantificar las aminas biógenicas (histamina, tiramina y putrescina) en las especies trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
-) Implementar en el laboratorio del Instituto departamental de salud de Nariño (IDSN) una metodología de análisis por HPLC para la determinación de aminas biogénicas en pescado.

2. ESTADO DEL ARTE

Las aminas biogénicas (ABs) son compuestos nitrogenados no proteicos de bajo peso molecular que están naturalmente presentes en los organismos vivos y en los alimentos⁸. Cuando estos compuestos químicos se encuentran en altas concentraciones pueden producir efectos fisiológicos indeseables en el consumidor como náuseas, dolores de cabeza, alteraciones respiratorias, enrojecimiento de la piel, palpitaciones cardíacas y fenómenos de alergia; además de algunas enfermedades crónicas como la hipertensión y la esclerosis múltiple⁹. La mayoría de las intoxicaciones alimentarias se relacionan principalmente con la histamina^{10,11,12}, sin embargo también se ha estudiado la influencia organoléptica de otras aminas como la putrescina, tiramina y cadaverina¹³.

En cuanto a los valores admisibles de ABs en alimentos, sólo existen algunas legislaciones específicas para histamina y principalmente en pescado, evidenciándose cierta discrepancia en los niveles establecidos. De esta manera, la legislación europea¹⁴ ha establecido un límite en el nivel de histamina en productos de la pesca de 100 mg.Kg⁻¹; mientras que para la agencia de Administración de drogas y alimentos¹⁵ y la Autoridad Europea¹⁶ para la Seguridad Alimentaria el límite es de 50 mg.Kg⁻¹. Por su parte, en Colombia, el Ministerio de

⁸ ÖNAL, Arma an; TEKKELE, Serife y ÖNAL, Cem. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. En: Food Chemistry. Mayo, **2013**, vol. 138, no.1, p. 509–15.

⁹ FAROKHI. Op. Cit., p. 746.

¹⁰ LANDETE, Jose, *et al.* PCR methods for the detection of biogenic amine producing bacteria on wine. En: Annals of Microbiology. **2010**, vol. 61, no.1, p.159–166.

¹¹ MAINTZ, Laura y NOVAK, Natalija. Histamine and histamine intolerance. En: The American Journal of Clinical Nutrition. Enero, **2007**, vol. 85, no. 5, p.1185–1196.

¹² GARCÍA, Emilia y MUÑOZ, Rosario. Does *Oenococcus oeni* produce histamine. En: International Journal of Food Microbiology. Julio, **2012**, vol. 157, no. 2, p.121–9.

¹³ PALACIOS, Antonio, *et al.* Influencia organoléptica de las aminas biógenas producidas durante la fermentación maloláctica del vino. En: ACE Revista de Enología. Febrero, **2005**, vol. 70, no. 53, p.14–20.

¹⁴ DIRECTIVA 91/439/EEC. Directive of 22 July 1991 establishing standards to be applied to the production and commercialization of fishery products. En: Official Journal of the European Communities. Julio, **1991**, vol. L268, p. 15–34.

¹⁵ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition. [en línea]. [citado el 16 de Noviembre de 2015]. Disponible en <<http://www.fda.gov/downloads/food/guidancecompliance/regulatoryinformation/>>

¹⁶ EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. En: EFSA Journal, **2011**, vol. 9, no. 10, p. 2393-2486.

la Protección Social según Resolución 000122 del 2012, estableció un límite de ABs de 100 mg.Kg⁻¹ ¹⁷.

En años recientes se ha considerado retomar investigaciones dedicadas al estudio de ABs de carácter exógeno. Éste tipo de compuestos son formados por microorganismos como consecuencia de la descarboxilación de aminoácidos presentes¹⁸. Por lo tanto, la formación de ABs requiere disponibilidad de aminoácidos libres, la presencia de enzimas descarboxilasas y las condiciones que permitan el crecimiento bacteriano y la actividad de dichos catalizadores¹⁹. Se ha demostrado que el origen de histamina, putrescina y tiramina es consecuencia de la actividad descarboxilasa de algunos microorganismos sobre sus aminoácidos precursores provenientes de los alimentos y bebidas fermentados, es decir, se puede esperar su presencia en casi todos los alimentos que contienen proteínas o aminoácidos libres y están sujetos a las condiciones que permitan la actividad microbiana²⁰.

A lo largo de los últimos años se ha incrementado el número de alimentos de los que se tiene constancia que puedan contener cantidades importantes de ABs. Entre los alimentos que más sufren de este problema se encuentra el pescado y sus derivados, los quesos curados, carne cruda y sus derivados (curados, en conserva y en semiconserva), la col fermentada, las bebidas alcohólicas fermentadas (vino, cerveza, sidra), el cacao y sus derivados, algunas frutas y hortalizas. En general, se trata de alimentos susceptibles de presentar una contaminación bacteriana durante los días previos a su consumo o transformación, o durante el proceso de manipulación y/o fermentación²¹.

El pescado, es uno de los principales alimentos implicados en intoxicaciones por ABs, debido a su alto contenido de humedad, concentración de sal y a la laxitud de sus tejidos, que favorecen la actividad proteolítica de las bacterias productoras de estas toxinas²². El contenido de ABs en el pescado recién capturado es prácticamente despreciable. A modo de ejemplo, en sardina fresca histamina está presente en niveles menores a 5 mg/100 y putrescina menor de 1 mg/100 g. Sin embargo, inmediatamente después que el pez es capturado y si no se

¹⁷SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA, Op. Cit., Disponible en <<http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/vigilancia-y-eventos-de-interes/942-informe-enos-por-municipios-a-semana-14-a-05-04-2014>>

¹⁸ MORET, Sabrina, *et al.* A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *En: Food Chemistry*. Febrero, **2005**, vol. 89, no. 3, p.355–361.

¹⁹ RESTUCCIA, Donatella, *et al.* A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *En: Talanta*. Julio, **2011**, vol. 85, no. 1, p.363–9.

²⁰ *Ibid.*, p. 363.

²¹ TINAJAS, Antonio. Intoxicación por Histamina. *En: Jano Emc*. Junio, **1998**, vol. 55, no. 1269, p. 62.

²² IZQUIERDO, Pedro, *et al.* Aminas Biógenas y Crecimiento Bacteriano en Carne de Hamburguesas". *En: RC*. Febrero, **2004**, vol.14, no.1, p.7.

implementan buenas prácticas de manufactura, el contenido de ABs puede llegar a sobrepasar los máximos permisibles²³.

Investigaciones internacionales describen el estudio de ABs en productos pesqueros, bebidas alcohólicas, lácteos y derivados, entre otros²⁴. Para ello, se han desarrollado numerosos procedimientos analíticos, los cuales abarcan desde métodos colorimétricos y fluorimétricos simples hasta los métodos más sofisticados, como los métodos cromatográficos. De estos últimos, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha sido el método más utilizado para la determinación de ABs²⁵.

En productos de la pesca, las especies más estudiadas y más implicadas en este tipo de intoxicación química pertenecen a la familia de los escómbridos (caballa y jurel), túnidos (atún y bonito), clupeiformes (sardina y boquerón)^{26,27,28}. Los estudios de cuantificación de ABs en especies de agua dulce como la trucha arcoíris y tilapia son recientes y escasos. Algunas determinaciones consisten en análisis microbiológicos y sensoriales²⁹. Otras investigaciones internacionales, ya reportan el uso de técnicas cromatográficas en el análisis de ABs^{30,31}. A la fecha, en Colombia se realiza determinaciones de Histamina en conservas de pescado mediante métodos fluorimétricos según la Norma Técnica Colombiana³² NTC1322. Por su parte, a nivel departamental no se han reportado estudios en este campo.

²³ GALLEGUILLOS, Monica. Aminas biogénicas, nuevos indicadores químicos utilizados como criterios de calidad en harina de pescado. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. En: FAO-México. Mayo, **1994**, vol. 5, no. 16, p. 269.

²⁴ KAROVI OVÁ, Jolana y KOHAJDOVÁ, Zlatica. Biogenic amines in food. En: Chem. Agosto, **2005**, vol. 59, no. 1, p. 70-79.

²⁵ RUIZ, Claudia; PINTADO, Tatiana y JIMÉNEZ, Francisco. Biogenic amine formation in refrigerated fresh sausage "chorizo" keeps in modified atmosphere. En: Journal of Food and Biochemistry. Diciembre, **2011**, vol. 36, no. 4, p. 449-457.

²⁶ *Ibid.*, p. 452.

²⁷ TAHMOUZI, Saeed; KHAKSAR, Ramin y GHASEMLOU Mehran. Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). En: Science direct. Mayo, **2011**, vol. 126, no. 2, p 756–761.

²⁸ BUENO, Carolina, et al. HPCL determination of histamine, tyramine and amino acids in shrimp by-products. En: J. Braz. Chem. Soc. Febrero, **2012**, vol. 23, n.1, p. 96-102.

²⁹ KATIKOU, Panagiota, et al. Relation of biogenic amines formation with microbiological and sensory attributes in Lactobacillus-inoculated vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. En: J Agric Food Chem. Diciembre, **2006**, vol. 54, no. 12, p. 4277-83.

³⁰ AHMAD, Reza, et al. Determination of histamine content in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during ice storage. En: Springer Protocols. Junio, **2014**, vol. 23, no. 3, p. 775-778.

³¹ KAROVI OVÁ. Op cit., p. 70-79.

³² NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. ICONTEC. [citado el 22 de Noviembre de 2015]. Disponible en <<http://tienda.icontec.org/brief/NTC1322.pdf>>

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 AMINAS BIOGÉNICAS (ABs)

Las aminas biogénicas (ABs) son compuestos orgánicos con carácter básico y bajo peso molecular, formadas principalmente por reacciones de descarboxilación de aminoácidos precursores y sintetizadas en el metabolismo de plantas, animales y microorganismos³³.

En el pescado se acepta que el origen de contenidos elevados de ABs es producto de la actividad aminoácido-descarboxilasa que presentan algunos microorganismos como las enterobacterias, y es por ello que su determinación se ha propuesto para reflejar el deterioro del pescado³⁴.

3.1.1 Clasificación de las aminas biogénicas

Las ABs se pueden clasificar según el número de sustituyentes unidos al nitrógeno como: primarias, secundarias y terciarias; según la estructura molecular como: alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina), aminas aromáticas (tiramina, -feniletilamina, dopamina), y heterocíclicas (histamina, serotonina); o en base al número de grupos amino: monoaminas (feniletilamina y tiramina), diaminas (cadaverina y putrescina) o poliaminas (espermidina y espermina)³⁵.

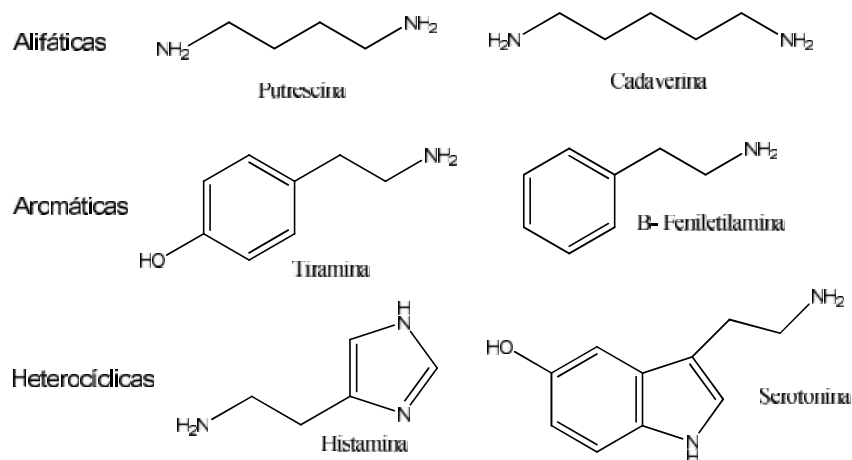
La figura 1 muestra la clasificación de algunas de las principales ABs de acuerdo con su estructura molecular:

³³ DALGAARD, *et al.* Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone*) effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. En: *J Appl Microbiol.* Julio, **2006**, vol. 1, no. 101, p. 80–95.

³⁴ LJERKA, Prester. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. En: *Food Additives & Contaminants.* Junio, **2011**, vol. 1, no. 28, p. 1548-1549.

³⁵ *Ibid.*, p. 1551.

Figura 1. Estructura molecular de las principales Aminas Biogénicas



Fuente: Esta Investigación

3.1.2 Origen y formación de las aminas biogénicas

Las ABs se pueden encontrar en una amplia gama de alimentos, tanto de origen animal como vegetal³⁶. Debido a ello, inicialmente se consideró que todas las ABs eran componentes naturales de éstos. Hoy en día, se distingue claramente entre dos grupos, en función de si su origen es endógeno o exógeno:

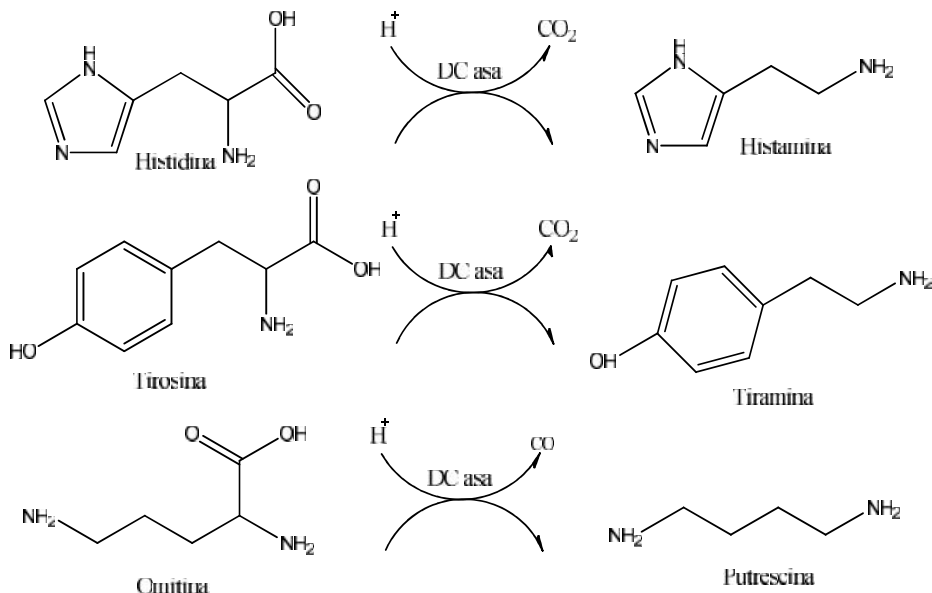
3.1.2.1 *Aminas biogénicas endógenas, naturales o de origen fisiológico.* Se forman como consecuencia de los procesos metabólicos celulares normales de los seres vivos. Por tanto, su presencia en los alimentos sería de origen endógeno. Dentro de este grupo se incluyen las diaminas putrescina y cadaverina y las poliaminas espermina, espermidina y agmatina. Algunas de estas aminas, como la putrescina, la cadaverina y la agmatina, también se pueden formar como consecuencia de la actividad descarboxilasa de los microorganismos³⁷.

3.1.2.2 *Aminas biogénicas exógenas.* Se forman por la descarboxilación microbiana de los aminoácidos libres precursores, la figura 2 muestra algunos ejemplos de este proceso.

³⁶ LORENZO, José, *et al.* Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. *En: Meat Sci.* Octubre, **2007**, vol. 77, no. 2, p. 287–93.

³⁷ RUIZ, Claudia; HERRERO, Ana María y JIMÉNEZ-COLMENERO, Francisco. Reduction of biogenic amines levels in meat and meat products. *En: Natural Antimicrobials in Food quality and Food Safety.* 3 ed. Rai, M. and Chikindas, M.L. CAB International, UK, **2010**, 15-55 p.

Figura 2. Esquemas de las reacciones de formación de Histamina, tiramina y putrescina a partir de sus aminoácidos precursores.



Fuente: Esta Investigación

Dentro de este grupo se encuentran las aminas aromáticas tiramina, -feniletilamina, histamina y triptamina, resultantes de la descarboxilación de la tirosina, fenilalanina, histidina y triptófano respectivamente. Las enzimas responsables de la biosíntesis de estas aminas son de origen microbiano y, en general, específicas para cada aminoácido³⁸.

3.1.3 Importancia de las aminas biogénicas

La determinación de ABs en los alimentos en general, y en los productos cárnicos en particular, tiene un doble interés, por un lado por su interés biológico y por otro por la posibilidad de ser empleados como índices de calidad.

3.1.3.1 Interés biológico y toxicológico de las aminas biogénicas. Las ABs son moléculas con funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos, aunque en algunos casos constituye un potencial problema de salud pública debido a sus posibles efectos toxicológicos.

La intoxicación histamínica es el trastorno asociado a las ABs más ampliamente estudiado, especialmente en relación con el consumo de pescado. Esta intoxicación alimentaria es producida por la ingestión de alimentos con cantidades

³⁸ Ibid., 20 p.

elevadas de histamina, superiores a 500 mg.L⁻¹ ³⁹. Durante mucho tiempo esta intoxicación fue atribuida exclusivamente al consumo de pescados de las familias Scomberesocidae y Scombridae (atún, caballa, arenques, etc.) recibiendo por tanto, el nombre de “envenenamiento por escómbridos” o “escombrototoxicosis”. Sin embargo, esta intoxicación también se ha dado por el consumo de otras especies de pescado e incluso por la ingesta de alimentos como quesos, vinos y productos cárnicos, razón por la cual, tomó el nombre general de intoxicación histamínica⁴⁰.

En la tabla 1, se puede evidenciar las implicaciones fisiológicas y toxicológicas de cada una de las ABs estudiadas.

Tabla 1. Efectos fisiológicos y potenciales toxicológicos de aminas biogénicas.

AB	Efectos fisiológicos	Efectos toxicológicos
Tiramina	Neurotransmisores ; favorece la vasoconstricción periférica; aumenta la presión arterial, la respiración y la glicemia; libera la norepinefrina; incrementa el nivel de azúcar en la sangre (glucemia), interviene en la formación de nitrosaminas, etc.	Migraña, desorden neurológico, náusea, vómitos, desorden respiratorio, hipertensión y crisis hipertensiva (reacción de queso), parálisis de las extremidades, taquicardia, provoca hemorragia cerebral y cardíaca, etc.
Histamina	Neurotransmisor; interviene en el crecimiento y la diferenciación celular, el ritmo circadiano, la regulación de la temperatura corporal, el aprendizaje y la memoria, la respuesta inmune, las reacciones alérgicas y la síntesis de noradrenalina y adrenalina; participa en los procesos inflamatorios, en la regulación de la circulación local; tiene un efecto vasodilatador de los vasos sanguíneos capilares y arteriales; disminuye la presión arterial, etc.	Migraña, hipotensión, arritmia, taquicardia, palpitaciones, anafilaxia, sofocos, edemas, sudoración, obstrucción nasal, broncoconstricción, broncoespasmo, enrojecimiento facial, erupciones cutáneas, urticaria, picor, dolor gastrointestinal, diarrea, mareos, vómitos, náuseas, dificultad respiratoria, esclerosis múltiple trastornos de la presión arterial y de la neurotransmisión.
Putrescina-cadaverina	Neurotransmisor; psicoactiva; regula la expresión genética; interviene en la maduración y absorción intestinal, el crecimiento y la diferenciación celular; disminuye la presión arterial y el catabolismo de la histamina y la tiramina, etc.	Taquicardia, hipertensión, efectos carcinógenos, rigidez mandibular, bradicardia, potencia el efecto de otras AB, provoca trastornos de la neurotransmisión, etc.

Fuente: Adaptada de: LADERO, Victor, *et al.* Toxicological effects of dietary biogenic amines. *En: Current Nutrition and Food Science*. Mayo, **2010**, vol. 6, no. 2, p.145-156.

³⁹ GONZAGA, Victor, *et al.* Histamine levels in fish from markets in Lima, Peru. *En: J Food Prot*. Mayo, **2009**, vol. 72, no. 5, p. 1112-5.

⁴⁰ YONGMEI, Lu, *et al.* Biogenic amines in Chinese soy sauce. *En: Food Control*. Enero, **2009**, vol. 20, no. 6, p. 593–7.

Otro riesgo toxicológico adicional está asociado con la producción de compuestos N-nitrosos, potencialmente carcinógenos⁴¹. Las ABs, especialmente la putrescina y la cadaverina pueden reaccionar con los nitritos dando lugar a nitrosaminas.

Esta reacción puede darse durante el procesado de los alimentos, de forma que se ingerirían las nitrosaminas ya formadas, o bien, el individuo podría ingerir nitritos y aminos biogénicos con los alimentos y la reacción se produciría a nivel gastrointestinal. En el caso del pescado, además de las ABs, existe el riesgo potencial de formación de nitrosaminas a partir de derivados del óxido de trimetilamina^{42,43,44}.

3.1.3.2 *Las aminos biogénicos como índices de calidad.* La determinación de ABs en los alimentos no es solamente importante desde un punto de vista toxicológico sino también por su empleo como indicadores de calidad. El uso de varias aminos expresado como índice de aminos biogénicos (BAI) ha sido sugerido para informar sobre el nivel de frescura y/o deterioro de los productos alimenticios^{45,46}.

El BAI más tradicional para la evaluación de la calidad de los alimentos fue propuesto por Mietz y Karmas⁴⁷, como indicador de la descomposición del pescado y se basa en el incremento de los niveles de putrescina, cadaverina e histamina, y la disminución de los niveles de espermidina y espermina a lo largo de la conservación del pescado. Los límites sugeridos para este índice son 0-1 mg.Kg⁻¹ como indicativo de buena calidad del pescado, 1-10 mg.Kg⁻¹ como límite de tolerancia y mayores a 10 mg.Kg⁻¹ como descomposición del producto. Sin embargo, en algunos casos este índice no ha proporcionado buenos resultados, por lo que se han propuesto distintas alternativas, como se registran en la tabla 2.

⁴¹ÖNAL. Op. Cit., p. 1479-1480.

⁴²GONZÁLEZ, Consuelo, *et al.* Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in *chorizo* dry sausage. En: *Food Microbiol.* Noviembre, **2003**, vol.20, no. 3, p. 275-284.

⁴³KAROVÍ OVÁ. Op. Cit., p. 74-76.

⁴⁴ÖNAL. Op. Cit., p. 1481

⁴⁵ŠIMAT, Vida y DALGAARD, Paw. Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. En: *Food Science and Technology.* Marzo, **2011**, vol. 44, p. 399-406.

⁴⁶CUNHA, França, *et al.* Determinação e monitoramento de aminos biogénicas por cromatografia líquida de alta eficiência em filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados embalados em atmosfera modificada e irradiados. En: *Revista Brasileira de Medicina Veterinária.* Octubre, **2012**, vol. 35, no. 3, p. 275-282.

⁴⁷MIETZ, John y KARMAS, Endel. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. En: *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* Enero, **1977**, vol. 61, no. 1, p. 139-145.

Tabla 2. Algunos ejemplos de Índices de calidad basados en la presencia de aminas biogénicas en carne y productos cárnicos.

Producto	Aminas Biogénicas (BAI)
Carne de pescado ⁴⁸	Putrescina+cadaverina+histamina+tiramina espermidina + espermina
Atún y sardinas ^{49,50}	
Carne procesada ⁵¹	
Carnes at 6-8°C ⁵²	Putrescina+cadaverina+histamina+tiramina
Carnes y productos cárnicos ⁵³	
	Tiramina + cadaverina
Carne fresca ⁵⁴	Tiramina + putrescina + cadaverina
	Putrescina + cadaverina
Carne picada cruda y cocida ⁵⁵	Putrescina + Tiramina

Así, Wortberg y Woller⁵⁶ han sugerido un BAI que consiste en la suma de putrescina, cadaverina, histamina y tiramina, eliminando la espermidina y la espermina del índice de Mietz & Karmas. Este índice se correlaciona con la calidad organoléptica de atún y sardinas^{57,58} y establece un límite menor a 50

⁴⁸ Ibid., p. 142–143.

⁴⁹ VECIANA, María; MARINE, Abel y VIDAL, Carmen. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compound, volatile amines, and organoleptic changes. *En: J Agric Food Chem.* Junio, **1997**, vol. 45, no. 6, p. 2038–2039.

⁵⁰ OZOGUL, Fatih y ÖZOGUL, Yesim. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packing and vacuum packing. *En: Food Chem.* Agosto, **2005**, vol. 99, no. 3, p. 574–578.

⁵¹ DURLU, Fügen; AYHAN, Kamuran y VURAL, Nilufer. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *En: Meat Sci.* Junio, **2001**, vol. 58, no. 2, p. 163-6.

⁵² HERNÁNDEZ-JOVER, Teresa, *et al.* Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *En: Journal of Agricultural Food Chemistry.* Octubre, **1996**, vol. 44, no. 10, p. 3097–3101.

⁵³ NOWAK, Agnieszka y CZYZOWSKA, Agata. In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms. *En: Meat Sci.* Julio, **2011**, vol. 88, no. 3, p. 571-4.

⁵⁴ ROKKA, Mervi. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions: Biogenic amines as quality-indicating metabolites. *En: Food Control Department of Chemistry.* Noviembre, **2003**, vol. 15, no. 8, p. 601-607.

⁵⁵ SAYEM, N.; SIMARD, R. y FILLION, J. Changes in the amine content of ground beef during storage and processing. *En: Food science and Technol.* **1984**, vol.17, p. 319–323.

⁵⁶ WORTBERG, W. y WOLLER, R. Quality and freshness of meat and meat products as related to their content of biogenic amines. *En: Food and agriculture organization of the united nations.* Noviembre, **1982**, vol. 62, no. 11, p. 1457–1463.

⁵⁷ VECIANA. Op. Cit., p. 2039.

⁵⁸ OZOGUL. Op. Cit., p. 574–578.

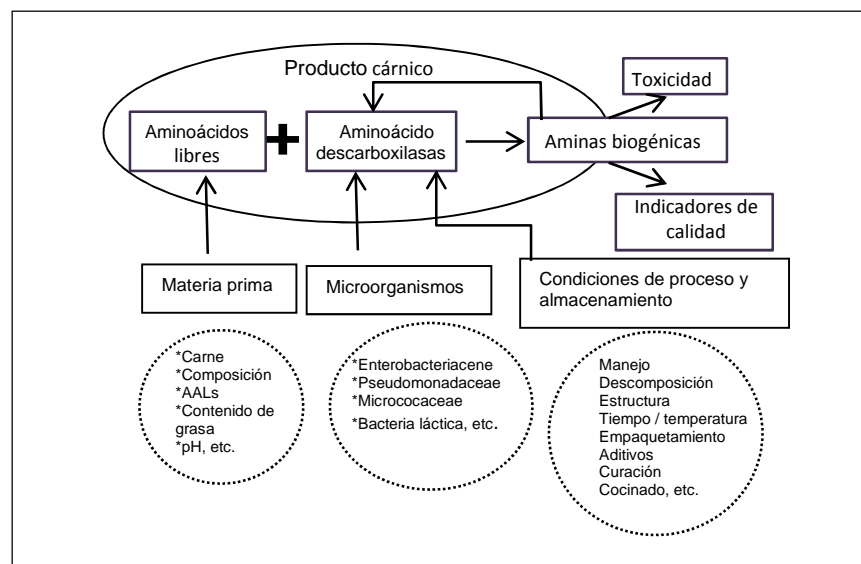
mg.Kg⁻¹ para indicar una calidad aceptable del atún y uno mayor a 50 y 90 mg.Kg⁻¹ para indicar una descomposición inicial y avanzada del mismo respectivamente⁵⁹.

Hernández-Jover *et al.*⁶⁰ ha sugerido límites de BAI menores a 5 mg.Kg⁻¹ para la carne fresca de buena calidad, entre 5 y 20 mg.Kg⁻¹ para una carne fresca aceptable pero con señales de inicio del deterioro, entre 20 y 50 mg.Kg⁻¹ para una baja calidad de carne y finalmente mayores a 50 mg.Kg⁻¹ para una carne deteriorada. Otros autores proponen como índice de aceptabilidad en carne fresca un BAI resultante de la combinación de putrescina y cadaverina porque sus concentraciones aumentan durante el deterioro y se correlacionan bien con el crecimiento microbiano.

3.1.4 Factores que influyen en la formación de aminas biogénicas

El contenido de ABs puede variar dependiendo de distintos factores como, matriz alimentaria, microorganismos presentes y condiciones de conservación de los alimentos en general. La figura 3 muestra un esquema de los factores más importantes relacionados con la formación de ABs.

Figura 3. Factores que influyen en la formación de Aminas Biogénicas en productos cárnicos.



Fuente: RUIZ. Op. Cit., p. 489-499.

⁵⁹ DU, Wei, *et al.* Development of biogenic amines in yellow fin tuna (*Thunnus albacores*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *En: J Food Sci.* **2002**, vol. 67, no. 1, p. 292-301.

⁶⁰ HERNÁNDEZ-JOVER. Op.Cit., p. 3099.

3.1.4.1 *Matriz alimentaria*. La carne es una fuente natural de aminoácidos libres (AAL), y el medio donde se produce la reacción enzimática de descarboxilación que induce la formación de ABs. Cualquier condición que altere la naturaleza de la carne y sus características va a influir de una manera u otra en la formación de ABs.

Los AAL juegan un papel fundamental en la formación de ABs en la carne, ya que son sus precursores y además constituyen un sustrato para el crecimiento microbiano⁶¹. En general, en pescado fresco la fracción aminoacídica libre es poco importante, pero ésta aumenta a medida que transcurre el deterioro debido primero al proceso de autólisis que sufre el pescado y, posteriormente, por la acción proteolítica de la flora bacteriana contaminante.

En el pescado, la flora microbiana puede avanzar rápidamente desde la piel o el tracto digestivo hasta el interior del músculo debido a la alta actividad de agua, la laxitud de sus tejidos y la elevada proporción de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular⁶².

Con gran frecuencia se ha planteado que la producción de ABs es un importante mecanismo de defensa de los microorganismos frente a las condiciones ácidas del medio en el que se desarrollan. Así, valores bajos de pH parecen estimular la producción de aminas, aunque un medio excesivamente ácido puede inhibir tanto el crecimiento de los microorganismos como su actividad aminogénica⁶³.

3.1.4.2 *Microorganismos con actividad descarboxilasa*. La presencia de actividad aminoacildescarboxilasa implicada en la síntesis de ABs es una característica que depende de la cepa bacteriana y no de la especie. Pueden ser bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y se pueden encontrar en especies de diversos géneros como: Citrobacter, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Micrococcus, Enterococcus, Kocuria, Morganella, Vibrio e incluso en bacterias reconocidas generalmente como seguras, como las pertenecientes a los generos Lactobacillus, Pediococcus o Lactococcus. En el caso de alimentos no fermentados serán las bacterias Gram negativas, principalmente enterobacterias, las responsables de la síntesis de ABs⁶⁴.

⁶¹ NOWAK. Op. Cit., p. 571-4.

⁶² RODRÍGUEZ, Juan. Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos. Trabajo de Grado, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, **2010**, 19-22 p.

⁶³ KAROVI OVÁ. Op. Cit., p. 76-77.

⁶⁴ GALGANO, Fernanda. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. En: Food Res. Octubre, **2009**, vol. 42, no. p. 1147-1152.

La composición de la flora bacteriana del pescado es muy variable en función de la zona geográfica donde vive, del método de pesca, de la temperatura del agua, del tipo de alimentación y de la manipulación y condiciones de almacenamiento tras la captura⁶⁵.

La microflora del pescado de agua dulce capturado en aguas sin contaminación aparente se compone principalmente de bacterias Gram negativas como *Moraxella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Corynebacterium*. Por su parte, el pescado procedente de aguas dulces más contaminadas presenta mayores recuentos de esta especie y de enterobacterias. Durante el deterioro de la carne de pescado, las enterobacterias han sido identificadas como los principales productores de cadaverina, tiramina, putrescina e histamina^{66,67,68}.

3.1.4.3 *Conservación de alimentos cárnicos*. Las condiciones de procesamiento y almacenamiento de la carne influyen en la formación de ABs, ya que afectan directamente o indirectamente la composición, condiciones y demás factores implicados en la producción de ABs.

La temperatura y el tiempo de almacenamiento son los factores más influyentes en la formación de ABs. Temperaturas de almacenamiento inadecuados (es decir, temperaturas > 5°C), almacenamientos prolongados, o abusos de temperatura durante el almacenamiento pueden tener un doble efecto: contribuir con el proceso de proteólisis debido al aumento del crecimiento microbiano, y/o favorecer la actividad amino descarboxilasa de las enzimas⁶⁹.

Un estudio sobre la formación de ABs en el curso de almacenamiento de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) a bajas temperaturas durante 18 días, reportando haber determinado putrescina, cadaverina, tiramina, espermidina, triptamina, beta-feniletilamina, espermina e histamina. De los ABs determinadas, la concentración de putrescina, aumentó abruptamente entre los días 15 y 18 de almacenamiento con concentraciones en el intervalo de 13 a 14 mg.Kg⁻¹ y proponiéndolo como indicador de frescura⁷⁰. En otro estudio, se monitorizó la concentración de

⁶⁵ ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios. 6 ed. Acribia Zaragoza, **2001**, 156-158 p.

⁶⁶ BOVER-CID, Sylvia, *et al.* Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. En: Journal of Food Protection. Febrero, **2000**, vol. 63, no. 2, p. 237-243.

⁶⁷ DU. Op. Cit., p. 292-301.

⁶⁸ LAVIZZARI, Tomasso. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. En: Journal of Chromatography. Septiembre, **2006**, vol. 1129, no. 1, p. 67-72.

⁶⁹ KAROVI OVÁ. Op. Cit. p. 77.

⁷⁰ CHYTIRI S., *et al.* Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored on ice. En: J Food Prot. Mayo, **2004**, vol. 67. no. 5, p. 960-5.

histamina en el tejido muscular de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) durante el almacenamiento de hielo durante un período de 18 días. La concentración inicial de histamina fue de 1,09 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y finalmente alcanzó 4,30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.⁷¹

3.1.5 Aminas biogénicas en pescado

En alimentos ricos en proteína, aminoácidos y humedad como el pescado, una manipulación y almacenamiento inadecuados favorecen la actividad proteolítica y descarboxilasa de algunos microorganismos y por tanto la formación de ABs⁷².

Son numerosos los trabajos en los que se estudia la formación de ABs a lo largo del proceso de almacenamiento del pescado. La tabla 3 recoge algunos ejemplos.

Tabla 3. Estudios de Formación de aminas biogénicas durante el almacenamiento de pescado a diferentes temperaturas.

Especie de pescado	Temperatura de almacenamiento (°C)	Conclusiones más relevantes
Atún ⁷³	08	Ligera formación de HI
	10	Ligera formación de PU y CA
	22	Formación de HI, PU y CA
Trucha ⁷⁴	Hielo	Formación de PU
Perca ⁷⁵	Hielo	Ligera formación de PU, CA y TI
Boqueron ⁷⁶	35	Formación de HI, PU y CA

HI: histamina; PU: putrescina; CA: cadaverina

3.1.6 Legislación del contenido de aminas biogénicas en pescado

A pesar de la importancia de las ABs, no existen límites legales para aminas diferentes de histamina. Por otro lado, en los límites establecidos para histamina

⁷¹ AHMAD, Reza. Op cit., p 775–778.

⁷² JØRGENSEN, Lasse Vigel; HUSS, Hans Henrik y DALGAARD, Paw. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *En: Journal of Applied Microbiology*. Enero, **2001**, vol. 89, no. 6, p. 920-934.

⁷³ DU. Op. Cit., p. 294.

⁷⁴ CHYTIRI S, *et al.* Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *En: Food Microbiology*. Abril, **2004**, vol. 21, no. 2, p. 157-165

⁷⁵ PALEOLOGOS, E., *et al.* Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *En: Food Microbiol.* Octubre, **2004**, vol. 21, no. 5, p. 549-557.

⁷⁶ YONGSAWATDIGUL, Jirawat, *et al.* Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *En: J Food Sci.* Mayo, **2004**, vol. 69, no. 4, p. 312-319.

en productos de la pesca se aprecian ciertas discrepancias, por ejemplo: la legislación europea (Directiva 91/439/CEE)⁷⁷ permite un límite en los valores de histamina de 100 mg.Kg⁻¹; mientras que la agencia de alimentos y drogas (FDA, 2011)⁷⁸ ha establecido como límite 50 mg.Kg⁻¹. En cualquier caso cabe concluir que fijar los límites es una tarea difícil porque el efecto tóxico de las aminas biógenas no depende solamente de su presencia, sino también de su interacción con otros compuestos y de la eficacia específica de los mecanismos de desintoxicación del individuo^{79,80}.

3.1.6.1 Legislación colombiana sobre el contenido de ABs en productos de la pesca.⁸¹

Artículo 6. Requisitos fisicoquímicos: Los productos de la pesca en particular pescados, moluscos, y crustáceos frescos, congelados, ultracongelados, precocidos, pasteurizados, cocidos y en conserva con destino al consumo humano debe cumplir con los requisitos fisicoquímicos que se señalan en la tabla 4:

Tabla 4. Requisitos fisicoquímicos para productos de la pesca

Requisito	Productos	Límites máximos
Histamina mg.Kg ⁻¹	Atún, bonito y pescados de las familias: scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Colyfenidae, Pomatomidae, Scombrosidae	100
Bases Volátiles Totales (mg.g ⁻¹)	Pescados frescos y congelados, crustáceos y moluscos.	70/100

Fuente: SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA, Op. Cit., Disponible en <<http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/vigilancia-y-evento-s-de-interes/942-informe-enos-por-municipios-a-semana-14-a-05-04-2014>>

Numerosos procedimientos analíticos se han desarrollado para la determinación de ABs en diferentes alimentos^{82,83}. Estos abarcan desde métodos colorimétricos y

⁷⁷ DIRECTIVA 91/439/EEC. Op. Cit., p. 15–34.

⁷⁸ FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition. [citado el 16 de Noviembre de 2015] Disponible en <<http://www.fda.gov/downloads/food/guidanccecompliancereulatoryinformation/>>

⁷⁹ SUZZI, Giovanna y GARDINI, Fausto. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *En: International Journal of Food Microbiology*. Enero, **2003**, vol. 88, p. 41-54.

⁸⁰ RUIZ. Op. Cit., p. 451-453.

⁸¹ MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución 122 de 2012 (enero 26). Por la cual se modifica parcialmente la Resolución número 776 de 2008. Diario Oficial. Bogotá, D.C., 2012. No. 48.329. 3 p.

⁸² ÖNAL. Op. Cit., p. 1480.

fluorimétricos simples hasta los métodos más sofisticados, como los métodos cromatográficos (CG, HPLC, HPTLC, etc.).

Los primeros métodos colorimétricos publicados por la AOAC (Nº 957.07)⁸⁴ se basaron en la extracción de la histamina con metanol y su posterior reacción con ninhidrina para su cuantificación. Estos métodos, no se usan hoy en día debido a que son tediosos y requieren especial atención en el procedimiento de purificación de la muestra⁸⁵.

Los métodos espectrofluorimétricos, descritos por la AOAC (977.13)⁸⁶, han sido usados para determinar histamina en alimentos. El método se basa en la extracción con metanol de histamina, y una posterior derivatización con o-ftalaldehído (OPA) para producir un compuesto fluorescente que es determinado mediante un fluorímetro. Este método ofrece algunas dificultades dado que el OPA no reacciona con grupos amino secundarios y los derivados OPA-ABs son inestables⁸⁷.

Los métodos enzimáticos se fundamentan en la utilización de la enzima diamina-oxidasa (DAO) que cataliza la conversión de histamina a imidazol acetaldehído con producción simultánea de peróxido de hidrógeno. La adición de una segunda enzima, la peroxidasa, y de un leuco-cristal incoloro, provoca una oxidación del leuco-cristal que origina un compuesto de color morado que se mide mediante espectrofotometría. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de histamina excedente. Con el fin de simplificar esta metodología, se han desarrollado también biosensores que proporcionan simplicidad y rapidez al sistema; sin embargo, estos biosensores no son accesibles para análisis rutinarios⁸⁸.

A partir de los métodos enzimáticos, se han desarrollado métodos inmunoenzimáticos como: ELISA, immunoassay, color test, F.L.O.R.I.D.A. entre otros, los cuales se basan en una reacción colorimétrica que emplea anticuerpos específicos de las enzimas DAO, previamente marcadas con una molécula coloreada. La coloración obtenida se mide por espectrofotometría y es inversamente proporcional a la cantidad de histamina contenida en la muestra.

⁸³ RUIZ. Op. Cit., p. 454.

⁸⁴ AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Histamine in seafood: Chemical method. Sec. 35.5.31, Method 957.07. In Official Methods of Analysis of AOAC International., 16 ed. P.A. Cunniff, **1995a**, 15-16 p.

⁸⁵ PATANGE, S, MUKUNDAN, M. y ASHOK-KUAMR, K. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. Central Institute of Fisheries Technology, India. *En: Food Control*. Junio, **2005**, vol. 16, no. 5, p. 465–472.

⁸⁶ AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Histamine in seafood: Fluorometric method. Sec. 35.1.32, Method 977.13. In Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed, P.A. Cunniff, **1995b**, 6-17 p.

⁸⁷ ÖNAL. Op. Cit., p. 1480-1482.

⁸⁸ AHMAD. Op. Cit., p. 777.

La desventaja de este protocolo es que no existen en el mercado métodos inmunoenzimáticos para las demás ABs⁸⁹.

El análisis de inyección de flujo (FIA) también se ha empleado para la determinación de histamina en alimentos. La muestra se inyecta en el sistema FIA donde se produce la reacción con OPA, el compuesto resultante se determina mediante un fluorímetro en línea. Aunque los sistemas de análisis de inyección de flujo fueron desarrollados para hacer determinaciones en pescado, esta técnica sólo permite determinar histamina⁹⁰.

Los métodos de TLC se basan en una extracción de cada AB con metanol o ácido tricloroacético seguida de una migración y separación (realizada sobre una fase estacionaria de gel de sílice en una cámara de cromatografía) con distintos solventes (metanol: amoníaco (20:1) y cloroformo: metanol: amoníaco (2:2:1)). La reacción de derivatización se realiza con ninhidrina, fluorescamina o diacetilbenzeno y la detección se realiza comparando la intensidad del color de la AB con sus estándares por detección simultánea en la placa cromatográfica. No obstante este método no es muy usado para determinaciones cuantitativas ya que ni la sensibilidad ni el poder de resolución son muy altos⁹¹.

La Cromatografía de Gases (GC) no es la técnica más aplicada para la determinación de ABs debido a problemas inherentes al fenómeno tailing, que se produce por la baja volatilidad de las ABs, lo que se traduce en una asimetría y un excesivo coleo de los picos y por ende una separación deficiente de los analitos⁹².

Probablemente el método más empleado y con mejores resultados para la determinación de las ABs sea la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés). Este método se ha combinado con diferentes sistemas de detección como ultravioleta (UV) y fluorescencia y ofrecen una gran ventaja sobre los métodos señalados previamente permitiendo principalmente el análisis simultáneo de histamina y otras ABs en diferentes alimentos⁹³.

⁸⁹ EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Op. Cit. p. 2393-2486.

⁹⁰ ALBULUSHI Ismail, et al. Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-a review. En: *Crit. Rev. Food Sci.* Mayo, **2009**, vol. 49, no. 4, p. 369-377

⁹¹ ÖNAL. Op. Cit., p. 1483-1484.

⁹² LJERKA. Op. Cit., p. 1550.

⁹³ AHMAD. Op. Cit. p. 775-778.

3.1.6.2 *Análisis de aminas biogénicas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)*. La cromatografía de líquidos HPLC se define como una técnica de separación que involucra una transferencia de masa entre una fase estacionaria y una fase móvil⁹⁴ y es la técnica más utilizada en el análisis de ABs. Debido a la ausencia de cromóforos en estos compuestos, es necesario formar derivados que absorban en ultravioleta o que sean fluorescentes, con el fin de facilitar su detección. Estos procesos conocidos como derivatizaciones se pueden realizar antes de la separación cromatográfica (pre-columna), o bien después de la misma (post-columna)⁹⁵. Para realizar el proceso de derivatización se han desarrollado metodologías que emplean diversos reactivos, siendo los más utilizados los que se resumen en la tabla 5:

Tabla 5. Reactivos más empleados en la derivatización de aminas biogénicas

Reactivo	Reacción con ABs	Derivatización	Método de separación	Detección	Desventajas
OPA ^{96,97}	1 ^a	Pre y post-columna	CFR (pre) CIC (post)	Fluorescencia	Inestabilidad del derivado isoindólico.
Cloruro de dansilo	1 ^a Y 2 ^a	Pre-columna	CFR	Fluorescencia	Derivados termolábiles
Cloruro de dabsilo	1 ^a Y 2 ^a	Pre-columna	CFR	Vis	Tolerancia limitada a la presencia de sales y metales.
Cloruro de benzoilo	1 ^a Y 2 ^a	Pre-columna	CFR	UV	Puede reaccionar con Nitrógeno de anillo imidazol

CFR: Cromatografía en fase Reversa, CIC: Cromatografía de Intercambio catiónico.

Fuente: Adaptada de PROESTOS, C., LOUKATOS, P. y KOMAITIS, M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *En: Food Chemistry*. **2008**, vol.106, no. 3, p.1218-1224.

⁹⁴GARCIA, Saurina y Hernandez, Cassou. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. *En: Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 575, no. 1, p. 97-105.

⁹⁵ CUNHA Op. Cit., p. 275-282.

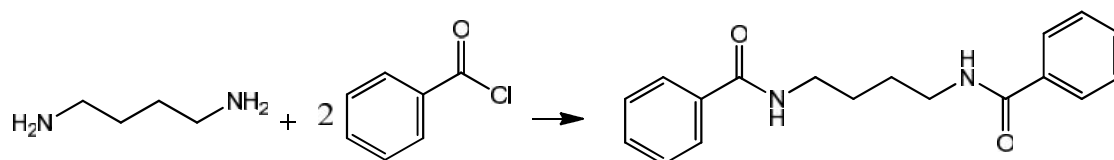
⁹⁶ CAROU. Op. Cit., 98-101 p.

⁹⁷ ALBULUSHI. Op. Cit., p. 369-377

Los reactivos de cloruro de acilo, como el cloruro de benzoilo, son los que mejores resultados han ofrecido para los análisis de ABs y hoy por hoy están siendo ampliamente utilizados. Este reactivo, presenta ventajas como tiempos cortos de derivatización y de elución en la columna cromatográfica.

El cloruro de benzoilo es un reactivo de estructura no tan compleja, accesible, y más económico en comparación con otros agentes derivatizantes. Su grado de pureza es menos crítico en comparación con el cloruro de dansilo. Los productos del proceso de derivatización (Benzamidas) presentan las ventajas de no ser fotosensibles y las reacciones para la formación de estos derivados no requieren altas temperaturas, ni el uso de buffers⁹⁸.

Figura 4. Reacción entre cloruro de benzoilo y putrescina bajo condiciones alcalinas (condensación Schotten-Baumann).



Fuente: MORGAN, David. Op. Cit., p. 112.

3.1.6.3 *Preparación de las muestras en el análisis de aminas biogénicas Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)*. El análisis de ABs en matrices complejas como alimentos, tejidos o compuestos biológicos puede traer muchas dificultades y bajos rendimientos dado que contienen compuestos potencialmente interferentes como sales, tampones y lípidos⁹⁹, los cuales ocasionan interferencias en el análisis cromatográfico. Por tanto, las muestras deben estar libres de estas sustancias antes de que tengan lugar los procesos de hidrólisis y derivatización, siendo necesario para ello realizar procedimientos selectivos de extracción y purificación a las muestras¹⁰⁰.

La elección del disolvente de extracción depende del tipo de matriz. Para el caso de líquidos, existe una gran variedad de solventes, los cuales se pueden emplear en mezcla y con agentes modificadores del pH. Sin embargo, la desventaja de la extracción líquido-líquido para este tipo de matrices radica en la formación de emulsiones (debido a una baja tensión interfacial de la fase dispersa respecto de la dispersante) y el uso de solventes tóxicos e inflamables. En la actualidad, para este tipo de matrices se ha empleado la extracción en fase sólida como una

⁹⁸ ÖNAL. Op. Cit., p. 1483-1484.

⁹⁹ SUZZI, Op Cit., p. 41-54.

¹⁰⁰ LJERKA. Op. Cit., p. 1557.

alternativa adecuada y que presenta como ventaja una mayor eliminación de interferencias y pre-concentración en el cartucho de extracción. La desventaja frente a la extracción Líquido-Líquido (L-L) es el costo de cartuchos selectivos para estos compuestos¹⁰¹.

Para muestras solidas en alimentos y tejidos se ha reportado el uso de soluciones acidas, como ácido perclórico 0,6 M, ácido tricloroacético (6-15%) y ácido clorhídrico 0,1 M. La extracción y recuperación de ABs puede incrementarse con el uso de soluciones salinas saturadas y el control de pH. La eficiencia de la extracción depende del tipo de solvente o solución de extracción, el tipo de amina biogénica y la matriz de análisis¹⁰².

La tabla 6 consigna algunas metodologías por cromatografía líquida, que incluyen procedimientos de extracción, derivatización y análisis en diferentes matrices alimentarias.

Tabla 6. Procedimientos para el análisis de aminas biogénicas en muestras de alimentos.

Muestra	Amina	Tratamiento de la muestra	Derivatización	Condiciones Cromatográficas
Pescado, Vino	Histamina	Ácido perclórico al 6%	Post-columna con OPA	Columna ODS(2) 250 mm x 4.6 mm, 5 µm Fase móvil: Acetonitrilo: Buffer Fosfato pH 7,0 Detección: FLD
Pescado	Histamina, putrescina, cadaverina, Espermina	Ácido tricloroacético al 5%	Pre-columna con Cloruro de Dansilo a 60°C x 55min	Columna: C8 250 mm x 3 mm , 10 µm Fase móvil: Metanol:Acetonitrilo:Ac Acético 0,02M Gradiente de separación Detección UV 254nm
Pescado	Varias aminas	Ácido tricloroacético al 5% 60°C x 15min	Precolumna con Cloruro de Dansilo a 60°C x 55min	Columna de Silica fase normal 250 mm x 4.6 mm Fase Móvil: n-Hexano: acetato de etilo (40:60) con adición de aminoetanol al 0,01% Detección: FLD

¹⁰¹ Ibid., p. 1549.

¹⁰² ÖNAL. Op. Cit., p. 1484.

Tabla 6. (Continuación)

Carne, pescado, queso	Varias aminas	Ácido clorhídrico 0,1M	Precolumna con Cloruro de Dansilo a 40°C x 60min	Columna C18 150 mm x 4.6mm, 3 µm Fase Móvil: Acetonitrilo : Agua Detección UV 214nm
Pescado	Varias aminas	Ácido tricloroacético al 6%	Precolumna con Cloruro de Benzoilo 24°C x 40 min	Columna: ODS(2) 125 mm x 4.6mm, 5 µm Fase Movil: Acetonitrilo: Agua Gradiente de separación Detector UV 254nm
Pescado	Histamina, tiramina, putrecina y espermidina	Ácido tricloroacético 6%	Precolumna con Cloruro de Benzoilo 30°C x 45 min	Columna C18 250 mm x 4.6mm, 5 µm Fase Movil: Metanol:agua (70:30) Detector UV 254nm
Pescado enlatado	Varias aminas	Extracción con Metanol	Pre-columna con cloruro de dansilo	Columna C18 150 mm x 3,9mm, 4 µm Fase Movil: Acetonitrilo:Metanol:Agua (1:2:1) Detector UV 214nm
Pescado y productos de la pesca	Varias aminas	Ácido preclórico 0,6 M	Post-columna con OPA	Columna C18 150 mm x 3,9mm, 4 µm Fase Movil: A: Acetato de Sodio 0,1M y ácido octanosulfónico 10mM (pH 5,2) B: Acetonitrilo, acetato de sodio 0,2 M y ácido octanosulfónico 10mM (pH 4,5) Detector fluorimétrico (excitación 340 nm, emisión 495 nm)
Sardina	Histamina	Ácido tricloroacético 10%	Post-columna con OPA	Columna C18 1250 mm x 4,6mm, 5 µm Fase Movil: Gradiente de elución con Acetato de Sodio (pH 6,2) Detector fluorimétrico (excitación 350 nm, emisión 450 nm)

Fuente: ROMERO, R., et al. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *En: Journal of Chromatography*. 2000, vol. 871, no. 1-2, p. 75-83.

3.2 GENERALIDADES DE LAS ESPECIES TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*) y TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO

El Departamento de Nariño presenta una economía tradicional, basada en el sector primario; donde las actividades productivas del subsector de la acuicultura y la pesca, han permitido generar procesos de transformación socio empresariales y a su vez han garantizado seguridad alimentaria a través de especies rentables y ambientalmente sostenibles. En la actualidad, el municipio de Pasto es uno de los mayores productores y comercializadores de especies piscícolas como la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis niloticus*), Cachama (*Piaractus brachypomus*) y Carpa (*Cyprinus carpio*)¹⁰³.

3.2.1 Trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)

Figura 5. Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*)



Fuente: FISH BASE. A Global Information System on Fishes. [en línea]. [citado el 24 de noviembre de 2015]. Disponible en < www.fishbase.org>

La trucha arco iris, perteneciente a la familia Salmonidae, se caracteriza por presentar un cuerpo alargado, fusiforme y cabeza relativamente pequeña que termina en una boca grande puntiaguda, hendida hacia el nivel de los ojos y con una fila de dientes fuertes en cada una de las mandíbulas que le permiten aprisionar las presas capturadas.

Se distinguen por sus numerosas y pequeñas manchas oscuras y por sus diminutas escamas; así como la línea iridiscente que recorre el cuerpo a ambos costados. Hacia la mitad del cuerpo se encuentra una primera aleta dorsal formada únicamente por radios blandos; posteriormente a esta aparece una pequeña aleta de unción desconocida y de carácter adiposo; opuesta a esta y ventralmente se haya la aleta anal. Por su parte las aletas pares son las

¹⁰³ GOBERNACIÓN DE NARIÑO. Plan de Desarrollo Departamental, “Nariño Mejor”, [citado el 01 de febrero de 2014]. Disponible en <<http://www.narino.gov.co/files/PlandeDesarrollo/PLANDEDESARROLLONARINOMEJOR2012-2015.pdf>>

pectorales y las pélvicas o ventrales ubicadas en la sección media posterior al pez. La trucha arco iris tiene un peso entre 1 y 3 Kilogramos en su edad adulta; y una longitud máxima de 120 cm, aunque lo normal es una longitud máxima de 60 cm.

Su composición nutricional está determinada por humedad (69,8-75,9%), proteína total (17,8-20,4%), ceniza (1,0-1,2%) y grasa total (4,1-8,1%)¹⁰⁴. La clasificación taxonómica de esta especie según el Instituto Nacional de Pesca acuicultura INPA es el siguiente:

Reino: Animal
Phylum: Cordata
Subphylum: Vertebrada
Clase: Osteichthyes
Subclase: Actinopterygii
Orden: Clupeiformes
Familia: Oncorhynchus
Especie: *Oncorhynchus mykiss*
Nombre común: Trucha arco iris

3.2.2 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Figura 6. Tilapia Roja (*Oreochromis niloticus*)



Fuente: FISH BASE. A Global Information System on Fishes. [en línea]. [citado el 24 de noviembre de 2015]. Disponible en < www.fishbase.org >

Tilapia es un término genérico utilizado para designar un grupo de especies de peces de valor comercial pertenecientes a la familia Cichlidae; la expresión deriva de la palabra nativa de Bechuana (África) "thlape" que significa Pez.

¹⁰⁴ PEREA, Op Cit., p. 91-97.

La tilapia Roja también conocida como mojarra roja, mojarra cardenal y pargo rojo se caracteriza morfológicamente por tener un cuerpo oblongo con aleta dorsal larga de 21-32 espinas, llegan a alcanzar los 60 cm de longitud total y los 4,324 kg de peso. El cuerpo de la tilapia Nilotica es generalmente comprimido y a menudo discoidal, raramente alargado, predominantemente de color gris plata y rosa hacia los lados aunque en época de reproducción la coloración se torna más oscura¹⁰⁵.

Su composición nutricional está determinada por humedad (72,3-76,9%), proteína total (18,4-20,8%), ceniza (1,1-1,5%) y grasa total (2,2-4,5%)¹⁰⁶. La clasificación taxonómica según el Instituto Nacional de Pesca acuicultura INPA es el siguiente¹⁰⁷:

Reino: Animal
Phyllum: Chordata
Subphylum: Craneata
Clase: Actinopterygii
Subclase: Gnathostomata
Orden: Perciformes
Familia: Cichlidae
Género: Oreochromis
Especie: niloticus
Nombre común: Tilapia Roja.

3.3 PROBIÓTICOS USADOS EN LA PRODUCCIÓN ACUÍCOLA.

El término probiótico, se podría definir como un suplemento alimentario, microbiológico con efectos beneficiosos para el albergue animal¹⁰⁸. Entre los microorganismos que han presentado propiedades probióticas en peces se encuentran los géneros: Carnobacterium, Pediococcus, Lactococcus,

¹⁰⁵ CASTILLO, Campo. Tilapia Roja 2001: Una evolución de 20 años de la incertidumbre al éxito doce años después. [en línea]. Cali-Colombia. [citado el 12 de abril de 2015]. Disponible en <<http://www.ag.arizona.edu/azaqua/ista/edited,tedpapers/south%20A122>>

¹⁰⁶ PEREA, Aide, et al. Caracterización nutricional de pescados de producción y consumo regional en Bucaramanga, Colombia. ALAN [online]. 2008, vol. 58, n. 1, p. 91-97. ISSN 0004-0622

¹⁰⁷ SOLARTE GUEVARA, Ana. Evaluación de diferentes densidades en incubación de huevos de tilapia roja (*oreochromis sp*), mediante un sistema de incubación artificial, en la estación piscícola alto Magdalena, Gigante, Huila, Colombia. Pasto, Colombia. Trabajo de grado (Ingeniero en producción acuícola), Universidad de Nariño, Facultad de ciencias pecuarias, Programa de ingeniería en producción acuícola, **2008**, 27-34 p.

¹⁰⁸ DECAMP, Oliver; MORIARTY David y LAVENS, Patrik. Probiotics for shrimp larviculture. review of field data from Asia and Latin America. En: Aquaculture Research. Marzo, **2008**, vol. 39, no. 4, p. 334-338.

Lactobacillus, Bacillus y Aeromonas, entre otras¹⁰⁹. Algunos de los probióticos comercializados en el mercado para uso en acuicultura se reportan en la tabla 7¹¹⁰, los cuales están formados por mezcla de microorganismos con actividad descarboxilasa responsable de la formación de las ABs histidina, tiramina, putrescina y/o cadaverina¹¹¹.

Tabla 7. Probióticos comercializados en el mercado para uso en acuicultura

Probióticos	Microorganismos
Mycolactor dry probiotic®	Saccharomyces cerevisiae, Enterococcus faecium, Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. plantarum y L. brevis
Inve sanolife® mic	Bacillus
Biogen®	Bacillus licheniformis y Bacillus subtilis
Bactocell®	Pediococcus acidilactici

Fuente: DE LAS RIVAS. Op Cit., p. 2509-2514

3.4 DEFICIENCIAS TÉCNICAS SANITARIAS EXISTENTES EN LOS EXPENDIOS DE PRODUCTOS ACUÍCOLAS EN LA CIUDAD DE PASTO

Las deficiencias técnicas sanitarias durante la captura, transporte, manipulación y conservación del producto acuícola traen como consecuencia la proliferación de microorganismos patógenos y con ello la alteración o degradación del alimento.

En la mayoría de los casos, la alteración de estos alimentos, se debe al crecimiento no deseado de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, las cuales, producen proteasas y lipasas termoestables que contribuyen con la formación de compuestos orgánicos como las aminas volátiles y la aminas biogénicas que además de ser responsables de los olores y sabores repugnantes en los alimentos en descomposición generan riesgos de intoxicación en la población consumidora¹¹².

¹⁰⁹ BRUNT, Jason; NEWAJ-FYZUL, Aweeda y AUSTIN, Brian. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *En: Journal Fish Dis.* Octubre, **2007**, vol. 30, no. 10, p. 573-9.

¹¹⁰ FERGUSON, Rosemary, et al. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *En: Journal of Applied Microbiology.* Marzo, **2010**, vol. 109, no. 3, p. 851-862.

¹¹¹ DE LAS RIVAS, B, et al. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *En: Journal of Food Protection.* Octubre, **2006**, vol. 69, p. 2509-2514.

¹¹² RODRÍGUEZ. Op. Cit., 19-22 p.

Aunque en la actualidad se busca poner en práctica una serie de normas sanitarias para controlar las fuentes de contaminación sobre el producto acuícola; estudios realizados por Hernández¹¹³ en expendios de pescado en la ciudad de San Juan de Pasto reportan el hallazgo de microorganismos como *salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus spp.*, y *Streptococcus spp.* que presentan actividad aminoacildescarboxilasa y estarían implicadas en la síntesis de ABs.

En otro estudio realizado a los expendios de productos acuícolas los autores Bastidas *et al.*¹¹⁴ definieron las condiciones mínimas de salubridad e higiene para los establecimientos, tomando como referencia la incidencia microbiológica en los productos, procesos de manipulación por parte del operario, distribución general y estado sanitario del lugar, encontrando que los microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus sp.* sobrepasaban los límites permisibles.

Los anteriores resultados ponen en manifiesto la existencia de deficiencias en las técnicas sanitarias de comercialización de productos de la pesca y la presencia de microorganismos responsables de la formación de ABs, lo cual sirve como índice de referencia para la presente investigación.

¹¹³ HERNÁNDEZ, Iván. Op cit., p.12-15.

¹¹⁴ BASTIDAS, Luis, *et al.* Evaluación sanitaria de la calidad microbiológica de productos acuícolas en la ciudad de San Juan de Pasto. En: *Centro de estudios en salud*. Noviembre, 2005, vol. 1, no. 6, p. 22-32.

4. METODOLOGIA

4.1 CONSIDERACIONES GENERALES

La línea de investigación a la cual pertenece este proyecto es "Control y Contaminación de Alimentos", del Grupo de Investigación Estudios de Sistemas Contaminantes (GIESIC) de la Universidad de Nariño.

4.2 LOCALIZACIÓN

El presente proyecto se desarrolló en los laboratorios de Cromatografía del Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN) y de la Universidad de Nariño, y comprendió las tres etapas siguientes:

a) Validación de la técnica cromatográfica de análisis b) Extracción (sólido-líquido) de histamina, tiramina y putrescina con ácido tricloroacético (TCA 6%), c) identificación y cuantificación de las ABs de estudio en las dos especies de mayor producción y consumo en el municipio de Pasto: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*).

4.3 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

4.3.1 Equipos

-] Balanza analítica, Adventures (precisión 0,1 mg).
-] Purificador de Agua Simplicity de Millipore.
-] Baño Ultrasónico VWR Modelo 97043-952.
-] Rota-evaporador, Heidolph WB 2000.
-] pH-Metro, Metrohm.
-] Baño de agua termostático.
-] Espectrofotómetro, Thermo Electron.
-] Vortex de contacto V1 Plus, Boeco.
-] Cromatógrafo líquido de Alta Resolución HPLC Agilent 1200, equipado con:
 - Bomba cuaternaria.
 - Desgasificador online.
 - Detector de longitud de onda variable G1314b/G1314C.
 - Horno de columna Serie G1316A.
 - Automuestreador.
 - Software Chemstation de Agilent, Versión 0302.

Figura 7. Cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1200



Fuente: Esta Investigación

4.3.2 Material de laboratorio

-] Pipetas graduadas y volumétricas, Silberbrand y Blaubrand.
-] Micropipetas de 10-100 μL , 100 –1000 μL y 1 – 10 μL , Transferpette.
-] Micro jeringas de 25 y 50 μL , Agilent.
-] Acrodiscos, filtros de jeringa GHP (pall) de 0,45 μm .
-] Balones Aforados en vidrio transparente y de boro silicato, Glassco y Duran.
-] Papel filtro cualitativo franja azul 125 mm de diámetro, Whatman.
-] Viales de 1.5 ml, Agilent.
-] Material volumétrico clase A, certificado.
-] Columna C18, 250 X 4.6 mm, 5 μm , Agilent.
-] Columna C18, 250 X 4.6 mm, 5 μm , Thermo Scientific.

4.3.3 Reactivos y Solventes

Éter Etílico AR-ACS de Burdick Jackson (99,9%), Metanol MeOH/HPLC de Mallinckrodt; HCl, NaOH, NaCl, TCA, Nitrógeno grado 5, Cloruro de benzoilo de (99,9%), Agua ultrapura (18 M cm^{-2}) producida con el sistema Simplicity.

4.3.4 Estándares

Las ABs estándar: histamina, tiramina, putrescina al (99%) se adquirieron de Sigma.

4.4 MONTAJE DEL MÉTODO

4.4.1 Preparación de las soluciones estándar de aminas biogénicas

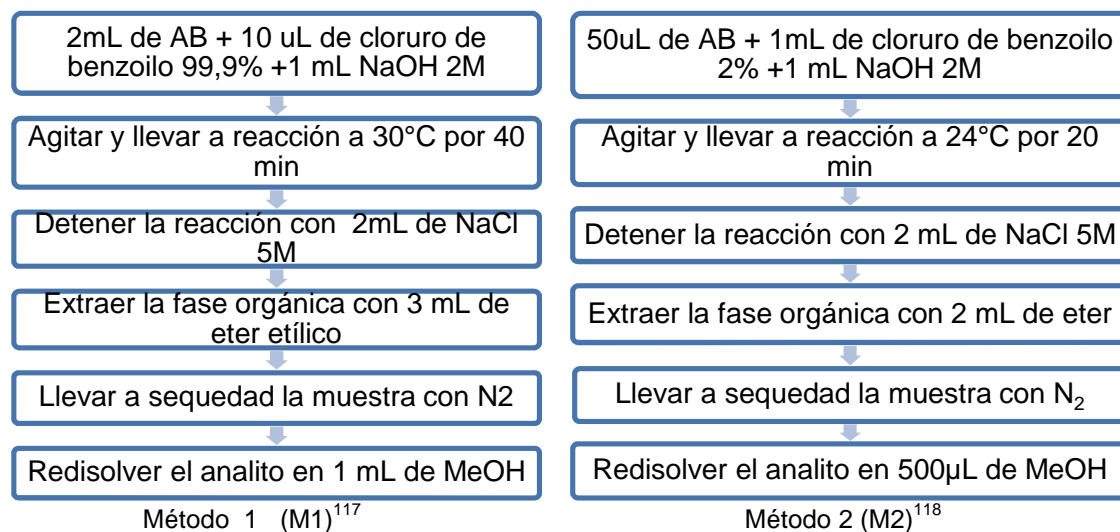
Las soluciones estándar de ABs se prepararon a una concentración de 1000 mg.L⁻¹ en HCl 0,1M, como solución stock. De esta solución se obtuvieron todas las concentraciones mediante diluciones. Las soluciones stock fueron almacenadas a 4°C.¹¹⁵

4.4.2 Preparación de las soluciones estándar de trabajo de aminas biogénicas

A partir de las soluciones stock, se realizaron una serie de diluciones para obtener las soluciones de trabajo de las ABs con concentraciones comprendidas en el intervalo 0-100 mg.L⁻¹ de acuerdo a los límites máximos establecidos por la legislación nacional, según la Resolución 776 de 2008¹¹⁶.

4.4.3 Evaluación del proceso de derivatización

Figura 8. Métodos evaluados para el proceso de derivatización de ABs.



¹¹⁵ PINEDA LALLEMAND, Ángela. Estudio de la variabilidad del contenido de aminas biógenas en vinos chilenos de acuerdo a cepaje y denominación de origen. Tesis de Maestría en Ciencias farmacéuticas, Universidad de Concepción, Facultad de Farmacia, Departamento de farmacia, **2009**, 38 p.

¹¹⁶ MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. [en línea]. [Citado el 13 de abril de 2016] Disponible en <http://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_minproteccion_0776_2008.html>

¹¹⁷ ZAREI, Medhi, et al. Biogenic Amines Content of Canned Tuna Fish Marketed in Iran. American-Eurasian. En: Journal of Toxicological Sciences. 2011, vol. 3, no. 3, p. 190-193.

¹¹⁸ ZOGUL, Fatih, et al. Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. En: International Journal of Food Science and Technology. 2002, vol. 37, p. 515-522.

Una mezcla de ABs a una concentración de 100 mg.L⁻¹ se derivatizó por duplicado con cada uno de estos protocolos y se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas por Zarei¹¹⁹, las cuales consistieron en un análisis isocrático con una fase móvil compuesta por MeOH:H₂O en proporción 70:30 (v/v) a una longitud de onda de 254nm y con un flujo de 1mL min⁻¹. Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna analítica C18 (Agilent, 250mm x 4,6mm, 5µm).

Los análisis se realizaron en el laboratorio de cromatografía de la Universidad de Nariño en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector UV/VIS de arreglo de diodos (HPLC-PDA). El método seleccionado se replicó bajo las mismas condiciones en el laboratorio del Instituto Departamental de Nariño en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector UV/VIS de onda variable (HPLC-VWD).

4.4.4 Identificación y verificación de los picos cromatográficos de cada derivado

La identificación de las señales cromatográficas se realizó por medio de los tiempos de retención obtenidos para los estándar de ABs, Para ello, cada estándar de AB y la mezcla de las mismas se derivatizó a una concentración de 100 y 50 mg.L⁻¹ y se inyectaron en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector ultravioleta (HPLC-VWD), bajo las mismas condiciones cromatográficas propuestas por Zarei¹²⁰.

4.4.5 Determinación de condiciones cromatográficas de análisis

4.4.5.1 *Selección del Flujo óptimo de la fase móvil.* El flujo óptimo de la fase móvil para la columna fue obtenida mediante curvas de Van Deemter, a partir de una disolución estándar de putrescina como soluto de prueba, utilizando MeOH:H₂O como fase móvil. Para ello, se preparó una solución de putrescina a una concentración de 50 mg.L⁻¹ y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos manteniendo las condiciones cromatográficas anteriormente mencionadas pero variando los flujos de fase móvil en el rango de 0,5-1,0 mL min⁻¹.

Para trazar la curva de van Deemter, fue necesario calcular primero el valor del número de platos teóricos (N) y la altura equivalente de platos teóricos (H) en cada condición de flujo de fase móvil, haciendo uso de fórmulas matemáticas para el cálculo de parámetros cromatográficos (Anexo A).

Una vez calculados, se realizó la representación gráfica de la ecuación de van Deemter (altura equivalente de plato teórico (H) frente a flujo de fase móvil), con objeto de precisar el mínimo de la curva.

¹¹⁹ ZAREI. Op. Cit., p. 190-193.

¹²⁰ Ibid., p. 190-193.

4.4.5.2 *Determinación de la composición de la fase móvil.* Para mejorar el análisis de las ABs en estudio, se realizaron varias pruebas en modo de separación gradiente (tablas 8-10), usando una mezcla de estándares de putrescina, histamina y tiramina a una concentración de 50 mg.L⁻¹.

Tabla 8. Gradiente 1 programado para el análisis de ABs.

Periodo	Tiempo (min)	Metanol (%)	Agua (%)
	0,0	50	50
Elución	0,5	50	50
	7	85	15
	12	85	15
Retorno y equilibrio	14	50	50

Fuente: TSAI, Yung, et al. Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *En: Science direct.* Septiembre, 2005, vol. 16, no.7, p. 579-585

Tabla 9. Gradiente 2 programado para el análisis de ABs.

Periodo	Tiempo (min)	Metanol (%)	Agua (%)
	0,0	50	50
Elución	6	80	20
	7	85	15
	12	85	15
Retorno y equilibrio	15	50	50

Fuente: Esta Investigación

Tabla 10. Gradiente 3 programado para el análisis de ABs.

Periodo	Tiempo (min)	Metanol (%)	Agua (%)
	0,0	50	50
Elución	5	85	15
	6	70	30
	10	70	30
	14	50	50
Retorno y equilibrio	14	50	50

Fuente: Esta Investigación

Los análisis se realizaron a una temperatura de columna de 30°C, una longitud de onda de 254nm y una velocidad de flujo de 0,8 mL min⁻¹. Con las condiciones de análisis a diferente gradiente, se calcularon los parámetros: k', Rs, y N para cada pico (haciendo uso de las ecuaciones matemáticas del anexo A) y a partir de ellos se determinaron las mejores condiciones de elución para el análisis de ABs.

4.4.6 Optimización del sistema cromatográfico para el análisis de ABs

Para la optimización del sistema cromatográfico se preparó una mezcla de estándares de ABs a una concentración de 50 mg.L⁻¹ y se utilizó un modelo estadístico multivariado, específicamente un diseño Central Compuesto (DCC) con dos puntos centrales, tomando como variables de estudio: el flujo, longitud de onda y temperatura de columna y como variables respuesta: el área, tiempos de retención y resolución de los picos cromatográficos de cada AB. El diseño experimental con sus factores y niveles se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Factores a evaluar en la optimización del sistema cromatográfico para el análisis de ABs.

Factores	Niveles	
	Valor Mínimo	Valor máximo
Flujo (mL min ⁻¹)	0,5	1,0
Temperatura de la columna (°C)	20	40
Longitud de onda (nm)	230	275

Fuente: Esta Investigación

4.4.7 Condiciones cromatográficas finales

Las condiciones cromatográficas obtenidas de las secciones 4.4.5 y 4.4.6, fueron usadas para realizar el análisis cromatográfico de las ABs putrescina, histamina y tiramina, las cuales consistieron en una separación en gradiente utilizando como fase móvil MeOH:H₂O (Tabla 9) a un flujo de 0,8 mL min⁻¹, una columna cromatográfica Agient C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), a 30°C de temperatura y una longitud de onda de 230 nm.

4.4.8 Optimización del proceso de derivatización de ABs

En condiciones cromatográficas óptimas (*sección 4.4.7.*) se procedió a optimizar el protocolo de derivatización elegido en la sección 4.4.3, manteniendo fija la concentración de ABs en un valor de 50 mg.L⁻¹ y tomando como factores de estudio: la cantidad de derivatizante, el tiempo y la temperatura de reacción.

Se realizó un diseño factorial de screening 2^3 con un punto central, debido a que se desconocían los factores que estaban afectando el proceso de derivatización y con este diseño se buscaba determinar cuáles de los factores anteriormente seleccionados eran críticos en la derivatización de las ABs en estudio. Las variables respuesta para cada experimento fueron el área de los picos cromatográficos significativos y el número de picos cromatográficos interferentes.

Todos los experimentos fueron inyectados por duplicado ($n=2$) y en orden aleatorio para aportar protección contra el efecto de variables ocultas. Los factores y niveles se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Factores y niveles del diseño factorial de screening 2^3 para la optimización del proceso de derivatización de ABs

Factores	Niveles	
	Valor Mínimo	Valor máximo
t_{rx} (min)	20	60
T_{rx} (°C)	25	45
V_d (uL)	5	15

t_{rx} =tiempo de reacción; T_{rx} =Temperatura de reacción; Volumen de derivatizante

Fuente: Esta Investigación

Una vez identificados los factores influyentes (utilizando el diseño factorial anterior), se procedió a optimizar el proceso de derivatización, aplicando un nuevo diseño experimental de superficie de respuesta.

Para el nuevo diseño de dos factores se requirieron $N= 2^2 + 2 \times 2 + 2= 10$ experimentos, incluyendo dos réplicas del punto central. Todos los experimentos fueron inyectados en orden aleatorio con el fin de minimizar los efectos de los factores incontrolables que pueden producir sesgo en las respuestas. Las respuestas observadas para cada experimento fueron nuevamente el área de picos cromatográficos y número de picos interferentes. Los factores y niveles se muestran en la tabla 13. Hay que resaltar que al no considerarse el tiempo como un factor influyente, se mantuvo constante, de acuerdo con el valor reportado por la literatura (40 min)¹²¹.

¹²¹ ZAREI. Op. Cit., p. 190-193.

Tabla 13. Factores y niveles del diseño DCC 2² para la optimización del proceso de derivatización de ABs

Factores	Niveles		
	Nivel (-)	Punto central	Nivel (+)
T _{rx} (°C)	20	30,0	35
V _d (uL)	10	12,5	15

Trx: Temperatura de reacción; *Vd:* Volumen de derivatizante (cloruro de benzoilo).

Fuente: Esta Investigación

4.4.9 Condiciones Finales del proceso de derivatización de ABs.

Los derivados benzoílicos de las aminas biogénicas, se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito por Zarei¹²² considerando algunas modificaciones obtenidas como resultado del desarrollo de los diseños experimentales, (sección 4.4.8). Dos mililitros de las soluciones de aminas se homogenizaron con 1 mL de hidróxido de sodio 2 M y 15 µL de cloruro de benzoilo al 99,9%. La solución resultante se incubó durante 40 min a 20°C, con agitación continua. Posteriormente se agregaron 2 mL de una solución de NaCl 5 M y las amidas resultantes se extrajeron con 3 mL de éter etílico. La fase orgánica, fue evaporada hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno y el residuo fue redisolto en 500 µL de metanol grado HPLC. Finalmente, las muestras fueron filtradas a través de acrodiscos de 0,45 µm e inyectadas en el sistema cromatográfico.

4.4.10 Evaluación del proceso de extracción de ABs

Se evaluaron cuatro protocolos de extracción (anexo E) por duplicado, utilizando como soluto de prueba, muestras de pescado fortificadas con estándares de ABs a una concentración de 35 mg.L⁻¹. En cada caso se determinó el porcentaje de recuperación, de acuerdo con la ecuación 1¹²³.

$$\%RC = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

C_{MA} = Concentración promedio de la muestra adicionada

C_M = Concentración promedio de la muestra no adicionada (Blanco de matriz)

C_A = Concentración conocida adicionada a la muestra

¹²² ZAREI. Op. Cit., p. 191.

¹²³ MILLER, James. Estadística y quimiometría para Química analítica. 4 ed. Madrid: Pearson Education, 2002, 145 p.

4.4.11 Optimización del proceso de extracción de ABs

El protocolo de extracción elegido en la sección 4.4.10 se optimizó mediante un diseño factorial multinivel 3^2 manteniendo fija la concentración de ABs en un valor de 50 mg.L^{-1} y tomando como factores experimentales el tiempo y el número de extracción (con alícuotas de 15 mL de TCA al 6%) y como variable respuesta el porcentaje de recuperación de cada AB. El diseño experimental con los factores y niveles se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Factores y niveles del diseño factorial 3^2 para la optimización del proceso de extracción de ABs

Factores	Niveles		
	Nivel (-)	Punto central	Nivel (+)
t_{ag} (min)	15	30	60
Alícuotas (15 mL)	1	2	3

t_{ag}: tiempo de agitación

Fuente: Esta Investigación

Mediante la metodología de superficie de respuesta se optimizó la extracción de cada AB.

4.4.12 Condiciones finales del proceso de extracción de ABs

La extracción de las muestras se realizó de acuerdo con el método descrito por Tsai¹²⁴ considerando algunas modificaciones, obtenidas a partir del proceso de optimización (sección 4.4.11). Cinco gramos de muestra de pescado se homogenizaron con alícuotas de 15 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 6%. La mezcla se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C; y se filtró con papel Whatman no. 2. Los extractos obtenidos se llevaron a un volumen final de 50mL con TCA. Finalmente, dos mililitros de este extracto se utilizaron para realizar la derivatización de la muestra y su respectivo análisis cromatográfico.

4.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación se realizó según las recomendaciones de la Eurachem¹²⁵ y la interpretación de los resultados se hizo bajos los criterios de aceptación de la

¹²⁴Ibid., p. 579-585.

¹²⁵EURACHEM Guide. Terminology in Analytical Measurement. (2011). [en línea]. [citado el 17 de julio de 2015]. Disponible en <<http://www.eurachem.org>>

decisión de la comisión Europea de 12 de agosto de 2002¹²⁶ considerando los siguientes parámetros: linealidad, rango lineal, selectividad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), límites de confianza, sensibilidad (límite de detección y de cuantificación) y exactitud.

4.5.1 Rango Lineal y Linealidad

El rango lineal se determinó mediante un gráfico de concentración versus la respuesta del detector (Área/mUA.min). En este sentido las concentraciones que cubrieron el intervalo de trabajo se definieron tomando valores equidistantes cercanos al cero y superiores al LMP (100 mg.L^{-1})¹²⁷. Los porcentajes fueron 0,5, 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 y 195 % respecto de la concentración de interés. Finalmente, luego de realizar el gráfico y observar el comportamiento de la curva de cada AB, se estableció el rango lineal.

4.5.2 Evaluación del efecto matriz

Se trazaron dos curvas de calibración para cada AB, una con soluciones estándar y otra con adición de estándar sobre matriz. Este estudio se realizó para 7 niveles de concentración dentro del rango lineal de cada AB.

La evaluación del efecto matriz, se llevó a cabo a través de un análisis de varianza, mediante la comparación estadística de las pendientes y ordenadas en el origen de las rectas de calibrado.

4.5.3 Linealidad

Se trazó una recta de calibrado por análisis de muestras de pescado fortificadas con ABs con concentraciones conocidas dentro del rango lineal.

Cada solución se inyectó por triplicado, dado que un número mayor de repeticiones verifican la repetibilidad. La curva de calibración presentó la forma $Y=mx+b$ y los valores de la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación fueron encontrados a través del tratamiento de los datos aplicando el método de los mínimos cuadrados. Además se realizó una evaluación estadística con la prueba t-Student como un mejor indicador del modelo lineal y un análisis de varianza con el fin de probar la significancia estadística del modelo ajustado.

¹²⁶ CCE. CdICE. Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, **2002**, 1-29 p.

¹²⁷ MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución 122 de 2012 (enero 26). Op. Cit., 3 p.

4.5.4 Selectividad

Para determinar la selectividad del método se preparó una muestra enriquecida con una mezcla de ABs a una concentración de 50 mg.L⁻¹, la cual se inyectó por triplicado en el equipo de HPLC: Los resultados obtenidos como tiempos de retención, áreas y anchos de picos, de los analitos en estudio, fueron empleados para expresar la selectividad en términos de factor de capacidad, factor de selectividad y resolución, calculados mediante las ecuaciones del anexo A.

4.5.5 Sensibilidad

La sensibilidad del método se determinó en términos de límite de detección y el límite de cuantificación.

4.5.5.1 *Límites de detección y cuantificación.* La determinación de estos parámetros se hizo basada en la curva de regresión sobre matriz a niveles bajos de concentración de cada AB. Para ello se realizó lo siguiente:

Se determinó la pendiente de la curva de calibración (Concentración vs Área) de cada AB. A su vez, se preparó una 2^o curva de calibración (Concentración vs Área), con 3 niveles bajos de concentración sobre matriz dentro del rango lineal (1; 2,5 y 5 mg.L⁻¹ para todas las ABs), inyectando cada punto por triplicado. Se determinó la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapoló la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl}.

Se determinó la desviación estándar a cada concentración de la 2^a curva de calibración. Se determinó la recta de calibrado (concentración vs desviación estándar) y nuevamente se extrapoló la respuesta a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl}, correspondiente a la desviación estándar del blanco. Finalmente se calculó el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (3,3 LD) para n' medidas individuales, de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3¹²⁸.

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{m} \times \frac{1}{n'} \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$\text{Límite de cuantificación} = 3,33 \text{ LD} \quad (\text{Ecuación 3})$$

¹²⁸ QUINO, Israel; RAMOS, Oswaldo y GUISBERT, Elvira. Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea. *En: Revista Boliviana de Química*. **2007**, vol.24, no.1, p. 54.

Dónde:

Y_{bl} = es la respuesta cuando la concentración es igual a cero ($X=0$)

S_b = la desviación estándar del blanco

m = la pendiente de la curva de calibración

n = número de medidas individuales

4.5.5.2 *Comprobación experimental del límite de detección y cuantificación.* Para comprobar los límites de detección y cuantificación; se analizaron por triplicado, muestras de pescado fortificadas con las concentraciones de ABs dadas para los LD y LC teóricos. Para este ensayo se determinó coeficiente de variación.

4.5.6 Precisión

La precisión se evaluó mediante un estudio intradía e interdía determinando de esta manera la repetitividad y la precisión intermedia respectivamente. Para ello, se analizó la fluctuación de la concentración (a tres niveles) y de los tiempos de retención de cada AB. Los niveles de concentración seleccionados fueron para putrescina: 10, 50, 100 mg.L^{-1} ; histamina: 30, 80, 150 mg.L^{-1} y tiramina: 10, 50, 125 mg.L^{-1} . Cabe resaltar que para trabajar con 100 mg.L^{-1} de putrescina se realizó un factor de dilución, con el fin de incluirla dentro del rango lineal y poder cuantificar con una precisión adecuada.

4.5.6.1 *Repetibilidad (Estudio intradía).* Nueve determinaciones de la matriz fortificada en los tres niveles de interés se extrajeron, derivatizaron e inyectaron en el equipo de HPLC por el mismo analista, en el mismo día y con el mismo instrumento. La determinación de la repetibilidad se expresó en términos de la concentración media y el coeficiente de variación.

4.5.6.2 *Precisión Intermedia (Estudio interdía).* El proceso anteriormente nombrado se realizó en un período de seis días seguidos. Cada día, se prepararon los derivados y los resultados se expresaron en términos de concentración media y coeficiente de variación.

4.5.7 Intervalos de Confianza para tiempos de retención

Se determinaron los intervalos de confianza para los tiempos de retención de putrescina, histamina y tiramina en cada uno de los análisis llevados a cabo en la precisión intermedia, usando el programa statgraphics centurion XVI, versión 16.1.11.

4.5.8 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante ensayos de recuperación de ABs en una matriz negativa (se consideró matriz negativa a la muestra de trucha y tilapia,

correspondiente al día cero, ya que su contenido de ABs sería insignificante y/o nulo). Para esto, se determinó el porcentaje de recuperación del contenido de ABs en los lotes de muestras fortificadas analizadas durante los seis días, haciendo uso de la ecuación 1 (sección 4.4.10).

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los diseños experimentales utilizados para optimizar los procesos de derivatización, extracción y análisis de ABs (DCC y factorial multinivel), fueron planteados y analizados a través del programa statgraphics centurion XVI, versión 16.1.11.

De la misma manera, los datos experimentales obtenidos en el proceso de la validación y los test estadísticos usados como criterios de aceptación fueron evaluados con el programa estadístico statgraphics centurion XVI, versión 16.1.11.

4.7 DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGENICAS (PUTRESCINA, HISTAMINA Y TIRAMINA) EN TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO

4.7.1 Determinación de los puntos de muestreo

Se realizó una documentación de los expendios de productos piscícolas registrados ante la alcaldía municipal de Pasto. De estos, se seleccionaron aleatoriamente 8 expendios tomando como factor de muestreo el 25% del total de la población. Cabe resaltar que por motivos de seguridad, la identidad de los establecimientos no será reportada en esta investigación.

4.7.2 Tamaño muestral

Se constituyó por un total de 16 muestras de carne de pescado, distribuidas por igual entre las especies truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*).

El tamaño de la muestra se calculó atendiendo a la aplicación de la fórmula estándar para cálculo de la población finita:

$$n = Z_{\alpha}^2 \frac{N \cdot p \cdot q}{i^2 (N - 1) + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde:

n = tamaño de la muestra representativa que se desea obtener.

N = tamaño de la población.

Z = Valor correspondiente a la distribución de Gauss (siendo el nivel de confianza elegido). Z = 1,96 para $\alpha = 0,05$

i = error de la estimación. Error que se prevé cometer. (5%).

p= probabilidad que la variable estudiada se dé en la población.

q= probabilidad que la variable estudiada no se dé en la población.

Dado que en la ciudad de Pasto, no existen estudios previos de la variable estudiada (cantidad de ABs) en la población (productos piscícolas), solo hay dos posibilidades: que dicha variable se dé en la población o que no se dé. Aplicando lo anterior y teniendo en cuenta que la suma de probabilidad es 1 se deduce que $p = q = 0,5$.

Ahora, a un riesgo $\alpha = 0,05$ le corresponde un valor de Z = 1,96 y tomando $p = q = 0,5$ y sustituyendo estos valores en la ecuación 4, la fórmula se reduce a:

$$n = \frac{N}{i^2(N-1)+1} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En base a la aplicación de los criterios de cálculo anteriormente mencionados, se obtuvo un tamaño representativo sujeto a estudio de 8 muestras. Dado que el muestreo se realizó por duplicado en cada establecimiento, el tamaño de muestras fue de 16.

4.7.3 Procedimiento de muestreo

El muestreo se realizó el día lunes (día de mercado) en horas de la mañana. Las muestras tenían un peso comprendido entre 1-5 Kg y una longitud de 20-30cm y se empacaron al vacío en bolsas de poliestireno a una temperatura de -18°C hasta su llegada al laboratorio del Instituto departamental de salud de Nariño. El tiempo de transporte desde el momento de la toma de las muestras hasta su procesamiento fue de 30 minutos.

Figura 9. Muestras de trucha arcoiris y tilapia obtenidas de los 8 establecimientos de pesca.



Fuente: Esta Investigación

4.7.4 Pre- tratamiento de la muestra

De cada una de las muestras de pescado, se eliminaron cabeza, vísceras, cola y escamas. Enseguida, se cortaron en tres secciones perpendiculares a la columna vertebral de un grosor aproximado a 2.5 cm, una en la zona pectoral del lomo, otra a la mitad entre la primera sección y el conducto urogenital y la tercera sección exactamente atrás del conducto antes citado. Cada una de las secciones se deshuesaron y cortaron en filetes para pasar su contenido a un mezclador hasta que la muestra quedó lo suficientemente homogénea.

Finalmente se almacenaron a -18°C hasta su análisis; esto con el propósito de retardar la proliferación de microorganismos, así como para disminuir la velocidad con la que transcurren las reacciones químicas y enzimáticas deteriorativas de la carne¹²⁹.

Figura 10. Tratamiento previo de las muestras de pescado para el análisis de aminas biogénicas por HPLC-UV.



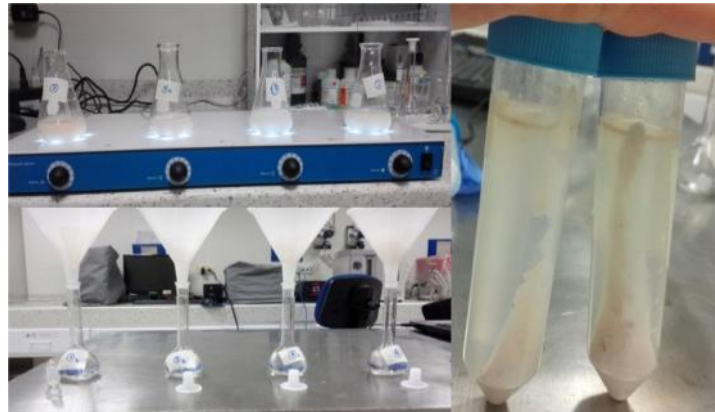
Fuente: Esta Investigación

4.7.5 Análisis de muestras

Las muestras de pescado se extrajeron mediante extracción sólido-líquido (*sección 4.4.12*), se derivatizaron (*sección 4.4.9*) y finalmente se analizaron por HPLC-UV utilizando la condiciones cromatográficas definidas en la *sección 4.4.7*.

¹²⁹ NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM. [en línea]. [citado el 17 de julio de 2016]. Disponible en <<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-541-1996.PDF>>

Figura 11. Imágenes del proceso de extracción de putrescina, histamina y tiramina en las muestras de pescado.



Fuente: Esta Investigación

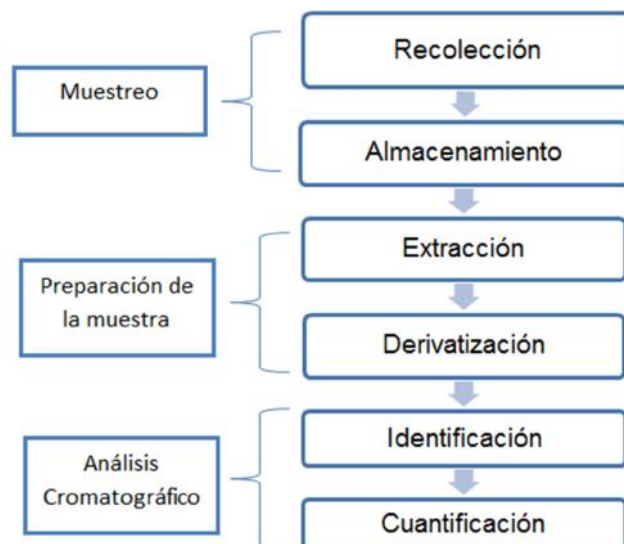
Figura 12. Imágenes del proceso de derivatización y análisis de putrescina, histamina y tiramina en las muestras de pescado.



Fuente: Esta Investigación

El procedimiento en general para la determinación de aminas biogénicas en especies piscícolas se muestra en el flujograma de la figura 13.

Figura 13. Diagrama de flujo de los procesos usados para la preparación y tratamiento de las muestras de pescado en el análisis de putrescina, histamina y tiramina.



Fuente: Esta Investigación.

4.7.6 Identificación y cuantificación

La identificación de putrescina, histamina y tiramina se hizo por comparación de los tiempos de retención de cada AB estándar con los tiempos obtenidos en cada muestra dentro de los intervalos de confianza. Por su parte, la cuantificación en mg.g^{-1} se realizó haciendo uso de las correspondientes ecuaciones de calibrado y porcentajes de recuperación para cada AB.

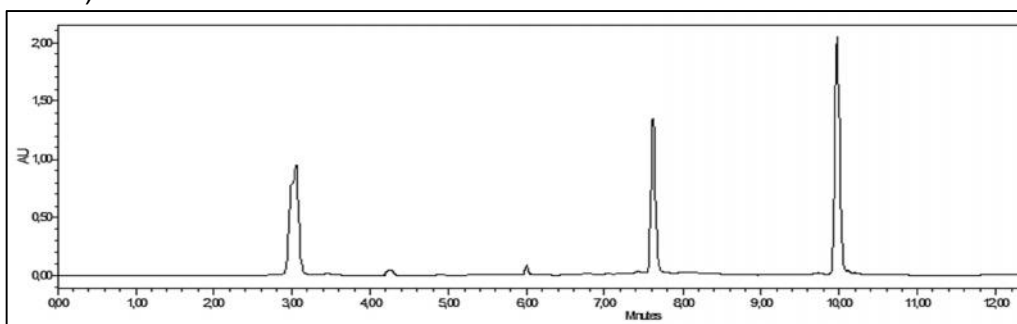
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE DERIVATIZACIÓN

El proceso de derivatización es un paso decisivo en el análisis de ABs ya que debido a la ausencia de cromóforos en sus estructuras es necesario derivatizarlas para permitir su detección en la región ultravioleta. Por lo tanto, se consideró imprescindible disponer de un método adecuado para la derivatización de putrescina, histamina y tiramina.

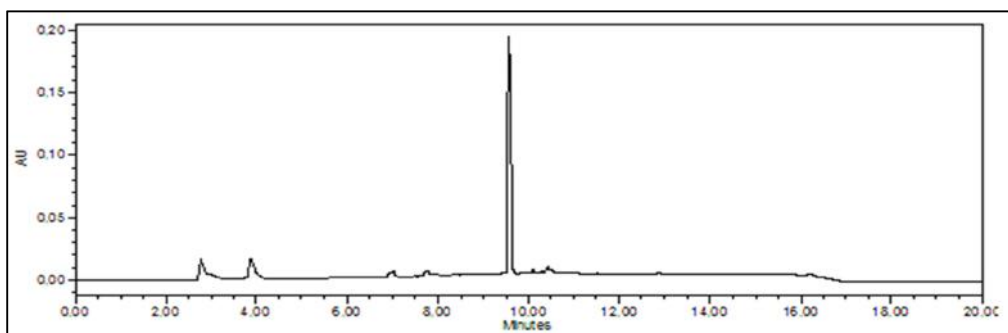
Como punto de partida, se evaluaron dos métodos de derivatización con cloruro de benzoilo (*figura 8, sección 4.4.3*), que habían sido citados en algunas investigaciones. En las figuras 14 y 15 se observan los cromatogramas obtenidos para estas dos metodologías, mediante HPLC-PDA.

Figura 14. Cromatograma obtenido para para putrescina, histamina y tiramina (100 mg.L^{-1}) derivatizadas con el método 1, y analizadas mediante HPLC-PDA ($\lambda = 254 \text{ nm}$)



Fuente: Esta Investigación.

Figura 15. Cromatograma obtenido para para putrescina, histamina y tiramina (100 mg.L^{-1}) derivatizadas con el método 2, y analizadas mediante HPLC-PDA ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

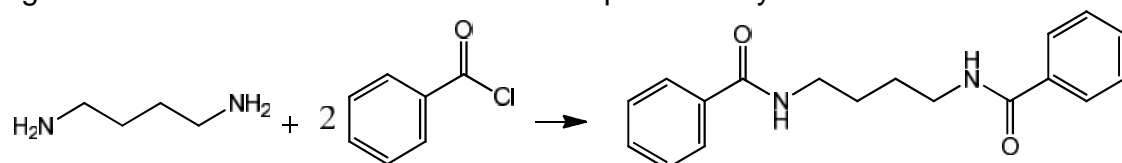


Fuente: Esta Investigación.

Como se puede observar en las figuras 14 y 15, con el método 1 fue posible apreciar tres señales cromatográficas completamente resueltas y que corresponden a los derivados de las tres ABs; mientras que con el método 2 sólo se evidenció una sola señal cromatográfica hasta los 30 minutos de análisis, razón por la cual se continuó la investigación con el método 1.

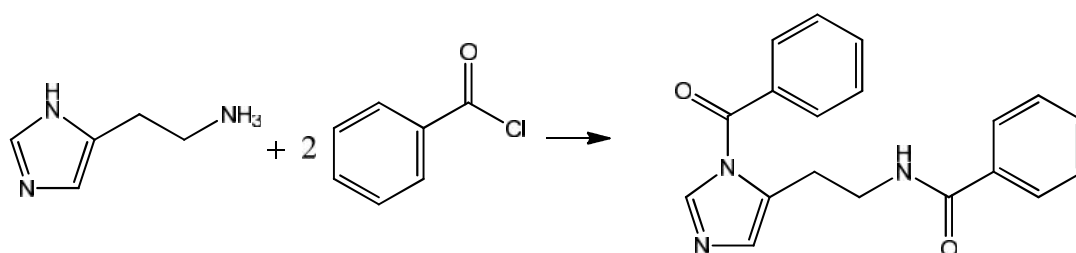
Las reacciones de derivatización para las tres ABs con cloruro de benzoilo se presentan en las figuras 16-18.

Figura 16. Reacción de derivatización entre putrescina y cloruro de benzoilo.



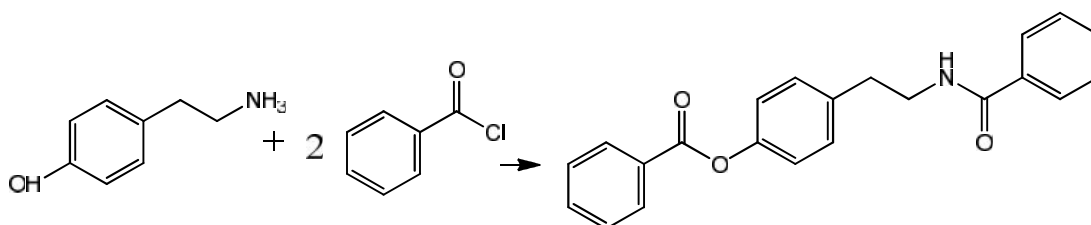
Fuente: MORGAN, David. Determination of Polyamines as Their Benzoylated Derivatives by HPLC. En: *Springer Protocols*. 1998, vol. 79, p. 112.

Figura 17. Reacción de derivatización entre histamina y cloruro de benzoilo.



Fuente: HOFMANN, Klaus. The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Imidazole and Its Derivatives. 6 ed. New York: John Wiley & Sons, 2009. p.155.

Figura 18. Reacción de derivatización entre tiramina y cloruro de benzoilo

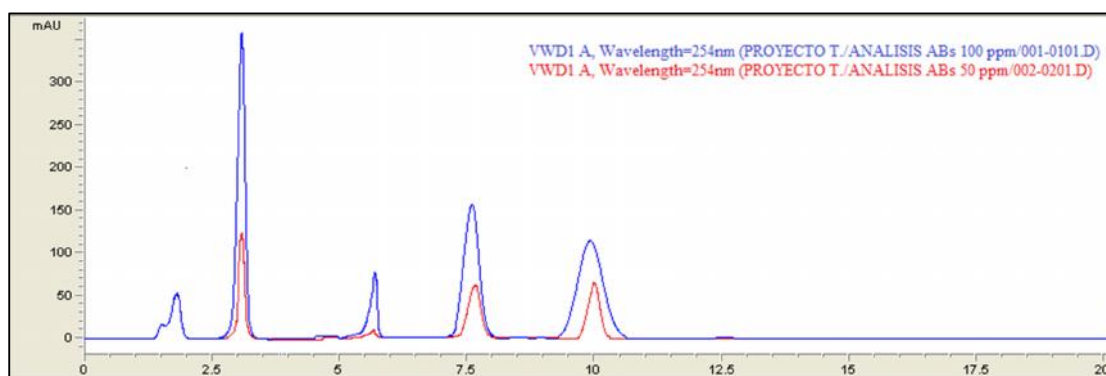


Fuente: Esta Investigación.

5.2 IDENTIFICACIÓN Y VERIFICACIÓN DE LOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

Una vez elegido el método de derivatización, se replicaron estos ensayos en un HPLC-VWD y se procedió a identificar y verificar los picos cromatográficos de cada analito. En la figura 19 se puede observar el cromatograma para este análisis y en la tabla 15 se consignan los resultados de la respuesta del detector en tiempos de retención.

Figura 19. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis isocrático para putrescina, histamina y tiramina (50 y 100 mg.L⁻¹), mediante HPLC-VWD.



Fuente: Esta Investigación.

La identificación de las señales cromatográficas se realizó con los tiempos de retención obtenidos para los estándares de ABs en análisis individuales (Anexo F). En este sentido, la primera señal cromatográfica corresponde al derivado de putrescina, la segunda al derivado de histamina y la tercera al derivado de tiramina. A su vez, el análisis de la desviación de los tiempos de retención en dos niveles de concentración con %CV menores a 1, permitió corroborar la identidad de cada pico cromatográfico (tabla 15).

Tabla 15. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs (a 50 y 100 mg.L⁻¹), mediante HPLC- DAD

Concentración (mg.L ⁻¹)	t _R Putrescina (min)	t _R Histamina (min)	t _R Tiramina (min)
50	3,02	7,61	10,28
100	2,99	7,59	10,26
X	3,01	7,60	10,27
%CV	0,71	0,14	0,14

Fuente: Esta Investigación.

El orden de elución determinado por los tiempos de retención de los estándares es acorde con la polaridad e hidrofobicidad de los derivados de cada AB. De este modo, el derivado de putrescina eluye rápidamente debido al establecimiento de puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo con la fase móvil. Por su parte, los derivados de histamina y tiramina son más retenidos debido a su hidrofobicidad. Este carácter hidrofóbico es mayor en el derivado de tiramina, puesto que la presencia del anillo aromático compensa la carga de las funciones polares, lo cual incrementa la interacción analito-fase estacionaria y permite su elución al final del cromatograma.

5.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISIS

Comparando los cromatogramas de las figuras 14 y 19 es posible evidenciar que las señales cromatográficas para histamina y tiramina se ensancharon en los análisis con HPLC-VWD. Por tanto, se determinó la eficiencia de la columna con el fin de incrementarla mediante la optimización de las condiciones de separación dadas por el flujo y composición de la fase móvil, buscando aumentar el número de platos teóricos que permitan picos más simétricos con mejor resolución en el menor tiempo posible.

La eficiencia de la columna cromatográfica se determinó calculando el número de platos teóricos (N) para cada pico cromatográfico, en la tabla 16 se consignan estos resultados.

Tabla 16. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de putrescina, histamina y tiramina mediante elución isocrática.

Pico	Amina Biogénica	t _R (min)	W (min)	N
1	Putrescina	3,005	0,122	9628
2	Histamina	7,575	0,202	22612
3	Tiramina	10,27	0,428	9230

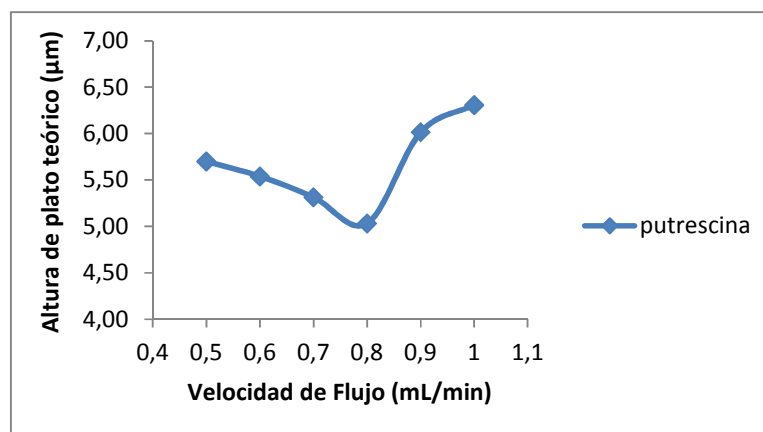
Fuente: Esta Investigación.

5.3.1 Selección del flujo óptimo de la fase móvil

El flujo óptimo de la fase móvil para la columna fue obtenida mediante curvas de Van Deemter, a partir de una disolución estándar de putrescina como soluto de prueba, utilizando MeOH/H₂O como fase móvil. Para realizar la representación de van Deemter, fue necesario calcular primero el valor del número de platos teóricos (N) y luego el de HETP (H) en cada condición de flujo de fase móvil, haciendo uso

de las ecuaciones 5 y 6 del Anexo A. De esta manera, según se observa en la figura 20 la máxima eficiencia para la columna cromatográfica (menor valor de H), se alcanza a valores de flujo de fase móvil de 0,8 mL min⁻¹.

Figura 20. Curva de Van Deemter para putrescina a 50 mg.L⁻¹, mediante HPLC-VWD.



Fuente: Esta Investigación.

5.3.2 Ajustes de la composición de la fase móvil

Para una separación adecuada de las ABs objeto de estudio, se consideró que se debían cumplir con los siguientes criterios técnicos¹³⁰, los cuales dependen considerablemente de la composición de la fase móvil¹³¹.

-) 0,5 k 20
-) > 1
-) Rs > 1,5
-) 0,9 factor de Asimetría (As) 1,5

En las condiciones de análisis isocrático anteriormente trabajadas, se obtenían tres señales cromatográficas completamente separadas pero muy anchas, además, la elución del derivado de putrescina ocurría muy rápido y podía presentarse solapamientos con sustancias polares interferentes provenientes de la matriz. Por tanto, y dado que la mezcla de ABs a separar tienen un amplio rango

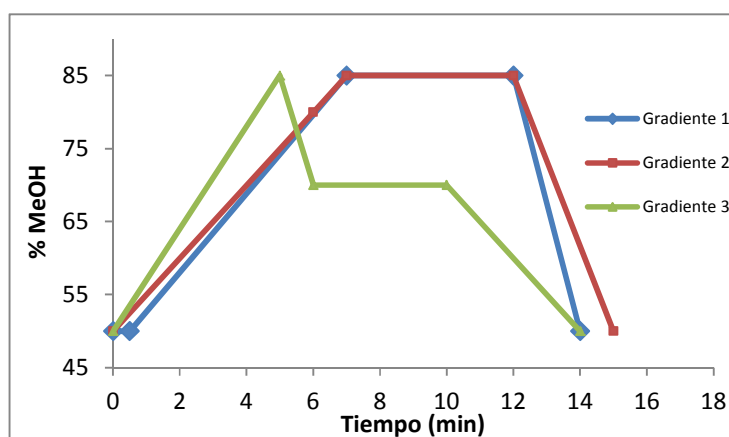
¹³⁰ SAN-CRISTÓBAL, Mara, *et al.* Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil. *En: Reduca (Biología). Serie Técnicas y Métodos.* Agosto, 2011, vol. 4. no. 3, p. 51.

¹³¹ *Ibid.*, p. 51.

de polaridad se consideró adecuado utilizar un sistema de elución por gradiente con el fin de aumentar la retención del primer analito y disminuir la retención de los dos últimos y así obtener señales cromatográficas más simétricas y con mayor altura, lo cual es muy importante en el análisis de trazas¹³².

De esta manera partiendo del gradiente propuesto por Tsai¹³³ se realizaron sucesivas pruebas de composición (Tabla 8-10, sección 4.4.5.2) hasta conseguir la mejor resolución y eficiencia en la separación cromatográfica. En la Figura 21 se representa de forma gráfica, cada uno de los gradientes evaluados.

Figura 21. Representación gráfica de los gradientes empleados en el análisis de putrescina, histamina y tiramina.



Fuente: Esta Investigación.

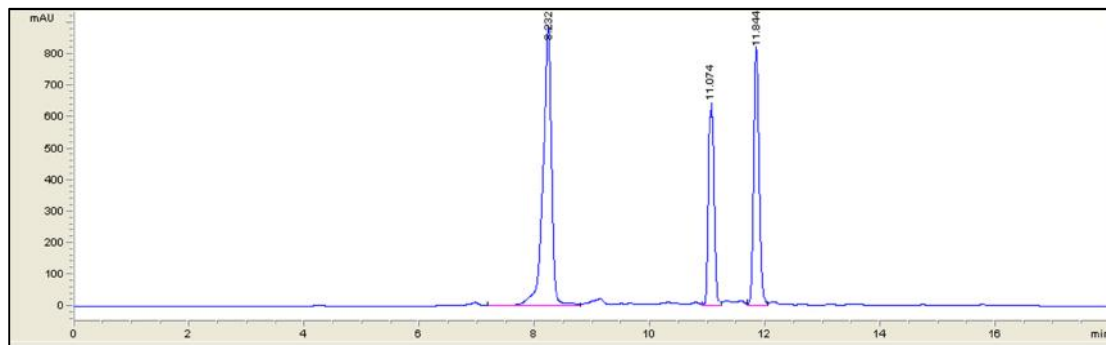
Cómo se puede observar en la figura 21, los gradientes 1, 2 y 3 son lineales y presentan un retorno programado o “re-equilibrado” que consiste en volver a las condiciones iniciales de composición de la fase móvil, permitiendo estabilizar el sistema y facilitar las sucesivas inyecciones.

La mezcla de las tres ABs se analizó con cada uno de los tres gradientes a 254 nm y 30° C de temperatura de columna. Los cromatogramas para estos análisis se indican en las figuras 22-24 y los parámetros cromatográficos se resumen en las tablas 17-19.

¹³² Ibid., p. 55.

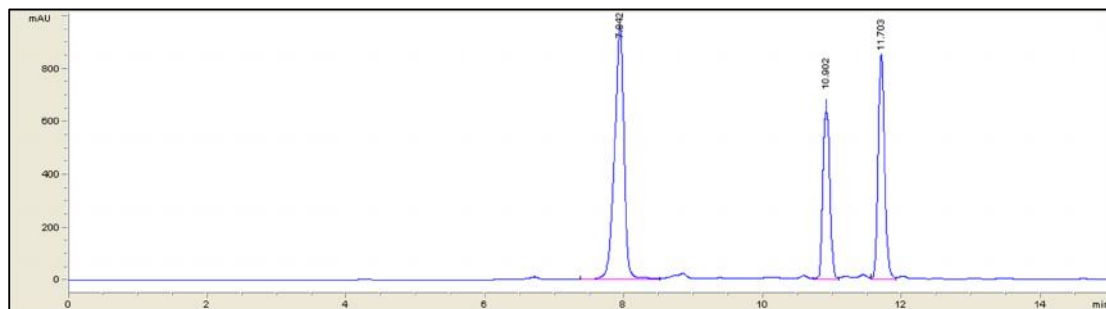
¹³³ TSAI. Op. Cit., p. 579-585.

Figura 22. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente 1, mediante HPLC-VWD, ($\lambda = 254\text{nm}$).



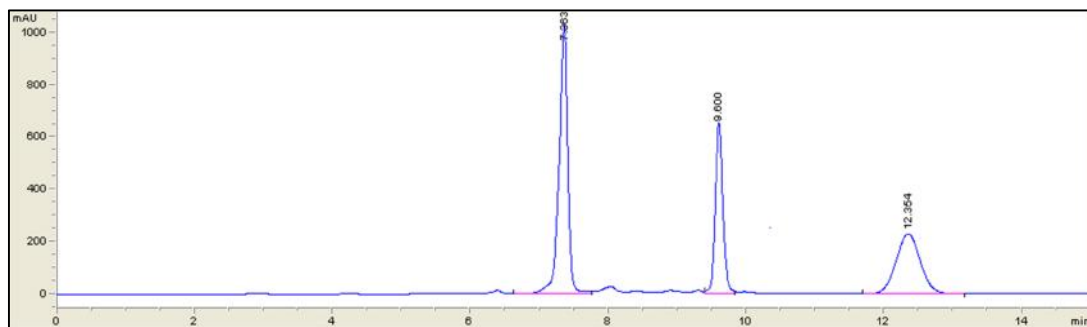
Fuente: Esta Investigación.

Figura 23. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente 2, mediante HPLC-VWD, ($\lambda = 254\text{nm}$).



Fuente: Esta Investigación.

Figura 24. Cromatograma obtenido mediante las condiciones de análisis del gradiente 3, mediante HPLC-VWD, ($\lambda = 254\text{nm}$).



Fuente: Esta Investigación.

Tabla 17. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs en las condiciones de análisis según el gradiente 1.

Pico	t _R (min)	W (min)	A mUA.s	As	k'		R _s	N
1	8,232	0,149	9280	1,527	2,659	-	-	48707
2	11,074	0,103	2101	0,876	3,922	1,475	22,538	184950
3	11,844	0,103	4480	0,859	4,264	1,087	7,494	213633

Fuente: Esta Investigación.

Tabla 18. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs en las condiciones de análisis según el gradiente 2.

Pico	t _R (min)	W (min)	A mUA.s	As	k'		R _s	N
1	7,942	0,140	9284	1,018	2,530	-	-	51564
2	10,902	0,105	2205	0,964	3,845	1,520	24,213	173808
3	11,703	0,099	4546	0,931	4,201	1,093	7,868	223586

Fuente: Esta Investigación.

Tabla 19. Parámetros Cromatográficos obtenidos para el análisis de ABs en las condiciones de análisis según el gradiente 3.

Pico	t _R (min)	W (min)	A mUA.s	As	k'		R _s	N
1	7,363	0,129	9180	1,369	2,272	-	-	52206
2	9,600	0,127	2310	0,860	3,267	1,438	17,511	92002
3	12,354	0,378	4737	0,976	4,491	1,375	10,922	17118

Fuente: Esta Investigación.

Analizando los parámetros cromatográficos para todos los gradientes, se puede observar que los factores de capacidad o retención (k') se encuentran en el rango 2-4 lo que infiere una adecuada velocidad de migración de los analitos. Por su parte, los factores de selectividad () fueron mayores a la unidad, indicando que la columna ofrece buena separación de los mismos.

También se puede evidenciar que la resolución (R_s) entre las parejas de picos contiguos en los tres tipos de gradiente es siempre superior a 1,5; lo que indica que los picos están resueltos hasta línea base, permitiendo que el sistema de datos mida el tamaño de cada banda apropiadamente y esto se traduzca en una

cuantificación fiable¹³⁴. Aunque la mejor resolución entre los derivados de histamina y tiramina se observa en la separación con el gradiente 3, la eficiencia (N) de la separación del derivado de tiramina con este gradiente disminuye en comparación con los gradientes 1 y 2, produciendo el ensanchamiento del pico, hecho que se refleja porque aumenta la retención para este analito.

Finalmente, el factor de Asimetría (As), que de acuerdo con el criterio técnico debe ser mayor a 0,9 y menor a 1,5; sólo se cumple para todos los picos del gradiente 2, permitiendo inferir que en estas condiciones de elución el sistema cromatográfico se comporta como un operador gaussiano, ensanchando las bandas cromatográficas hacia una distribución normal¹³⁵, según van eluyendo los analitos a través de la columna cromatográfica.

Los anteriores resultados se pueden explicar analizando la composición de fase móvil utilizada en cada gradiente durante la separación. Como se observa en la figura 21 los tres gradientes utilizados en el análisis de ABs iniciaron con una fase móvil Metanol: Agua en una proporción 50:50, cuya fuerza eluotrópica fue menor en comparación con la ejercida en el análisis isocrático; esto, favoreció la retención de las tres ABs, principalmente, la putrescina.

La diferencia entre los tres gradientes, radicó en el incremento lineal de solvente orgánico en la fase móvil con respecto al tiempo; pudiéndose observar que en los primeros 5 minutos este incremento fue mayor con el gradiente 3, lo que permitió obtener un tiempo de retención para putrescina más bajo. También es posible observar que la disminución en la fuerza eluotrópica de la fase móvil para este gradiente en el minuto 5, favoreció la elución del derivado de histamina, el cual tiene el tiempo de retención más bajo en comparación con el gradiente 1 y 2. Sin embargo, esta disminución en la fuerza de arrastre de la fase móvil contribuyó con la retención del derivado de tiramina, incrementando su tiempo de retención, ensanchando la señal cromatográfica y disminuyendo la eficiencia de la separación.

Por el contrario, el aumento prolongado de la proporción de fase orgánica para los gradientes 1 y 2 se extendió hasta aproximadamente el minuto 12, lo que aumentó el tiempo de retención para el derivado de histamina pero favoreció la elución del derivado de tiramina. Así mismo, el gradiente 2 presentó tiempos de retención más bajos para los tres analitos porque el incremento de metanol en la fase móvil lo hizo más rápido que el gradiente 1 y este se extendió hasta aproximadamente el minuto 13 a partir del cual comenzó a buscar el reequilibrio.

Con lo anteriormente expuesto, se deduce que las condiciones de fase móvil empleadas en el gradiente 2 favorece el equilibrio de distribución de los analitos

¹³⁴ SAN-CRISTÓBAL. Op. Cit., p. 55.

¹³⁵ Ibid., p. 56.

entre la fase móvil y la fase estacionaria, permitiendo una separación más eficiente de las ABs y con las características cromatográficas deseables.

5.4 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Teniendo en cuenta las diferentes condiciones cromatográficas reportadas para el análisis de ABs¹³⁶, se vio necesario optimizarlas con el fin de obtener la máxima resolución y sensibilidad.

En la mayor parte de los estudios realizados previamente por otros investigadores, los parámetros cromatográficos evaluados para la determinación de ABs son: flujo, proporción de solvente orgánico en la fase móvil, longitud de onda y temperatura de la columna^{137,138}. En este caso, para la optimización del sistema cromatográfico se evaluaron los parámetros cromatográficos flujo, temperatura de columna y longitud de onda dentro de los intervalos consignados en la tabla 10 (sección 4.4.6).

La elección de los intervalos de trabajo para la evaluación de los parámetros cromatográficos, se realizó de acuerdo con la literatura.^{139,140} Hay que resaltar que para la elección del intervalo de longitud de onda también se tuvo en cuenta los máximos de absorbancia de cada derivado de AB a una concentración de 5 mg.L⁻¹ en la región ultravioleta (Anexo G.)

En el presente trabajo, las condiciones cromatográficas fueron optimizadas empleando un método estadístico multivariado central compuesto (DCC) dado que es la técnica más utilizada para optimizar sistemas cromatográficos¹⁴¹.

Para un modelo de tres factores se requirieron $N = 2^3 + 2 \cdot 3 + 2 = 16$ experimentos, incluyendo dos réplicas del punto central. Todos los experimentos fueron inyectados en orden aleatorio con el fin de minimizar los efectos de los factores incontrolables que pudieran producir sesgo en las respuestas. La respuesta observada para cada experimento fue el área y los tiempos de retención (t_R) de cada pico cromatográfico (A) y la resolución (R_s) entre picos adyacentes.

En la tabla 20 es presentado el diseño experimental y en la tabla 21 los resultados de cada uno de los 16 análisis llevados a cabo en la optimización de las condiciones cromatográficas.

¹³⁶ LAZARO DE LA TORRE, Cesar y CONTE-JUNIOR, Carlos. Métodos cromatográficos para determinar aminos biogénicos en alimentos de origen animal. *En: Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo*. Diciembre, 2013, vol. 50, n. 6, p. 439.

¹³⁷ ROMERO. Op. Cit., p. 77.

¹³⁸ GARCIA. Op. Cit., 103.

¹³⁹ ROMERO. Op. Cit., p. 77.

¹⁴⁰ LAZARO DE LA TORRE, Cesar y CONTE-JUNIOR, Carlos. Op. Cit., p. 438-440

¹⁴¹ GARCIA. Op. Cit., p. 103.

Tabla 20. Diseño experimental establecido para la optimización cromatográfica.

Exp	Flujo (mL min ⁻¹)	(nm)	T (°C)
1	0,8	230	30
2	1	254	30
3	0,8	275	30
4	0,5	275	20
5	0,5	230	40
6	1	275	40
7	0,5	230	20
8	0,8	254	30
9	0,5	254	30
10	0,8	254	20
11	1	230	40
12	0,5	275	40
13	1	275	20
14	1	230	20
15	0,8	254	30
16	0,8	254	40

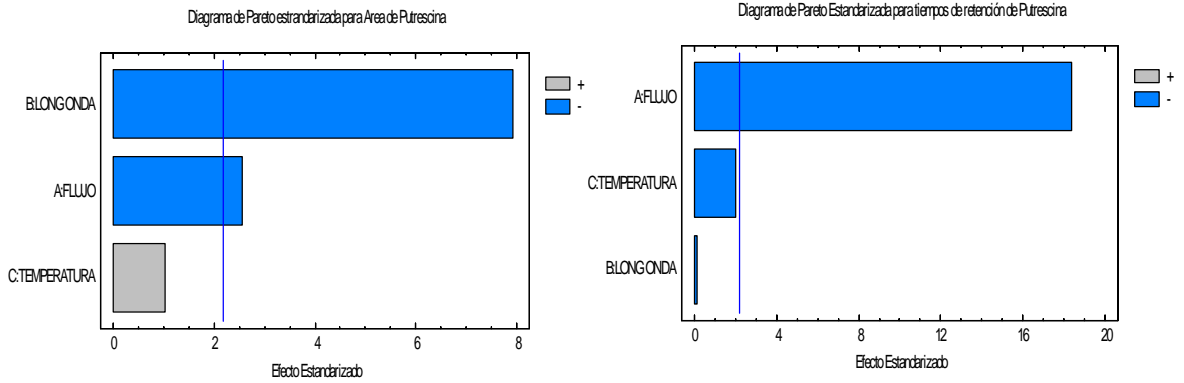
Fuente: Esta Investigación.

Tabla 21. Variables respuestas, para la optimización del proceso de optimización de las condiciones cromatográficas mediante HPLC-VWD.

Exp	Putrescina			Histamina			Tiramina				
	A	t _R	N	A	R _s	t _R	N	A	R _s	t _R	N
1	20813	7,93	49689	5200	23,92	10,91	166684	12418	7,78	11,72	220026
2	3986	6,69	42741	1775	26,48	9,65	167874	3099	8,50	10,42	234661
3	1030	8,01	54023	2301	24,24	10,95	175406	1293	7,80	11,76	210203
4	1782	11,77	91494	1791	20,57	14,85	172016	3763	8,42	16,10	173362
5	33392	11,08	56950	2823	18,67	14,09	169934	9798	7,66	15,15	188366
6	737	6,33	39437	2294	27,39	9,32	168869	1017	9,01	10,11	225291
7	19538	7,59	45982	2849	24,62	10,58	173666	11912	8,33	11,39	248427
8	9284	7,94	51564	4182	24,21	10,90	173808	4740	7,86	11,70	223586
9	9293	7,88	51508	4188	24,94	10,91	175771	4655	7,95	11,71	237900
10	7960	11,30	75225	5154	20,50	14,39	177558	4678	8,16	15,54	183981
11	5040	8,30	59027	2164	23,71	11,23	166156	3990	7,73	12,08	194694
12	16660	6,36	38378	4413	26,32	9,34	151006	10353	8,72	10,12	231772
13	5264	10,96	74502	3580	21,20	14,00	196028	1032	7,96	15,05	191761
14	789	7,00	45489	1855	26,23	9,99	170514	1244	8,16	10,77	214921
15	16456	7,10	45311	4138	24,61	10,00	153394	9863	7,86	10,76	218861
16	5056	7,64	48318	2485	24,72	10,62	174196	4022	8,28	11,43	236190

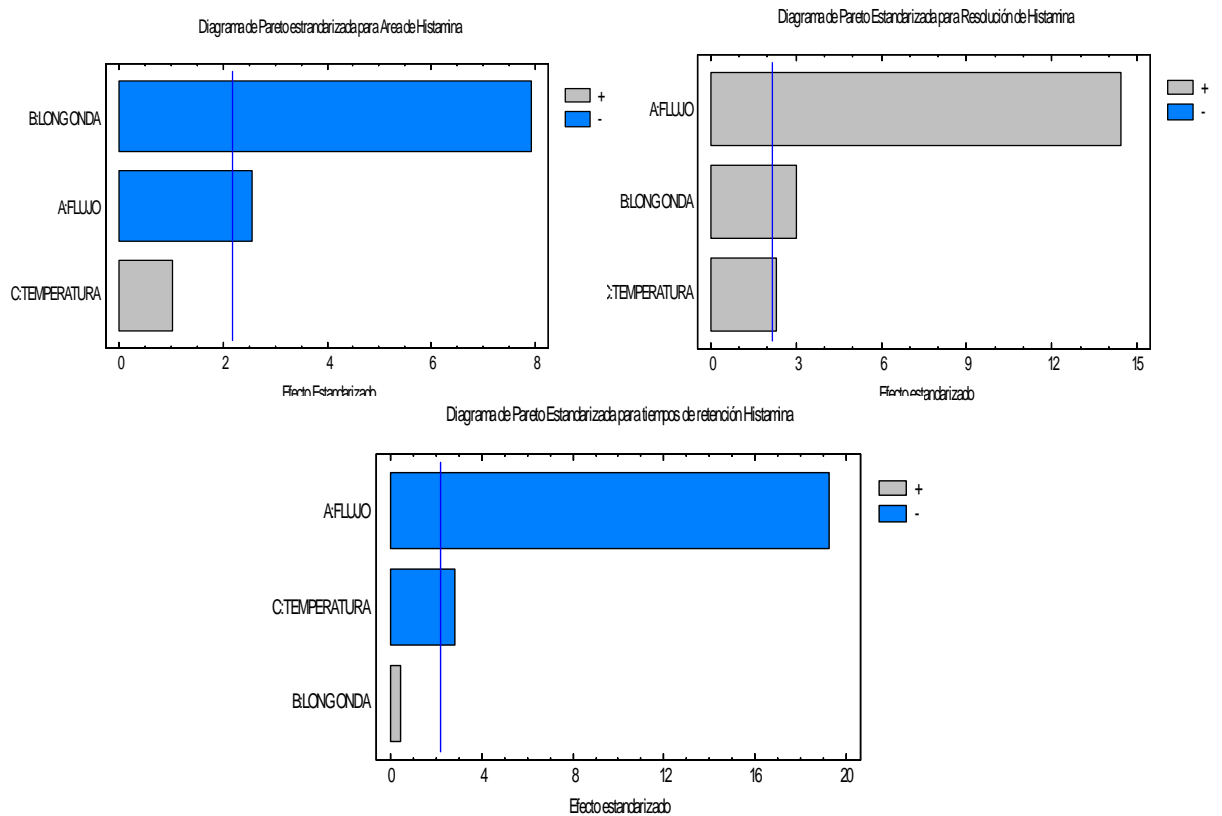
Fuente: Esta Investigación.

Figura 25. Gráficos de Pareto representando la influencia de los factores estudiados sobre las respuestas en el análisis cromatográfico de Putrescina.



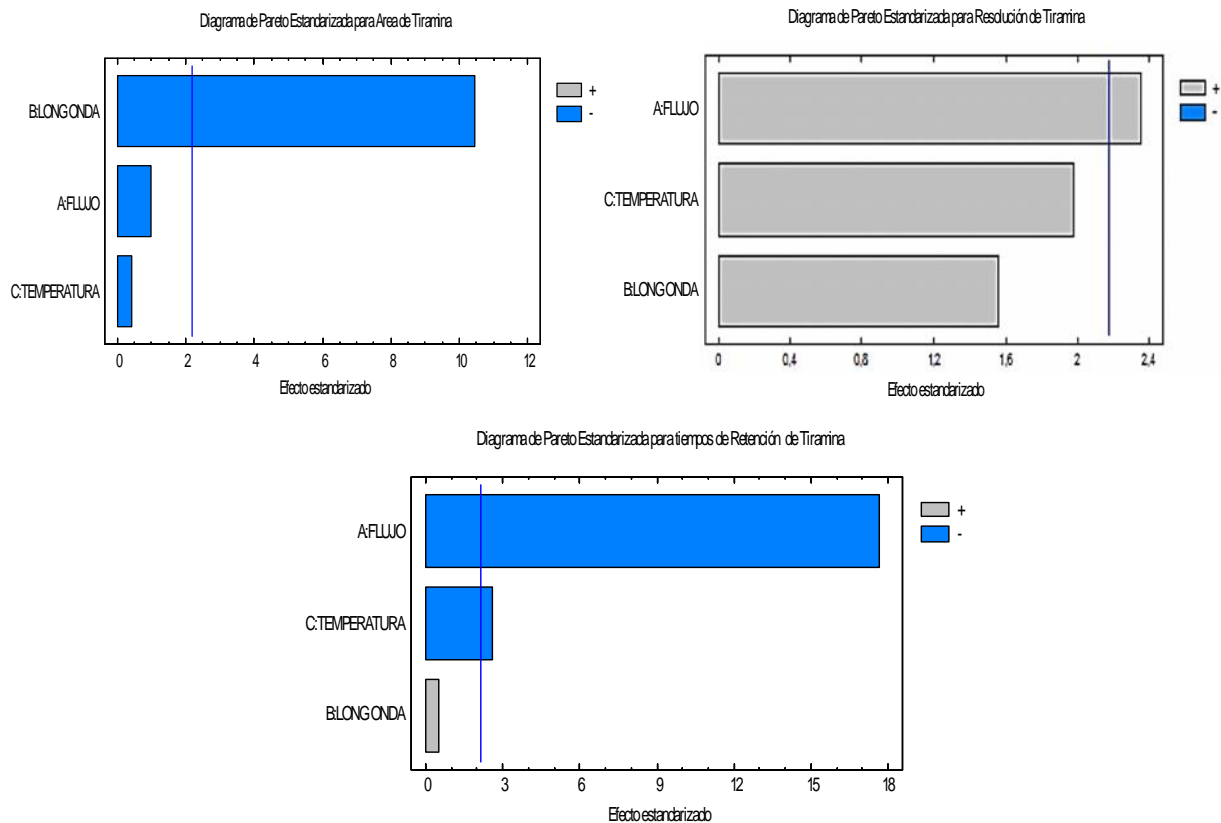
Fuente: Esta Investigación.

Figura 26. Gráficos de Pareto representando la influencia de los factores estudiados sobre las respuestas en el análisis cromatográfico de Histamina



Fuente: Esta Investigación.

Figura 27. Gráficos de Pareto representando la influencia de los factores estudiados sobre las respuestas en el análisis cromatoaráfico de Tiramina.



Fuente: Esta Investigación.

En los gráficos de Pareto dados por el análisis ANOVA (figuras 25-27) se puede observar que para los derivados de putrescina, histamina y tiramina el factor longitud de onda afecta significativamente y de manera negativa sobre la variable Área ($P < 0,05$), es decir a mayores longitudes de onda, las áreas de los derivados de estas ABs se ven disminuidas.

El cromóforo aromático, que se ha introducido en las ABs, presenta transiciones electrónicas de origen $\pi \rightarrow \pi^*$, adicional a ello presenta un grupo carbonilo ($C=O$) en posición del anillo, en el cual la presencia del oxígeno con sus pares electrónicos libres hace posible la existencia de transiciones electrónicas $n \rightarrow \pi^*$. Todas estas transiciones son las responsables de las bandas de absorción que presentan los compuestos analizados en la región UV-Vis¹⁴². Sin embargo, y a pesar de existir insaturaciones en los derivados no estamos hablando de sistemas altamente

¹⁴² RIOS, Yolanda. Espectroscopia UV-Visible. [en línea]. [citado el 23 de Julio de 2016]. Disponible en <<http://www.yolanda-rios.net/materiales/UV Teoria.pdf>>

conjugados, y por tanto es lógico que en longitudes de onda mayores disminuya la intensidad de absorción de los derivados.

En los gráficos de Pareto, también es posible evidenciar que tanto el flujo como la temperatura de columna influyen de manera negativa sobre los tiempos de retención de los derivados de histamina y tiramina, mientras que para el tiempo de retención del derivado de putrescina solamente el primero ofrece este mismo efecto. Por su parte, la resolución de todos los derivados, se ve afectada por el flujo, el cual ejerce una influencia positiva al nivel de significancia de 0,05.

En definitiva, el tiempo de retención y la resolución de los derivados se ven afectados directa y principalmente por la velocidad de flujo de la fase móvil e indirectamente por la temperatura de la columna. En este último caso, la temperatura de la columna influye sobre la velocidad de flujo, ya que al aumentar la temperatura disminuye la viscosidad del metanol, reduciendo la presión del sistema y permitiendo una mayor velocidad de flujo de la fase móvil. Si la velocidad de flujo es elevada, los derivados pasarán menos tiempo en la columna y la elución de los mismos se producirá muy rápido, por el contrario, si es baja, los analitos se retendrán más en la columna, el ensanchamiento de la señal cromatográfica será evidente y la resolución se verá afectada.

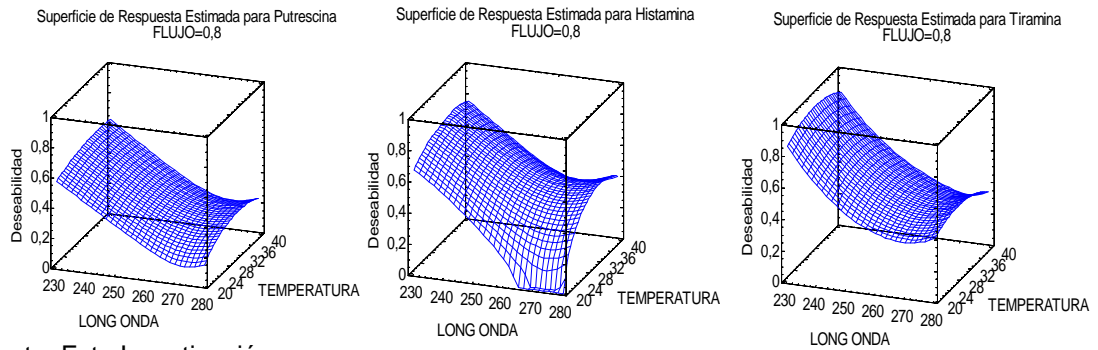
Debido a ello y dado que los derivados de cada AB tienen una naturaleza química diferente, fue necesario optimizar la longitud de onda, el flujo de fase móvil y la temperatura de columna, buscando encontrar las condiciones propicias para que todos los analitos eluyeran con una adecuada resolución y con tiempos de retención bajos y reproducibles.

Además, se vio la necesidad de trabajar con una temperatura de columna mayor a la temperatura ambiente pero no muy elevada, con el fin de evitar las fluctuaciones en los análisis (que perjudican la precisión de los tiempos de retención y áreas) y la degradación de la fase estacionaria (que reduce la vida de la columna).

En la Figura 28 se presentan los gráficos de superficie de respuesta para el análisis cromatográfico de las tres ABs mediante HPLC, aplicando el diseño experimental DCC 2³.

El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta indica la variación en la respuesta frente a cambios en los factores temperatura, y longitud de onda. Las condiciones óptimas determinadas por el modelo se presentan en la tabla 22.

Figura 28. Gráfico tridimensional de superficie de respuesta para el DCC 2³ aplicado para la optimización del proceso de análisis cromatográfico



Fuente: Esta Investigación.

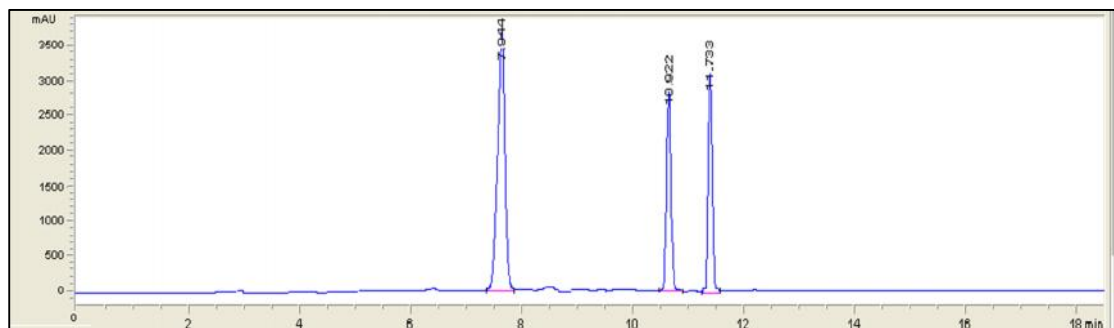
Tabla 22. Valores óptimos de las condiciones cromatográficas de análisis

Factor	Valor óptimo
Flujo (ml.min ⁻¹)	0,8
Temperatura de columna (°C)	30
Longitud de onda (nm)	230

Fuente: Esta Investigación.

En estas condiciones los derivados de putrescina, histamina y tiramina presentan un adecuado equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil, lo cual se traduce en una mayor absorbancia por unidad de concentración y una velocidad de separación apropiada que permita la elución de los analitos en menor tiempo y con buena resolución, tal como se presenta en la figura 29.

Figura 29. Cromatograma obtenido para el análisis de ABs en condiciones óptimas de operación instrumental, mediante HPLC-VWD.

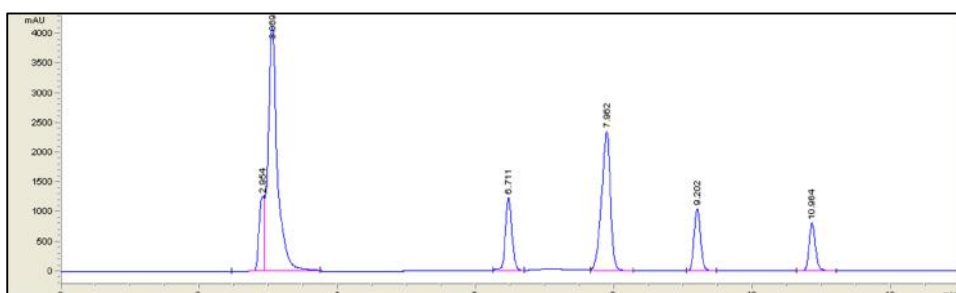


Fuente: Esta Investigación.

5.5 OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DERIVATIZACIÓN

El proceso de derivatización presentó algunos inconvenientes, dado que eventualmente se evidenciaban algunas señales cromatográficas diferentes a las ya identificadas que en algunas ocasiones disminuían el área de los derivados de histamina y tiramina y en otras inhibían completamente la señal de tiramina, tal como se indica en la figura 30.

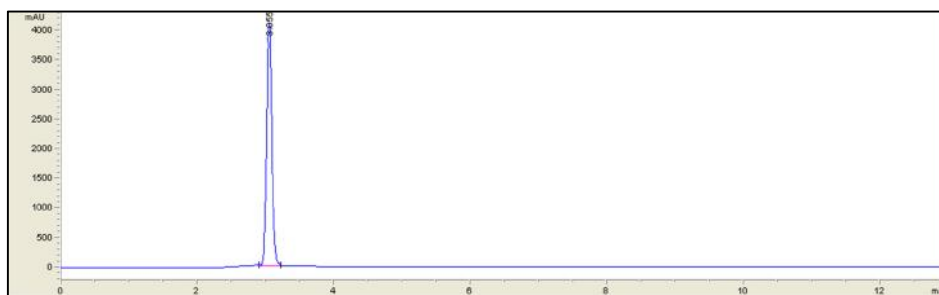
Figura 30. Cromatograma para el proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina con presencia de señales interferentes



Fuente: Esta Investigación.

Morgan¹⁴³, en su investigación determinó que los principales contaminantes en el cromatograma eran cloruro de benzoilo, ácido benzoico y anhídrido benzoico, siendo los dos primeros los más importantes cuantitativamente hablando. Para descartar dos de los tres contaminantes posiblemente formados, se realizaron inyecciones de una solución de ácido benzoico y de cloruro de benzoilo disueltos en Metanol a una concentración de 10 mg.L⁻¹. En las figuras 31 y 32 se presentan los cromatogramas para estos análisis.

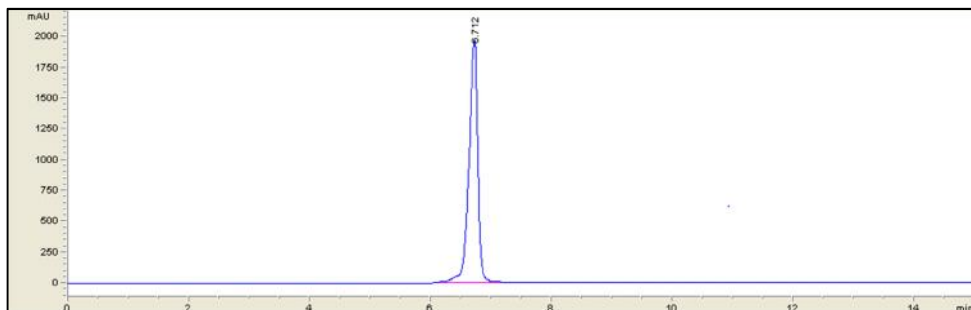
Figura 31. Cromatograma para Ácido benzoico a una concentración de 10 mg.L⁻¹



Fuente: Esta Investigación.

¹⁴³ MORGAN, David. Determination of Polyamines as Their Benzoylated Derivatives by HPLC. *En: Springer Protocols*. 1998, vol. 79, p. 113.

Figura 32. Cromatograma para Cloruro de Benzoilo a una concentración de 10 mg.L⁻¹



Fuente: Esta Investigación.

Comparando las señales cromatográficas obtenidas para el ácido benzoico y el cloruro de benzoilo con las dos primeras señales en el cromatograma de la figura 30, se puede observar que hay una coincidencia en los tiempos de retención, infiriendo que en las condiciones de derivatización trabajadas gran parte del cloruro de benzoilo se convertía en ácido benzoico, otra reaccionaba con la putrescina e histamina y una última quedaba sin reaccionar.

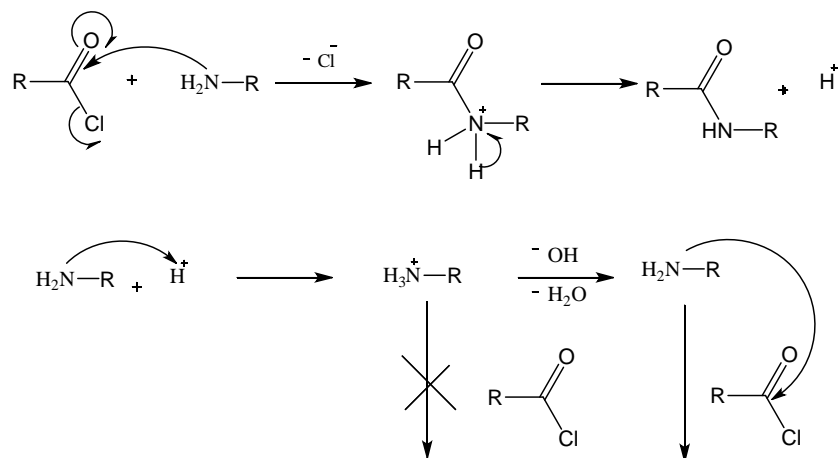
En la figura 30 también se evidencia que adicional a los picos de los contaminantes ya identificados, eluía un compuesto al minuto 9,202 de naturaleza aún desconocida, que posiblemente esté relacionada con la degradación de alguno de los analitos de interés.

Por tanto, se planteó optimizar el proceso de derivatización, con el fin de encontrar las condiciones adecuadas para desplazar la reacción hacia la formación de los derivados benzoilados de todas las ABs, aumentar el rendimiento de la misma y con ello evitar problemas en la precisión e identidad del método.

En la figura 33, se observa el mecanismo general de la reacción Schotten-Baumann que explica como ocurre la acilación de las ABs con el cloruro de benzoilo.

De acuerdo con el esquema, en el medio de reacción se produce ácido clorhídrico el cual protonaría a las aminas presentes en el medio y afectaría el rendimiento de la reacción. Por consiguiente, como primer recurso, se consideró importante evaluar la cantidad de NaOH adecuada para neutralizar el ácido formado y desplazar la reacción hacia la formación de las amidas.

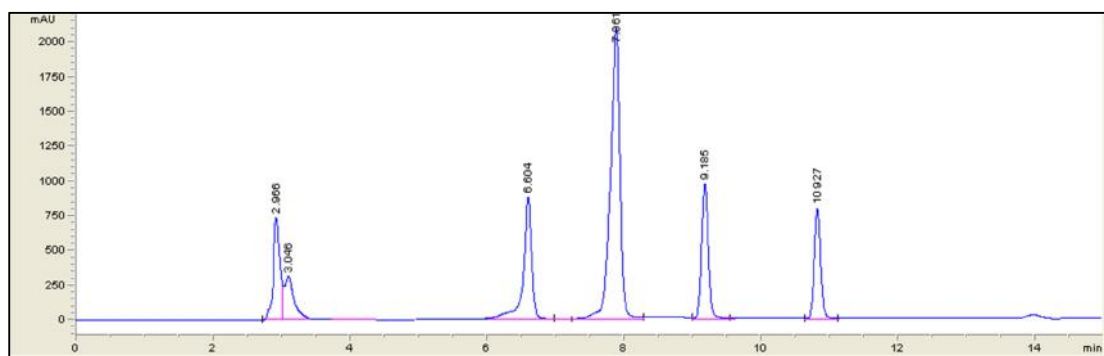
Figura 33. Esquema general del mecanismo de la reacción de Schotten-Baumann.



Fuente: ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. [en línea]. [citado el 23 de Julio de 2016]. Disponible en <<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.shtm>>

De este modo, las ABs nuevamente fueron derivatizadas de acuerdo con el protocolo propuesto por Zarei¹⁴⁴, modificando la cantidad de NaOH por encima y por debajo del valor teórico reportado por Zarei. Los cromatogramas para estos análisis se presentan en las figuras 34 y 35.

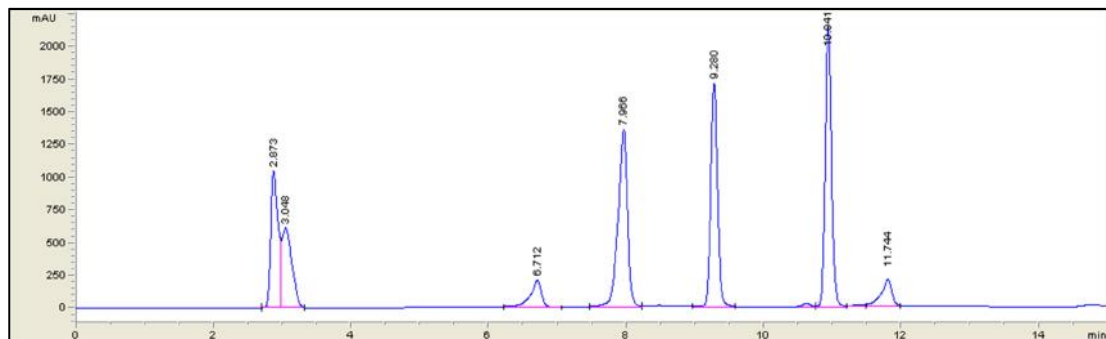
Figura 34. Cromatograma obtenido para el proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina con 0,5 mL de NaOH.



Fuente: Esta Investigación.

¹⁴⁴ ZAREI. Op. Cit., p. 191.

Figura 35. Cromatograma obtenido para el proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina con 2 mL de NaOH.



Fuente: Esta Investigación.

Se puede observar que al aumentar la cantidad de NaOH la señal cromatográfica para cloruro de benzoilo disminuye, aparece un pequeño pico para el derivado de tiramina (11,744) pero la señal para ácido benzoico se mantiene. En ninguno de los dos casos se observa mejoría en la detección del derivado de tiramina, razón por la cual, se mira la necesidad de evaluar otros factores propios de la reacción como la temperatura, tiempo de reacción y el volumen de derivatizante.

En primer lugar, para conocer cuáles de los factores anteriormente nombrados eran críticos en el proceso de derivatización, se realizó un diseño factorial de screening 2^3 con un punto central. El diseño experimental así como los factores y variables respuesta para cada uno de los experimentos se presenta en la tabla 23.

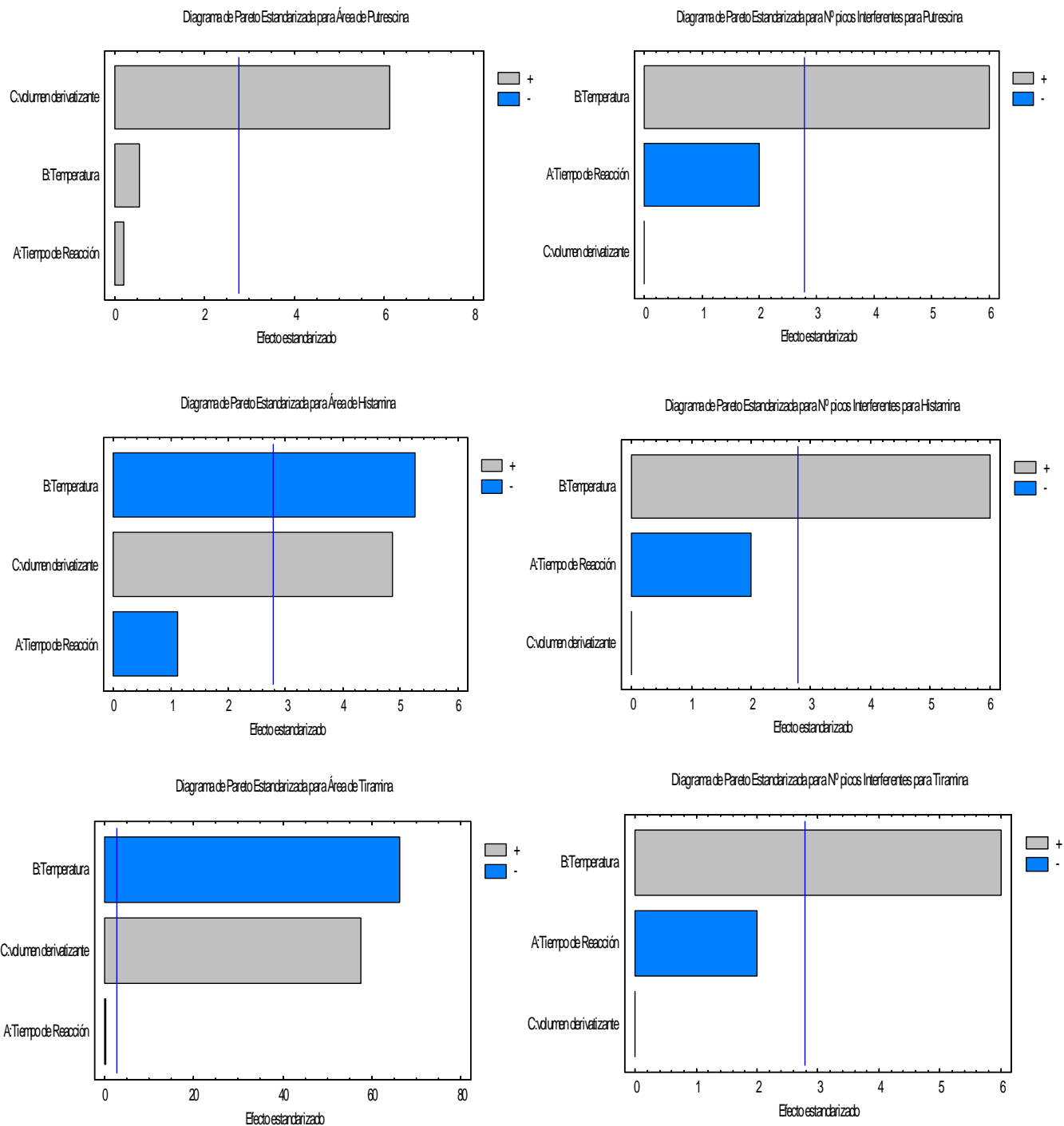
Tabla 23. Diseño experimental multifactorial de optimización del proceso de derivatización con sus respectivas variables respuestas, mediante HPLC-VWD.

Exp.	Factores			Variables respuesta			# PI
	Vd (μ l)	t_R (min)	T ($^{\circ}$ C)	Putrescina	Histamina	Tiramina	
				50 mg.L ⁻¹			
A (mAU*s)	A (mAU*s)	A (mAU*s)					
1	15	20	25	22280	3779	9624	0
2	15	60	25	21990	3751	9597	0
3	5	20	25	13575	3089	5283	0
4	5	60	25	13655	3061	5433	0
5	5	20	45	10890	2852	291	4
6	5	60	45	10615	2476	168	2
7	15	20	45	26200	3059	4677	4
8	15	60	45	28200	3006	4737	2

Vd: volumen de derivatizante (cloruro de benzoilo), A: Área; #PI: número de picos interferentes

Fuente: Esta Investigación.

Figura 36. Gráficos de Pareto estandarizadas para el diseño factorial 2^3 para la optimización del proceso de derivatización de putrescina, histamina y tiramina.



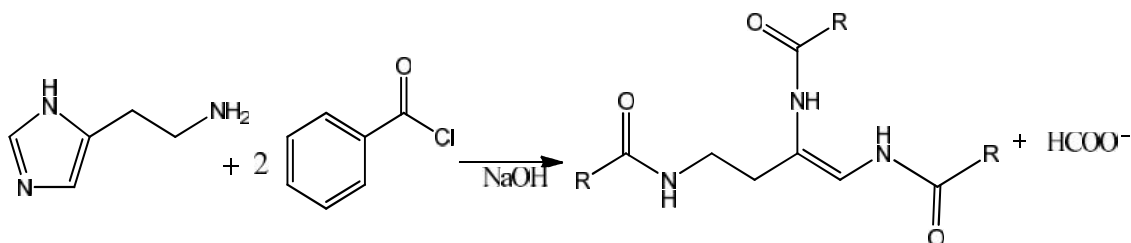
Fuente: Esta Investigación.

En los gráficos de Pareto dados por el análisis ANOVA (Figura 36), se observa consecutivamente los factores de mayor a menor significancia, donde las columnas que sobrepasen la línea vertical, señalan que son significativamente diferentes de cero, afectando las respectivas variables con un nivel de confianza del 95.0%.

Se puede observar, que el factor “volumen de derivatizante” influyó de manera positiva en el área de todos los derivados, es decir, un incremento en esta variable, desplazó la reacción hacia la formación de las amidas, provocando un aumento en la respuesta. Por otro lado, el factor temperatura ofreció el efecto contrario sobre el área de histamina y tiramina y afectó de manera directa sobre la variable “número de picos interferentes”, evidenciándose que a temperaturas de reacción alta, se producían mayor número de interferencias. Finalmente, el tiempo de reacción no tuvo una significancia estadística sobre ninguna de las variables respuesta.

De acuerdo con lo anterior, es evidente que la temperatura afectó en mayor grado la reacción de derivatización de las tres ABs, principalmente de la histamina y tiramina, lo cual es acorde con la bibliografía, puesto que se ha encontrado que a temperaturas altas el cloruro de benzoilo reacciona con la histamina en presencia de hidróxido de sodio rompiendo el anillo imidazol según la siguiente reacción¹⁴⁵.

Figura 37. Esquema de la reacción de apertura del anillo imidazol al reaccionar histamina con cloruro de benzoilo



Fuente: HOFMANN, Klaus. Op.Cit., p.156.

Es evidente que la presencia de interferencias en el análisis afectaría la precisión del método. En vista de ello, y teniendo una idea del comportamiento de los factores de reacción dados por el diseño de screening se descartó el tiempo de reacción y se optimizaron las variables temperatura y volumen de derivatizante, considerando esta vez temperaturas bajas y volúmenes de derivatizante altos, a fin de encontrar las condiciones propicias que aseguren una mayor selectividad en la formación de los derivados.

¹⁴⁵ SMITH, Gordon V. y PARR, Russell L. Marked and cost approaches. En: Valuation of intellectual property and intangible asstes. 3 ed. New York: John Wiley, 2000, p. 175-214

El diseño experimental para el nuevo modelo estadístico de dos factores y los resultados para cada uno de los experimentos se presenta en la tabla 24.

Tabla 24. Diseño experimental para la optimización del proceso de derivatización con sus respectivas Variables respuestas, mediante HPLC-VWD.

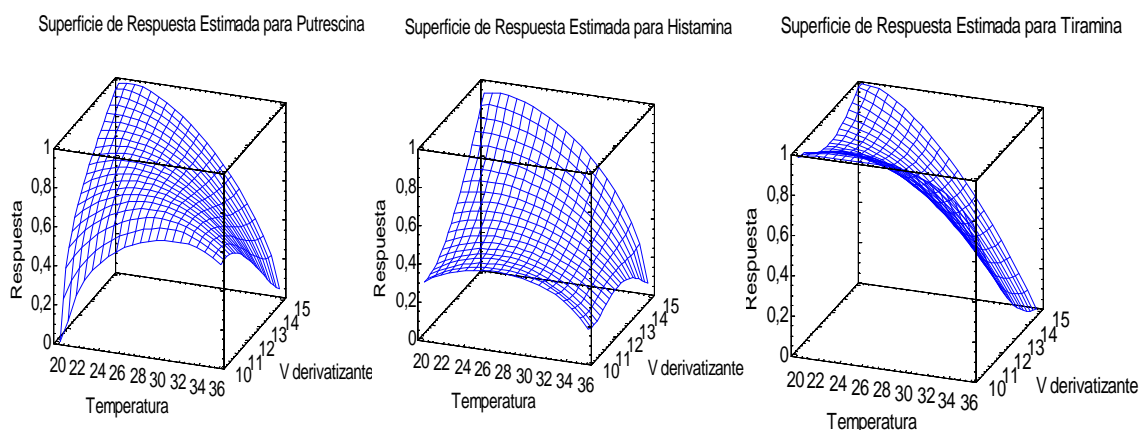
Exp	Factores		Variables respuesta			# PI
	Vd (μ l)	T ($^{\circ}$ C)	Putrescina	Histamina	Tiramina	
			A (mAU*s)	A (mAU*s)	A (mAU*s)	
1	10,0	35	19001	2297	9237	0
2	12,5	30	21138	2907	9639	0
3	10,0	20	17170	2532	11151	0
4	12,5	20	20322	2952	11323	0
5	15,0	20	22469	4724	11928	0
6	15,0	35	18928	4423	0	2
7	12,5	30	21055	2931	9695	1
8	10,0	30	18814	2748	10084	0
9	15,0	30	23015	5109	5905	1
10	12,5	35	20384	2724	0	2

Vd: volumen de derivatizante (cloruro de benzilo), A: Área; #PI: numero de picos interferentes

Fuente: Esta Investigación.

En la Figura 38 se presentan los gráficos de superficie de respuesta obtenidos para el proceso de derivatización de las tres ABs, aplicando el diseño experimental DCC 2².

Figura 38. Gráfico tridimensional de superficie de respuesta para el DCC 2² aplicado para la optimización del proceso de derivatización



Fuente: Esta Investigación.

El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta indica la variación en la respuesta frente al cambio de temperatura de incubación y cantidad de derivatizante y sugiere una disminución en la temperatura de reacción y un aumento en el volumen de derivatizante para obtener picos cromatográficos con mayor área y con un menor número de interferencias. Las condiciones óptimas determinadas por el modelo se presentan en la tabla 25.

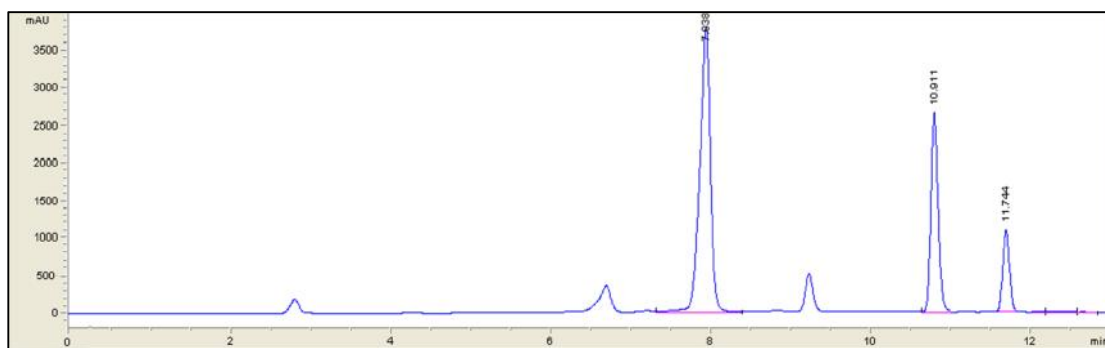
Tabla 25. Valores óptimos para las condiciones del proceso de derivatización

<i>Factor</i>	<i>Valor óptimo</i>
Volumen derivatizante (μL)	15
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	20

Fuente: Esta Investigación.

En estas condiciones se prepararon nuevamente los derivados de ABs a una concentración de 50 mg.L^{-1} , y se analizó por HPLC-UV, tal como se indica en la figura 39.

Figura 39. Cromatograma obtenido en condiciones óptima de derivatización para la mezcla de ABs (50 mg.L^{-1}), mediante HPLC-VWD.



Fuente: Esta Investigación.

En la figura 39 se evidencia que aunque las señales cromatográficas para ácido benzoico y cloruro de benzoilo disminuyeron, el pico cromatográfico para el derivado de tiramina se veía aún afectado. Por consiguiente, en condiciones óptimas de reacción, se estudió un factor adicional: *tiempo de agitación*, para el cual se realizaron 3 ensayos por duplicado, agitando de manera continua la mezcla de reacción durante 10, 20 y 40 minutos respectivamente.

En la tabla 26 se consignan los resultados, en área y número de picos interferentes y en la figura 40 se observa el cromatograma del análisis.

Tabla 26. Resultados de la evaluación del factor tiempo de agitación en el proceso de derivatización de ABs ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mediante HPLC-VWD.

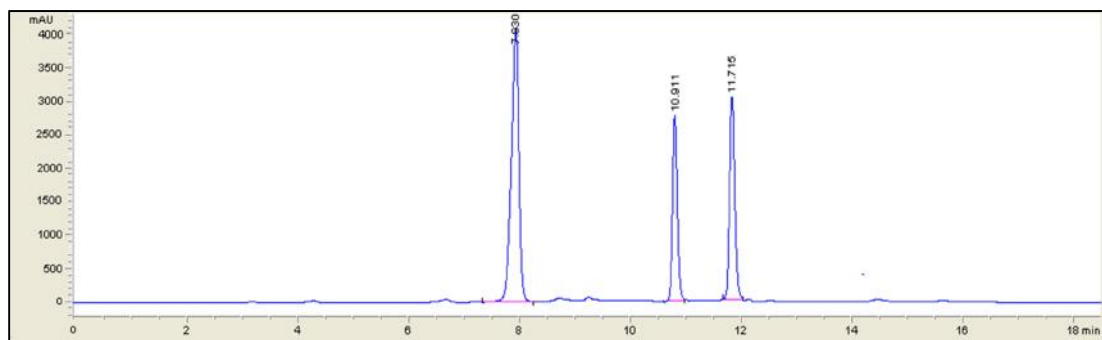
Exp.	Factor		Respuesta			# PI
	t Agit. (min)	Putrescina	Histamina	Tiramina	A	
		A (mAU*min)	A (mAU*min)	A (mAU*min)		
1	10	19432	4019	6242	2	
2	10	19750	4079	6163	2	
3	20	20176	4104	11653	0	
4	20	20472	4113	11635	0	
5	40	22381	4826	12200	0	
6	40	22563	4757	12334	0	

t agit.: Tiempo de Agitación, A: Área; #PI: número de picos interferentes

Fuente: Esta Investigación.

Se puede observar que una agitación continua durante todo el proceso de derivatización de las ABs, favorece la superficie de contacto entre los reactivos, incrementando las áreas de los derivados y eliminando los contaminantes.

Figura 40. Cromatograma obtenido en condiciones óptimas de derivatización para la mezcla de ABs ($50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), mediante HPLC-VWD.



Fuente: Esta Investigación.

5.6 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.

En la tabla 27 se consignan los resultados de porcentaje de recuperación sobre muestras enriquecidas para los cuatro protocolos de extracción evaluados.

Tabla 27. Porcentajes de recuperación obtenidos con cada uno de los métodos de extracción evaluados para la determinación de ABs en 5 g de muestra.

M	Aminas Biogénicas											
	Putrescina				Histamina				Tiramina			
	C_M	C_A	C_{MA}	%RC	C_M	C_A	C_{MA}	%RC	C_M	C_A	C_{MA}	%RC
	(mg.g ⁻¹)				(mg.g ⁻¹)				(mg.g ⁻¹)			
1	0,103		5,12	73,15	NS		2,24	33,02	NS		NS	NS
2	0,980		5,99	85,06	NS		6,07	86,76	NS		0,95	13,60
3	0,101	7	NS	NS	NS	7	NS	NS	NS	7	NS	NS
4	0,100		NS	NS	NS		NS	NS	NS		NS	NS

M: método; NS: no se evidencia señal, CMA = concentración promedio en la muestra adicionada; CM = Concentración promedio inicial de la muestra no adicionada; CA = Concentración conocida adicionada a la muestra.

Fuente: Esta Investigación.

Como se puede observar en la tabla 27 sólo el método 2 permitió extraer las tres ABs, no obstante los porcentajes de recuperación eran bajos, principalmente para tiramina, razón por la cual, se procedió a optimizar el método de extracción con ácido tricloracético propuesto por Tsai (método 2)¹⁴⁶.

5.7 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Con el fin de mejorar la transferencia de ABs desde la matriz al disolvente orgánico, se decidió optimizar los factores tiempo de extracción con agitación continua y volumen de alícuotas de reactivo extractante, dado que ellos favorecen el contacto directo entre las dos fases, aumentando el porcentaje de recuperación de ABs.

El diseño factorial 3² con los factores y variables respuesta para el proceso de optimización del método de extracción se presentan en la tabla 28.

En la Figura 41 se presentan los gráficos de superficie obtenidos para el proceso de extracción de las ABs, aplicando el diseño factorial 3².

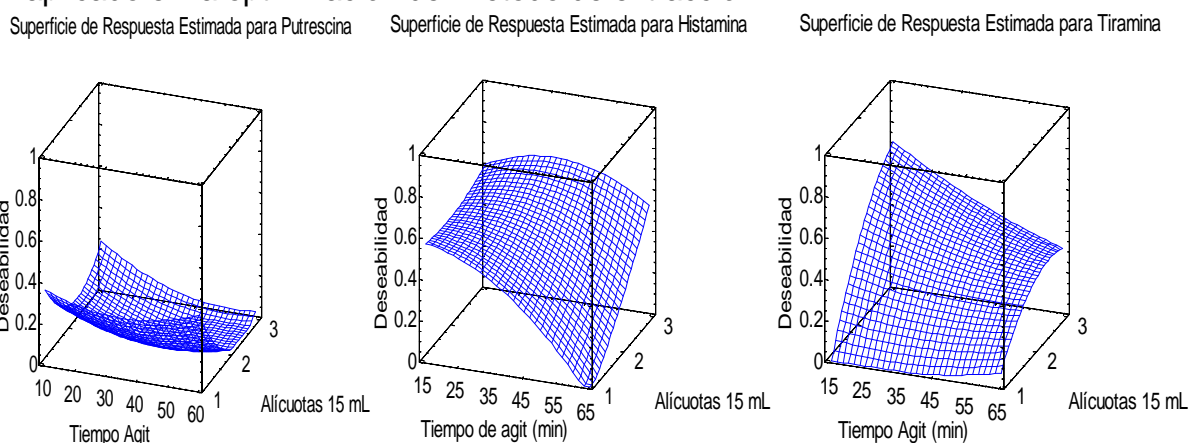
¹⁴⁶ TSAI. Op. Cit., p. 579-585.

Tabla 28. Diseño experimental para la optimización del proceso de extracción, mediante HPLC-VWD.

Exp.	FACTORES		AMINAS BIOGENICAS		
	t _{ag} (min)	Alícuotas de 15 mL	putrescina %RC	histamina %RC	tiramina %RC
1	15	3	79,48	85,3	89,62
1	60	2	43,68	48,79	20,23
1	30	3	46,21	73,3	39
1	15	1	90,99	44,06	0
1	30	2	57,07	67,02	73,13
1	60	1	95,11	32,23	1,39
1	60	3	52,18	99,83	24,2
1	30	1	66,13	99,49	0
1	15	2	55,92	91,40	19,36
2	60	1	94,59	39,01	0
2	30	1	96,57	59,76	0,11
2	15	2	44,04	85,42	31,41
2	30	3	53,97	83,34	22,35
2	30	2	50,03	53,36	31,52
2	15	3	73,13	63,04	68,97
2	60	3	49,3	57,97	46,43
2	15	1	92,55	73,57	0
2	60	2	44,49	46,97	30,63

Fuente: Esta Investigación.

Figura 41. Gráfico tridimensional de superficie de respuesta para el diseño 3² aplicado en la optimización del método de extracción.



Fuente: Esta Investigación.

El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta indica la variación en la respuesta frente al cambio de tiempo de agitación y número de alícuotas de

extracción. Las condiciones óptimas determinadas por el modelo se presentan en la tabla 29.

Tabla 29. Valores óptimos para las condiciones del proceso de extracción de ABs.

Amina Biogénica	FACTORES	
	Tiempo de extracción (min)	Número de extracciones (Alícuotas de 15 mL de TCA al 6%)
Putrescina	60	1
Histamina	35	3
Tiramina	15	3

Fuente: Esta Investigación

Se puede observar que un mayor número de extracciones favorece la recuperación de histamina y tiramina, mientras que la putrescina se ve favorecida con una sola extracción.

Para explicar este comportamiento, hay que tener presente que el ácido tricloroacético es el disolvente que permite la dispersión de las ABs en el medio, ejerciendo su acción al interaccionar electrostáticamente con cada una de ellas y rodearlas, mediante el fenómeno de solvatación.

El contacto íntimo, que contribuye con la transferencia de ABs de la matriz al disolvente, puede verse afectado por el impedimento estérico que ofrece cada soluto. En este caso, como se puede ver en las figuras 17-19, la putrescina es una amina alquílica lo cual favorece el acercamiento de las moléculas de disolvente y por tanto la transferencia de masa por solvatación. Por otro lado, la histamina es una amina heterocíclica y la tiramina una amina aromática, cuyos anillos moleculares ofrecen impedimento estérico a la aproximación del disolvente, razón por la cual es necesario un contacto múltiple con agitación continua para mejorar la recuperación del soluto desde la matriz.

5.8 VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO

La validación del proceso analítico se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Tabla 30. Condiciones cromatográficas empleadas en el análisis de ABs

Condiciones	Descripción
Columna Cromatográfica:	Agilent, C18, 5 μm , 4.6 mm x 250 mm
Flujo	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura Columna	30°C
Longitud de onda de detección	230 nm
Fase móvil MeOH:H ₂ O en gradiente	Tabla 9, sección 4.4.5.2

Fuente: Esta Investigación.

Para este proceso se determinaron las figuras de mérito: rango dinámico lineal (RDL), linealidad, selectividad, intervalos de confianza, sensibilidad (expresada como límite de detección y de cuantificación), precisión (expresada como repetibilidad y precisión intermedia) y exactitud.

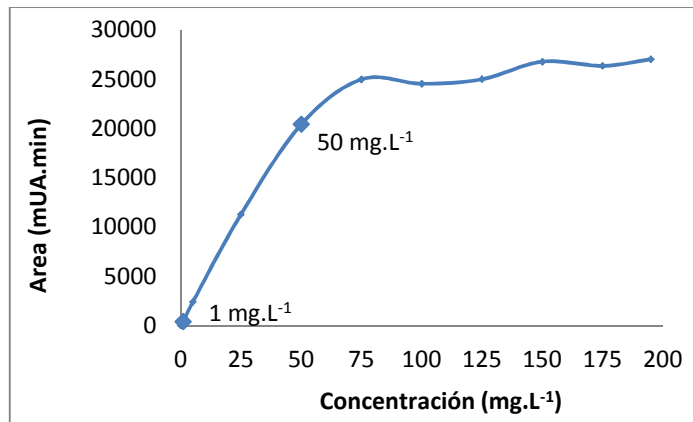
5.8.1 Evaluación del rango dinámico lineal (RDL)

La determinación de este parámetro fue fundamental en el proceso de validación, para asegurar que en las curvas de calibración la respuesta analítica estuviera linealmente relacionada con la concentración de cada analito.

Las figura 42-44 presentan las curvas de regresión para las tres ABs en el rango de concentración elegido respecto a la concentración de interés: 100 mg.L⁻¹. Se puede observar que la linealidad de la putrescina comienza a tener una desviación a partir de los 50 mg.L⁻¹ mientras que el límite superior para el rango lineal de histamina y tiramina es más amplio. Por otro lado, el límite inferior fue igual para todas las ABs, encontrándose desviaciones por debajo de 1 mg.L⁻¹.

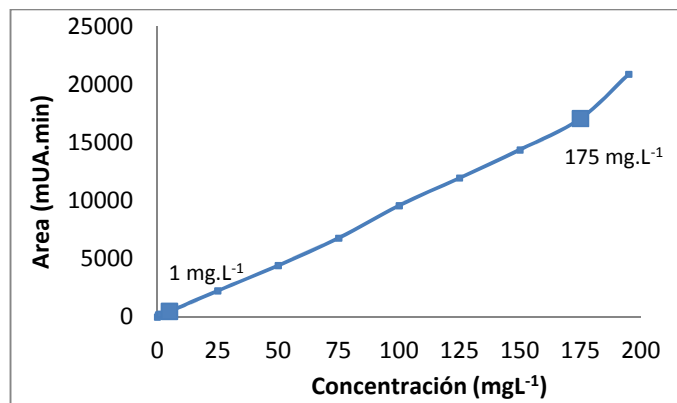
De acuerdo con el comportamiento de las curvas, se determinó que el rango lineal para putrescina, histamina y tiramina fueron de 1-50; 1-175; 1-125 mgL⁻¹ respectivamente. En estos rangos se puede asegurar la proporcionalidad de la cantidad de analito presente en la muestra con la concentración del mismo.

Figura 42. Curva de regresión para putrescina en el rango 0,5-195 mg.L⁻¹



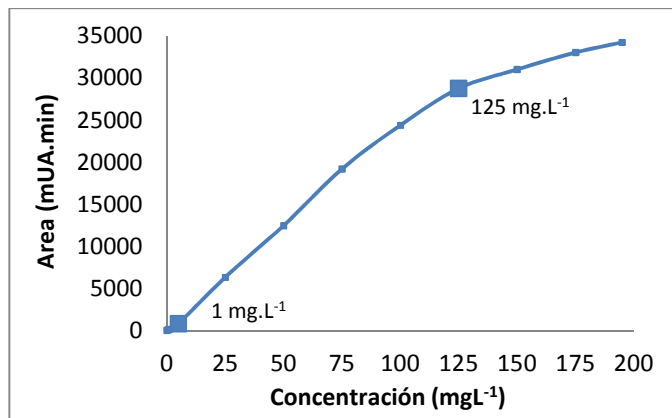
Fuente: Esta Investigación

Figura 43. Curva de regresión para histamina en el rango 0,5-195 mg.L⁻¹



Fuente: Esta Investigación

Figura 44. Curva de regresión para tiramina en el rango 0,5-195 mg.L⁻¹



Fuente: Esta Investigación

Si se analiza las áreas de todas las ABs desde el comienzo de la investigación, es posible evidenciar que el área de la putrescina siempre fue mayor, seguida por la tiramina y en último lugar la histamina. Esto, posiblemente se deba a una competencia de sustratos por el reactivo derivatizante, donde la putrescina es el sustrato con menor impedimento estérico y además tiene 2 grupos amino primarios, en comparación con la histamina quien tiene un grupo amino primario y un secundario y la tiramina quien cuenta sólo con un grupo amino primario. Ahora, para entender la mayor absorbancia del derivado de tiramina en comparación con el derivado de histamina hay que enfocarse en la presencia del grupo hidroxilo en el anillo bencénico de la tiramina, que en medio básico convierte a la molécula en un ión fenóxido el cual es un excelente nucleófilo.

Todo lo anterior da una idea para explicar el comportamiento de linealidad obtenido con cada AB; logrando inferir que la putrescina ofrece una reacción más eficiente y por tanto su derivado estará en mayor concentración en el medio de reacción, absorbiendo mayor radiación UV y posiblemente saturando al detector después de una concentración de $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, a partir de la cual se evidencia desviaciones de la linealidad. En este mismo orden se puede analizar el comportamiento de histamina y tiramina.

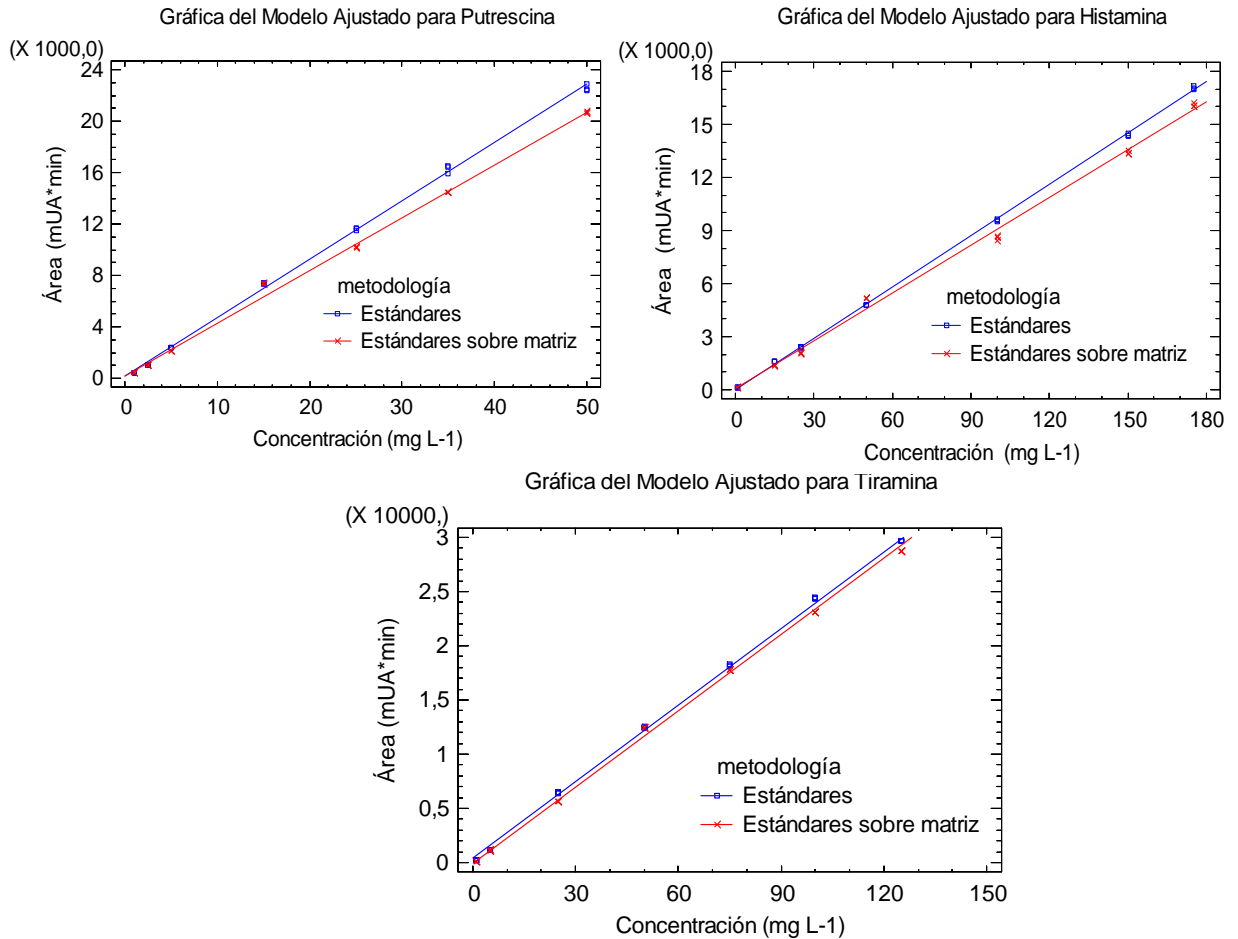
5.8.2 Evaluación del efecto Matriz

El pescado tiene un alto contenido de sales y lípidos, los cuales pueden dar lugar a interferencias, reduciendo la eficiencia en la extracción e interfiriendo en la detección. Debido a ello, el desarrollo de esta metodología requirió la evaluación del efecto matriz mediante la comparación de dos rectas de calibrado, una construida con las soluciones estándar de ABs y otra donde las soluciones estándar de cada AB se ha añadido a una matriz de pescado libre de ABs (blanco de muestra). Las gráficas de estos análisis se presentan la figura 45.

Analizando las gráficas de la figura 45, se observa claramente la diferencia entre ambas rectas, es decir que para la misma concentración de ABs el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental.

Adicional a esto, se puede ver que en la curva sobre matriz existe una disminución en el área de todas las ABs y este comportamiento es más marcado cuanto mayor es la concentración de las mismas, en otras palabras, el efecto matriz provoca un error sistemático proporcional, es decir, dependiente de la concentración de analito en la muestra.

Figura 45. Evaluación del efecto matriz mediante comparación de rectas de calibrado (Área vs concentración) para putrescina, histamina y tiramina con solución estándar y con solución estándar sobre matriz de pescado.



Fuente: Esta Investigación

Se realizó un análisis de varianza con el fin de probar la significancia estadística del efecto matriz sobre el análisis de ABs, buscando determinar si los interceptos y pendientes de las líneas de regresión son significativamente diferentes. Un Valor P menor que 0,05 (con un nivel de confianza del 95%) indica diferencias de los parámetros entre los niveles de las curvas de regresión evaluadas. En la tabla 31 se consignan los resultados de este análisis.

Tabla 31. Análisis de varianza para la evaluación del efecto matriz en el análisis de putrescina, histamina y tiramina.

Analito	Parámetro	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor P
Putrescina	Interceptos	6,522E6	1	6,522E6	49,73	0,000
	Pendientes	6,008E6	1	6,008E6	45,81	0,000
Histamina	Interceptos	2,101E6	1	2,101E6	30,30	0,000
	Pendientes	1,799E6	1	1,799E6	25,94	0,000
Tiramina	Interceptos	3,483E6	1	3,483E6	27,29	0,000
	Pendientes	1,029E6	1	1,029E6	8,06	0,007

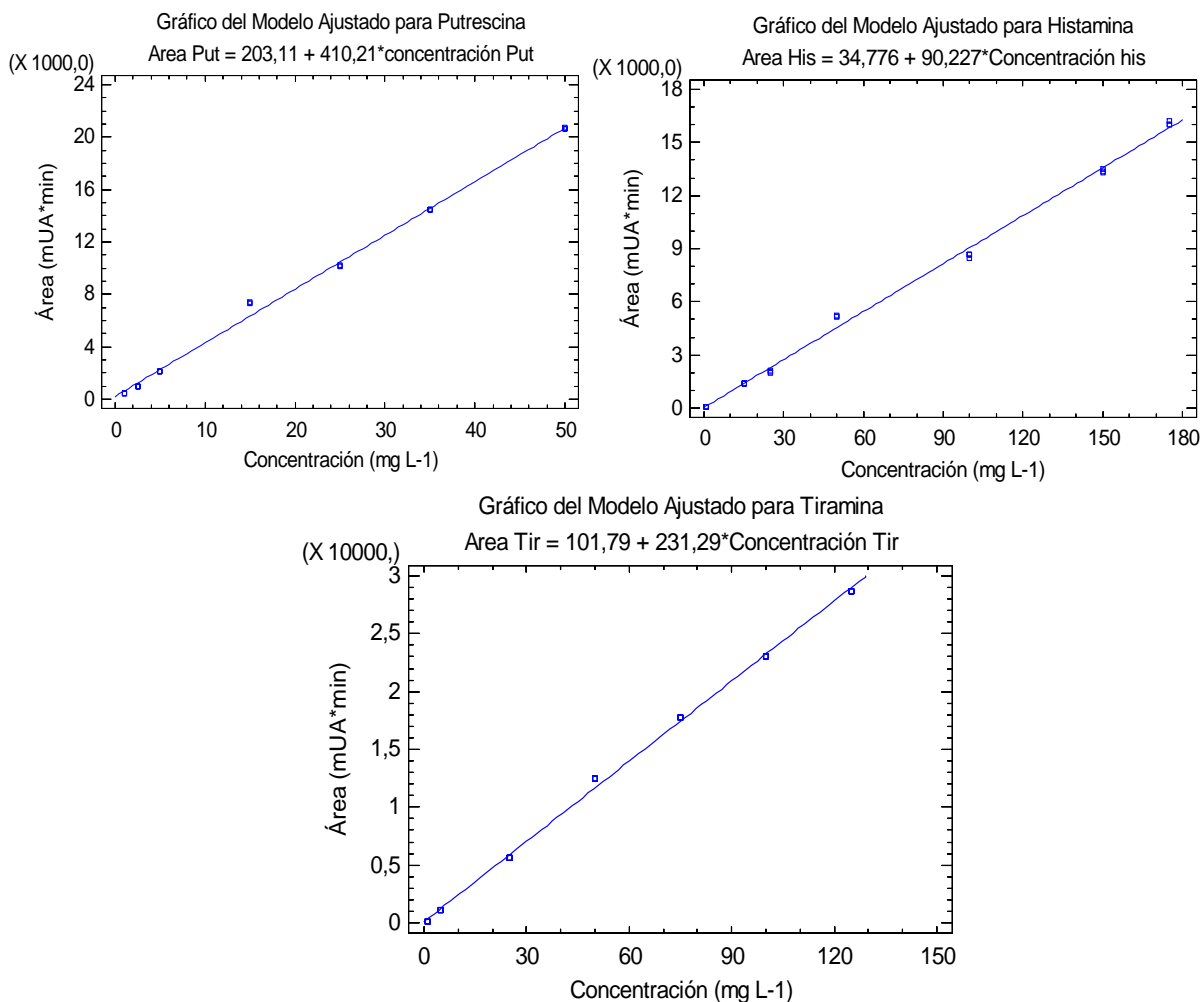
Fuente: Esta Investigación

Los resultados obtenidos demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes y las ordenadas en los niveles de las dos curvas de regresión evaluadas para cada AB, por tanto, se concluye que el efecto matriz debido a la presencia de lípidos y factores adicionales como el pH y concentración de sales, afectan la extracción y recuperación de las ABs putrescina, histamina y tiramina desde la matriz y producen errores en la determinación de ABs en pescado, con un nivel de confianza del 95%. Se concluye que para contrarrestar este efecto, hay que establecer las funciones de calibración sobre matriz.

5.8.3 Linealidad

Los resultados de linealidad se presentan como curvas de calibración para cada una de las ABs estudiadas en 7 niveles de concentración sobre matriz, tal como se indican en la figura 46.

Figura 46. Curvas de Calibración para Putrescina, Histamina y Tiramina en el rango lineal.



Fuente: Esta Investigación

5.8.3.1 *Determinación de los estimadores de regresión para las curvas de calibración y test de linealidad.* Para comprobar si el modelo lineal simple se ajusta o no para estudiar la relación entre el área y la concentración de cada AB, se determinó: la ecuación de la recta y se calcularon los parámetros de la pendiente, el intercepto, el coeficiente de correlación (r), y el coeficiente de determinación (r^2) de la línea de regresión o curva de calibración ajustada, mediante el método de los mínimos cuadrados.

Los criterios de aceptación tomados en consideración fueron¹⁴⁷:

- Coeficiente de correlación de la regresión lineal $r \geq 0,99$
- Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0,98$
- Pendiente distinta de cero ($t_{\text{experimental}} > t_{\text{crítico}}$)
- Intercepto igual o cercano a cero ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{crítico}}$)

En la tabla 32, se consignan los estimadores de regresión para putrescina, histamina y tiramina.

Tabla 32. Estimadores de regresión para putrescina, histamina y tiramina.

Amina Biogénica	Parámetro	Contraste t		
		Valor exp.	Valor crítico	
Putrescina	Coeficiente de correlación	0,998	40,743	2,365
	Coeficiente de determinación	0,997		
	Pendiente	410,210	75,299	2,571
	Intercepto	203,110	1,453	2,015
Histamina	Coeficiente de correlación	0,998	40,743	2,365
	Coeficiente de determinación	0,997		
	Pendiente	90,227	74,201	2,571
	Intercepto	34,776	0,293	2,015
Tiramina	Coeficiente de correlación	0,999	70,640	2,365
	Coeficiente de determinación	0,999		
	Pendiente	231,29	120,250	2,571
	Intercepto	101,79	0,755	2,015

Fuente: Esta Investigación

¹⁴⁷SUAREZ, Yania; IZQUIERDO, Adalberto y MILIAN, Jana. Validación de un método cromatográfico para la cuantificación de mefenesina en tabletas de producción nacional. *En: Rev Cubana Farm.* Febrero, 2009, vol. 43, n. 2, p. 0-0. ISSN 1561-2988.

Como se puede observar en la tabla 32, se cumplen los requerimientos de un coeficiente de determinación lineal (r) mayor o igual a 0,99 y de un coeficiente de determinación (r^2): mayor o igual a 0,98. Los resultados obtenidos indican que el modelo ajustado es capaz de explicar la respuesta (área) a partir del uso de la variable concentración, de manera que en el intervalo de concentración 1-50; 1-175; 1-125 mg.L^{-1} para putrescina, histamina y tiramina respectivamente, se satisfacen las condiciones de linealidad del método analítico, existiendo una dependencia lineal y una relación relativamente fuerte entre las variables.

Hay que resaltar que los estadísticos coeficiente de determinación (expresados en porcentaje) indican que el modelo ajustado explica 99,7%, 99,7% y 99,9% de la variabilidad en área de Putrescina, Histamina y tiramina debido a la influencia de la variable X (concentración inyectada).

Como un mejor indicador del modelo lineal se realizó una prueba t-Student para “r” al 95% de confianza y con n-2 grados de libertad, para probar una correlación significativa entre las variables área y concentración, es decir, H_0 : correlación cero. Como se observa en la tabla 29 para cada AB $t_{\text{exp}} > t_{\text{crit}}$, por tanto, se rechaza la hipótesis nula H_0 , existiendo una correlación lineal significativa en la calibración con la probabilidad calculada.

Adicionalmente, se evaluó la significación del intercepto y la pendiente con respecto al cero a través del estadístico t- Student, con la hipótesis nula, H_0 : el parámetro no es significativamente distinto de cero frente a la hipótesis alternativa H_1 : el parámetro es significativamente distinto de cero.

Al aplicarse la prueba de Student para la pendiente se observa que $t_{\text{exp}} > t_{\text{crit}}$ para cada AB, por tanto, la hipótesis nula se rechaza y se concluye que el método es sensible a la concentración del analito. Por su parte, para el intercepto $t_{\text{exp}} < t_{\text{crit}}$ para una probabilidad del 95% y n-2 grados de libertad, lo que permite aceptar la hipótesis nula quedando así demostrada la proporcionalidad del sistema.

5.8.3.2 Análisis de Varianza. Esta prueba se realizó con el fin de probar la significancia estadística del modelo ajustado, donde un valor P menor que 0,05 indica que el modelo es altamente significativo. En los datos consignados en la tabla 33, se puede observar que los valores P son menores que 0,05 existiendo una relación estadísticamente significativa entre el área de cada AB y la concentración, con un nivel de confianza del 95%.

Esto también se corrobora al observar la relación $F_{\text{experimental}} > F_{\text{crítico}}$, rechazando la H_0 , la cual sugería que el efecto de los distintos niveles de concentración era el mismo, es decir, que el área sería la misma para cada uno de las concentraciones de trabajo. Además, con esto también se puede concluir que el efecto de los errores aleatorios sobre la señal analítica área es mucho menor que el efecto de la

concentración de cada AB y que por tanto el método es sensible con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 33. Análisis de varianza para probar la significancia estadística del modelo ajustado para cada AB.

Analito	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	F _{experimental}	F _{crítico}	Valor P
Putrescina	1,27E9	1	1,27E9	16935	2.35	0,000
Histamina	7,90E8	1	7,90E8	43621	2.35	0,000
Tiramina	2,38E9	1	2,38E9	16311	2.35	0,000

Fuente: Esta Investigación

5.8.4 Selectividad

La selectividad del método se analizó mediante la determinación de los parámetros de eficiencia de la separación cromatográfica, los cuales se calcularon de acuerdo con las fórmulas matemáticas consignadas en el anexo A.

En la tabla 34 se puede observar que los factores de capacidad o retención (k') se encuentran en el rango 2-6 lo que infiere una adecuada velocidad de migración de los analitos; de la misma manera los factores de selectividad (α) fueron mayores a la unidad los valores de resolución mayores a 1,5 y el factor de Asimetría (A_s), fue mayor a 0,9 y menor a 1,5; indicando una adecuada separación de las ABs. Por tanto, los parámetros de eficiencia están acorde con la literatura y el método es selectivo para la separación de las tres ABs en estudio.

Tabla 34. Parámetros de eficiencia para la separación Cromatográfica

Pico	t_R (min)	w (min)	A_s	k'	α	R_s
Putrescina	7,93	0,14	1,101	2,52	-	-
Histamina	10,91	0,11	0,985	3,85	1,52	23,92
Tiramina	11,71	0,09	0,986	4,21	1,09	7,78

Fuente: Esta Investigación

5.8.5 Sensibilidad

5.8.5.1 *Límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)*. La estimación del LD y LC se hizo con base en la curva de calibración a niveles bajos de concentración. Los gráficos de estos análisis se consignan en los anexos H e I y en la tabla 35 se registran cada uno de los estimados, así como los límites de detección y cuantificación experimentales para cada AB.

Tabla 35. LD y LC del método para putrescina, histamina y tiramina

ABs	Ybl	Sb	m	LD (mg.L ⁻¹)	LC (mg.L ⁻¹)
Putrescina	360	21	410	0,3	1
Histamina	125	18	90	0,7	2
Tiramina	188	21	232	0,4	1

Fuente: Esta Investigación

5.8.5.2 *Comprobación experimental del límite de detección y cuantificación*. En la tabla 36 se consignan los resultados obtenidos para la comprobación experimental de los LD y LC para cada una de las ABs.

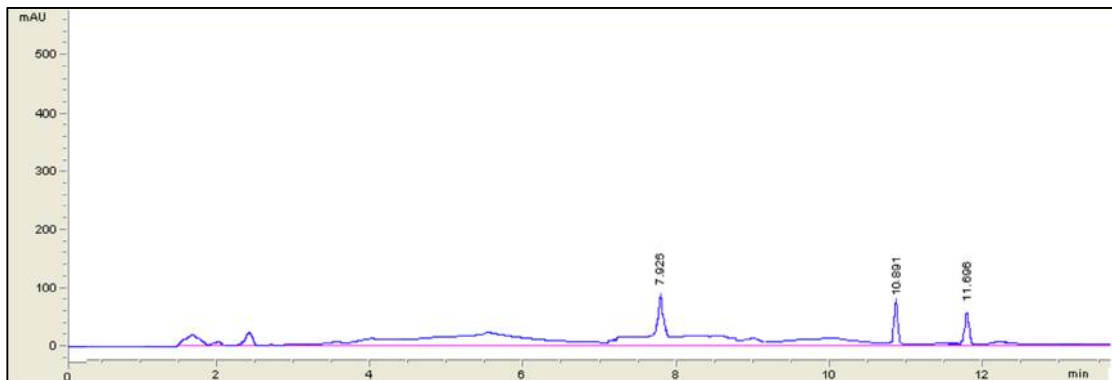
Tabla 36. Comprobación experimental del LD y LC del método para cada AB.

Amina Biogénica	LD		LC		%RC
	Concentración (mg.L ⁻¹)	Área (mUA.min)	Concentración (mg.L ⁻¹)	Área (mUA.min)	
Putrescina		131,54		576,20	90,95
	0,3	129,98	1	588,26	93,89
		127,96		583,70	92,78
	%CV	1,38	%CV	1,05	
Histamina		62,90		206,86	95
	0,7	65,70	2	212,30	98
		63,10		213,93	99
	%CV	2,44	%CV	1,75	
Tiramina		92,60		269,23	72
	0,4	93,00	1	264,29	70
		95,70		279,11	76
	%CV	3,85	%CV	2,79	

Fuente: Esta Investigación

De los resultados alcanzados se puede decir que el método detecta putrescina, histamina y tiramina desde concentraciones de 0,3; 0,7 y 0,4 mg.L⁻¹ respectivamente, tal como se presenta en la figura 47.

Figura 47. Cromatograma con concentraciones correspondientes al LD para putrescina, histamina y tiramina.



Fuente: Esta Investigación

En lo que respecta a los resultados de LC, se confirma que el método cuantifica confiablemente la concentración de putrescina e histamina en matriz de pescado desde 1 y 2 mg.L⁻¹ respectivamente, ya que estas concentraciones están dentro del rango lineal, los %CV son menores al 5% y los %RC se encuentran en el rango 80-110% dado por la decisión 657¹⁴⁸, asegurando una cuantificación con precisión y exactitud aceptable.

5.8.6 Precisión

En el anexo J se presenta la precisión, en términos de repetibilidad, y en el anexo K se presenta los valores obtenidos para la precisión en términos de precisión intermedia.

En ambos casos se observa que los % CV para repetibilidad y precisión intermedia son menores al 5%, cumpliendo con los criterios de aceptación propuestos por la decisión 657, donde para una fracción de masa 1000 µg/kg el %CV no debe exceder el 10%¹⁴⁹, por lo que se concluye que el método es preciso para garantizar los resultados de este parámetro en la validación del método.

¹⁴⁸ CCE. CdICE. Op. Cit., 8 p.

¹⁴⁹ Ibid., 14 p.

Por su parte, en las tablas de los anexos J y K también puede observarse el criterio de aceptabilidad de la precisión basado en el coeficiente de variación de Horwitz. En este sentido se cumplió que para la repetibilidad, el CV% fue $< (CVh\%/2)$. Y en el caso de la precisión intermedia (intralaboratorio) el CV% $< (2CVh\%/3)^{150}$.

Las dificultades en los procesos de derivatización y extracción así como la influencia de la matriz de pescado en la determinación de ABs, pudieron influir en la precisión del método; no obstante, la optimización y mejoras a estas dificultades, permitieron obtener los % CV menores al 5% que aseguran una precisión en la entrega de resultados con esta metodología.

5.8.7 Intervalos de confianza para tiempos de retención

En la tabla 37 se presentan los intervalos de confianza, considerando la media muestral de cada AB con un nivel de confianza del 95%

Tabla 37. Intervalos de confianza al 95,0% para tiempos de retención de las ABs (n =162)

Amina Biogénica	Límite De Confianza
	t_R $X \pm SD$ (min)
Putrescina	7,924 +/- 0,005
Histamina	10,891 +/- 0,004
Tiramina	11,691 +/- 0,005

$X \pm SD$, Promedio \pm Desviación Estándar.

Fuente: Esta Investigación

La interpretación clásica de estos intervalos es que, en muestreos repetidos, estos contendrán la media verdadera de la población de la que fueron extraídas las muestras, el 95% de las veces. En términos prácticos, puede establecerse con 95% de confianza, que la media verdadera de t_R de putrescina, histamina y tiramina se encuentra en los intervalos 7,9192 y 7,929; 10,887 y 10,896; 11,685 y 11,696 minutos respectivamente.

Estos intervalos de confianza, son útiles en el momento de la identificación de las señales cromatográficas para cada uno de los derivados de putrescina, histamina y tiramina, asumiendo que sólo en esos intervalos de tiempo se podrá identificar y cuantificar cada uno de los analitos de estudio con una precisión aceptable.

¹⁵⁰Ibid., 8 p.

5.8.8 Exactitud

La exactitud fue medida basándose en el porcentaje de recuperación de cada AB en las muestras de pescado. En la tabla 38 se presentan los niveles de concentración evaluados para cada analito, así como los resultados dados en porcentajes de recuperación.

Tabla 38. Exactitud evaluada a partir de los porcentajes de recuperación de cada AB en matriz.

Día	PUTRESCINA			HISTAMINA			TIRAMINA		
	10	50	100	30	80	150	10	50	125
	mg.L ⁻¹								
	% RC	% RC	% RC	% RC	% RC	% RC	% RC	% RC	% RC
1	99,57	95,92	95,51	97,46	98,42	94,76	72,92	85,50	86,50
2	99,03	95,86	95,03	97,47	98,70	95,99	72,47	86,03	85,09
3	99,49	96,91	94,85	96,97	98,23	95,89	73,27	86,11	87,94
4	99,63	96,29	95,38	97,32	98,15	96,32	72,58	85,62	86,50
5	99,54	96,61	94,78	97,29	98,43	95,81	73,69	86,14	85,22
6	99,69	95,95	94,08	97,71	97,93	94,72	72,77	86,18	84,90
X	99,49	96,26	94,94	97,37	98,31	95,58	72,95	85,93	86,02
%CV	0,24	0,45	0,54	0,25	0,27	0,71	0,63	0,34	1,37

Fuente: Esta Investigación

La recuperación del método fluctúa entre 94,08 y 99,69 % para putrescina; 94,72 y 98,70% para histamina; y 72,47 y 87,94% para tiramina. Estos resultados están acordes para putrescina e histamina con los propuestos por la Comunidad Europea, donde para una fracción de masa 10 µg/kg se esperan valores entre 80%-110%¹⁵¹, por lo que se concluye que el método presenta una exactitud adecuada para putrescina e histamina en todo el rango de concentración evaluado. Por su parte, para tiramina se podría hablar de exactitud a partir de los 50 mg.L⁻¹

5.9 DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGENICAS (PUTRESCINA, HISTAMINA Y TIRAMINA) EN TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) COMERCIALIZADAS EN LA CIUDAD DE PASTO

Se analizaron 8 muestras de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y 8 de tilapia (*Oreochromis niloticus*) comercializadas en la ciudad de pasto. Los resultados de los análisis de aminas biogénicas se resumen en la tabla 39.

¹⁵¹ Ibid., 8 p.

Tabla 39. Contenido de putrescina, histamina y tiramina en las especies trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) comercializadas en la ciudad de Pasto.

Punto de Muestreo	Especie	T _{alm} (°C)	Almacenamiento del lugar de muestreo	Put	His (mg.g ⁻¹)	Tir
1	Trucha	T _{cong}		ND	ND	ND
1	Tilapia	T _{cong}		ND	ND	ND
2	Trucha	T _{cong}		ND	ND	ND
2	Tilapia	T _{cong}		ND	ND	ND
3	Trucha	T _{cong}	Bolsa plástica, congelador	ND	ND	ND
3	Tilapia	T _{cong}		ND	ND	ND
4	Trucha	T _{cong}		ND	ND	ND
4	Tilapia	T _{cong}		ND	ND	ND
5	Trucha	T _{cong}		ND	ND	ND
5	Tilapia	T _{cong}		ND	ND	ND
6	Trucha	T _{cong}		ND	ND	ND
6	Tilapia	T _{cong}		ND	ND	ND
7	Trucha	T _{amb}		ND	ND	ND
7	Tilapia	T _{amb}	Bolsa plástica, sobre un mesón	ND	ND	ND
8	Trucha	T _{amb}		0,402 ± 0,071	ND	ND
8	Tilapia	T _{amb}		ND	ND	ND

T_{alm}: Temperatura de almacenamiento. T_{amb}: Temperatura ambiente. T_{cong}: Temperatura de congelación. ND: No Detectada. Fuente: Esta Investigación

De las 16 muestras analizadas se identificó una con un contenido de putrescina mayor al límite de cuantificación (Anexo L). Por su parte, las aminas biogénicas restantes histamina y tiramina no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas.

La muestra en la cual se detectó putrescina no se encontraba almacenada adecuadamente y se mantenía expuesta a la intemperie sin ningún mecanismo que permitiera conservar la cadena de frío.

Estos resultados permiten inferir que la reducción de temperatura como medio de conservación tiene gran importancia, puesto que al no mantener el pescado a temperaturas bajas, aumenta la actividad de las enzimas y bacterias, se aceleran los procesos químicos y físicos, aumentando la tasa de deterioro del pescado y conllevando a la producción de toxinas como son las Aminas biogénicas

A su vez, los resultados obtenidos en esta investigación se correlacionan con algunos reportados en la bibliografía, ya que en especies como trucha arcoiris almacenada a bajas temperaturas se han encontrado concentraciones de putrescina con valores desde 0,4 hasta 8,97 $\mu\text{g/g}$ ¹⁵².

¹⁵² REZAEI, Masoud, *et al.* The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. En: Food Chemistry, **2007**, vol. 103, p. 150–154.

CONCLUSIONES

- J Las condiciones óptimas para la determinación de histamina, tiramina y putrescina en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) consistieron en la derivatización de las ABs con 15µL de cloruro de benzoilo al 99,9%, a 20°C de temperatura y 40 minutos de reacción; la extracción de mediante lixiviación con ácido tricloroacético al 6%, variando número y tiempo de extracción para cada AB; y el análisis cromatográfico en modo gradiente con la fase móvil metanol:Agua a flujo 0,8 mL/min, temperatura de columna de 30°C y longitud de onda de 230 nm.

- J Las dificultades evidenciadas a lo largo de los procesos de derivatización y extracción así como la influencia de la matriz de pescado en la determinación de ABs, pudieron influir en la precisión del método. No obstante, la optimización de estos procesos y de las condiciones instrumentales permitieron obtener coeficientes de variación (CV) menores al 5% cumpliendo con los criterios de aceptación propuestos por la decisión 657¹⁵³, lo cual expresa que el método es preciso para garantizar los resultados de la determinación de putrescina, histamina y tiramina en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*).

- J La derivatización de putrescina, histamina y tiramina, se favoreció mediante agitación continua a temperatura ambiente, lo cual, se comprobó con la obtención de señales cromatográficas selectivas para los analitos de interés con mayor área y con menor número de interferencias en el medio de elución.

- J La agitación continua y el contacto directo y múltiple de la matriz de pescado con ácido tricloroacético, favorecieron el proceso de extracción de tiramina desde la matriz, incrementando su eficiencia hasta en un 50%.

- J El modo de separación en gradiente que incluyó una fuerza eluotrópica baja en los primeros minutos y un incremento del poder de elución al pasar el tiempo, favoreció el equilibrio de distribución de los derivados de putrescina, histamina y tiramina entre la fase móvil y la fase estacionaria, contribuyendo con una

¹⁵³CCE. CdICE. Op. Cit., 14 p.

separación eficiente de los analitos y con unas características cromatográficas deseables.

- J) Se validó una metodología analítica por cromatografía líquida de alta eficiencia evaluando los parámetros de linealidad, rango, precisión, límites de detección y cuantificación y exactitud. La linealidad se cumplió en los rangos de concentración de 1-50; 1-175; 1-125 mg.L⁻¹ para putrescina, histamina y tiramina respectivamente. Los resultados de coeficientes de variación menores al 5% para áreas y tiempos de retención demostraron la precisión del método. Los límites de detección y cuantificación de 0,3 y 1 mg.L⁻¹ para putrescina; 0,7 y 2 mg.L⁻¹ para histamina y 0,4 y 1 mg.L⁻¹ para tiramina comprobaron la sensibilidad del método. Los porcentaje de recuperación determinados para putrescina e histamina en todos los rangos de concentración y para tiramina desde los 50 mg.L⁻¹ infirieron una exactitud adecuada, concluyendo que el método analítico se puede implementar en la determinación de putrescina, histamina y tiramina en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- J) De las 16 muestras analizadas, se determinó putrescina con un valor de 0,402 ± 0,071 mg.g⁻¹ en una muestra de trucha. Estos resultados se correlacionan con algunos reportados en la bibliografía, ya que en especies como trucha arcoiris almacenada a bajas temperaturas se han encontrado concentraciones de putrescina con valores desde 0,4 hasta 8,97 µg/g.

PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

PONENCIA

-) Esta investigación ha sido sometida a divulgación científica a través de la participación en los siguientes eventos:

XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines-COLACRO 2014 y 7º Congreso Colombiano de Cromatografía-COCOCRO 2014, con la propuesta denominada: Determinación por HPLC de aminas biogénicas en las especies trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) comercializadas en la ciudad de Pasto, en la temática ALIMENTOS Y BEBIDAS, modalidad Poster. Cartagena de Indias-Colombia, 3 de octubre de 2014.

Publicación en el libro de las memorias del congreso titulado CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES (ISBN 978-958-99607-8-3), en la sección ALIMENTOS Y BEBIDAS con el código P-AB-63.

PUBLICACIÓN

-) Se publicó el artículo: "CENTRAL COMPOSITE DESIGN TO OPTIMIZE THE DERIVATIZATION PROCEDURE FOR ANALYSIS OF BIOGENIC AMINES BY HPLC-UV" en la Journal of the Brazilian Chemical Society, el cual se encuentra registrado con el DOI 0103-5053:

ARGOTTY, Ángela Katherine y LOZADA, Juan José. CENTRAL COMPOSITE DESIGN TO OPTIMIZE THE DERIVATIZATION PROCEDURE FOR ANALYSIS OF BIOGENIC AMINES BY HPLC-UV En: *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Julio, **2016**, vol. 0, no. 0, p. 1-7. doi: 0103-5053

-) Participación de la convocatoria No 01-2014 "Formación de capital humano de alto nivel, Componente Jóvenes Investigadores e innovadores" en el área estratégica-componente B, con la propuesta titulada: "Determinación por HPLC de histamina, tiramina y putrescina en las especies trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) comercializadas en la ciudad de Pasto.

RECOMENDACIONES

-) Evaluar algunos factores que estén directamente relacionados con la comercialización de pescado y que influyan en la formación de aminas biogénicas como cadena de frío, tiempo de transporte, tiempo de almacenamiento, tipo de sacrificio.

-) Realizar pruebas fisicoquímicas (pH, humedad, temperatura, contenido de aminas volátiles) a las matrices de pescado y correlacionarlas con la producción de aminas biogénicas, con el fin de que entidades de salud pública puedan incluirlas dentro de sus actividades de control.

-) Aislar e identificar, las especies bacterianas de los cultivos iniciadores implicados en la producción de estas aminas biógenas.

-) Formular actividades y programas de vigilancia por parte de las entidades competentes, con el fin de promover un control en la calidad de los productos piscícolas comercializados en la ciudad de Pasto y así contribuir con la seguridad alimentaria de la población.

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, Reza, *et al.* Determination of histamine content in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during ice storage. En: *Comparative Clinical Pathology*. Junio, **2014**, vol. 23, no. 3, p. 775-778.

ALBULUSHI, Ismail, *et al.* Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-a review. En: *Crit. Rev. Food Sci.* Mayo, **2009**, vol. 49, no. 4, p. 369-377.

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Histamine in seafood: Chemical method. Sec. 35.5.31, Method 957.07. In Official Methods of Analysis of AOAC International,. 16 ed. P.A. Cunniff, **1995a**, 15-16 p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Histamine in seafood: Fluorometric method. Sec. 35.1.32, Method 977.13. In Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed, P.A. Cunniff, **1995b**, 6-17 p.

BASTIDAS, Luis, *et al.* Evaluación sanitaria de la calidad microbiológica de productos acuícolas en la ciudad de San Juan de Pasto. En: *Centro de estudios en salud*. Noviembre, **2005**, vol. 1(6), p. 22-32

BOVER-CID, Sylvia, *et al.* Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. En: *Journal of Food Protection*. Febrero, **2000**, vol. 63, no. 2, p. 237-243.

BRUNT, Jason; NEWAJ-FYZUL, Aweeda y AUSTIN, Brian. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: *Journal Fish Dis.* Octubre, **2007**, vol. 30, no. 10, p. 573-9.

BUENO, Carolina, *et al.* HPCL determination of histamine, tyramine and amino acids in shrimp by-products. En: *J. Braz. Chem. Soc.* Febrero, **2012**, vol. 23, n.1, p.096-102

CAROU, Carmen y NOGUÉS, Teresa. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. Trabajo de grado (Tesis doctoral), Universidad de Barcelona, Departamento de nutrición y Bromatología, **2008**, 98-101 p.

CASTILLO, Campo. Tilapia Roja 2001: Una evolución de 20 años de la incertidumbre al éxito doce años después. [en línea].

Cali-Colombia. [citado el 12 de abril de 2015]. Disponible en <<http://www.ag.arizona.edu/azaqua/ista/edited,tedpapers/south%20A122>>.

CCE. CdICE. Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, **2002**, 1-29 p

CHYTIRI, S., *et al.* Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. En: *Food Microbiology*. Abril, **2004**, vol. 21, no. 2, p. 157-165

CHYTIRI, S., *et al.* Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) stored on ice. En: *J Food Prot.* Mayo, **2004**, vol. 67. no. 5, p. 960-5.

CRAWFORD SCIENTIFIC. [en línea]. [citado el 17 de julio de 2016]. Disponible en <http://www.grupobiomaster.com/pdf/LC-13_Incidencias_y_Mantenimiento_en_HPLC.pdf>

CUNHA, França, *et al.* Determinação e monitoramento de aminas biogênicas por cromatografia líquida de alta eficiência em filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) resfriados embalados em atmosfera modificada e irradiados. En: *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. Octubre, **2012**, vol. 35, no. 3, p. 275-282.

DALGAARD, Paw, *et al.* Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone*) effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. En: *J Appl Microbiol.* Julio, **2006**, vol. 1, no. 101, p. 80–95.

DECAMP, Oliver; MORIARTY David y LAVENS, Patrik. Probiotics for shrimp larviculture. review of field data from Asia and Latin America. En: *Aquaculture Research*. Marzo, **2008**, vol. 39, no. 4, p. 334-338

DE LAS RIVAS, B., *et al.* PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. En: *Journal of Food Protection*. Octubre, **2006**, vol. 69, p. 2509-2514.

DIRECTIVA 91/439/EEC. Directive of 22 July 1991 establishing standards to be applied to the production and commercialization of fishery products. En: *Official Journal of the European Communities*. Julio, **1991**, vol. L268, p. 15–34.

DU, Wei, *et al.* Development of biogenic amines in yellow fin tuna (*Thunnus albacores*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. En: *J Food Sci.* **2002**, vol. 67, no. 1, p. 292-301.

DURLU, Fügen; AYHAN, Kamuran y VURAL, Nilufer. Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. En: *Meat Sci.* Junio, **2001**, vol. 58, no. 2, p. 163-6.

EURACHEM Guide. Terminology in Analytical Measurement. (2011). [en línea]. [citado el 17 de julio de 2015]. Disponible en <<http://www.eurachem.org>>

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. En: *EFSA Journal*, **2011**, vol. 9, no. 10, p. 2393-2486.

FERGUSON, Rosemary, et al. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of ongrowing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). En: *Journal of Applied Microbiology*. Marzo, **2010**, vol. 109, no. 3, p. 851-862.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition. [en línea]. [citado el 16 de Noviembre de 2015]. Disponible en <<http://www.fda.gov/downloads/food/guidancecompliancereulatoryinformation/>>

GALGANO, Fernanda. Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials. En: *Food Res.* Octubre, **2009**, vol. 42, no. p. 1147-1152.

GALLEGUILLOS, Monica. Aminas Biogénicas, Nuevos Indicadores Químicos Utilizados Como Criterios De Calidad En Harina De Pescado. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. En: *FAO-México*. Mayo, **1994**, vol. 5, no. 16, p. 269.

GARCÍA, Emilia y MUÑOZ, Rosario. Does *Oenococcus oeni* produce histamine? En: *International Journal of Food Microbiology*. Julio, **2012**, vol. 157, no. 2, p.121–9.

GARCIA, Saurina y HERNANDEZ, Cassou. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. En: *Analytica Chimica Acta*. **2006**, vol. 575, no. 1, p. 97-105.

GOBERNACIÓN DE NARIÑO. Plan de Desarrollo Departamental, “Nariño Mejor”. [en línea]. Pasto- Nariño. [citado el 01 de febrero de 2014]. Disponible en <<http://www.narino.gov.co/files/PlandeDesarrollo/PLANDEDESARROLLONARINOMEJOR2012-2015.pdf>>

GONZAGA, Victor, et al. Histamine levels in fish from markets in Lima, Peru. En: *J Food Prot.* Mayo, **2009**, vol. 72, no. 5, p. 1112-5.

- GONZÁLEZ, Consuelo, *et al.* Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in *chorizo* dry sausage. En: *Food Microbiol.* Noviembre, **2003**, Vol.20, no. 3, p. 275-284.
- HERNÁNDEZ, Iván. Plan de manejo sanitario con distribuidores de pescado y mariscos en el municipio de San Juan de Pasto. Informe presentado a La DMSS. San Juan de Pasto, **2001**, p.12.
- HERNÁNDEZ-JOVER, Teresa, *et al.* Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. En: *Journal of Agricultural Food Chemistry.* Octubre, **1996**, vol. 44, no. 10, p. 3097–3101.
- HOFMANN, Klaus. The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Imidazole and Its Derivatives. 6 ed. New York: John Wiley & Sons, **2009**. p.155.
- ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios. 6 ed. Acibia Zaragoza, **2001**, 156-158 p.
- IZQUIERDO, Pedro, *et al.* Aminas Biógenas y Crecimiento Bacteriano en Carne de Hamburguesas”. En: *RC.* Febrero, **2004**, vol.14, no.1, p. 07-1.
- JØRGENSEN, Lasse Vigel; HUSS, Hans Henrik y DALGAARD, Paw. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. En: *Journal of Applied Microbiology.* Enero, **2001**, vol. 89, no. 6, p. 920-934.
- KAROVI OVÁ, Jolana y KOHAJDOVÁ, Zlatica. Biogenic amines in food. En: *Chem.* Agosto, **2005**, vol. 59, no. 1, p. 70-79.
- KATIKOU, Panagiota, *et al.* Relation of biogenic amines formation with microbiological and sensory attributes in Lactobacillus-inoculated vacuum-packed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. En: *J Agric Food Chem.* Diciembre, **2006**, vol. 54, no. 12, p. 4277-83.
- LADERO, Victor, *et al.* Toxicological effects of dietary biogenic amines. En: *Current Nutrition and Food Science.* Mayo, **2010**, vol. 6, no. 2, p.145-156.
- LANDETE, Jose, *et al.* PCR methods for the detection of biogenic amine producing bacteria on wine. En: *Annals of Microbiology,* **2010**, vol. 61, no.1, p.159–166.
- LATORRE, M. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. En: *Food Chem.* Marzo, **2008**, vol.107, no. 2, p. 912-921.

LAVIZZARI, Tomasso. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. En: Journal of Chromatography. Septiembre, **2006**, vol. 1129, no. 1, p. 67–72.

LAZARO DE LA TORRE, Cesar y CONTE-JUNIOR, Carlos. Metodos cromatográficos para determinar aminos biogénicas en alimentos de origen animal. En: Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo. Diciembre, **2013**, vol. 50, n. 6, p. 438-440.

LJERKA, Prester. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. En: Food Additives & Contaminants. Junio, **2011**, vol. 11, no. 28, p. 1547-1560.

LORENZO, José, *et al.* Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives. En: Meat Sci. Octubre, **2007**, vol. 77, no. 2, p. 287–93.

MAINTZ, Laura y NOVAK, Natalija. Histamine and histamine intolerance. En: The American Journal of Clinical Nutrition. Enero, **2007**, vol. 85, no. 5, p.1185–1196.

MIETZ, John y KARMAS, Endel. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. Enero, **1977**, vol. 61, no. 1, p. 139–145.

MILLER, James. Estadística y quimiometría para Química analítica. 4 ed. Madrid: Pearson Education, **2002**, 145 p.

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución 122 de 2012 (enero 26). Por la cual se modifica parcialmente la Resolución número 776 de 2008. *Diario Oficial*. Bogotá, D.C., **2012**. No. 48.329. 3 p.

MORET, Sabrina, *et al.* A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. En: Food Chemistry. Febrero, **2005**, vol. 89, no. 3, p.355–361.

MORGAN, David. Determination of Polyamines as Their Benzoylated Derivatives by HPLC. En: Springer Protocols. **1998**, vol. 79, p. 113.

NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM. [en línea]. [citado el 17 de julio de 2016]. Disponible en <<http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-541-1996.PDF>>

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA. ICONTEC. [en línea]. [citado el 22 de Noviembre de 2015]. Disponible en <<http://tienda.icontec.org/brief/NTC1322.pdf>>

NOWAK, Agnieszka y CZYZOWSKA, Agata. In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms. En: Meat Sci. Julio, **2011**, vol. 88, no. 3, p. 571-4.

ÖNAL, Arma an. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. En: Food Chemistry. Enero, **2007**, vol. 103, no. 4, p. 1475-1486

ÖNAL, Arma an; TEKKELI, Serife y ÖNAL, Cem. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. En: Food Chemistry. Mayo, **2013**, vol. 138, no.1, p. 509–15.

ORGANIC CHEMISTRY PORTAL. [en línea]. [citado el 23 de Julio de 2016]. Disponible en <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.htm>

OZOGUL, Fatih y ÖZOGUL, Yesim. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packing and vacuum packing. En: Food Chem. Agosto, **2005**, vol. 99, no. 3, p. 574–578.

PALACIOS, Antonio, *et al.* Influencia organoléptica de las aminas biógenas producidas durante la fermentación maloláctica del vino. En: ACE Revista de Enología. Febrero, **2005**, vol. 70, no. 53, p.14–20.

PALEOLOGOS, E., *et al.* Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). En: Food Microbiol. Octubre, **2004**, vol. 21, no. 5, p. 549-557. PATANGE, S., MUKUNDAN, M. y ASHOK, K. A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. Central Institute of Fisheries Technology, India. En: Food Control. Junio, **2005**, vol. 16, no. 5, p. 465–472.

PROESTOS, C., LOUKATOS, P. y KOMAITIS, M. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. En: Food Chemistry. 2008, vol.106, no. 3, p.1218-1224.

QUINO, Israel; RAMOS, Oswaldo y GUISBERT, Elvira. Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea. En: Revista Boliviana de Química. **2007**, vol.24, no.1, p. 54.

RESTUCCIA, Donatella, *et al.* A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. En: *Talanta*. Julio, **2011**, vol. 85, no. 1, p.363–9.

REZAEI, Masoud, *et al.* The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. En: *Food Chemistry*, **2007**, vol. 103, p. 150–154.

RIOS, Yolanda. Espectroscopia UV-Visible. [en línea]. [citado el 23 de Julio de 2016]. Disponible en <[http://www.yolanda-rios.net/materiales/UV Teoria.pdf](http://www.yolanda-rios.net/materiales/UV%20Teoria.pdf) >

RODRÍGUEZ, Juan. Consecuencias higiénicas de la alteración de los alimentos. Trabajo de Grado, Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, **2010**, 19-22 p.

ROKKA, Mervi. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions: Biogenic amines as quality-indicating metabolites. En: *Food Control Department of Chemistry*. Noviembre, **2003**, vol. 15, no. 8, p. 601-607.

ROMERO, R., *et al.* Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. En: *Journal of Chromatography*, **2000**, vol. 871, no. 1-2, p. 75-83.

RUIZ, Claudia; HERRERO, Ana María y JIMÉNEZ-COLMENERO, Francisco. Reduction of biogenic amines levels in meat and meat products. En: *Natural Antimicrobials in Food quality and Food Safety*. 3 ed. Rai, M. and Chikindas, M.L. CAB International, UK, **2010**, 15-55 p.

RUIZ, Claudia; PINTADO, Tatiana y JIMÉNEZ, Francisco. Biogenic amine formation in refrigerated fresh sausage “chorizo” keeps in modified atmosphere. En: *Journal of Food and Biochemistry*. Diciembre, **2011**, vol. 36, no. 4, p. 449-457.

SAN-CRISTÓBAL, Mara, *et al.* Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvil. En: *Reduca (Biología). Serie Técnicas y Métodos*. Agosto, **2011**, vol. 4. no. 3, p. 51.

SAYEM, N.; SIMARD, R. y FILLION, J. Changes in the amine content of ground beef during storage and processing. En: *Food science and Technol.* **1984**, vol.17, p. 319–323.

SETHI, Rajat, *et al.* An Improved High Performance Liquid Chromatographic Method for Identification and Quantization of Polyamines as Benzoylated Derivatives. En: *American Journal of Analytical Chemistry*. Mayo, **2011**, vol. 2, no.4, p. 456-469

ŠIMAT, Vida y DALGAARD, Paw. Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. En: *Food Science and Technology*. Marzo, **2011**, vol. 44, p. 399-406.

SMITH, Gordon V. y PARR, Russell L. Marked and cost approaches. En: Valuation of intellectual property and intangible asstes. 3 ed. New York: John Wiley, **2000**, p. 175-214

SOLARTE GUEVARA, Ana. Evaluación de diferentes densidades en incubación de huevos de tilapia roja (*oreochromis sp; trewavas* 1983), mediante un sistema de incubación artificial, en la estación piscícola alto Magdalena, Gigante, Huila, Colombia. Pasto, Colombia. Trabajo de grado (Ingeniero en producción acuícola), Universidad de Nariño, Facultad de ciencias pecuarias, Programa de ingeniería en producción acuícola, **2008**, 27-34 p.

SUAREZ, Yania; IZQUIERDO, Adalberto y MILIAN, Jana. Validación de un método cromatográfico para la cuantificación de mefenesina en tabletas de producción nacional. En: *Rev Cubana Farm.* Febrero, **2009**, vol. 43, n. 2, p. 0-0. ISSN 1561-2988.

SUBDIRECCIÓN DE SALUD PÚBLICA, SIVIGILA. IDSN. Eventos de notificación epidemiológica semanal (ENOS). [en línea]. Pasto- Nariño. [citado el 03 de mayo de 2014]. Disponible en <<http://www.idsn.gov.co/index.php/subdireccion-de-salud-publica/epidemiologia/vigilancia-y-eventos-de-interes/942-informe-enos-por-munic-ípios-a-semana-14-a-05-04-2014>>

SUZZI, Giovanna y GARDINI, Fausto. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. En: *International Journal of Food Microbiology*. Enero, **2003**, vol. 88, p. 41-54.

TAHMOUZI, Saeed; RAMIN, Khaksar y MEHRAN Ghasemlou. Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). En: *Food Chemistry*. Noviembre, **2011**, vol. 126, p. 756–761.

TINAJAS, Antonio. Intoxicación por Histamina. En: *Jano Emc.* Junio, **1998**, vol. 55, no. 1269, p. 62.

TSAI, Yung, *et al.* Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. En: *Science direct*. Septiembre, **2005**, vol. 16, no.7, p. 579-585.

VECIANA, María; MARINE, Abel y VIDAL, Carmen. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compound, volatile amines, and organoleptic changes. En: *J Agric Food Chem*. Junio, **1997**, vol. 45, no. 6, p. 2036–2041.

WORTBERG, W. y WOLLER, R. Quality and freshness of meat and meat products as related to their content of biogenic amines. En: *Food and agriculture organization of the united nations*. Noviembre, **1982**, vol. 62, no. 11, p. 1457–1463.

YONGMEI, Lu, *et al.* Biogenic amines in Chinese soy sauce. En: *Food Control*. Enero, **2009**, Vol. 20, no. 6, p. 593–7.

YONGSAWATDIGUL, Jirawat, *et al.* Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). En: *J Food Sci*. Mayo, **2004**, vol. 69, no. 4, p. 312-319.

ZAREI, Medhi, *et al.* Biogenic Amines Content of Canned Tuna Fish Marketed in Iran. *American-Eurasian*. En: *Journal of Toxicological Sciences*. **2011**, vol. 3, no. 3, p. 190-193.

ZOGUL, Fatih, *et al.* Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. En: *International Journal of Food Science and Technology*. **2002**, vol. 37, p. 515–522.

ANEXOS

Anexo A. Fórmulas matemáticas para el cálculo de parámetros cromatográficos

1. Tiempo de retención, t_R (min) o (mm). Es el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la detección del máximo número de moléculas de cada soluto.

2. Tiempo muerto, t_M (min) o (mm). Es el tiempo requerido para que eluya un compuesto no retenido por la columna. También se conoce como tiempo cero o tiempo de retención del disolvente.

3. Tiempo de retención corregido, t'_R (min) o (mm). Representa el tiempo que el soluto pasa "absorbido" dentro del empaquetamiento de la columna.

$$t'_R = t_R - t_M \quad (\text{ecuación 1})$$

4. Factor de capacidad, k' (adimensional). Representa el número de moléculas que, en el equilibrio, pasan a la fase estacionaria respecto a las que permanecen en la fase móvil. También se denomina relación de capacidad o factor de retención.

$$k' = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M \quad (\text{ecuación 2})$$

5. Selectividad, α (adimensional). Determina la separación entre picos y representa una relación de la retención relativa de dos compuestos que eluyen uno a continuación del otro. Un valor de igual a 1 representa tiempos de retención iguales y por lo tanto no existe separación. Un número más grande representa una columna más selectiva. Cuanto más alejado de "1", mayor separación.

$$\alpha = (t_R - t_M)_2 / (t_R - t_M)_1 = t'_{R2} / t'_{R1} \quad (\text{ecuación 3})$$

6. Resolución, R_s (adimensional). Es una medida cuantitativa del grado de separación de dos picos. Un valor de 1,5 representa una separación hasta la línea base de ambos picos y un valor de 1,0 representa una resolución del 90%. En algunos casos esto es suficiente para los cálculos del área de los picos (análisis cuantitativo). Valores de $R_s < 1$ indican solapamiento; valores de $R_s \geq 1$ indican separación.

$$R_s = (2 t_R) / (b_1 + b_2) \quad (\text{ecuación 4})$$

7. Número de platos teóricos, eficiencia, N (adimensional). Es la longitud de columna requerida para que se establezca un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. Es una medida estimada de la agudeza del pico y es característico de cada soluto en cada sistema cromatográfico.

$$N = 16 (t_R / b)^2 = 5,54 (t_R / 1/2)^2 \text{ (ecuación 5)}$$

9. Altura equivalente de plato teórico, H (mm). Es la distancia que separa dos platos consecutivos o, dicho de otra manera, el largo de columna requerido por un plato teórico.

$$H = L / N \text{ (ecuación 6)}$$

L = longitud de la columna (mm)

Anexo B. Estadístico W de Shapiro-Wilk para prueba de Normalidad aplicada a la optimización de condiciones cromatográficas en el análisis de ABs

<i>Parámetro</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Longitud de onda (nm)	0,88031	0,19297
Temperatura de columna (°C)	0,89378	0,06476
Flujo (mL.min ⁻¹)	0,81008	0,12675

Valor-P < 0,05, por tanto los datos provienen de una distribución normal

Anexo C. Estadístico W de Shapiro-Wilk para prueba de Normalidad aplicada a la optimización de condiciones de derivatización de ABs

<i>Parámetro</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo de reacción (min)	0,64676	0,13420
Temperatura de reacción (°C)	0,64676	0,08976
Volumen de derivatizante (µL)	0,64676	0,09675

Valor-P < 0,05, por tanto los datos provienen de una distribución normal

Anexo D. Estadístico W de Shapiro-Wilk para prueba de Normalidad aplicada a la optimización de condiciones de extracción de ABs

<i>Parámetro</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
Tiempo de extracción (min)	0,80170	0,11451
Número de extracciones con alícuotas de 15 mL de TCA 6%	0,80299	0,12223

Valor-P _ 0,05, por tanto los datos provienen de una distribución normal

Anexo E. Métodos de extracción evaluados para la determinación de ABs.

Método de extracción	Descripción
1 ¹⁵⁴	5 g de pescado se homogenizaron con 20 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (w/v), 8 ml de HCl 0,1 M y 16 mL de n-heptano. 50 mL de la suspensión resultante se llevó a un baño de ultrasonidos durante 10 min a una temperatura de 60° C. El sobrenadante se centrifugó durante 15 min a 4°C y a 8500G y se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1.
2 ¹⁵⁵	5 g de pescado se transfirieron a tubos de centrifuga de 50 ml y se homogenizaron con 20 ml de ácido tricloroacético al 6 % (TCA) durante 3 min. El homogenizado se centrifugó durante 10 min, a 4° C y a 10.000 G y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman no. 2. El filtrado se llevó a un volumen de 50 mL.
3 ¹⁵⁶	5 g de muestra se homogenizaron con suficiente agua y 0,5 mL de HCl (1:1). La mezcla se homogenizó bien, se calentó en baño maría a aprox 90 °C durante 20 min y se filtró en papel Whatman no. 12. Finalmente el filtrado se llevó a un volumen de 50 mL.
4 ¹⁵⁷	5 g de muestra se homogenizaron con 25 mL de Metanol. La mezcla se homogenizó bien, se calentó en baño maría a 60°C durante 15 min y se filtró en papel Whatman no. 1. Finalmente el filtrado se llevó a un volumen de 50 mL.

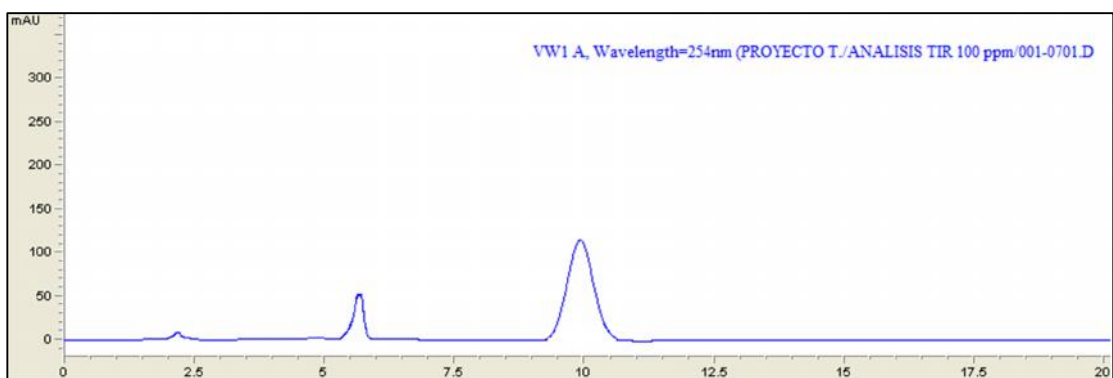
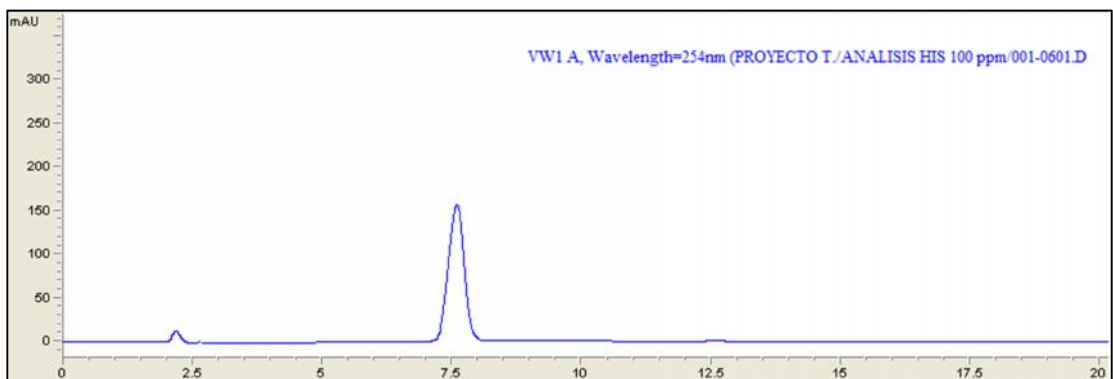
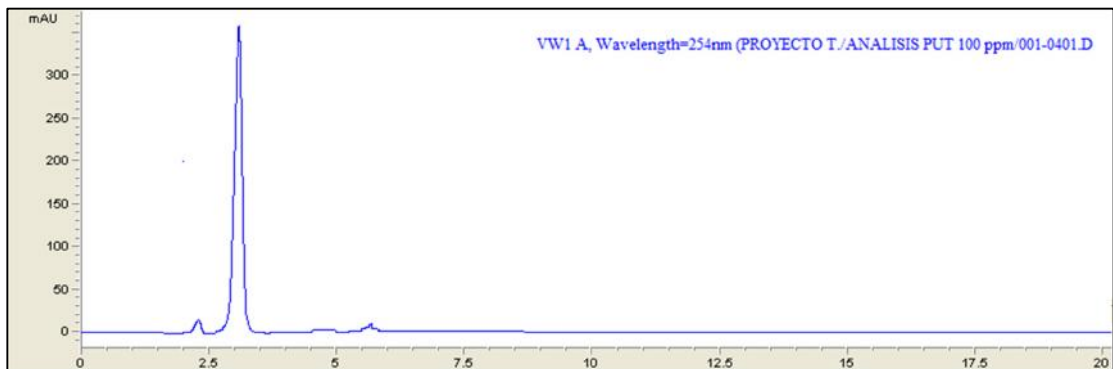
¹⁵⁴ TAHMOUZI, Saeed. Op Cit., p. 756–761.

¹⁵⁵ TSAI. Op. Cit., p. 579-585.

¹⁵⁶ AOAC. Op. Cit., 15 p.

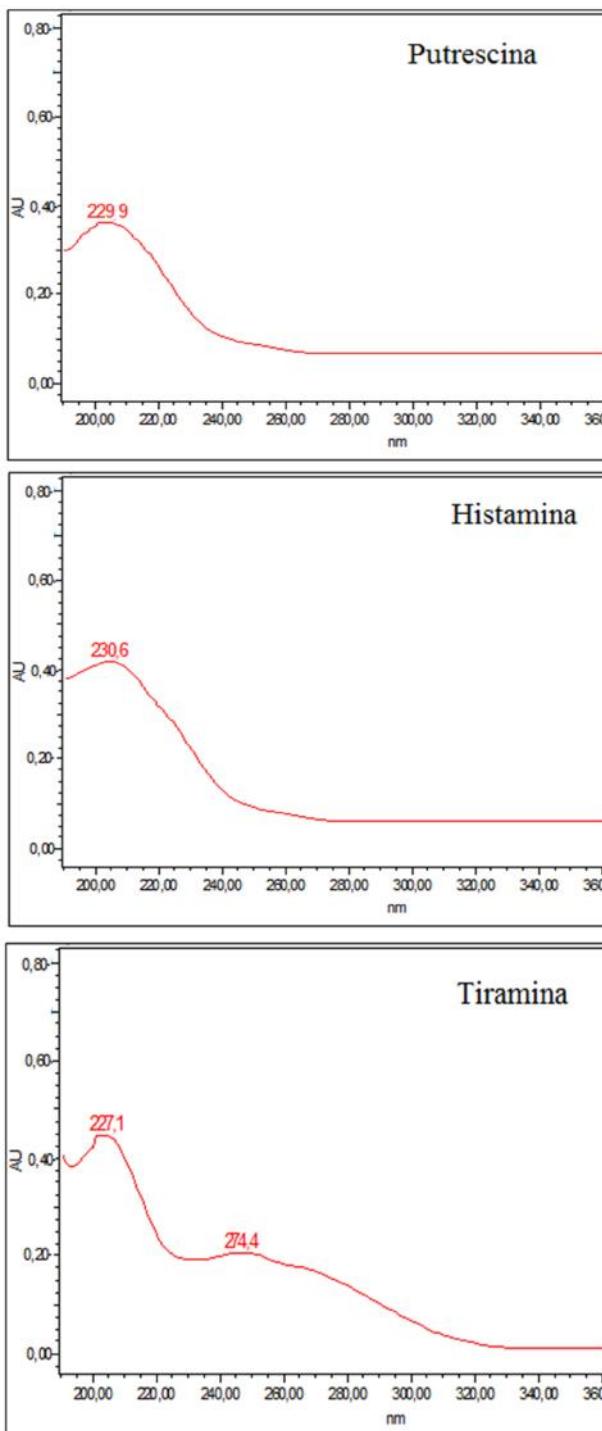
¹⁵⁷ AOAC. Op. Cit., 16 p.

Anexo F. Cromatogramas obtenidos para los análisis individuales de Putrescina, Histamina y tiramina a una concentración de 100 mg.L⁻¹



Fuente: Esta Investigación

Anexo G. Espectro de absorción para putrescina, histamina y tiramina a una concentración de 5 mg.L⁻¹.



Fuente: Esta Investigación

Anexo H. Curvas de calibración del método (Concentración vs Área) a niveles bajos de concentración para Putrescina, Histamina y Tiramina.

Gráfico del Modelo Ajustado para Putrescina

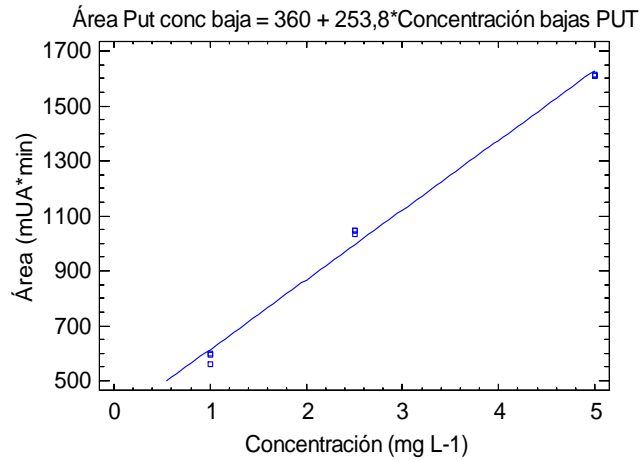


Gráfico del Modelo Ajustado para Histamina

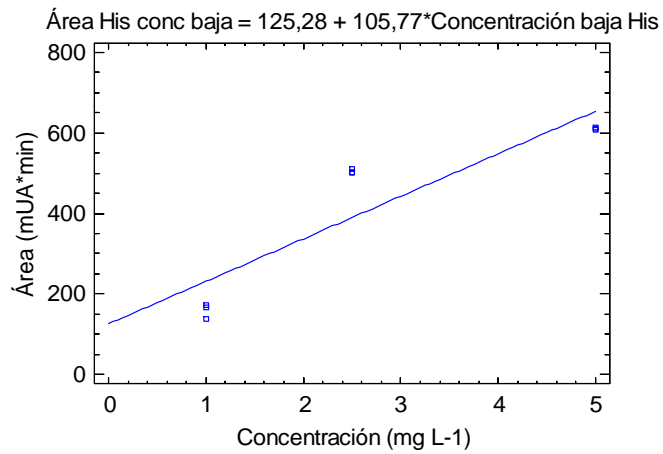
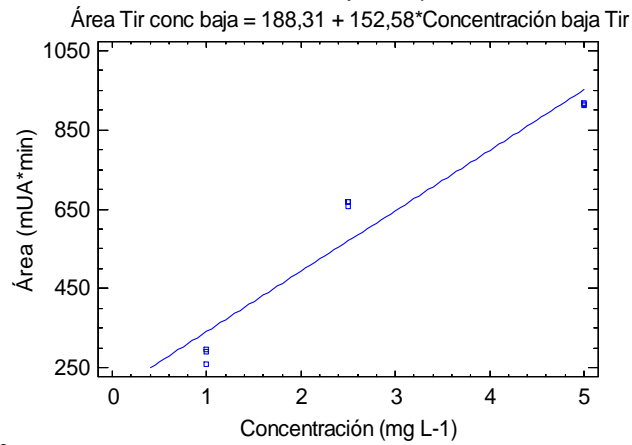
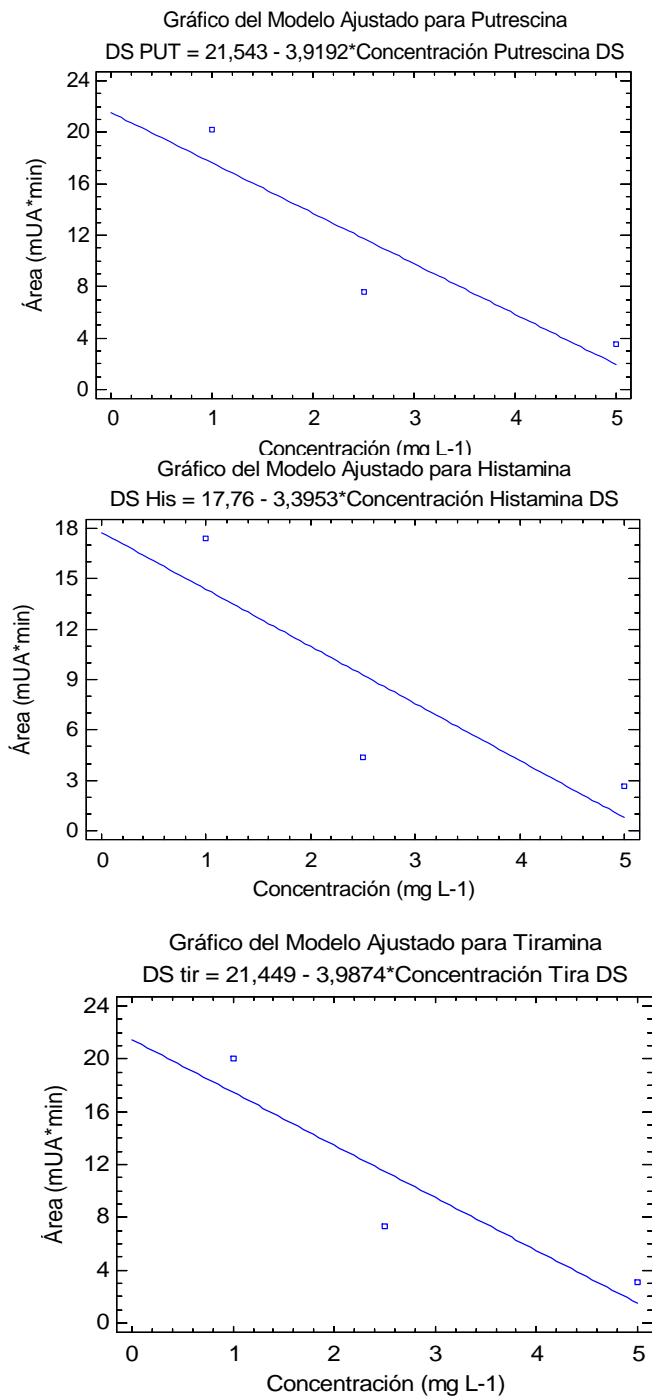


Gráfico del Modelo Ajustado para Tiramina



Fuente: Esta Investigación

Anexo I. Curvas de calibración del método (Concentración vs Desviación estándar) a niveles bajos de concentración para Putrescina, Histamina y Tiramina.



Fuente: Esta Investigación

Anexo J. Precisión de las ABs en términos de repetibilidad.

Día	PUTRESCINA						HISTAMINA						TIRAMINA						
	10 mg.L ⁻¹		50 mg.L ⁻¹		100 mg.L ⁻¹		30 mg.L ⁻¹		80 mg.L ⁻¹		150 mg.L ⁻¹		10 mg.L ⁻¹		50 mg.L ⁻¹		125 mg.L ⁻¹		
	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	
1	9,97	7,89	47,64	7,89	96,73	7,90	29,35	10,86	78,45	10,86	142,64	10,88	7,33	11,66	42,35	11,66	108,49	11,69	
	9,97	7,88	47,88	7,93	96,36	7,99	29,30	10,85	79,48	10,88	142,19	10,86	7,32	11,67	42,18	11,68	108,28	11,66	
	9,97	7,87	48,06	7,94	96,35	7,95	28,91	10,83	79,61	10,88	142,43	10,91	7,31	11,66	41,99	11,68	108,24	11,70	
	9,95	7,86	49,32	7,94	96,46	7,95	29,22	10,83	78,81	10,95	139,82	10,93	7,67	11,62	41,37	11,74	111,81	11,72	
	9,95	7,91	48,44	7,89	95,49	7,89	30,02	10,90	78,18	10,86	141,46	10,86	7,51	11,70	41,48	11,66	111,89	11,66	
	9,97	7,91	48,60	7,93	95,33	7,90	30,09	10,89	78,30	10,89	139,41	10,88	7,53	11,69	41,31	11,69	111,17	11,68	
	9,89	7,93	47,90	7,96	94,25	7,97	29,42	10,85	78,23	10,94	143,43	10,94	7,09	11,64	41,56	11,74	109,15	11,73	
	9,99	7,95	46,99	7,94	94,02	7,91	28,75	10,88	78,49	10,89	143,70	10,91	6,88	11,68	41,66	11,69	108,50	11,71	
	9,95	7,91	46,82	7,92	94,56	7,96	29,83	10,88	78,62	10,91	144,14	10,92	7,22	11,68	42,56	11,71	108,34	11,72	
	X	9,96	7,90	47,96	7,93	95,51	7,94	29,43	10,86	78,68	10,90	142,13	10,90	7,32	11,67	41,83	11,69	109,54	11,70
	%CV _r	0,29	0,37	1,63	0,29	1,08	0,44	1,58	0,25	0,67	0,29	1,16	0,26	3,28	0,21	1,09	0,27	1,46	0,23
%CV _r /2	16,01		12,64		11,39		13,60		11,73		10,73		16,77		12,90		11,16		
2	9,94	7,93	48,36	7,91	95,71	7,94	29,43	10,91	78,86	10,87	147,19	10,88	6,96	11,70	42,81	11,67	108,00	11,67	
	9,83	7,93	48,29	7,91	95,93	7,93	29,06	10,93	78,57	10,87	147,34	10,87	7,02	11,74	43,19	11,67	107,80	11,67	
	9,83	7,98	48,34	7,92	94,83	7,94	29,25	10,95	77,25	10,88	147,79	10,92	7,03	11,75	43,23	11,67	105,64	11,72	
	9,80	7,95	47,42	7,92	92,64	7,93	29,33	10,89	77,49	10,90	145,64	10,90	7,20	11,69	43,26	11,71	103,72	11,69	
	9,89	7,96	47,50	7,95	93,14	7,93	29,04	10,91	77,53	10,92	145,37	10,91	7,42	11,70	43,16	11,72	104,40	11,71	
	9,86	7,91	47,69	7,96	93,40	7,92	28,96	10,85	78,96	10,94	142,60	10,87	7,42	11,65	42,92	11,74	105,17	11,67	
	9,99	7,91	47,75	7,92	96,45	7,91	28,81	10,86	79,82	10,87	142,55	10,87	7,50	11,65	42,32	11,66	106,65	11,66	
	9,99	7,92	47,53	7,91	96,16	7,92	28,64	10,86	79,49	10,86	145,33	10,88	7,10	11,65	42,09	11,65	107,27	11,68	
	9,99	7,91	47,55	7,92	96,54	7,93	29,55	10,86	79,38	10,87	145,43	10,89	7,14	11,65	42,25	11,66	108,63	11,69	
	X	9,90	7,93	47,83	7,92	94,98	7,93	29,12	10,89	78,59	10,89	145,47	10,89	7,20	11,69	42,80	11,68	106,36	11,68
	%CV _r	0,78	0,34	0,82	0,21	1,61	0,12	1,01	0,33	1,21	0,25	1,30	0,15	2,76	0,33	1,09	0,26	1,61	0,17
%CV _r /2	16,02		12,64		11,40		13,62		11,73		10,69		16,81		12,86		11,21		

3		9,95	7,85	47,28	7,89	94,09	7,94	28,71	10,82	77,09	10,84	144,46	10,92	7,29	11,61	43,00	11,64	111,30	11,73
		9,94	7,87	47,45	7,87	94,25	7,98	29,33	10,83	76,58	10,85	145,06	10,96	7,26	11,62	42,82	11,64	111,41	11,77
		9,95	7,89	47,27	7,89	94,88	7,89	29,32	10,85	76,55	10,85	143,48	10,89	7,27	11,63	42,95	11,64	110,94	11,69
		9,98	7,90	48,44	7,88	94,74	7,95	29,27	10,86	79,35	10,85	143,64	10,93	7,36	11,64	42,78	11,64	108,50	11,73
		9,96	7,88	48,39	7,91	93,74	7,91	29,40	10,85	79,39	10,85	142,67	10,88	7,38	11,64	42,61	11,64	108,85	11,68
		9,97	7,91	48,50	7,91	94,68	7,93	29,07	10,87	79,38	10,87	143,40	10,89	7,38	11,66	42,42	11,66	108,29	11,69
		9,93	7,90	48,34	7,88	95,88	7,93	29,93	10,85	78,63	10,85	145,93	10,92	6,91	11,65	42,23	11,64	109,73	11,73
		9,93	7,91	48,29	7,89	95,85	7,94	30,08	10,86	78,42	10,85	147,07	10,94	6,90	11,65	42,35	11,65	110,92	11,74
		9,92	7,90	48,93	7,90	95,57	7,96	30,02	10,84	78,54	10,86	145,90	10,94	6,89	11,63	41,31	11,66	109,35	11,75
		X	9,95	7,89	48,10	7,89	94,85	7,94	29,46	10,85	78,22	10,85	144,62	10,92	7,18	11,64	42,50	11,65	109,92
	%CVr	0,21	0,24	1,26	0,14	0,82	0,33	1,56	0,15	1,50	0,08	1,01	0,25	3,00	0,15	1,22	0,08	1,13	0,26
	%CV _r /2	16,01		12,63		11,40		13,60		11,74		10,70		16,82		12,87		11,15	
4		9,96	7,89	48,40	7,92	95,82	7,91	28,36	10,85	78,57	10,88	142,88	10,89	7,09	11,65	42,74	11,67	105,36	11,68
		9,96	7,95	48,26	7,91	95,78	7,94	29,04	10,90	78,38	10,87	142,92	10,90	6,87	11,69	42,76	11,67	105,17	11,69
		9,95	7,94	48,49	7,91	96,24	7,92	28,90	10,89	78,44	10,88	143,03	10,90	7,29	11,68	42,28	11,68	105,60	11,69
		9,98	7,90	47,52	7,90	96,36	7,94	28,97	10,87	78,82	10,86	145,76	10,90	7,15	11,66	41,99	11,66	109,23	11,70
		9,99	7,90	47,41	7,91	96,23	7,94	29,18	10,87	78,70	10,88	143,50	10,91	7,19	11,67	41,97	11,67	108,71	11,70
		9,98	7,89	47,75	7,92	96,29	7,92	29,21	10,87	78,24	10,89	143,59	10,90	7,14	11,66	42,17	11,68	108,92	11,69
		9,93	7,90	47,59	7,92	94,40	7,93	29,18	10,86	77,07	10,89	145,16	10,90	7,33	11,66	43,33	11,68	109,48	11,70
		9,98	7,90	47,65	7,90	93,84	7,92	29,34	10,87	77,15	10,88	145,23	10,92	7,33	11,66	42,71	11,68	110,22	11,73
		9,93	7,91	47,51	7,92	93,49	7,96	29,26	10,87	77,18	10,89	145,34	10,95	7,31	11,67	42,90	11,68	110,45	11,75
		X	9,96	7,91	47,84	7,91	95,38	7,93	29,05	10,87	78,06	10,88	144,16	10,91	7,19	11,67	42,54	11,67	108,13
	%CVr	0,22	0,27	0,88	0,10	1,20	0,17	1,02	0,14	0,92	0,07	0,82	0,19	2,09	0,11	1,08	0,06	1,98	0,19
	%CV _r /2	16,01		12,64		11,39		13,63		11,74		10,71		16,81		12,87		11,18	

5		9,81	7,88	48,33	7,93	94,46	7,93	28,79	10,85	78,47	10,90	145,76	10,89	7,28	11,65	43,96	11,70	106,65	11,68
		9,96	7,91	48,30	7,92	94,57	7,95	28,43	10,89	78,51	10,89	146,34	10,92	7,30	11,69	43,55	11,69	103,03	11,73
		9,96	7,93	48,49	7,93	94,58	7,97	28,87	10,91	79,45	10,89	143,61	10,93	7,28	11,71	43,27	11,69	102,91	11,73
		10,00	7,92	47,75	7,93	95,67	7,95	29,29	10,90	79,44	10,92	143,52	10,90	7,30	11,71	42,90	11,73	105,78	11,70
		9,99	7,95	47,19	7,93	95,81	7,93	29,43	10,91	79,05	10,87	143,64	10,90	7,40	11,71	42,60	11,66	109,23	11,70
		9,99	7,92	46,78	7,91	95,65	7,94	29,20	10,91	79,38	10,88	143,62	10,90	7,43	11,72	42,81	11,67	106,70	11,69
		9,95	7,93	48,12	7,91	94,02	7,92	29,45	10,92	78,63	10,89	143,27	10,89	7,39	11,73	42,97	11,70	108,01	11,68
		9,96	7,99	47,83	7,95	94,07	7,97	29,59	10,94	78,28	10,93	146,33	10,95	7,47	11,74	42,79	11,74	109,70	11,75
		9,97	7,94	48,17	7,95	94,19	7,94	29,63	10,91	78,84	10,90	143,97	10,90	7,49	11,70	42,79	11,69	106,70	11,69
		X	9,95	7,93	47,88	7,93	94,78	7,94	29,19	10,90	78,90	10,90	144,45	10,91	7,37	11,71	43,07	11,70	106,52
	%CVr	0,56	0,38	1,19	0,16	0,77	0,22	1,40	0,24	0,58	0,17	0,90	0,21	1,14	0,23	1,02	0,21	2,24	0,21
	%CV _h /2	16,01		12,64		11,41		13,62		11,72		10,70		16,75		12,84		11,21	
6		9,97	7,87	48,19	7,94	95,05	7,95	29,53	10,83	78,58	10,90	141,61	10,92	7,32	11,73	43,11	11,79	106,71	11,71
		9,99	7,93	48,04	7,94	94,80	7,93	28,86	10,91	78,91	10,92	141,33	10,92	7,17	11,72	43,21	11,72	107,03	11,71
		9,99	7,94	48,19	7,94	94,32	7,95	29,33	10,93	78,59	10,91	139,18	10,91	6,90	11,73	43,16	11,71	106,51	11,72
		9,96	7,94	48,00	7,94	95,26	7,94	29,54	10,92	78,61	10,92	143,54	10,92	6,88	11,72	43,09	11,72	106,76	11,72
		9,96	7,94	47,15	7,95	95,36	7,94	29,55	10,91	78,58	10,91	142,16	10,91	6,86	11,73	43,09	11,72	106,38	11,72
		9,96	7,95	47,55	7,94	94,80	7,95	29,35	10,89	78,63	10,91	143,06	10,91	7,27	11,72	43,04	11,71	106,88	11,71
		9,96	7,94	47,59	7,94	94,83	7,94	29,41	10,93	77,70	10,92	142,67	10,91	7,29	11,72	42,78	11,72	109,64	11,71
		9,96	7,95	48,04	7,96	92,86	7,94	29,08	10,92	77,71	10,91	142,22	10,91	7,23	11,71	42,68	11,71	109,15	11,72
		9,96	7,94	47,55	7,93	93,39	7,94	29,19	10,93	77,77	10,92	142,99	10,91	7,30	11,71	42,65	11,72	109,60	11,71
		X	9,97	7,93	47,81	7,94	94,52	7,94	29,31	10,91	78,34	10,91	142,08	10,91	7,14	11,72	42,98	11,72	107,63
	%CVr	0,13	0,32	0,76	0,09	0,91	0,07	0,80	0,28	0,60	0,05	0,91	0,04	2,75	0,06	0,50	0,22	1,30	0,03
	%CV _h /2	16,01		12,64		11,41		13,61		11,74		10,73		16,83		12,85		11,19	

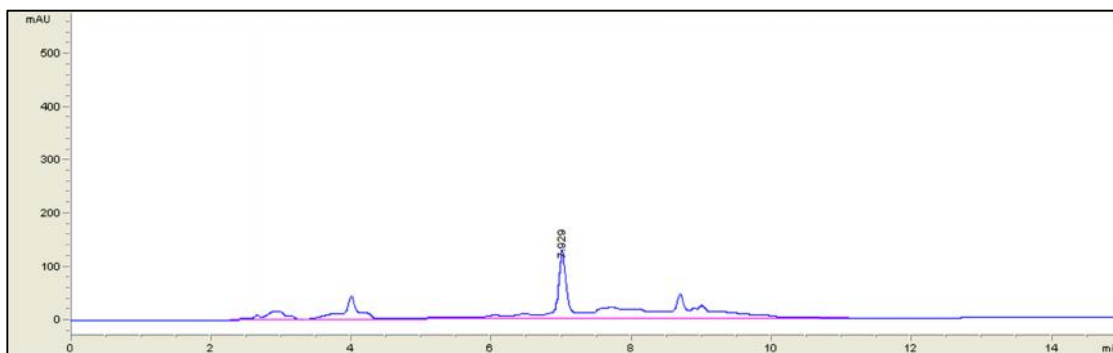
Fuente: Esta Investigación

Anexo K. Precisión de las AB en términos de Precisión Intermedia.

Día	PUTRESCINA						HISTAMINA						TIRAMINA					
	10 mg.L ⁻¹		50 mg.L ⁻¹		100 mg.L ⁻¹		30 mg.L ⁻¹		80 mg.L ⁻¹		150 mg.L ⁻¹		10 mg.L ⁻¹		50 mg.L ⁻¹		125 mg.L ⁻¹	
	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R	Conc. mg.L ⁻¹	t _R
1	9,96	7,90	47,96	7,93	95,51	7,94	29,24	10,86	78,73	10,90	142,13	10,90	7,29	11,67	42,75	11,69	108,13	11,70
2	9,90	7,93	47,93	7,92	95,03	7,93	29,24	10,89	78,96	10,89	143,99	10,89	7,25	11,69	43,01	11,68	106,36	11,68
3	9,95	7,89	48,46	7,89	94,85	7,94	29,09	10,85	78,58	10,85	143,83	10,92	7,33	11,64	43,05	11,65	106,87	11,72
4	9,96	7,91	48,14	7,91	95,38	7,93	29,19	10,87	78,52	10,88	144,48	10,91	7,26	11,67	42,81	11,67	108,13	11,70
5	9,95	7,93	48,31	7,93	94,78	7,94	29,19	10,90	78,75	10,90	143,71	10,91	7,37	11,71	43,07	11,70	107,00	11,71
6	9,97	7,93	47,98	7,94	94,08	7,94	29,31	10,91	78,34	10,91	142,08	10,91	7,28	11,72	43,09	11,72	106,12	11,71
X	9,95	7,91	48,11	7,91	95,13	7,93	29,19	10,87	78,76	10,88	143,32	10,90	7,29	11,66	42,94	11,67	107,12	11,70
%CV	0,24	0,28	0,61	0,25	0,36	0,07	0,29	0,21	0,24	0,21	0,72	0,15	0,56	0,21	0,38	0,22	0,85	0,16
%CV _r /3	21,34	22,09	16,85	22,09	15,22	22,09	18,14	21,06	15,65	21,05	14,31	21,05	22,38	20,83	17,12	20,83	14,95	20,83

Fuente: Esta Investigación

Anexo L. Cromatograma para la muestra de pescado de la especie trucha arcoiris con niveles de putrescina $0,402 \pm 0,071 \text{ mg.g}^{-1}$, mediante HPLC-VWD.



Fuente: Esta Investigación