



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Química

**MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE
HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus
albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECIFICA DE ELISA Y ANÁLISIS
MULTIVARIADO**

Sandra Judith Pineda Martínez

Asesorado por Ing. William Eduardo Fajiani Cruz

Guatemala, enero de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE
HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus
albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECIFICA DE ELISA Y ANÁLISIS
MULTIVARIADO**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA
POR

SANDRA JUDITH PINEDA MARTÍNEZ
ASESORADO POR ING. WILLIAM EDUARDO FAGIANI CRUZ

AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

GUATEMALA, ENERO DE 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA



NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

| | |
|------------|---------------------------------------|
| DECANA | Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada |
| VOCAL I | Ing. José Francisco Gómez Rivera |
| VOCAL II | Ing. Mario Renato Escobedo Martínez |
| VOCAL III | Ing. José Milton de León Bran |
| VOCAL IV | Br. Luis Diego Aguilar Ralón |
| VOCAL V | Br. Christian Daniel Estrada Santizo |
| SECRETARIO | Ing. Hugo Humberto Rivera Pérez |

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN GENERAL PRIVADO


| | |
|------------|------------------------------------|
| DECANO | Ing. Pedro Antonio Aguilar Polanco |
| EXAMINADOR | Ing. Orlando Posadas Valdéz |
| EXAMINADOR | Ing. Carlos Wong Salvador Davi |
| EXAMINADOR | Ing. Erwin Manuel Ortiz Castillo |
| SECRETARIA | Inga. Lesbia Magali Herrera López |

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de graduación titulado:

MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECIFICA DE ELISA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO

Tema que me fuera asignado por la Dirección de la Escuela de Ingeniería Química, con fecha 30 de julio de 2018.


Sandra Judith Pineda Martínez

Guatemala, 06 de septiembre de 2019

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
Director de la Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Estimado Ingeniero Álvarez:

Por este medio de la presente HAGO CONSTAR que he revisado y dado mi aprobación al informe final del Trabajo de Graduación **“MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECÍFICA DE ELISA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO”** de la estudiante de Ingeniería Química Sandra Judith Pineda Martínez quien se identifica con el carné número 201403600 y CUI 2911 69473 0101.

Sin otro particular me suscribo de usted.

Atentamente,



Ing. William Eduardo Fagiani Cruz
Colegiado No. 1734
Asesor

INGENIERO QUÍMICO
WILLIAM EDUARDO FAGIANI CRUZ
COL. 1734



Guatemala, 14 de octubre de 2019.
Ref. EIQ.TG-IF.037.2019.

Ingeniero
Williams Guillermo Álvarez Mejía
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería

Estimado Ingeniero Álvarez:

Como consta en el registro de evaluación, correlativo **018-2018**, le informo que reunidos los Miembros de la Terna nombrada por la Escuela de Ingeniería Química, se practicó la revisión del:

INFORME FINAL

Solicitado por el estudiante universitario: **Sandra Judith Pineda Martínez**.
Identificado con número de carné: **2911694730101**.
Identificado con registro académico: **201403600**.
Previo a optar al título de la carrera: **Ingeniería Química**.
En la modalidad: **Informe Final, Seminario de Investigación**.

Siguiendo los procedimientos de revisión interna de la Escuela de Ingeniería Química, los Miembros de la Terna han procedido a **APROBARLO** con el siguiente título:

MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECÍFICA DE ELISA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO


El Trabajo de Graduación ha sido asesorado por:

William Eduardo Fagiani Cruz, profesional de la Ingeniería Química

Habiendo encontrado el referido trabajo de graduación **SATISFACTORIO**, se autoriza al estudiante, proceder con los trámites requeridos de acuerdo a las normas y procedimientos establecidos por la Facultad para su autorización e impresión.



"ID Y ENSEÑAD A TODOS"


Cesar Ariel Vilella Rodas
Profesional de la Ingeniería Química
COORDINADOR DE TERNA
Tribunal de Revisión
Trabajo de Graduación



C.c.: archivo



Agencia Centroamericana de Acreditación de
Organismos de Enseñanza Superior





Ref.EIQ.TG.002.2020

El Director de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer el dictamen del Asesor y de los Miembros del Tribunal nombrado por la Escuela de Ingeniería Química para revisar el Informe del Trabajo de Graduación, de la carrera de Ingeniería Química, de la estudiante, **SANDRA JUDITH PINEDA MARTÍNEZ** titulado: **"MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECIFICA DE ELISA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO"**. Procede a la autorización del mismo, ya que reúne el rigor, la secuencia, la pertinencia y la coherencia metodológica requerida.

"Id y Enseñad a Todos"

Ing. Williams G. Alvarez Mejía; M.I.Q., M.U.I.E
DIRECTOR
Escuela de Ingeniería Química



Guatemala, enero de 2020

Cc: Archivo
WGAM/ale





Ref. DTG.023-2020

La Decana de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de San Carlos de Guatemala, luego de conocer la aprobación por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de graduación titulado: **MODELIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PRODUCCIÓN DE HISTAMINA EN EL LOMO DE DOS ESPECIES DE ATÚN (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*) POR MEDIO DE LA PRUEBA ESPECIFICA DE ELISA Y ANÁLISIS MULTIVARIADO**, presentado por la estudiante universitaria: **Sandra Judith Pineda Martínez** y después de haber culminado las revisiones previas bajo la responsabilidad de las instancias correspondientes, se autoriza la impresión del mismo.

IMPRÍMASE.

Inga. Aurelia Anabela Cordova Estrada
Decana



Guatemala, enero de 2020.

AACE/asga

ACTO QUE DEDICO A:

- Dios** Por su amor hacia mí, por haberme guiado y nunca abandonado en los momentos más difíciles y en cada reto diario.
- Mi mamá** Sandra Judith Martínez, por su amor incondicional, paciencia y confianza, por ser una gran mujer y el mejor ejemplo de vida para mí.
- Mi papá** Osmin Pineda, por su amor incondicional, por sus consejos, regaños, palabras de aliento, por ser una fuente de inspiración para mí y, sobre todo, por ser el mejor papá del mundo.
- Mi hermana** Sandra María Pineda, por su amor y amistad, por siempre compartir los buenos y malos momentos junto a mí. Por ser el mejor regalo que pudieron haberme dado mis padres.

AGRADECIMIENTOS A:

Mis padres y familia

Por brindarme su apoyo a lo largo de mi carrera profesional e inspirarme a alcanzar todas mis metas.

Mis amigos

Por su apoyo incondicional, sin ustedes la universidad no hubiera sido una experiencia tan inolvidable.

Javier Ayala

Por su amistad y apoyo incondicional a lo largo de la carrera, por la paciencia en las largas horas de estudio para el examen privado.

**La Dirección de
Inocuidad del VISAR**

Especialmente al personal del Laboratorio de Inocuidad por su apoyo.

**Personal docente
de la Facultad de
Ingeniería Química**

Por sus enseñanzas brindadas y por su apoyo.

Ing. William Fagiani

Por asesorarme en mi trabajo de graduación y por su apoyo y consejos.

| | | |
|------------|--|----|
| 2.4.1. | Prueba de ELISA..... | 19 |
| 2.4.2. | Características técnicas de la prueba | 20 |
| 2.4.3. | Ventajas sobre otros métodos..... | 20 |
| 3. | METODOLOGÍA | 21 |
| 3.1. | Variables | 21 |
| 3.2. | Delimitación de campo de estudio | 22 |
| 3.3. | Recursos humanos disponibles | 22 |
| 3.4. | Recursos materiales..... | 22 |
| 3.4.1. | Materiales y suministros..... | 23 |
| 3.4.1.1. | Reactivos..... | 23 |
| 3.4.1.1.1. | Componentes Kit histamina..... | 23 |
| 3.4.2. | Mobiliario y equipo | 24 |
| 3.5. | Técnica cuantitativa..... | 24 |
| 3.5.1. | Recolección de muestras y almacenamiento | 24 |
| 3.5.2. | Frecuencia de análisis..... | 25 |
| 3.5.3. | Molienda de carne de atún | 26 |
| 3.5.4. | Prueba Kit ELISA | 26 |
| 3.5.4.1. | Preparación de reactivos..... | 26 |
| 3.5.4.1.1. | Solución Buffer de lavado | 27 |
| 3.5.4.2. | Preparación del extracto..... | 27 |
| 3.6. | Recolección y ordenamiento de la información | 27 |
| 3.6.1. | Datos originales..... | 28 |
| 3.7. | Análisis estadístico..... | 30 |
| 3.7.1. | Análisis de regresión | 30 |
| 3.7.2. | Análisis de correlación | 30 |
| 3.7.3. | Análisis de varianza (ANOVA)..... | 30 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.7.4. | Prueba de Anderson-Darling | 33 |
| 3.7.5. | Análisis de residuos..... | 33 |
| 4. | RESULTADOS..... | 35 |
| 4.1. | Cuantificación de la concentración de histamina utilizando la metodología del kit ELISA para estimar su tendencia respecto al tiempo. | 35 |
| 4.2. | Estimación del efecto de la temperatura y la especie de atún sobre la producción de histamina | 40 |
| 4.3. | Construcción del modelo matemático de la producción de histamina para cada especie para estimar el tiempo de almacenamiento del atún..... | 46 |
| 5. | INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS..... | 63 |
| 5.1. | Caracterización de la producción de histamina a 4 y -18 grados Celsius para ambas especies..... | 63 |
| 5.2. | Caracterización del efecto de la temperatura en la producción de histamina en el lomo de una misma especie.... | 65 |
| | CONCLUSIONES | 69 |
| | RECOMENDACIONES | 71 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 73 |
| | APÉNDICES | 77 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | Atún bonito (<i>Katsuwonus pelamis</i>)..... | 6 |
| 2. | Atún Aleta Amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)..... | 7 |
| 3. | Estructura química histamina | 10 |
| 4. | Reacción síntesis histamina | 11 |
| 5. | Efectos en la piel, Escombrosis | 12 |
| 6. | Descripción del análisis experimental | 32 |
| 7. | Informe resumen de datos concentración de histamina (mg/kg) | 35 |
| 8. | Gráfica de dispersión de concentración de histamina en función del tiempo (2 especies, temperatura de 4 °C)..... | 36 |
| 9. | Gráfica de intervalos concentración de histamina en función del tiempo (<i>Katsuwonus pelamis</i> , 4 °C)..... | 37 |
| 10. | Gráfica de intervalos Concentración de histamina en función del tiempo (<i>Thunnus albacares</i> , 4 °C)..... | 37 |
| 11. | Gráfica de intervalos concentración histamina en función del tiempo (<i>Katsuwonus pelamis</i> , -18 °C)..... | 38 |
| 12. | Gráfica de intervalos concentración de histamina en función del tiempo (<i>Thunnus albacares</i> , -18 °C) | 39 |
| 13. | Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), <i>Katsuwonus pelamis</i> a 4 °C | 42 |
| 14. | Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), <i>Thunnus albacares</i> a 4 °C..... | 43 |
| 15. | Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), <i>Katsuwonus pelamis</i> a -18 °C | 44 |

| | | |
|-----|--|----|
| 16. | Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), <i>Thunnus albacares</i> a -18 °C | 45 |
| 17. | Gráfica de probabilidad normal, <i>Katsuwonus pelamis</i> a 4 °C | 47 |
| 18. | Residuos en función de orden de observaciones, <i>Katsuwonus pelamis</i> a 4 °C | 47 |
| 19. | Informe resumen de residuos función inversa de la concentración de histamina, <i>Katsuwonus pelamis</i> a 4 °C..... | 48 |
| 20. | Prueba de igualdad de varianzas, <i>Katsuwonus pelamis</i> a 4 °C..... | 48 |
| 21. | Gráfica de probabilidad normal, <i>Katsuwonus pelamis</i> a -18 °C | 49 |
| 22. | Residuos en función de orden de observaciones, <i>Katsuwonus pelamis</i> a -18 °C | 50 |
| 23. | Prueba de igualdad de varianzas, <i>Katsuwonus pelamis</i> a -18 °C..... | 51 |
| 24. | Informe resumen de residuos función logarítmica de la concentración de histamina, <i>Katsuwonus pelamis</i> a -18 °C | 52 |
| 25. | Gráfica de probabilidad normal, <i>Thunnus albacares</i> a 4 °C..... | 53 |
| 26. | Residuos en función de orden de observaciones, <i>Thunnus albacares</i> a 4 °C | 54 |
| 27. | Prueba de igualdad de varianzas, <i>Thunnus albacares</i> a 4 °C | 54 |
| 28. | Informe resumen de residuos función logarítmica de la concentración de histamina, <i>Thunnus albacares</i> a 4 °C | 55 |
| 29. | Gráfica de probabilidad normal, <i>Thunnus albacares</i> a -18 °C | 56 |
| 30. | Prueba de igualdad de varianzas, <i>Thunnus albacares</i> a -18 °C..... | 56 |
| 31. | Residuos en función de orden de observaciones, <i>Thunnus albacares</i> a -18 °C | 57 |
| 32. | Informe resumen de residuos función logarítmica de la concentración de histamina, <i>Thunnus albacares</i> a -18 °C..... | 58 |
| 33. | Tiempo límite de almacenamiento para <i>Katsuwonus pelamis</i> a 4 °C .. | 59 |
| 34. | Tiempo límite de almacenamiento para <i>Thunnus albacares</i> a 4 °C..... | 60 |

| | | |
|-----|--|----|
| 35. | Tiempo límite de almacenamiento para <i>Katsuwonus pelamis</i> a -18 °C..... | 61 |
| 36. | Tiempo límite de almacenamiento para <i>Thunnus albacares</i> a -18 °C.. | 62 |
| 37. | Imagen bacterias Gram negativas | 64 |

TABLAS

| | | |
|--------|---|----|
| I. | Taxonomía del atún..... | 5 |
| II. | Definición operacional de las variables cuantificables..... | 21 |
| III. | Nombre de reactivos a utilizar | 23 |
| IV. | Nombre del equipo, accesorios y cristalería a utilizar | 24 |
| V. | Organización de análisis para temperatura de 4 grados Celsius | 25 |
| VI. | Organización de análisis para temperatura de -18 grados Celsius..... | 26 |
| VII. | Aleatorización de muestras a 4 °C | 27 |
| VIII. | Aleatorización de muestras a -18 °C..... | 28 |
| IX. | Datos <i>Katsuwonus pelamis</i> (atún bonito), 4 °C | 28 |
| X. | Datos <i>Thunnus albacares</i> (atún aleta amarilla), 4 °C..... | 29 |
| XI. | Datos <i>Katsuwonus pelamis</i> (atún bonito), -18 °C..... | 29 |
| XII. | Datos <i>Thunnus albacares</i> (atún aleta amarilla), -18 °C..... | 29 |
| XIII. | Información de factores del ANOVA..... | 40 |
| XIV. | Análisis de varianza lineal | 40 |
| XV. | Análisis de varianza ajustado..... | 41 |
| XVI. | Especie: <i>Katsuwonus pelamis</i> , temperatura: 4 grados Celsius..... | 46 |
| XVII. | Especie: <i>Katsuwonus pelamis</i> , temperatura: -18 °C | 49 |
| XVIII. | Especie: <i>Thunnus albacares</i> , temperatura: 4 °C..... | 53 |
| XIX. | Especie: <i>Thunnus albacares</i> , temperatura: -18 °C..... | 55 |
| XX. | <i>Katsuwonus pelamis</i> almacenado a una temperatura de 4 °C..... | 59 |
| XXI. | <i>Thunnus albacares</i> almacenado a una temperatura de 4 °C | 60 |
| XXII. | <i>Katsuwonus pelamis</i> almacenado a una temperatura de -18 °C..... | 61 |

XXIII. *Thunnus albacares* almacenado a una temperatura de -18 °C.....62

LISTA DE SÍMBOLOS

| Símbolo | Significado |
|----------------|--|
| R^2 | Coeficiente de determinación |
| C | Concentración |
| $[H]$ | Concentración masa/masa de histamina |
| C_A | Concentración masa/masa sustancia A |
| C_B | Concentración masa/masa sustancia B |
| R | Constante de los gases ideales |
| s | Desviación estándar |
| dC | Diferencial de la concentración |
| dt | Diferencial del tiempo |
| E | Energía de activación |
| \ln | Logaritmo natural |
| \bar{x} | Media aritmética |
| ppm | Partes por millón |
| $pred$ | Predeterminado |
| T | Temperatura |
| t | Tiempo |
| p | Valor P de la prueba de Anderson Darling |
| r | Velocidad de reacción |

GLOSARIO

| | |
|------------------------|---|
| Amina | Compuesto orgánico derivado del amoniaco por sustitución de uno o dos átomos de hidrógeno por radicales hidrocarbonados monovalentes. |
| Amina biogénica | Biomolécula que contiene uno o más grupos aminos. Esta se forma principalmente de la descarboxilación de aminoácidos por el metabolismo de microorganismos. |
| Aminoácido | Molécula orgánica del grupo amino (-NH ₂) y un grupo carboxilo (-COOH). |
| Atún | Género de peces óseos marinos. |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas. |
| Escombriosis | Intoxicación alimentaria que se origina por consumir pescado con altos niveles de histamina. |
| Enterobacterias | Bacterias Gram negativas. |
| Fusiforme | Posee figura de huso. |

| | |
|--------------------------------|--|
| Histamina | Molécula orgánica compuesta de una amina alifática y un anillo imidazol involucrada en respuestas inmunes e inflamatorias. |
| Histidina | Aminoácido esencial de los seres humanos, cuyo grupo funcional es un anillo imidazol. |
| HPLC | High performance liquid chromatography, Cromatografía de alta resolución. |
| Modelo matemático | Objeto ideal que permite la situación y descripción de un fenómeno a través de relaciones funcionales entre variables, a partir de información de entrada. |
| Producto hidrobiológico | Seres o sustancias obtenidos de ríos, lagos, mares u océanos. |
| Variable dependiente | Aquella cuyos valores dependen de los que toma otra variable. |
| Variable independiente | Aquella cuyos valores no dependen de los que tome otra variable. |

RESUMEN

En el presente estudio se realizó una evaluación de estabilidad a partir de la modelización cinética del comportamiento de la producción de histamina en el lomo de las especies de atún bonito (*Katsumonius pelamis*) y de aleta amarilla (*Thunnus albacares*) a temperaturas de almacenamiento de 4 y -18 grados Celsius. Para esto, se utilizaron muestras procedentes de una industria atunera ubicada en Puerto Quetzal, Guatemala, a las cuales se les monitoreó sus niveles de concentración durante intervalos de tiempos determinados. La cuantificación en ambas especies de atún se llevó a cabo utilizando la metodología indicada en el kit específico de ELISA.

Posteriormente, se estimó el efecto de la temperatura y la especie de atún sobre la producción de la amina empleando análisis de varianza y contraste de medias. Fueron planteados cuatro posibles modelos matemáticos con el fin de describir la producción de histamina y utilizando criterios estadísticos se seleccionó, para cada especie y temperatura de almacenamiento, el modelo cinético de mayor ajuste y confiabilidad.

Los resultados obtenidos fueron cuatro modelos matemáticos con un comportamiento exponencial e invers, que explican en promedio un x % de la variación de la producción de histamina para ambas especies a las temperaturas utilizadas. Con ellos se estimó el tiempo ideal de almacenamiento, obteniéndose para el *Katsumonius pelamis* a 4 °C, 17 días y a -18 °C, 35 semanas. Los respectivos tiempos límites para la especie *Thunnus albacares* son a 4 °C de 16 días y a -18 °C de 27 semanas.

OBJETIVOS

General

Modelizar el comportamiento cinético de la producción de histamina en el lomo de dos especies de atún (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*) por medio de la prueba específica de ELISA y análisis multivariado con el fin de estimar sus condiciones de almacenamiento.

Específicos

1. Cuantificar la concentración de histamina en dos especies de atún utilizando la prueba de laboratorio específica de ELISA para estimar su tendencia en función del tiempo de almacenamiento.
2. Estimar el efecto de la temperatura de almacenamiento y la especie de atún sobre la producción de histamina para identificar sus condiciones de mayor producción utilizando análisis de varianza y contrastes de medias.
3. Construir un modelo matemático por medio de transformaciones y regresiones evaluadas con análisis de residuos para estimar el tiempo de almacenamiento del atún, suficiente para que la producción no sobrepase el límite permitido de histamina.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el tema de estándares de calidad de productos, para el consumo humano, es muy importante y exigente en el mercado internacional, debido a la globalización y a los tratados de libre comercio que se han firmado a lo largo de los años. Guatemala exporta muchos productos alimenticios tanto procesados como no procesados, a Estados Unidos y países de la Unión Europea, y por su posición geográfica, tiene acceso tanto al océano Pacífico como al Atlántico, lugares donde se generan una diversidad de productos hidrobiológicos anualmente, entre ellos el atún, de los cuales se obtienen importantes divisas a partir del proceso de exportación.

En el primer trimestre del año 2017, el sector de Acuicultura y Pesca de AGEXPORT por medio de Autorización de Exportaciones (SEADDEX), reportaron que los productos como el camarón, el atún, la tilapia y el pez dorado fueron los principales productos pesqueros de exportación, siendo el atún el segundo en producir las mayores ganancias después del camarón.

Un factor de calidad en la carne del pescado es la concentración de la amina biogénica, histamina, la cual se produce debido al metabolismo de bacterias gram negativas que se desarrolla por proceso de descomposición natural del animal o almacenamiento a condiciones inadecuadas. El consumo de este producto con altos niveles de histamina ocasiona intoxicación con efectos como dificultad respiratoria, taquicardia, erupciones en la piel, enrojecimiento, malestar, náuseas y diarrea, entre otras.

En el país existe la Dirección de Inocuidad de Alimentos, la cual pertenece al Viceministerio de Sanidad Agropecuaria y Regulaciones (VISAR), dependencia del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA). Dicha dirección es la unidad encargada de controlar la calidad de los alimentos no procesados tanto de exportación como para consumo interno. Como sección auxiliar de ella existe el Laboratorio de Inocuidad, el cual es responsable de realizar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

Actualmente, la carne de atún es considerada como una fuente alta de proteína para el consumo humano, pero muchos consumidores desconocen que pertenece a las especies productoras de histamina, por lo tanto, es de suma importancia establecer las condiciones de almacenamiento que reduzcan la producción de histamina desde las industrias hasta los expendios y hogares.

1. ANTECEDENTES

Por ser el atún un producto de gran importancia a nivel nacional e internacional, se han realizado distintas investigaciones sobre el desarrollo de métodos para cuantificar los niveles de histamina presentes y entre ellos destacan los siguientes:

En la Facultad de Farmacia de la Universidad del Valle se llevó a cabo el trabajo de investigación titulado “Diseño y validación de un método para cuantificar histamina en carne de pescado”¹. El método validado y mejorado fue el propuesto por Altieri *et al.* en el año 2016, el cual es utilizado por la Unión Europea y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación encargada de regular la inocuidad de los alimentos no procesados en Guatemala.

En el Departamento de Seguridad Alimenticia y Salud Pública del Instituto Superior de Sanidad en Italia se realizó “La validación del método oficial europeo para la determinación de histamina en productos derivados del pescado”² utilizando el método de HPLC con detector UV con una derivatización como derivatización pre columna. Los parámetros de desempeño utilizados fueron: especificidad, linealidad, exactitud y precisión encontradas en el método lo hacen aplicable como un control oficial

En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad San Carlos de Guatemala se realizó el estudio titulado “Determinación de los niveles

¹ ROSITO, María. *Diseño y validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de histamina en carne de pescado.* p. 26.

² ALTIERI, I.; SEMERARO, A.; SCALISE, F.; CALDERARI, I. *European official control of food: determination of histamine in food products by a HPLC—UV-DAD method.* p. 19.

de la biotoxina en la carne de pescado dorado (*Coryphanea hippurus*) de venta en tres mercados municipales en la Ciudad de Guatemala”³. El método empleado para la determinación fue ELISA utilizando el kit en 42 muestras recolectadas. Se determinó que en todos los mercados existe presencia de histamina en la carne de pescado dorado debido a que la manipulación recibida cuando lo exhiben para su venta rompe la cadena de frío, lo cual favorece el crecimiento de esta.

En la Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas de la Universidad Argentina de la Empresa (UADE) se realizó un estudio que habla de La influencia de la temperatura de conservación sobre la formación de histamina en Caballa (*Scomber japonicus*) asociada con los cambios químicos y los atributos organolépticos de los ejemplares conservados en diferentes condiciones. La calidad del pescado se determinó sensorialmente, mientras que la inocuidad se estableció midiendo los niveles de histamina. Se dedujo que la temperatura tiene un efecto significativo en la producción, ya que las muestras a temperatura ambiente después de tres días transcurridos contenían niveles de histamina peligrosos para el ser humano

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala se efectuó un estudio titulado “Determinación de niveles de histamina presente en muestras de lomo de atún que provenían de la industria atunera de Guatemala”⁴. El método empleado consistió en realizar una extracción de la matriz utilizando ácido perclórico y realizando la cuantificación por medio de HPLC con detector UV realizando una derivatización pre columna

³ FABIÁN, César. *Determinación de los niveles de la biotoxina histamina en la carne de pescado dorado (Coryphanea hippurus) de venta en tres mercados municipales de la Ciudad de Guatemala*. p. 45.

⁴ FLORES, Harold. *Determinación de los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún de peces (familia Escombridae) provenientes de la industria atunera guatemalteca*. p. 21.

con cloruro de dansilo. Antes de la cuantificación, se llevó a cabo la validación del método analítico para la cual se estimaron los límites de detección (0,50 mg/L) y cuantificación (1,67 mg/L) del método propuesto, estos satisficieron las necesidades requeridas por el Reglamento (CE) No. 2073/2005.

En la Universidad de Corea realizaron el “Análisis de 41 especies de mariscos para determinar su contenido de aminas biogénicas”⁵. Analizaron la relación entre las condiciones de almacenamiento, la concentración de aminas biogénicas encontradas, el tipo de bacterias más encontradas en las muestras y la actividad de la histidina descarboxilasa en estas bacterias. El método utilizado para la cuantificación de las aminas biogénicas consistió en una extracción con ácido perclórico y el análisis por medio de HPCL. A partir de dicha investigación se determinó que las cepas identificadas como Enterobacterias *aerogenes* producen grandes cantidades de histamina, putrescina y cadaverina. Por otra parte, las cepas identificadas como Enterobacterias *spp.* generan menos histamina, pero sí grandes cantidades de putrescina y cadaverina.

En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad San Carlos de Guatemala se realizó un análisis de la determinación y cuantificación de aminas biogénicas por medio de cromatografía líquida de alta resolución en productos cárnicos procesados, expendidos en la ciudad capital. El método consistió en una extracción con ácido clorhídrico a partir de las muestras y una determinación HPLC con detector de fluorescencia realizando una derivatización pre columna con ftaldehído. Se logró establecer un método satisfactorio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la separación, identificación y cuantificación simultánea de diez tipos de aminas biogénicas.

⁵ KIM, Min-Ki; MAH, Jae-Hyung y HWANG, Han Joon. *Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish*. p. 152.

Luego de llevarse a cabo la revisión bibliográfica, se conoce que existen diversos métodos para la detección de histamina presente en la carne de diversos productos hidrobiológicos. Por lo tanto, es importante seccionar la metodología más adecuada dependiendo de la exactitud, tiempo y capital de la investigación que se quiera llevar a cabo.

2. MARCO TEÓRICO

Para una mejor comprensión sobre la producción de histamina en el lomo del atún, se mencionará la información más relevante sobre su morfología, hábitat, composición química, entre otras.

2.1. Características del atún

Respecto a la morfología del atún, se puede mencionar que el cuerpo es fusiforme, en forma de huso; la cabeza pronunciada, en forma de pirámide triangular y boca pequeña con respecto al desarrollo del cráneo. Una característica muy común de los atunes es la existencia de dos aletas dorsales, normalmente separadas de color gris azulado. Es considerado un pez emigrante que se encuentra normalmente en la superficie, en aguas con temperatura mayor a 10 y hasta 37 grados Celsius.

Tabla I. **Taxonomía del atún**

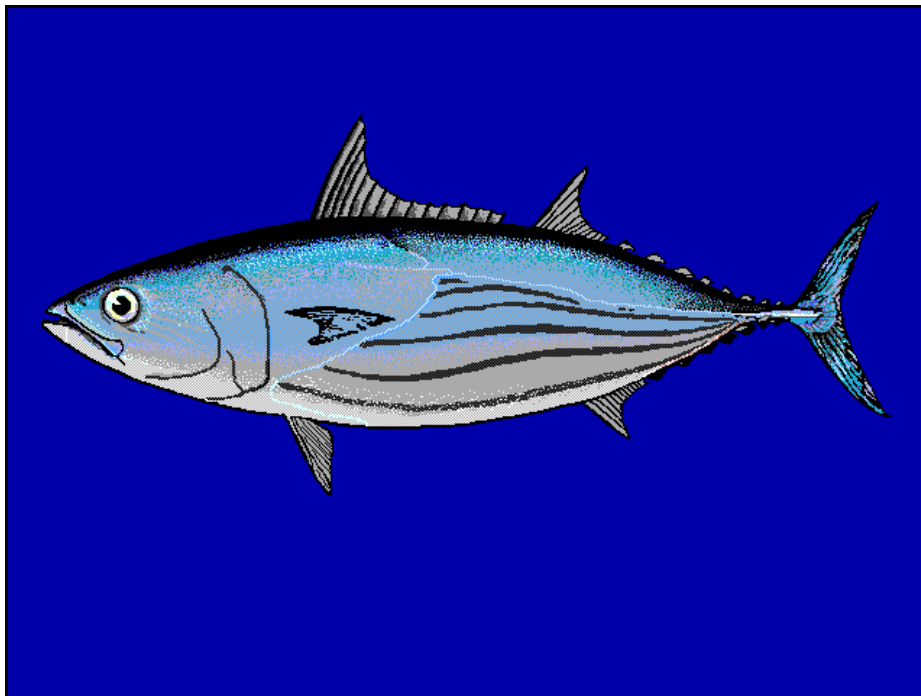
| | |
|------------|--|
| Reino | Animalia |
| Filo | Chordata |
| Subfilo | Vertebrata |
| Subclase | Neopterygii |
| Infraclase | Teleostei |
| Superorden | Acanthopterygii |
| Orden | Perciformes |
| Suborden | Scombroidei |
| Familia | Scombrinae |
| Género | Thunnus, Euthynus, Katsuwonus, Auxis y Allothunnus |

Fuente: elaboración propia.

Las escamas son duras, poco evidentes y lisas; la piel es lubricada por un moco que permite reducir la fricción con el agua. Las dos aletas dorsales se encuentran muy próximas, rígidas y robustas; además, posee una caudal fuerte en forma de arco terminado en dos zonas puntiagudas que le dan aspecto de media luna. Su coloración es típica de los peces pelágicos con el dorso azul oscuro y el vientre blanco plateado.

El atún pertenece a la familia *Escombridae* y existen cuatro géneros *Thunnus*, *Euthynus*, *Katsuwonus*, *Auxius* y *Allothunnus*. Entre los que se encuentran el atún aleta azul (*Thunnus thynnus*), el atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y el atún bonito o listado (*Katsuwonus pelamis*), entre otros.

Figura 1. **Atún bonito (*Katsuwonus pelamis*)**

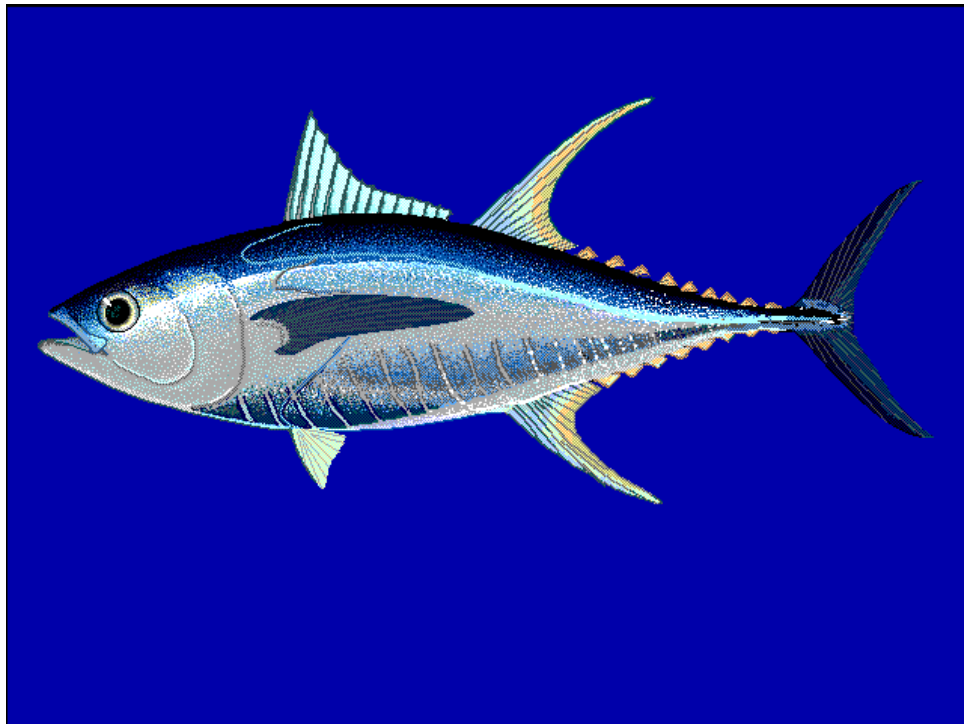


Fuente: Fishbase. *Atún bonito*. <http://www.fishbase.org>. Consulta: 27 de julio de 2018.

Katsuwonus pelamis es considerada la séptima de las principales especies comerciales de atún. Los machos pertenecientes pueden llegar a medir 1,1 m de longitud en total y pesar alrededor de 35 kg.

Es un atún robusto con tres aletas dorsales separadas a distancias cortas. La aleta anal se encuentra formada por siete a nueve pínulas. La coloración de sus escamas dorsales es azul oscuro, en los laterales y vientre plateados, normalmente con cuatro a seis líneas oscuras.

Figura 2. **Atún Aleta Amarilla (*Thunnus albacares*)**



Fuente: Fishbase. *Atún aleta amarilla*. <http://www.fishbase.org>. Consulta: 27 de julio de 2018.

Los atunes aleta amarilla se encuentran normalmente en aguas cálidas, por lo tanto, son considerados peces tropicales que abundan en el océano Atlánticos.

2.2. Las aminas biogénicas

Las aminas son compuestos orgánicos que contienen un grupo funcional amino (-NH₂). Pueden ser clasificadas como primarias, secundarias y terciarias, según sea el número de sustituyentes diferentes al hidrogeno sobre el átomo del nitrógeno.

“Son denominadas aminas biogénicas aquellas que se obtienen como productos del metabolismo o actividad de los organismos vivos. Es muy común encontrar aminas biogénicas alifáticas acíclicas, tales como putrescina, heterocíclica como tiramina y hexocíclica como la histamina”.⁶

“Los aminoácidos son productos de la actividad enzimática bacteriana, la cual está relacionada con los procesos de fermentación, deseados o no. En la descomposición de los alimentos, las aminas biogénicas son formadas por la flora bacteriana contaminante normal de estos y su formación es dependiente de las condiciones de almacenamiento”⁷.

En los últimos años se ha incrementado el número de alimentos que posiblemente puedan contener cantidades importantes de aminas biogénicas, entre los que más sufren este problema están el pescado y sus derivados, los quesos curados, la carne cruda y las bebidas alcohólicas fermentadas. En

⁶ KNIZE-MG, Felton. *Chromatographic methods for the analysis of the heterocyclic amine food mutagens/carcinogens*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1494008>.

⁷ N, Sayem-el-Daher; RE, Simard; L, L'Heureux; AG. Roberge. *Determination of mono-, di- and polyamines and foods using a single column amino acid autoanalyser*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833418>.

términos generales, se trata de alimentos que son susceptibles de presentar una contaminación bacteriana durante los días previos a su consumo o transformación.

“La carga bacteriana propia y aquella incorporada por los manejos posteriores a la captura, dan como resultado una proliferación bacteriana, que resulta en la formación de las aminas biogénicas, la cual va aumentando al no implementarse las buenas prácticas de manufactura en el proceso de manipulación del pez”.⁸

“La temperatura y el tiempo de almacenamiento del pescado, así como los daños físicos que suceden como consecuencia de la manipulación brusca y el magullamiento posterior a la captura, son las principales causas que ocasionan la contaminación de la carne con bacterias que permiten la liberación de enzimas, aumentando la tasa de deterioro”.⁹

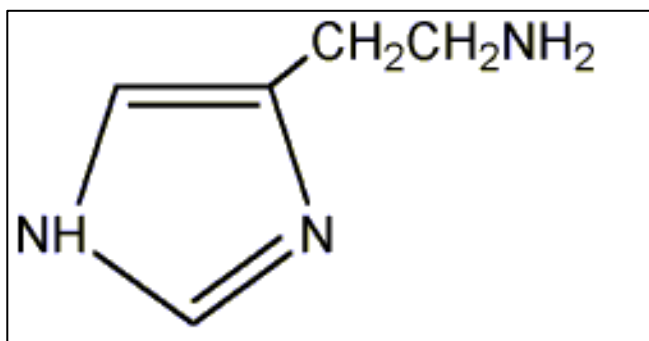
2.2.1. La histamina y sus efectos

La histamina se forma a partir de la descarboxilación del aminoácido histidina presente en concentraciones elevadas principalmente en el tejido muscular de los peces que pertenecen al género *Thunnus*.

⁸ IZQUIERDO, Pedro; SANDREA, Lisette; ALLARA, María; GONZÁLEZ, Peggy; GARCÍA, Aiza; VALECILLOS, Yalitz. *Evaluación bacteriológica y contenido de histamina en pescado desmenuzado precocido en Venezuela*. p. 51.

⁹ FREEMAN, B.A. *Microbiología de Burrows*. p. 89.

Figura 3. Estructura química histamina



Fuente: LÁZARO, César; CONTE, Carlos. *Métodos cromatográficos para determinar aminas biogénicas en alimentos de origen animal*. p. 54.

“Este proceso se origina por la acción de determinadas enterobacterias y lactobacilos que se encuentran en el intestino del pescado, quienes aprovechan las concentraciones de histidina para producir la histamina; estas bacterias pueden encontrarse en la mayoría de los pescados, probablemente como resultado de una contaminación posterior a la captura y se desarrollan bien a 10 °C, pero el mismo se retarda considerablemente a 5 °C”.¹⁰

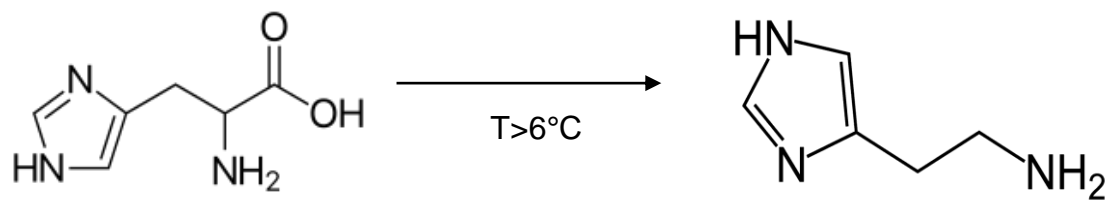
“Es muy importante recalcar que, una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que suceda una intoxicación en la persona que lo consume es muy alto. Por otro lado, es necesario afirmar que la histamina es un compuesto muy resistente al calor, por lo que a pesar de haber sometido el pescado al proceso de cocción u otro tratamiento térmico antes de ser consumido, la histamina no se destruye”.¹¹

¹⁰ GALLEGUILLLOS, Mónica. *Aminas Biogénicas – Nuevos Indicadores Químicos utilizados como criterios de calidad en la harina de pescado control de calidad de insumos y dietas acuícolas*. p. 64.

¹¹ *Ibíd.*

“La intoxicación por histamina es debida a la ingestión de alimentos que contienen altos niveles de esta sustancia, fatal si no es tratada a tiempo. Los síntomas principalmente son de tipo neurológico y cutáneo, ejerciendo acción sobre el aparato cardiovascular, glándulas endocrinas y músculo liso; las manifestaciones suelen darse 5 minutos después de la ingesta o pueden tardar varias horas, dependiendo de las concentraciones de histamina y otras aminas que se encuentren en el pescado”.¹²

Figura 4. **Reacción síntesis histamina**



Fuente: elaboración propia.

2.2.2. **Intoxicación alimentaria por histamina**

Escombrosis es el nombre de la intoxicación alimentaria que se origina de consumir pescado con alto nivel de histamina. No se ha logrado establecer una relación entre la dosis de histamina y el efecto en el cuerpo del ser humano, ya que la administración de la histamina pura a las mismas dosis no produce los mismos efectos tóxicos. Se ha sugerido que en el pescado se puede encontrar productos potenciadores que disminuyen el umbral de la dosis necesaria de histamina para crear una intoxicación. “Un mecanismo sugerido es que se encuentran moléculas que inhiben las enzimas de diaminooxidasa y la histidina

¹² GALLLEGUILLOS, Mónica. *Aminas Biogénicas – Nuevos Indicadores Químicos utilizados como criterios de calidad en la harina de pescado control de calidad de insumos y dietas acuícolas*. p. 64.

metiltransferasa, las que están encargadas del metabolismo de la histamina en el cuerpo”.¹³

Figura 5. **Efectos en la piel, Escombrosis**



Fuente: Expediente MD James Heilman

2.2.2.1. Síntomas

Los síntomas de la escombrosis se presentan normalmente entre 10 a 60 minutos después del consumo del pescado. Los síntomas son semejantes a una alergia y pueden ser variados, pueden incluir: adormecimiento oral, cefalea, mareos, palpitaciones, presión arterial baja, taquicardia, dificultad respiratoria y sed. La severidad de los síntomas dependerá de la cantidad de histamina ingerida y de la sensibilidad del paciente hacia ella. Para poder diferenciar

¹³ HUNGERFORD, James. *Scombroid poisoning: a review*. p. 125.

rápidamente la escombrosis de una alergia se debe tomar en consideración lo siguiente:

- Registros previos de alergia al mismo alimento
- Verificación de síntomas similares en personas que consumieron los mismos alimentos
- Análisis de los niveles de histamina en los alimentos consumidos.

2.2.3. Límites

La histamina no es en sí misma una molécula tóxica, pero al consumirse en altos niveles pueden causar una intoxicación. En el pescado recién atrapado los niveles de histamina son generalmente menores a 10 mg/kg, pero en el pescado procesado que no ha sido almacenado correctamente, en refrigeración, los niveles pueden cambiar ampliamente. En los productos que se han almacenado correctamente, la concentración es, por lo general, menos a 50 mg/kg.

La determinación de los límites de histamina que son tolerados en un producto es complicada, ya que la toxicidad no depende únicamente de la presencia de histamina sino de otros compuestos y del organismo de cada consumidor. “En el caso de la histamina, una ingesta de 5- 10 mg puede ocasionar efectos en pacientes sensibles, 100 mg inducen una toxicidad media y 1 000 mg es altamente tóxica. Otros autores señalan que 8-40 mg histamina causan toxicidad leve, de 40-100 mg toxicidad intermedia y por encima de 100 mg toxicidad severa”.¹⁴

¹⁴ STANDNICK, Joanna; DOLATOWSKI, Zbigniew. *Biogenic amines in meat and fermented meat products*. p. 94.

2.2.4. Límites legales

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

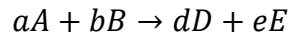
En Guatemala, según la reforma 0271-2010 del Acuerdo Ministerial 74-2007, se establece que por cada lote de atunes deben tomarse nueve muestras del músculo dorsal para su análisis. El valor medio del límite máximo residual de histamina debe ser inferior a 100 ppm o mg/kg. En dos de las muestras se pueden tener valores superiores a 100 mg/kg, pero deben ser inferiores a 200 mg/kg. Ninguna muestra puede tener un valor superior de 200 mg/kg de histamina. En el país se utilizan los mismos niveles de regulación que en la Unión Europea.

2.3. Cinética de reacciones químicas

Formando parte de la fisicoquímica, la cinética química estudia la velocidad a la que se lleva a cabo una reacción y los factores que influyen en esta.

2.3.1. La velocidad de reacción $-r_A$

“La velocidad de reacción es una variable intensiva que tiene la función de indicar con qué rapidez se consume una cantidad de moles de una especie química para formar otra, siendo especie química cualquier compuesto o elemento químico que tiene identidad única”¹⁵. Representando una reacción de la forma:



Donde A y B son reactivo; D y E son los productos, representando a, b, c y d sus coeficientes estequiométricos. La velocidad de reacción puede determinarse de la siguiente manera.

$$r = -\frac{1}{a} \frac{dC_A}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{dC_B}{dt} = \frac{1}{d} \frac{dC_D}{dt} = \frac{1}{e} \frac{dC_E}{dt}$$

Lo anterior indica que la velocidad de reacción es la rapidez con la que se producen los productos y la rapidez con la que se consumen los reactivos, representado en una sola palabra.

2.3.2. Ley de Velocidad

La ley de velocidad indica la proporcionalidad entre las concentraciones de los reactivos elevados a un orden de reacción que representa su participación neta en el mecanismo, para cada reactivo y multiplicados por una constante de proporcionalidad. La velocidad de reacción es dependiente de factores como la temperatura y la composición de los reactivos.

¹⁵ OGLER, Scott. *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. p. 513.

$$-r = k(T) * C_A^\alpha * C_B^\beta$$

2.3.2.1. La constante de velocidad de reacción y ecuación de Arrhenius

La constante de velocidad de reacción k no es verdaderamente una constante, es solo independiente de las concentraciones de las especies que interactúan en la reacción. Por lo cual, también se le conoce como velocidad de reacción específica. Casi siempre depende fuertemente de la temperatura y de algunos parámetros del mecanismo de reacción.

Se asumirá que k solo depende de la temperatura. Dicha suposición es válida en la mayoría de las reacciones de laboratorio e industriales. Fue un químico sueco, Svante August Arrhenius, quien por primera vez sugirió que la dependencia de la velocidad de reacción específica k respecto a la temperatura, podría correlacionarse por una ecuación exponencial:

$$k(T) = Ae^{-E/RT}$$

Donde A es el factor preexponencial o factor frecuencia, E es la energía de activación, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

La energía de activación puede considerarse como una barrera para la transferencia de energía (energía cinética y energía potencial) entre moléculas reactivas y debe ser vencida. Esto hace que no todas las colisiones entre partículas reaccionantes sean exitosas, ya que requieren alcanzar el nivel necesario de energía cinética para transformarla en potencial químico.

2.3.3. Método integral

A continuación, se presenta el método integral empleado para la ley de velocidad para la determinación de la constante de equilibrio y el orden.

$$\begin{aligned}\frac{dC}{dt} &= k[C]^x \\ \frac{dC}{[C]} &= k dt \\ \int_{CA_0}^{CA_1} \frac{dC}{[C]^x} &= \int_{t_0}^{t_1} k dt\end{aligned}$$

Obteniendo

$$\frac{1}{[CA]^{x+1}} = kt + \frac{1}{[CA_0]^{x+1}}$$

2.4. Métodos analíticos para la determinación de histamina en pescado

La determinación de histamina en carne de pescado se realiza por dos fines principales. El primero es por su potencial riesgo de intoxicación y el segundo es por su cuantificación, ya que se utiliza con un indicador de calidad de estos alimentos. “El índice de las aminas indica las condiciones higiénicas durante la manipulación de los productos, este se basa en las concentraciones de las aminas biogénicas (por ejemplo: histamina, tiramina, putrescina y cadaverina) en la carne de pescado. Aunque el índice de aminas no reemplaza

un análisis microbiológico, ya que no todas las especies de bacterias tienen la capacidad de descarboxilar aminoácidos”.¹⁶

Con relación a otras toxinas más peligrosas que encontramos en los mariscos, la amina biogénica, histamina, cuenta con una variedad alta de métodos de detección. Para la cuantificación de histamina puede ser utilizado métodos simples y económicos como cromatografía de capa fina (TLC. Thin Layer Chromatography, por sus siglas en inglés) y métodos más complejos que involucran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC. High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés).

Un paso crítico en la metodología es la extracción de histamina que se dificulta por la complejidad de la matriz, que es la carne de pescado. El análisis también se dificulta por la presencia de componentes que hacen interferencia como aminoácidos libres y otras aminas biogénicas. “Por ello la mayoría de métodos de separación utilizan la cromatografía líquida de alta precisión en fase reversa, en donde la histamina es detectada con base a esquemas de derivatización pre columna con el fin de producir moléculas fluorescentes, las cuales son detectables utilizando un detector UV. Otros métodos de separación incluyen cromatografía con intercambio iónico, electroforesis capilar, entre otros”.¹⁷

“En la actualidad, se busca un método que pueda ser fácilmente válido fácilmente en diferentes laboratorios y permitiendo un análisis más rápido, por ello utilizan métodos enzimáticos caracterizados por ser altamente selectivos y automatizables. Uno de estos métodos utiliza la diaminooxidasa, que degrada la

¹⁶ STANDNICK, Joanna; DOLATOWSKI, Zbigniew. *Biogenic amines in meat and fermented meat products*. p. 94.

¹⁷ *Ibíd.*

histamina presente en la muestra y produce peróxido de hidrógeno”¹⁸. Luego se utiliza cristal violeta junto con preoxidasa para detectar el peróxido de hidrógeno a 596 nm. También puede utilizarse oxidasa para cuantificar la histamina en base al consumo de oxígeno. “Además existen kits de análisis en los que se utilizan histamina hidrogenasa, histamina-N-metiltransferasa o anticuerpos selectivos para utilizar en Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)”¹⁹.

2.4.1. Prueba de ELISA

El método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para la detección de histamina en pescados es un ensayo inmunoenzimático que utiliza un lector de microplacas. Este se basa en la identificación del antígeno o anticuerpo, el cual se encuentra inmovilizado sobre una fase sólida por anticuerpos que directa o indirectamente provocan una reacción.

La prueba emplea inmunógenos, anticuerpos marcados con una enzima cuyo producto es colorido y puede ser medido espectrofotométricamente. El principio por el cual se rige la prueba posee propiedades de un inmunoensayo ideal, ya que es versátil, simple en su realización, robusto y, lo más importante, utiliza reactivos económicos y fácil de conseguir a comparación de otros métodos. Es importante mencionar que posee especificidad entre reactivo y analito, los resultados pueden ser reproducidos fácilmente y con rapidez, lo cual permite analizar varias muestras simultáneamente.

ELISA desarrolló el kit para histamina específico para análisis cuantitativos para las especies que productoras de histamina, tales como en el pez dorado,

¹⁸ HUNGERFORD, James. *Scombroid poisoning: a review*. p. 121.

¹⁹ TAYLOR, Steve. *Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3530640>.

atunes, entre otros. El test es un análisis cuantitativo, aunque visualmente se puede detectar una aproximación del resultado que se obtendrá correctamente utilizando un lector ELISA.

2.4.2. Características técnicas de la prueba

- Límite de detección: 2ppm
- Límite de cuantificación: 2,5 ppm
- Rango de cuantificación: 2,5 ppm-50ppm
- Concentraciones controles: 0, 2.5, 5, 10, 20, 50ppm
- Temperatura de conservación kit: 2-6 grados Celsius

2.4.3. Ventajas sobre otros métodos

A comparación de otros métodos el kit de histamina presenta las siguientes ventajas:

- Extracción sencilla utilizando agua.
- Contiene todos los reactivos necesarios.
- Controles de concentración conocida.
- Curva de calibración en cada ensayo lo que asegura resultados cuantitativos confiables.

3. METODOLOGÍA

3.1. Variables

Las variables utilizadas fueron cuantitativas con el fin de modelar el comportamiento cinético de la producción de histamina en función del tiempo.

Tabla II. **Definición operacional de las variables cuantificables**

| Nombre | Definición teórica | Definición operativa |
|--|---|--|
| Concentración de Histamina $[H]$ Variable dependiente | Cantidad de la amina biogénica, histamina, que se encuentra presente por unidad de masa. | La concentración de histamina se cuantificó a partir del método descrito por el kit de específico de histamina. La unidad de medición es mg/kg de atún. |
| Tiempo t Variable independiente | Magnitud física que permite medir la duración o separación de acontecimientos. (RAE) | Las unidades de medición del tiempo de almacenamiento del atún fueron días y semanas. |
| Temperatura T Variable Independiente | Magnitud física que expresa el grado o nivel de energía cinética de las partículas de los cuerpos o del ambiente, a nivel macroscópico. | La temperatura de almacenamiento del atún se midió con un termómetro de mercurio en la escala de grados Celsius. |

Fuente: elaboración propia.

Entre las variables se encuentran las de tipo independiente, consideradas explicativas en el modelo y las dependientes como la magnitud que es medida para determinar el efecto de la variable independiente y sus grados de asociación.

3.2. Delimitación de campo de estudio

Con el fin de modelar el comportamiento cinético de la producción de histamina, a partir de un diseño experimental, dicha investigación tuvo un alcance descriptivo y correlacional con un enfoque cuantitativo debido a que la unidad de análisis de la variable concentración de histamina se realizó por medio de métodos medibles.

El objeto de estudio fueron los atunes provenientes de una población (lote) de la industria atunera Rainxeira ubicada en Puerto Quetzal, Escuintla. Es importante mencionar que la experimentación se realizó para dos especies de atún (*Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*), los cuales fueron tomados aleatoriamente.

3.3. Recursos humanos disponibles

- Investigador: Sandra Judith Pineda Martínez
- Asesor: Ingeniero Químico William Eduardo Fagiani Cruz
- Colaboradora en muestreo atunes: Licenciada en acuicultura Fabiola Esquivel

3.4. Recursos materiales

Según la metodología experimental propuesta, se requirió de los siguientes equipos.

3.4.1. Materiales y suministros

A continuación, se mencionarán los materiales y suministros utilizados para la investigación.

3.4.1.1. Reactivos

- Kit de ELISA

3.4.1.1.1. Componentes Kit histamina

- 48 micropozos desglosables recubiertos de anticuerpos.
- 48 micropozos desglosables para mezclado con marca roja.
- Seis frascos de 1 mL, cada uno con control de histamina 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 ppm.
- Un frasco de 8 mL con solución conjugado.
- Un sobre contenido polvo buffer diluyente para extracto de muestras (10 mM PBS)
- Un frasco de 12,5 mL con solución de Substrato K-Blue®.
- Un frasco de 12,5 mL con solución stop.

Tabla III. **Nombre de reactivos a utilizar**

| Reactivos | Calidad o grado |
|------------------|------------------------|
| Agua | Destilada |

Fuente: elaboración propia.

3.4.2. Mobiliario y equipo

A continuación, se mencionará el mobiliario y equipo utilizados para la investigación.

Tabla IV. **Nombre del equipo, accesorios y cristalería a utilizar**

| Equipo | Cristalería |
|--|---|
| Lector de microplacas para absorbancias | Pipetas volumétricas de 0.100 μ L y 100-250 μ L |
| Filtro de 650 nm | Pipeta de 12 canales de 100-250 μ L |
| Agitador tipo vortex | Pizetas |
| Procesador de alimentos con recipiente plástico | Tubos de ensayo de 10 mL |
| Papel filtro | Vasos plásticos desechables capacidad 125 mL |
| Balanza analítica | Embudos plásticos |
| Congelador | Probeta de 100 mL |
| Refrigeradora | Beacker de 250 mL |
| Termómetro de mercurio escala 0-100 grados Celsius | Frasco de vidrio de 1 L con tapa |
| Termómetro electrónico | 2 cubetas de reactivo para pipeta de 12 canales |
| Soporte para tubos de ensayo | |

Fuente: elaboración propia.

3.5. Técnica cuantitativa

A continuación, se mencionará la técnica cuantitativa utilizada para la investigación.

3.5.1. Recolección de muestras y almacenamiento

Por parte de la industria atunera, se obtuvieron tres ejemplares de cada especie de atún, los cuales fueron seleccionados aleatoriamente por el personal, con similar tamaño y peso.

Durante la recepción de las muestras se les midió la temperatura, la cual debía ser aproximadamente -18 grados Celsius y posteriormente se trasladaron a un recipiente hermético con hielo hasta su lugar de almacenamiento para evitar el rompimiento de la cadena de frío.

Al momento de ser almacenadas en sus respectivos lugares (congelador y refrigeradora) se procedió a analizar las muestras para determinar la concentración inicial de histamina cuidando que no se elevara significativamente la temperatura.

3.5.2. Frecuencia de análisis

En la siguiente tabla se observa la organización de análisis para las especies analizadas.

Tabla V. **Organización de análisis para temperatura de 4 grados Celsius**

| Especie | Núm. Muestras | Núm. Análisis/Muestra | Tiempo de monitoreo | Frecuencia |
|---------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <i>Katsuwonus pelamis</i> | 2 | 2 | 1 semana | Cada día |
| <i>Thunnus albacares</i> | 2 | 2 | 1 semana | Cada día |

Fuente: elaboración propia.

Tabla VI. **Organización de análisis para temperatura de -18 grados Celsius**

| Especie | Núm. Muestras | Núm. Análisis/Muestra | Tiempo de monitoreo | Frecuencia |
|---------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <i>Katsuwonus pelamis</i> | 2 | 2 | 3 meses | Cada 1 y 2 meses |
| <i>Thunnus albacares</i> | 2 | 2 | 3 meses | Cada 1 y 2 meses |

Fuente: elaboración propia.

3.5.3. Molienda de carne de atún

Del lomo del atún fueron rebanados trozos de similar tamaño, de diferentes regiones del pez. Posteriormente se procesaron hasta obtener una consistencia homogénea y completamente desfibrada. Luego fueron guardadas en una bolsa de plástico y almacenadas a sus respectivas temperaturas (-18 y 4 °C). Procedimiento realizado para cada muestra de ambas especies. Se lavó adecuadamente en cada una de ellas el procesador de alimentos utilizado.

3.5.4. Prueba Kit ELISA

La metodología utilizada para la cuantificación fue la establecida en el Kit Elisa.

3.5.4.1. Preparación de reactivos

La preparación de los reactivos se presenta a continuación.

3.5.4.1.1. Solución Buffer de lavado

Se disolvió el Buffer contenido en el sobre en un litro de agua desmineralizada y se almacenó en una botella de vidrio con tapadera. Posteriormente este se guardó en un lugar oscuro y a temperatura ambiente.

3.5.4.2. Preparación del extracto

Se mezcló 10 gramos de muestra previamente homogenizada con 90 mL de agua destilada. Se agitó vigorosamente utilizando un vortex durante 20 segundos y se esperó 5 minutos y se procedió a realizarlo nuevamente. Por último, se agitó durante 20 segundos y se dejó sedimentar por 30 segundos.

Utilizando papel filtro y un embudo se filtró el sobre nadante introduciéndolo en un tubo de ensayo previamente identificado.

3.6. Recolección y ordenamiento de la información

Los datos recolectados se organizaron de la siguiente manera.

Tabla VII. Aleatorización de muestras a 4 °C

| Fecha | <i>Katsuwonus pelamis</i> | | <i>Thunnus albacares</i> | |
|-------------------|---------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 1 | Muestra 2 |
| 10/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 11/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 12/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 13/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 14/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 15/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 17/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla VIII. Aleatorización de muestras a -18 °C

| Fecha | <i>Katsuwonus pelamis</i> | | <i>Thunnus albacares</i> | |
|------------|---------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 1 | Muestra 2 |
| 10/10/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 10/12/2018 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 10/01/2019 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Fuente: elaboración propia.

La recolección de los datos necesarios para realizar los modelos matemáticos de la producción de histamina para ambas especies estudiadas se realizó de la siguiente manera.

3.6.1. Datos originales

Los datos originales de las concentraciones de especies de atunes analizadas.

Tabla IX. Datos *Katsuwonus pelamis* (atún bonito), 4 °C

| Fecha | Concentración (ppm) | Delta |
|------------|---------------------|--------|
| 10/12/2018 | 15,3328 | |
| 11/12/2018 | 19,4480 | 4,1153 |
| 12/12/2018 | 21,1423 | 1,6943 |
| 13/12/2018 | 22,3225 | 1,1803 |
| 14/12/2018 | 23,4615 | 1,1390 |
| 15/12/2018 | 24,1910 | 0,7295 |
| 17/12/2018 | 26,8985 | 2,7075 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla X. **Datos *Thunnus albacares* (atún aleta amarilla), 4 °C**

| Fecha | Concentración (ppm) | Delta |
|------------|------------------------|--------|
| 10/12/2018 | 9,5265 | |
| 11/12/2018 | 12,9583 | 3,4318 |
| 12/12/2018 | 16,0000 | 3,0418 |
| 13/12/2018 | 18,1098 | 2,1098 |
| 14/12/2018 | 19,8718 | 1,7620 |
| 15/12/2018 | 19,9093 | 0,0375 |
| 17/12/2018 | 20,6705 | 0,7613 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XI. **Datos *Katsuwonus pelamis* (atún bonito), -18 °C**

| Fecha | Concentración (ppm) | Delta |
|------------|------------------------|--------|
| 10/10/2018 | 14,0363 | |
| 10/12/2018 | 21,1423 | 7,1060 |
| 10/01/2019 | 27,2910 | 6,1488 |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XII. **Datos *Thunnus albacares* (atún aleta amarilla), -18 °C**

| Fecha | Concentración (ppm) | Delta |
|------------|------------------------|---------|
| 10/01/2019 | 7,6758 | |
| 10/12/2018 | 18,5000 | 10,8243 |
| 10/01/2019 | 22,3490 | 3,8490 |

Fuente: elaboración propia.

3.7. Análisis estadístico

Para estimar el nivel de correlación, independencia, variabilidad y predicción de tendencia de los modelos matemáticos propuestos, asociados al comportamiento de la producción de histamina para ambas especies se realizaron algunas pruebas estadísticas. Dichas pruebas permitieron escoger el modelo más adecuado.

3.7.1. Análisis de regresión

Proceso estadístico utilizado para estimar las relaciones entre variables, tiempo y concentración de histamina. En todos los casos, el objetivo de la estimación es una función de las variables independientes llamada la función de regresión.

3.7.2. Análisis de correlación

Es utilizado como un factor de comparación entre modelos para determinar el de mayor ajuste, por lo tanto, cuando el coeficiente se acerque a 0, la asociación entre variables es menor.

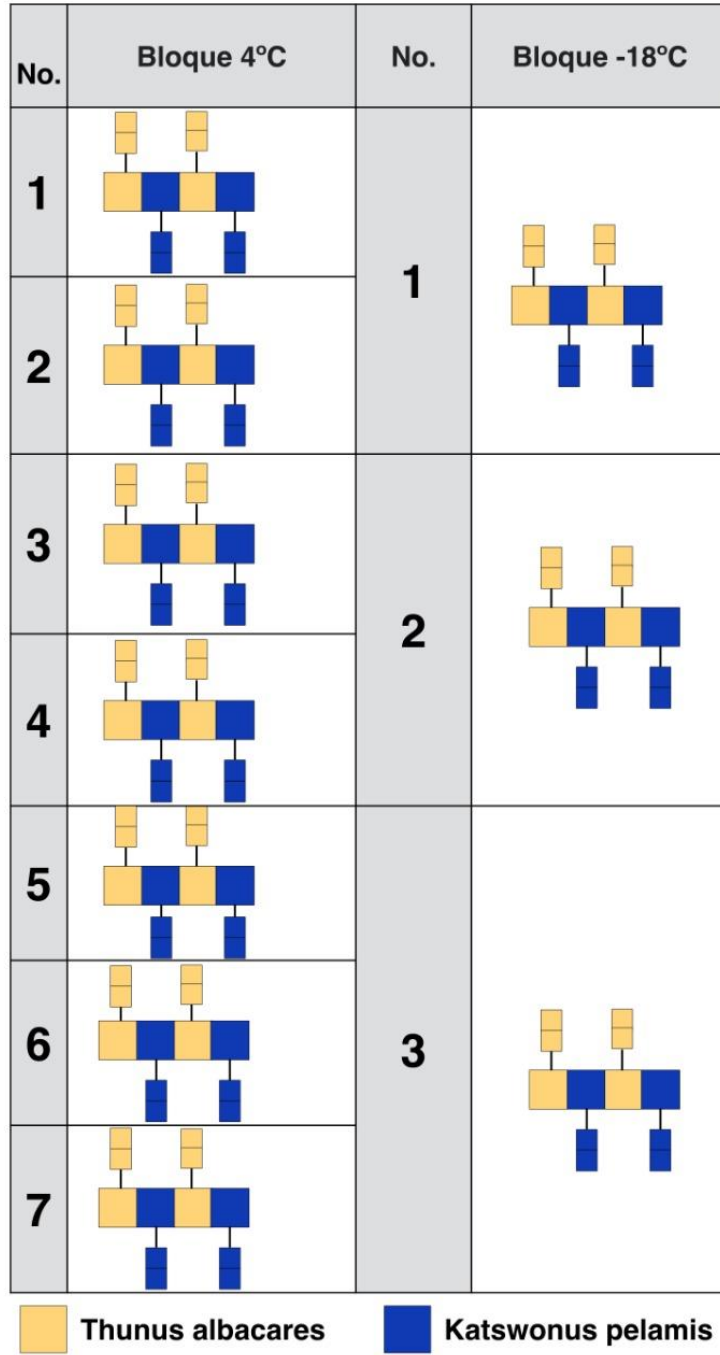
3.7.3. Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza es un método para comparar dos o más medias. El ANOVA se basa en la descomposición de la variación total de los datos con respecto a la media global. Es una estimación de σ^2 a partir de la información muestral.

La variación dentro de las muestras o intra-grupos, la cual cuantifica la dispersión de los valores de cada muestra con respecto a sus correspondientes medias.

La variación entre muestras o inter-grupos, cuantifica la dispersión de las medias de las muestras con respecto a la media global.

Figura 6. Descripción del análisis experimental



Fuente: elaboración propia.

En la imagen anterior se ilustra el desarrollo de la experimentación y organización de las muestras a las cuales se les monitoreo sus niveles de histamina. En cada análisis se examinaron siempre las cuatro mismas muestras (dos de cada especie) de los cuales se hicieron por duplicado.

3.7.4. Prueba de Anderson-Darling

La prueba de Anderson-Darling es una prueba estadística no paramétrica con la cual se determina los datos de una muestra proveniente de una distribución específica. La definición matemática del estadístico A es utilizada para determina si los datos pertenecen a una distribución con función acumulada F.

$$A^2 = -N - S$$

La prueba estadística de Anderson-Darling es utilizada para determinar si la muestra de datos se puede extraer de una distribución de probabilidad. La prueba asume que no existen parámetros a estimar en la distribución que se está probando, en cuyo caso la prueba y su conjunto de valores críticos siguen una distribución libre.

3.7.5. Análisis de residuos

Es una herramienta para inferir si el modelo de regresión empleado proporciona predicciones significativamente adecuadas de las variables respuesta.

El residuo i de la observación es la diferencia entre el valor observado de la variable independiente (y_i) y el valor estimado por del modelo \hat{y}_i , es decir el

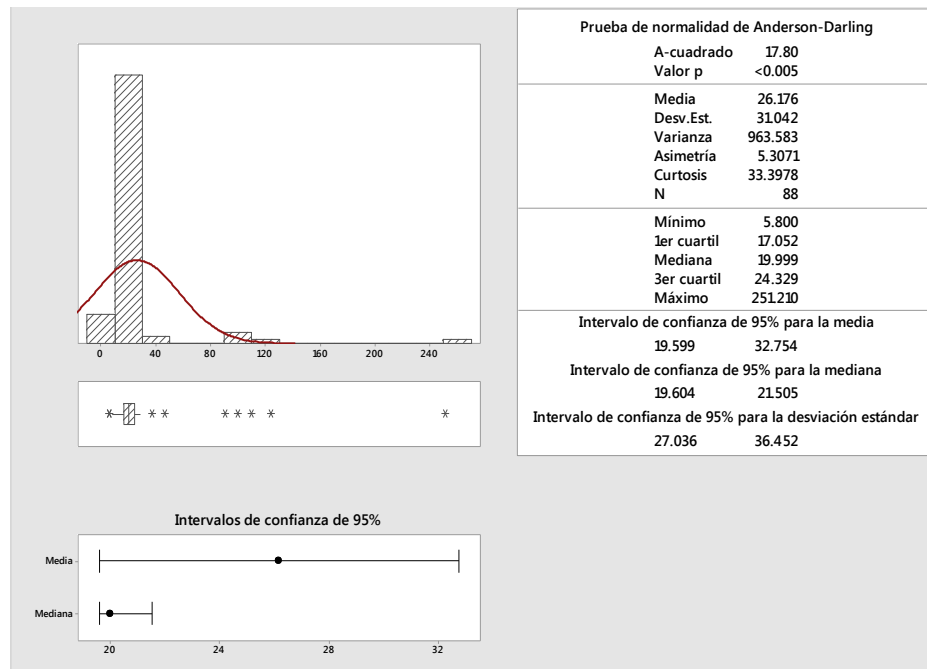
error que resulta de usar la ecuación de regresión estimada para predecir el valor de la variable dependiente. La mayor parte del análisis de residuos está basado en evaluación de gráficas.

4. RESULTADOS

4.1. Cuantificación de la concentración de histamina utilizando la metodología del kit ELISA para estimar su tendencia respecto al tiempo.

A continuación, se presenta la descripción de datos general obtenidos de ambas especies para las dos temperaturas de análisis.

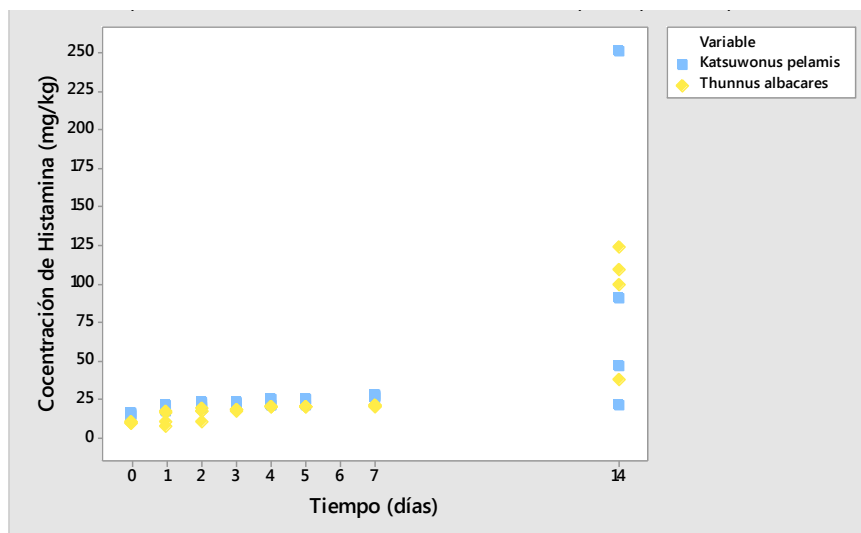
Figura 7. Informe resumen de datos concentración de histamina (mg/kg)



Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 18.

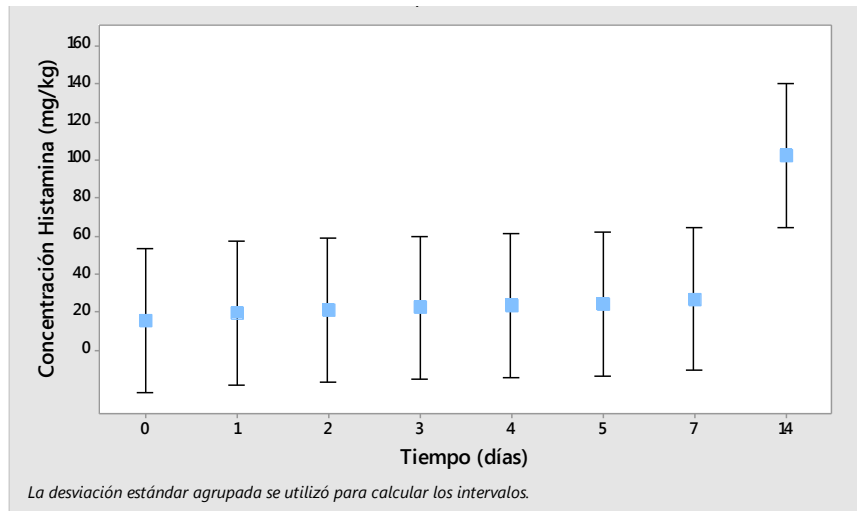
En el cuadro anterior se presentan los valores de concentración de histamina (mg/kg) obtenidos a lo largo de las cuantificaciones realizadas a las dos especies de atún (*Thunnus albacares* y *Katsuwonus pelamis*) en lapsos de tiempos establecidos para cada condición de almacenamiento. Se identifica una distribución asimétrica hacia la izquierda, con mayor frecuencia en el rango de 0 a 40 mg/kg.

Figura 8. **Gráfica de dispersión de concentración de histamina en función del tiempo (2 especies, temperatura de 4°C)**



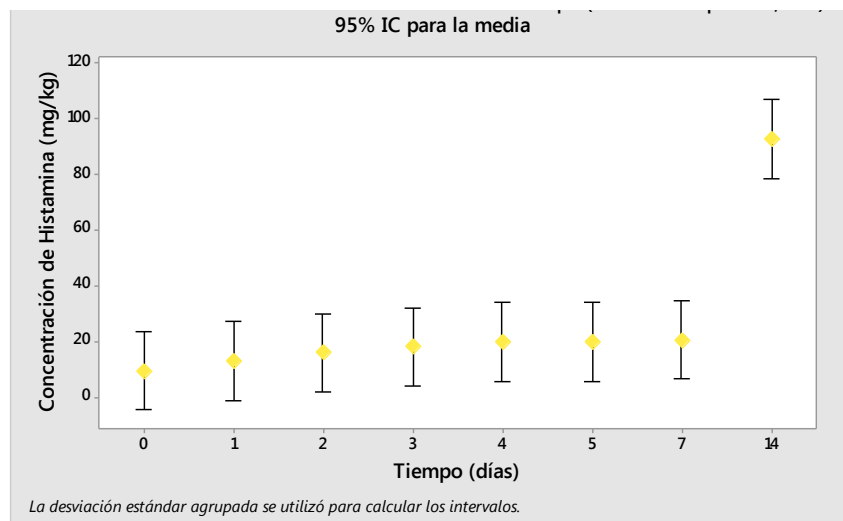
Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 18.

Figura 9. **Gráfica de intervalos concentración de histamina en función del tiempo (*Katsuwonos pelamis*, 4 °C)**



Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 18.

Figura 10. **Gráfica de intervalos Concentración de histamina en función del tiempo (*Thunnus albacares*, 4 °C)**

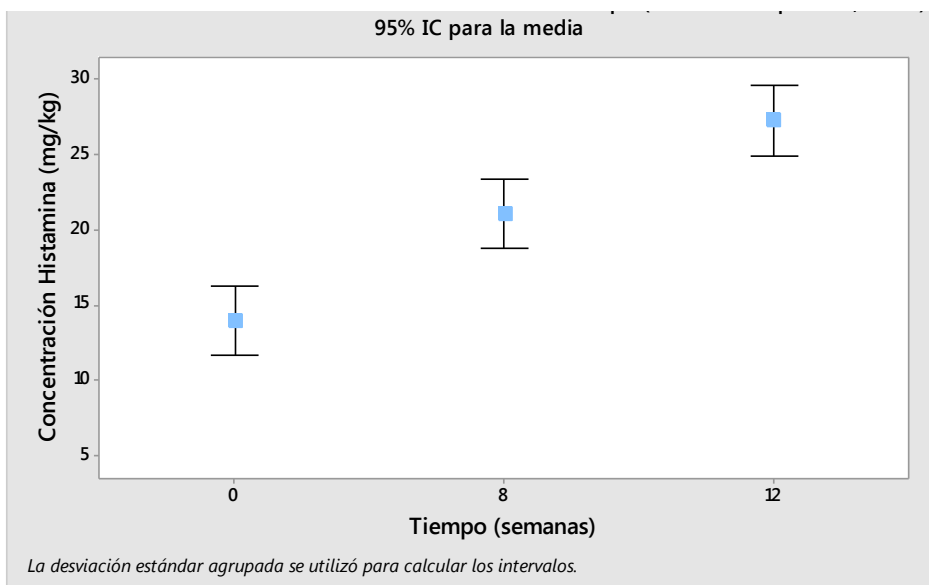


Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 18.

El primer gráfico expone la dispersión de la concentración de histamina en las muestras de atunes, *Thunnus albacares* y *Katsowonus pelamis*, almacenados a una temperatura de 4 grados Celsius, los cuales fueron monitoreados ocho veces durante dos semanas.

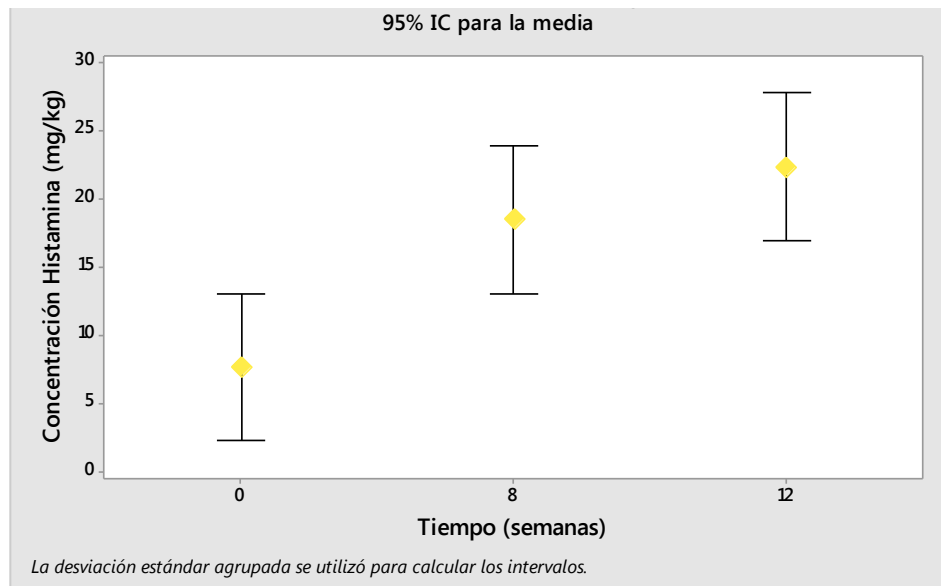
Posteriormente se presenta en gráficas individuales los intervalos de confianza del 95 % para cada medición y se observa claramente para ambas especies un aumento de la presencia de la amina biogénica en el lomo conforme aumenta su tiempo de almacenamiento.

Figura 11. **Gráfica de intervalos concentración histamina en función del tiempo (*Katsuwonus pelamis*, -18 °C)**



Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 18.

Figura 12. **Gráfica de intervalos concentración de histamina en función del tiempo (Thunnus albacares, -18 °C)**



Fuente: elaboración propia, empleando Minitab 18.

Para las condiciones de almacenamiento a -18 grados Celsius en un congelador se llevaron a cabo tres mediciones a lo largo de 12 semanas. En ambas gráficas se presenta los intervalos de concentración de histamina cuantificados y para ambas muestras de cada lote de atún aumenta su presencia a lo largo del tiempo.

4.2. Estimación del efecto de la temperatura y la especie de atún sobre la producción de histamina

Para la estimación de del efecto de la temperatura y la especie de atún sobre la producción de histamina se realizaron pruebas estadísticas y sus resultados se muestran a continuación.

Tabla XIII. Información de factores del ANOVA

| Factor | Tipo | Niveles | Valores |
|--------------------|------|---------|---|
| <i>Temperatura</i> | Fijo | 2 | -18,4 °C |
| <i>Especie</i> | Fijo | 2 | A: <i>Katsuwonus pelamis</i> B: <i>Thunnus albacares</i> |

Fuente: elaboración propia.

Tabla XIV. Análisis de varianza lineal

| Fuente | GL | Sc. Sec | Contribución | SC. Ajuste | MC Ajuste | Valor F | Valor p |
|------------------------|----|---------|--------------|------------|-----------|---------|---------|
| t | 1 | 193,2 | 0,23 % | 4 140,1 | 4140,1 | 4,51 | 0,037 |
| T | 1 | 5892,0 | 7,03 % | 5892,0 | 5892,0 | 6,42 | 0,013 |
| Especie | 1 | 643,8 | 0,77 % | 643,8 | 643,8 | 0,70 | 0,405 |
| Error | 84 | 77102,7 | 91,97 % | 77102,7 | 917,9 | | |
| Falta de ajuste | 18 | 40324,4 | 48,10 % | 40324,4 | 2240,2 | 4,02 | 0,00 |
| Error puro | 66 | 36778,3 | 43,87 % | 36778,3 | 557,2 | | |
| Total | 87 | 83831,7 | 100,00 % | | | | |

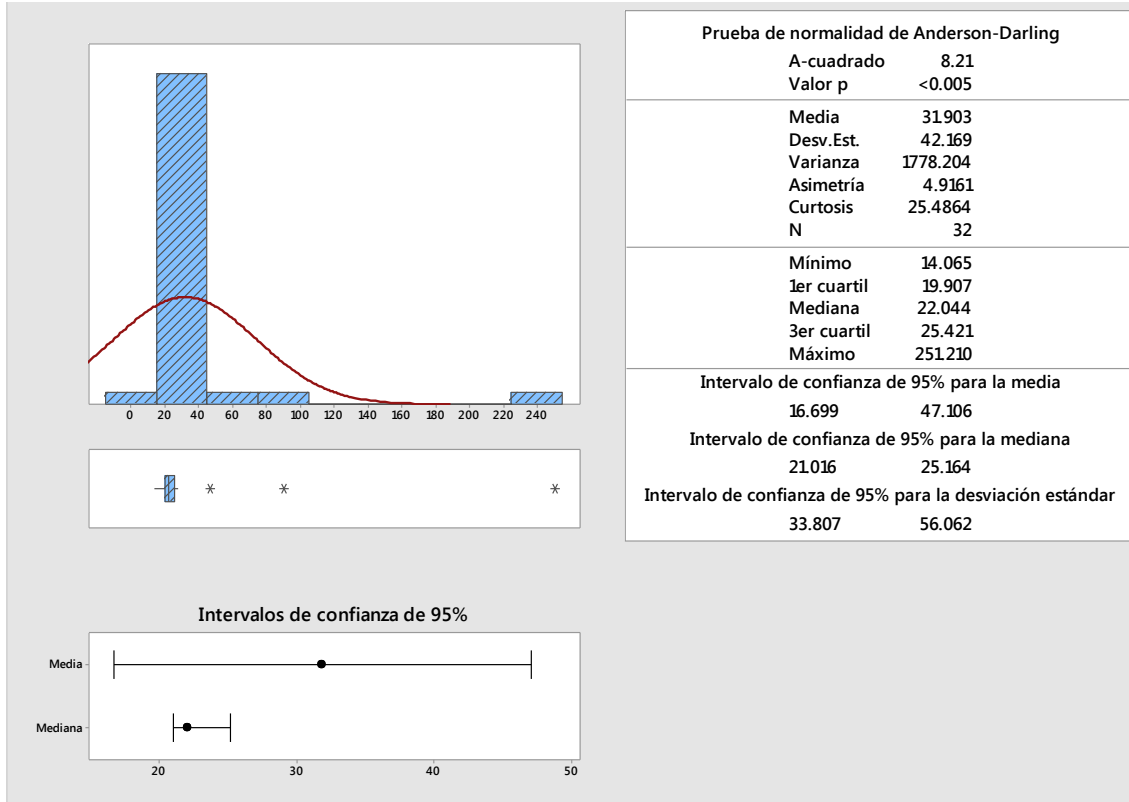
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XV. **Análisis de varianza ajustado**

| Fuente | GL | SC. Ajuste | MC Ajuste | Valor F | Valor p |
|------------------------|-----------|-----------------------|----------------------|----------------|----------------|
| t | 1 | 4,956 | 4,9559 | 6,89 | 0,010 |
| T | 1 | 91,062 | 91,0619 | 126,60 | 0,000 |
| Especie | 1 | 5,122 | 5,1215 | 7,12 | 0,009 |
| Error | 83 | 59,703 | 0,7193 | | |
| Falta de ajuste | 18 | 57,191 | 3,1773 | 82,20 | 0,00 |
| Error puro | 65 | 2,513 | 0,0387 | | |
| Total | 86 | 186,320 | | | |

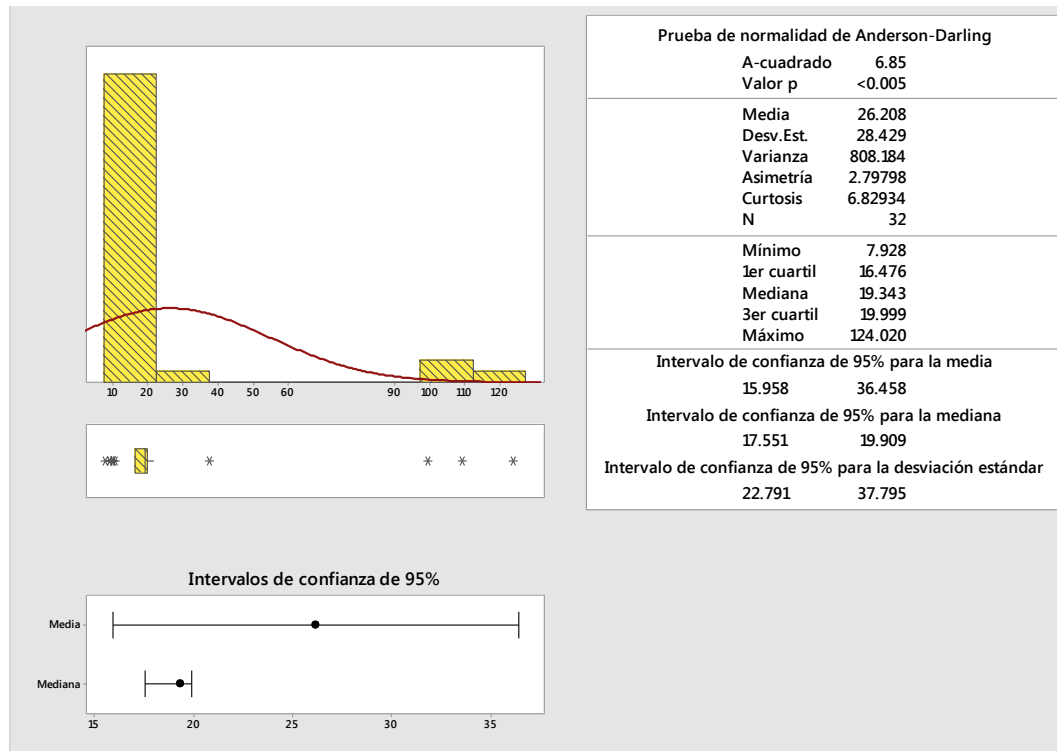
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 13. Informe resumen de concentración de Histamina (mg/kg), *Katsuwonus pelamis* a 4 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

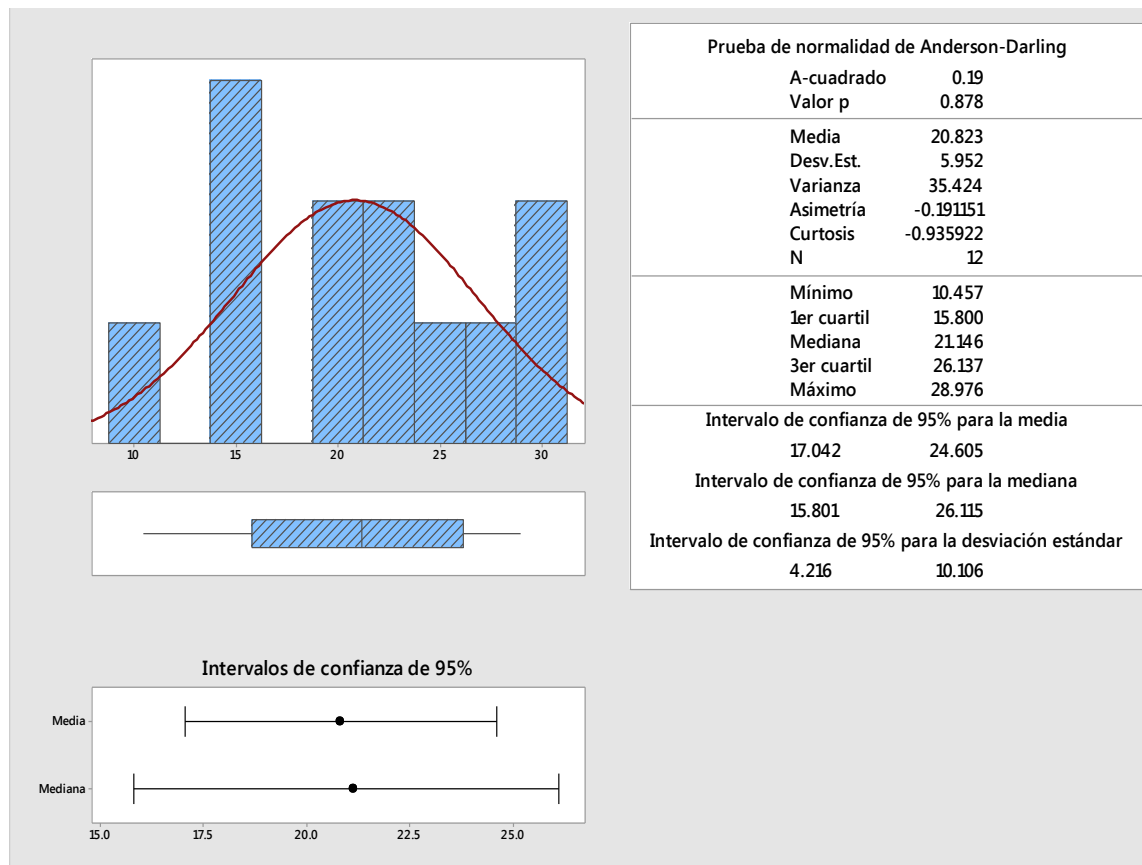
Figura 14. Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), *Thunnus albacares* a 4 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

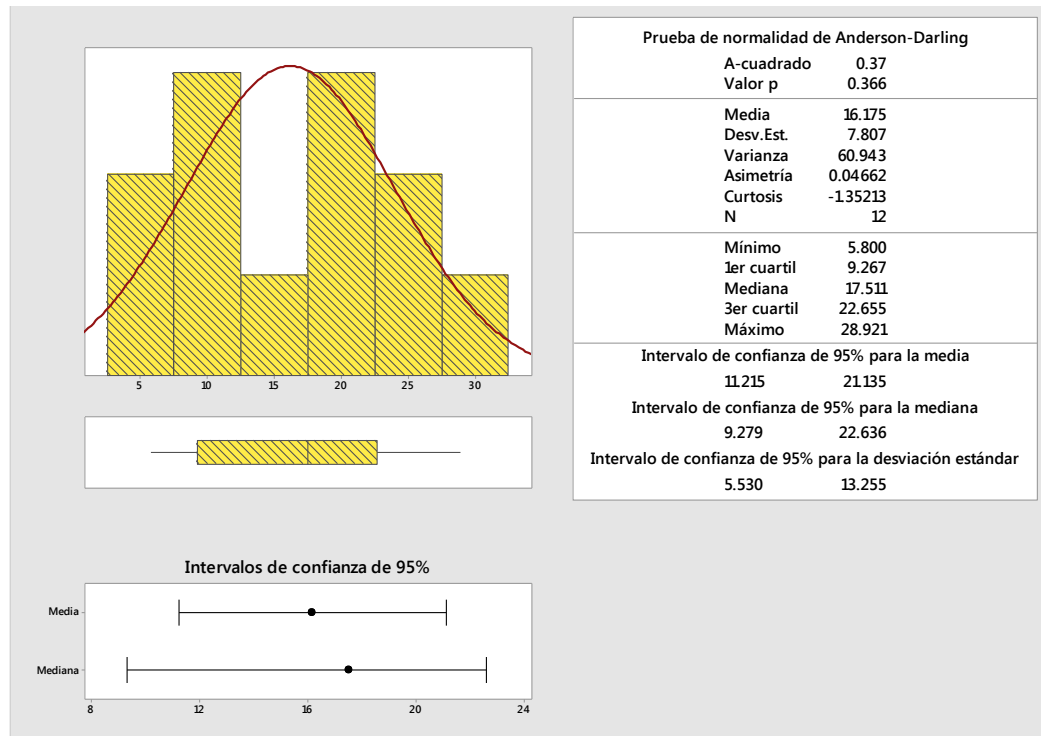
La distribución de datos para las muestras de atunes de ambas especies presenta una distribución sesgada hacia la izquierda. La mayor frecuencia de datos para la especie *Katsuwonus pelamis* se encuentra dentro del intervalo aproximadamente entre 20 y 50 mg/kg de Histamina en su lomo y para *Thunnus albacares* entre 10 y 20 mg/kg.

Figura 15. Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), *Katsuwonus pelamis* a -18 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 16. Informe resumen de concentración de histamina (mg/kg), *Thunnus albacares* a -18 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Para los valores de la concentración monitoreados en la especie *Thunnus albacares* a una temperatura de -18 grados Celsius, se obtuvo una distribución con mayor similitud a la normal.

4.3. Construcción del modelo matemático de la producción de histamina para cada especie para estimar el tiempo de almacenamiento del atún

Se desarrollaron cuatro diferentes modelos matemáticos (lineal, logarítmico, inverso e inverso al cuadrado) para la concentración de la producción de histamina, a los cuales se les calificaron aspectos como el coeficiente de determinación, la normalidad, homocedasticidad a los residuos.

La normalidad y homocedasticidad fueron comparados visualmente a partir de sus gráficas obtenidas. Se utilizó una escala de uno a cuatro para ordenarlos, siendo uno el mejor y cuatro el peor. Como criterios principales en la selección del modelo fueron la normalidad, el coeficiente de determinación y el de determinación de predicción.

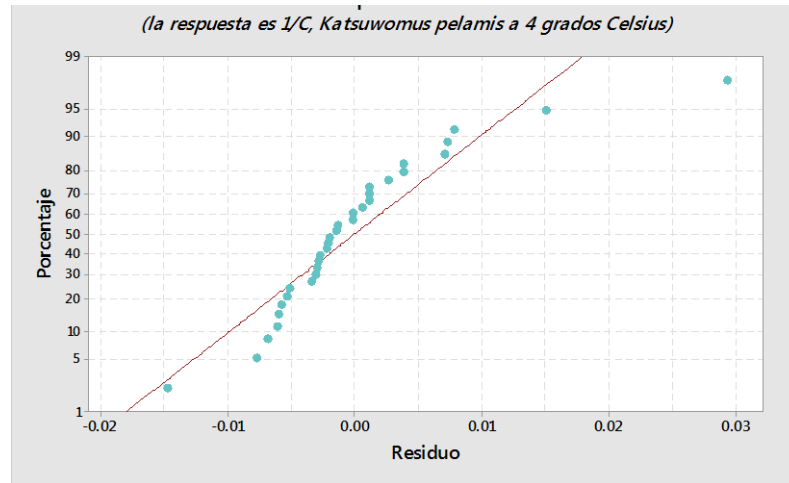
A continuación, se presentarán tablas resumen de la evaluación de los modelos para ambas especie de atún a su determinada condiciones de almacenamiento y posteriormente se indica el modelo matemático seleccionado.

Tabla XVI. **Especie: *Katsuwonus pelamis*, temperatura: 4 grados Celsius**

| Modelo | Criterios | | | | | |
|---------|------------|----------------|---------------------|------------------|--------------|-------|
| | Normalidad | R ² | R ² pred | Homocedasticidad | Aleatoriedad | P |
| Orden 0 | 4 | 0,35 | 0,02 | 0,00 | 4 | 0,005 |
| Orden1 | 3 | 0,59 | 0,38 | 0,00 | 3 | 0,005 |
| Orden 2 | 1 | 0,68 | 0,56 | 0,13 | 1 | 0,005 |
| Orden 3 | 2 | 0,58 | 0,48 | 0,04 | 2 | 0,005 |

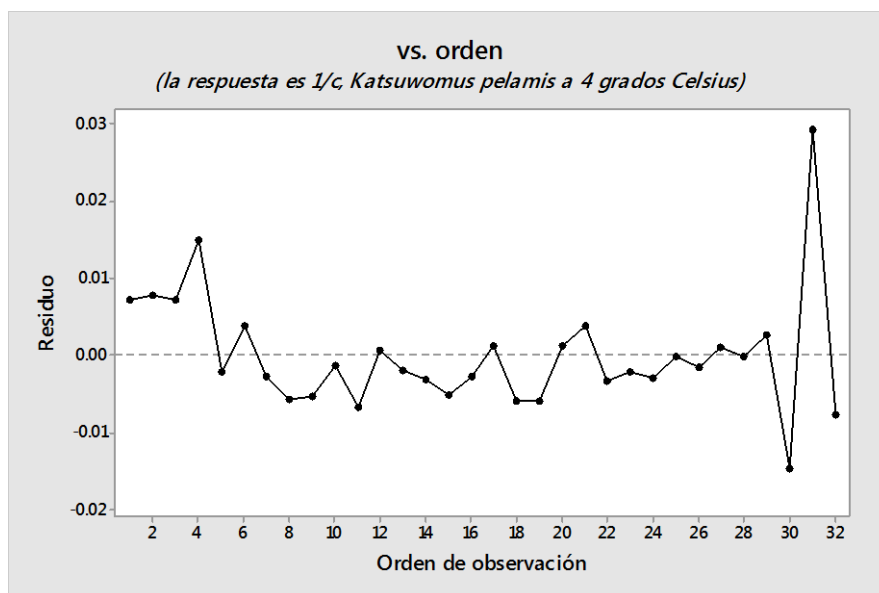
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 17. **Gráfica de probabilidad normal, *Katsuwonus pelamis* a 4 °C**



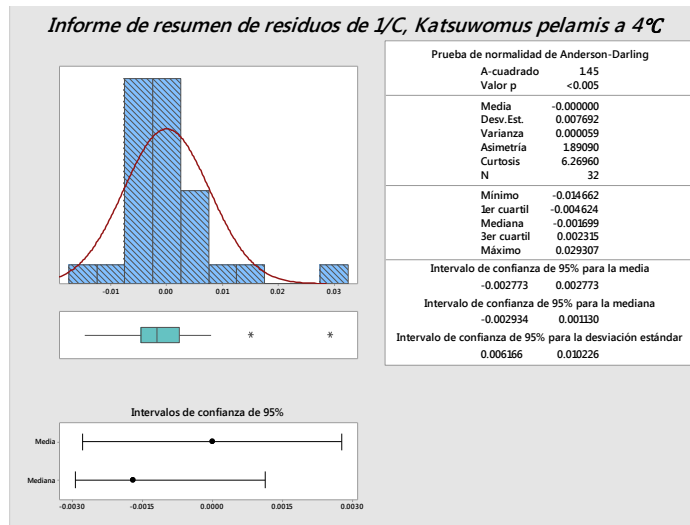
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 18. **Residuos en función de orden de observaciones, *Katsuwonus pelamis* a 4 °C**



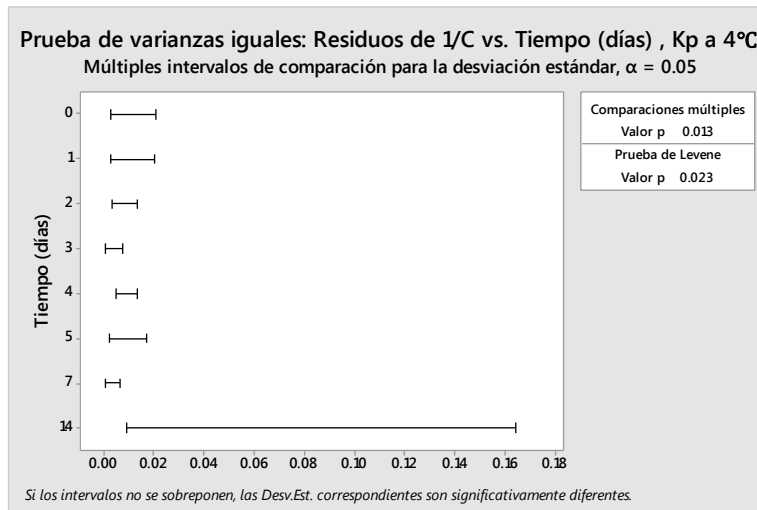
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 19. Informe resumen de residuos función inversa de la concentración de histamina, *Katsuwonus pelamis* a 4 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 20. Prueba de igualdad de varianzas, *Katsuwonus pelamis* a 4 °C



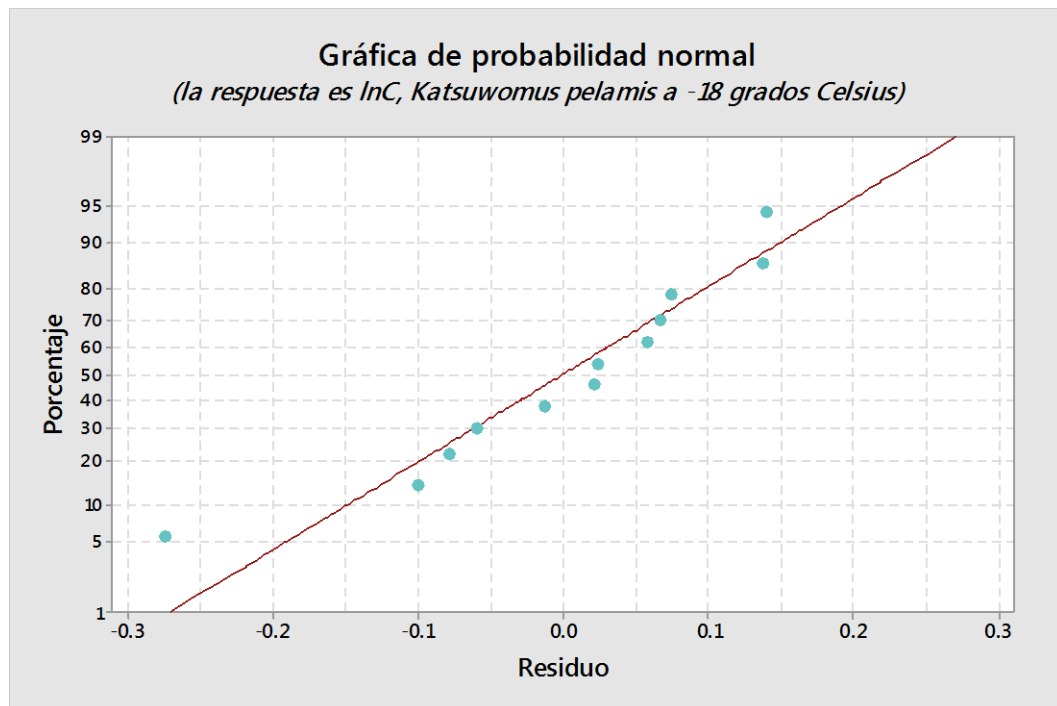
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XVII. Especie: *Katsuwonus pelamis*, temperatura: -18 °C

| Modelo | Criterios | | | | | |
|---------|------------|----------------|---------------------|------------------|--------------|------|
| | Normalidad | R ² | R ² pred | Homocedasticidad | Aleatoriedad | p |
| Orden 0 | 2 | 0.88 | 0.83 | 0.83 | 2 | 0.26 |
| Orden 1 | 1 | 0.86 | 0.77 | 0.35 | 1 | 0.37 |
| Orden 2 | 3 | 0.78 | 0.64 | 0.08 | 3 | 0.02 |
| Orden 3 | 4 | 0.66 | 0.44 | 0.01 | 4 | 0.01 |

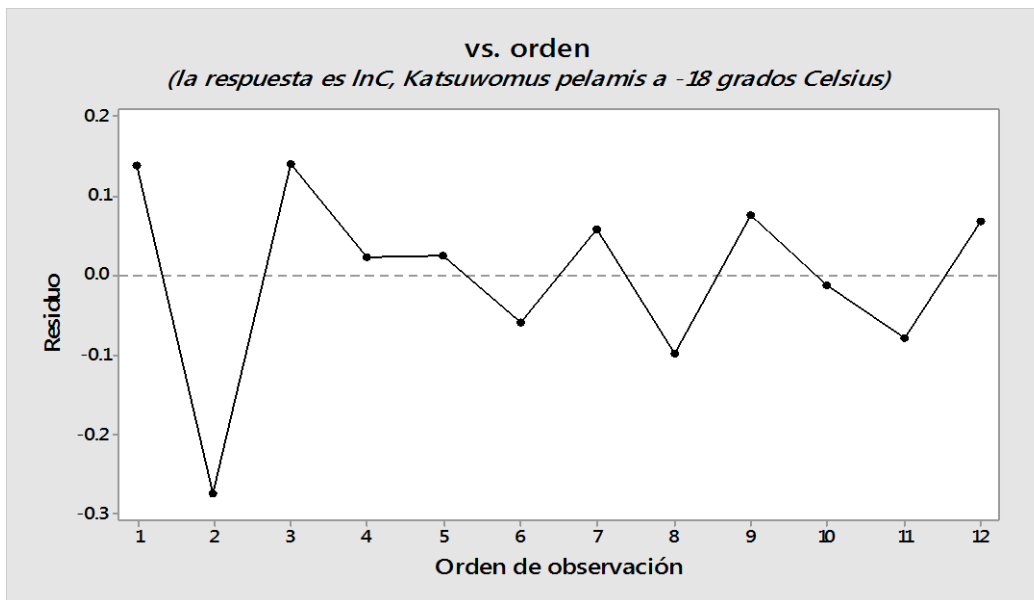
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 21. Gráfica de probabilidad normal, *Katsuwonus pelamis* a -18 °C



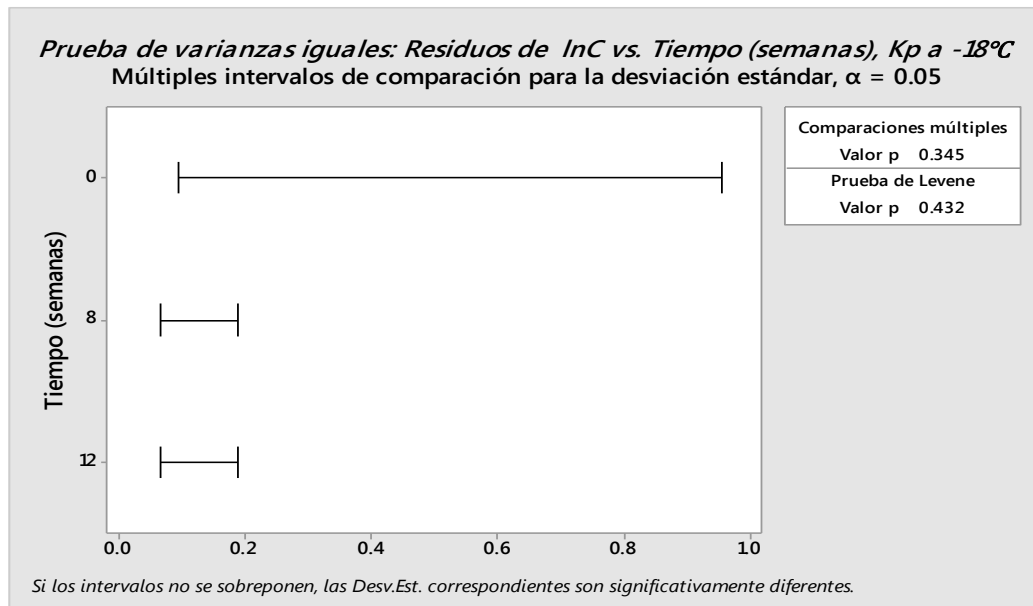
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 22. **Residuos en función de orden de observaciones,**
***Katsuwonus pelamis* a -18 °C**



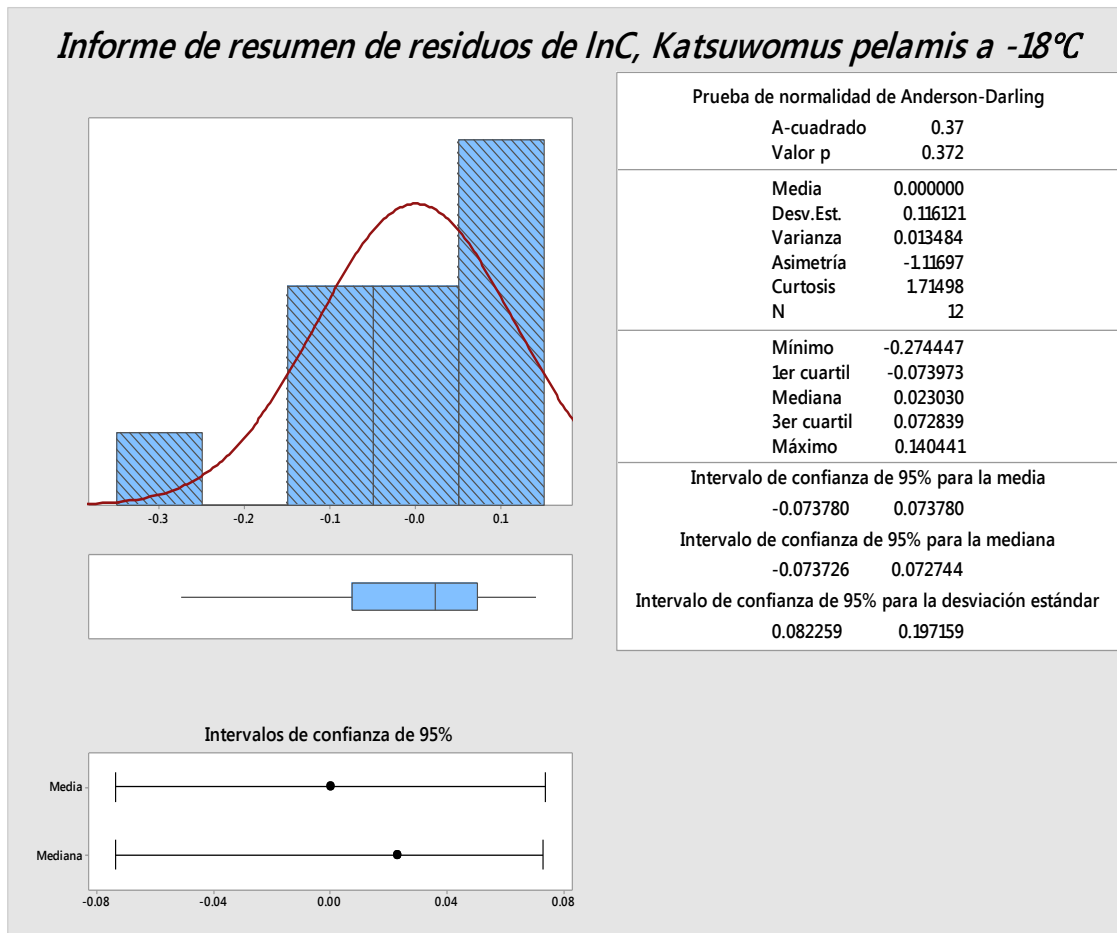
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 23. Prueba de igualdad de varianzas, *Katsuwonus pelamis* a -18 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 24. Informe resumen de residuos función logarítmica de la concentración de histamina, *Katsuwonus pelamis* a -18 °C



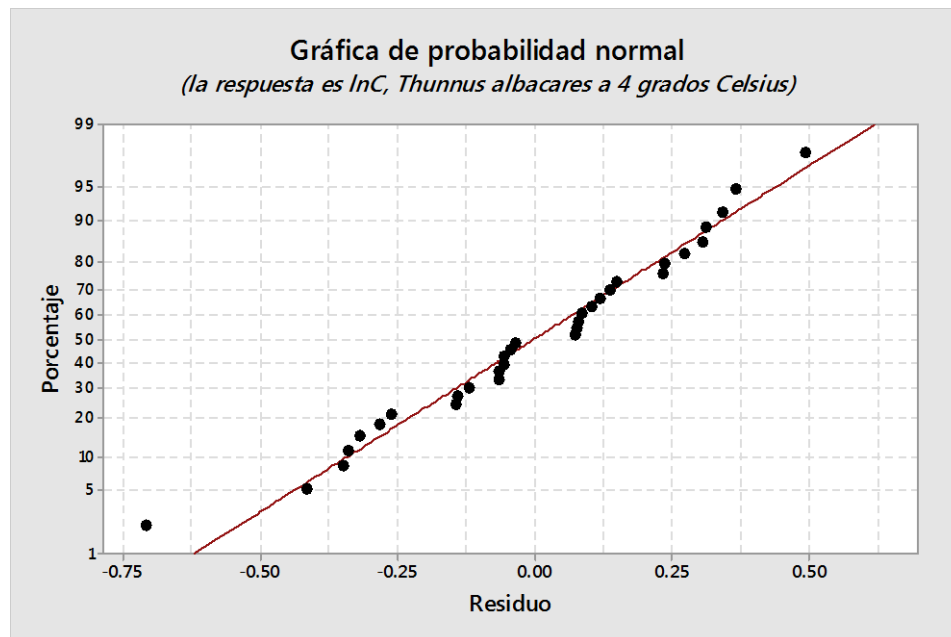
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XVIII. **Especie: *Thunnus albacares*, temperatura: 4 °C**

| Modelo | Criterios | | | | | |
|---------|------------|----------------|---------------------|------------------|--------------|------|
| | Normalidad | R ² | R ² pred | Homocedasticidad | Aleatoriedad | P |
| Orden 0 | 2 | 0,69 | 0,57 | 0,05 | 4 | 0,05 |
| Orden 1 | 1 | 0,83 | 0,78 | 0,14 | 1 | 0,65 |
| Orden 2 | 3 | 0,67 | 0,62 | 0,02 | 2 | 0,01 |
| Orden 3 | 4 | 0,43 | 0,36 | 0,02 | 3 | 0,01 |

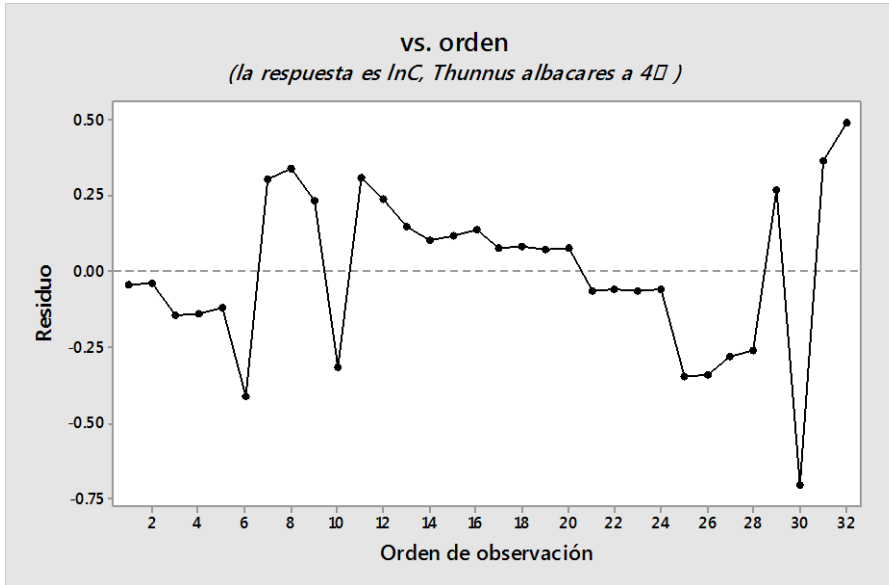
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 25. **Gráfica de probabilidad normal, *Thunnus albacares* a 4 °C**



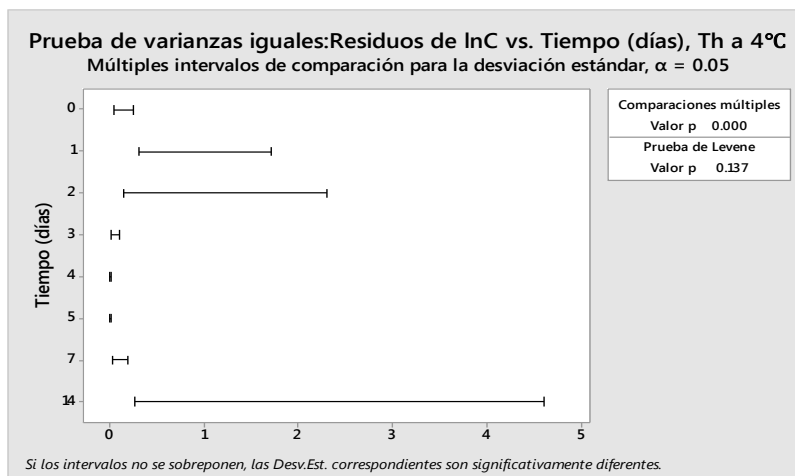
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 26. Residuos en función de orden de observaciones, *Thunnus albacares* a 4 °C



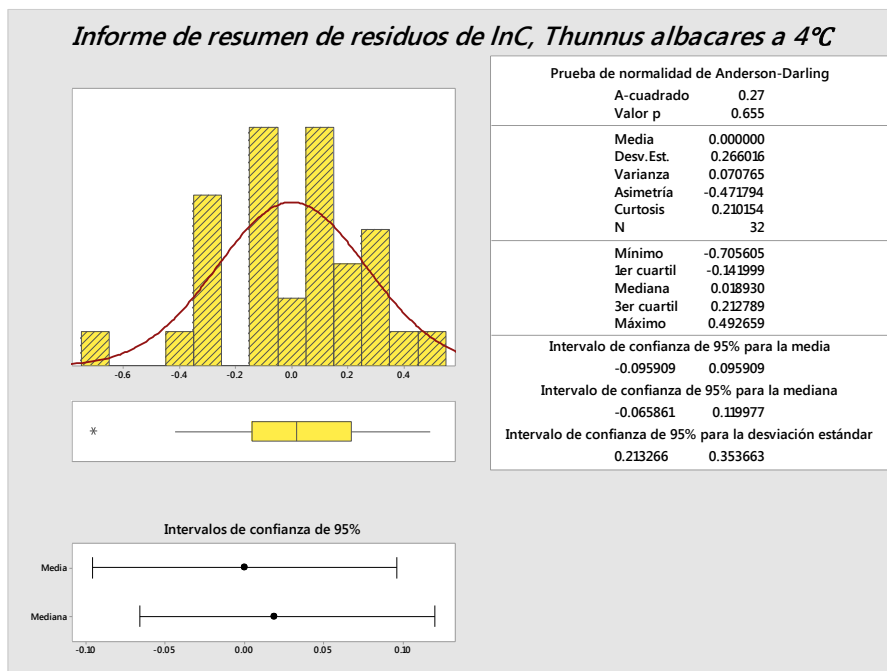
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 27. Prueba de igualdad de varianzas, *Thunnus albacares* a 4 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 28. Informe resumen de residuos función logarítmica de la concentración de histamina, *Thunnus albacares* a 4 °C



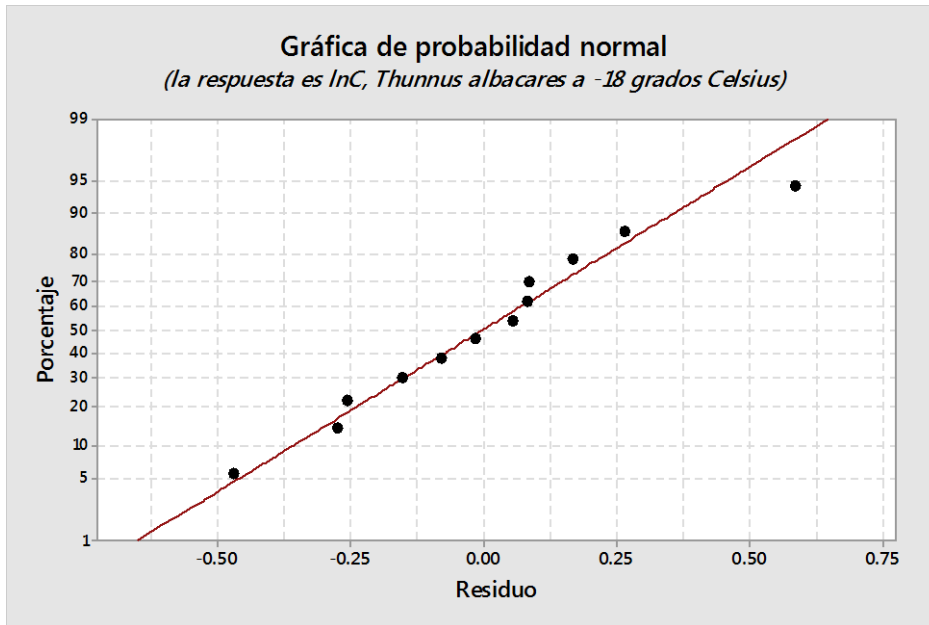
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XIX. Especie: *Thunnus albacares*, temperatura: -18 °C

| Modelo | Criterios | | | | | |
|------------------|------------|----------------|---------------------|------------------|--------------|------|
| | Normalidad | R ² | R ² pred | Homocedasticidad | Aleatoriedad | P |
| Lineal | 4 | 0,68 | 0,61 | 0,16 | 4 | 0,04 |
| Logarítmico | 1 | 0,75 | 0,66 | 0,00 | 1 | 0,89 |
| 1/C | 3 | 0,73 | 0,59 | 0,02 | 3 | 0,68 |
| 1/C ² | 2 | 0,64 | 0,61 | 0,00 | 2 | 0,50 |

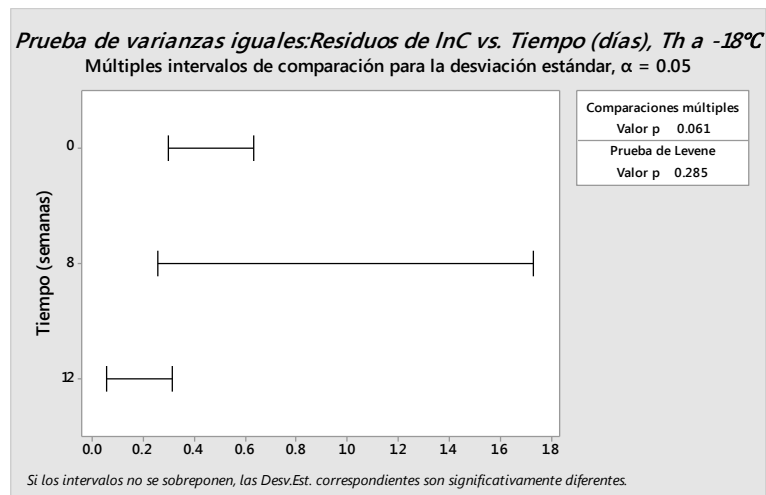
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 29. **Gráfica de probabilidad normal, *Thunnus albacares* a -18 °C**



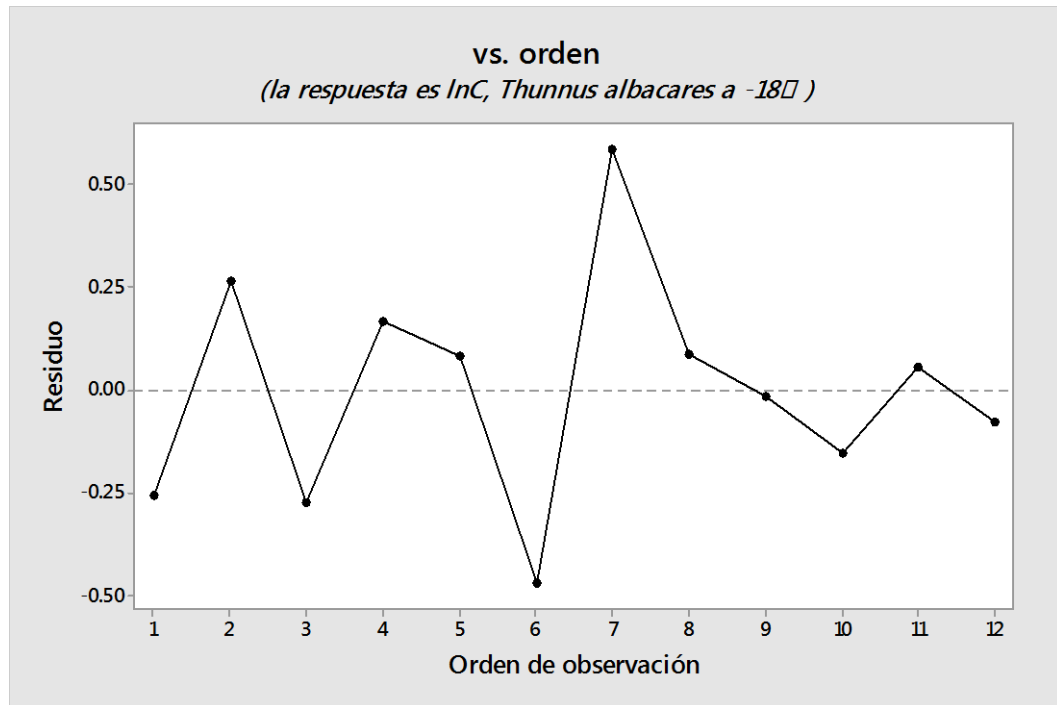
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 30. **Prueba de igualdad de varianzas, *Thunnus albacares* a -18 °C**



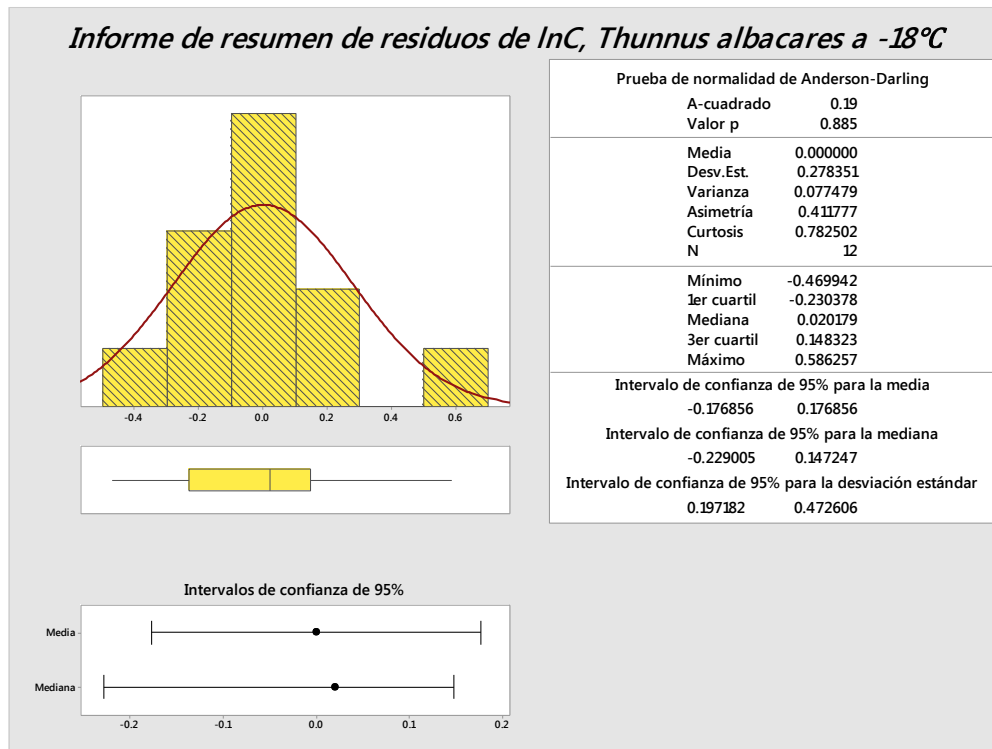
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 31. Residuos en función de orden de observaciones, *Thunnus albacares* a -18 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 32. Informe resumen de residuos función logarítmica de la concentración de histamina, *Thunnus albacares* a -18 °C



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

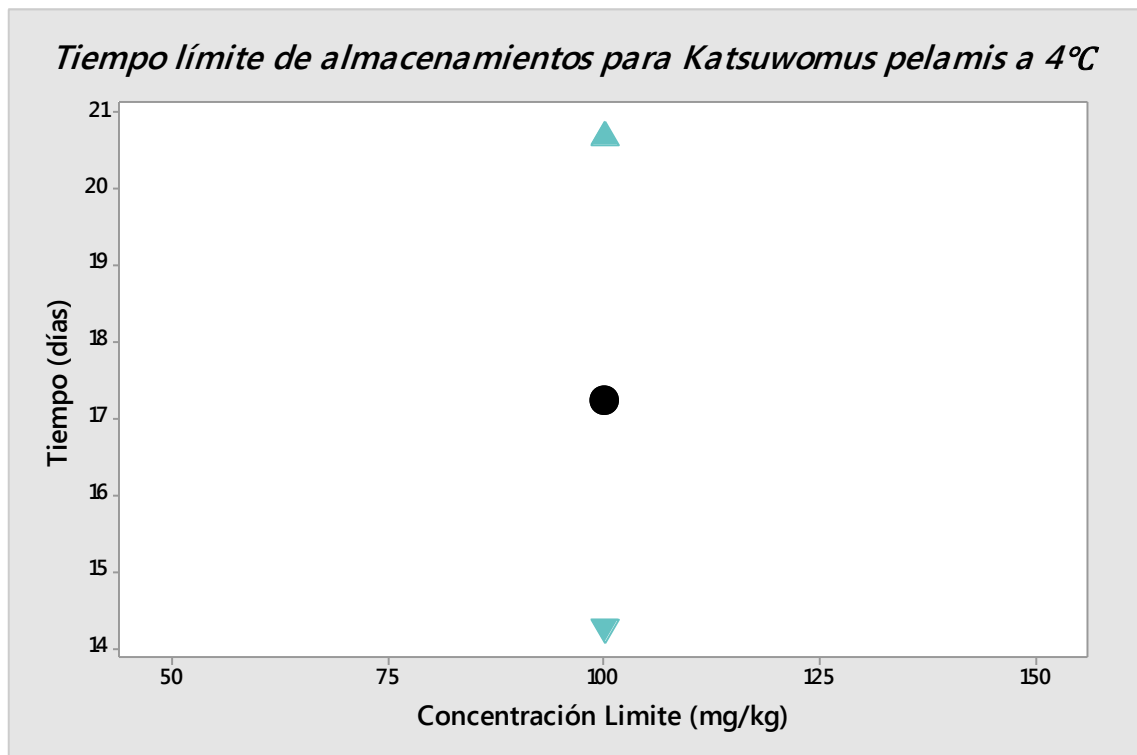
A partir de los modelos seleccionados, se continuó a estimar el tiempo máximo de almacenamientos en el cual se alcanza la concentración máxima permitida de histamina en el lomo del atún.

Tabla XX. ***Katsuwonus pelamis* almacenado a una temperatura de 4 °C**

| | | |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Límite Superior | $\frac{1}{C} = -0,0026t + 0,0637$ | $\frac{dC}{dt} = 0,0026[C]^2$ |
| Media | $\frac{1}{C} = -0,0027t + 0,056$ | $\frac{dC}{dt} = 0,0027[C]^2$ |
| Límite Inferior | $\frac{1}{C} = -0,0027t + 0,0485$ | $\frac{dC}{dt} = 0,0027[C]^2$ |
| Tiempo Límite | [14,25, 20,65] | |

Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 33. **Tiempo límite de almacenamiento para *Katsuwonus pelamis* a 4 °C**



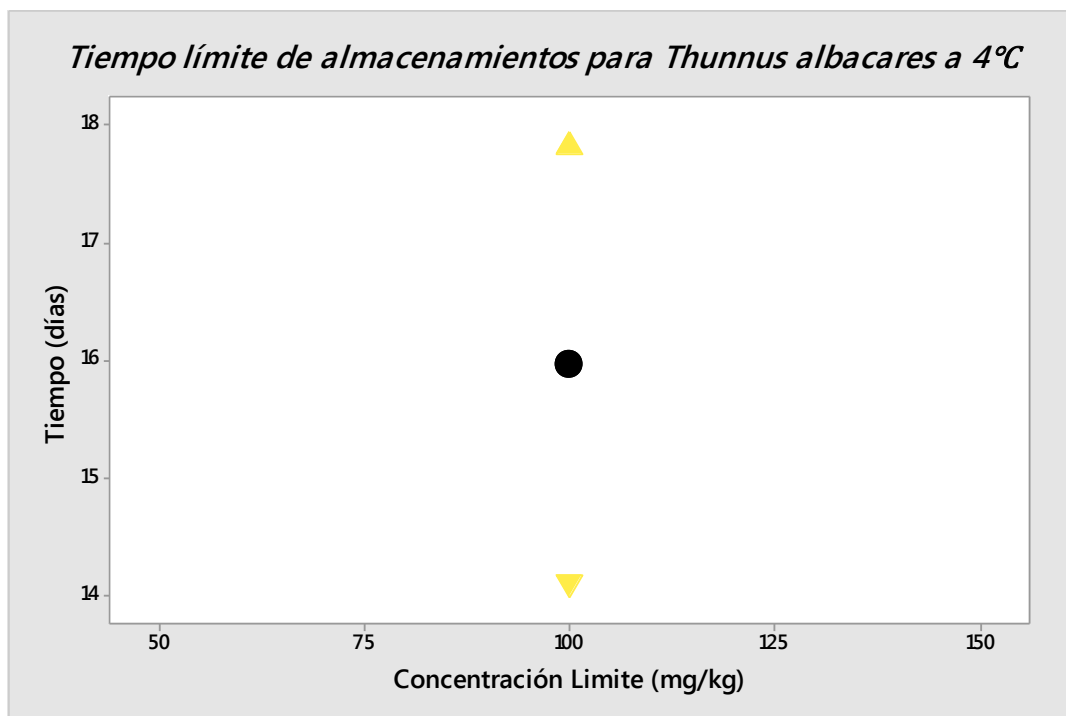
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XXI. ***Thunnus albacares* almacenado a una temperatura de 4 °C**

| | | |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Límite Superior | $\ln C = 0,1414t + 2,6105$ | $\frac{dC}{dt} = 0,1414[C]$ |
| Media | $\ln C = 0,1417t + 2,3435$ | $\frac{dC}{dt} = 0,1417[C]$ |
| Límite Inferior | $\ln C = 0,1418t + 2,0789$ | $\frac{dC}{dt} = 0,1418[C]$ |
| Tiempo Límite | [14,10, 17,81] | |

Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 34. **Tiempo límite de almacenamiento para *Thunnus albacares* a 4 °C**



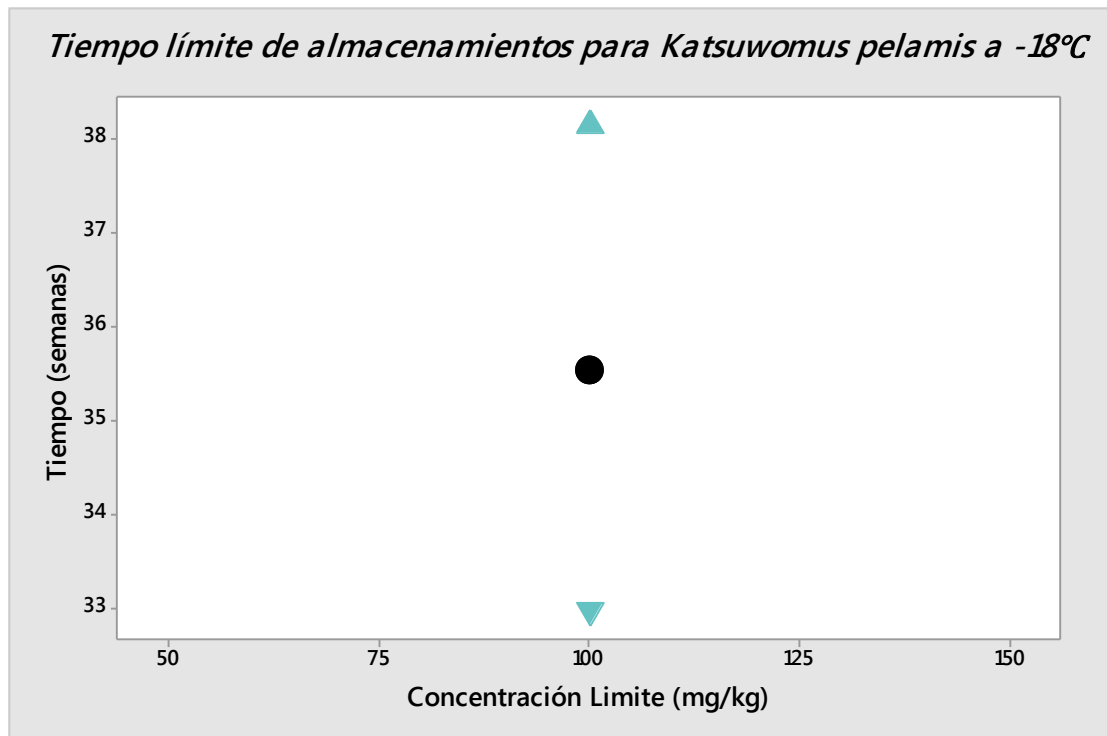
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XXII. ***Katsuwonus pelamis*** almacenado a una temperatura de **-18 °C**

| | | |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Límite Superior | $\ln C = 0.0558t + 2.7658$ | $\frac{dC}{dt} = 0.0558[C]$ |
| Media | $\ln C = 0.0558t + 2.6217$ | $\frac{dC}{dt} = 0.0558[C]$ |
| Límite Inferior | $\ln C = 0.0558t + 2.4776$ | $\frac{dC}{dt} = 0.0558[C]$ |
| Tiempo Límite | [32.96,38.12] | |

Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18

Figura 35. **Tiempo límite de almacenamiento para *Katsuwonus pelamis* a -18 °C**



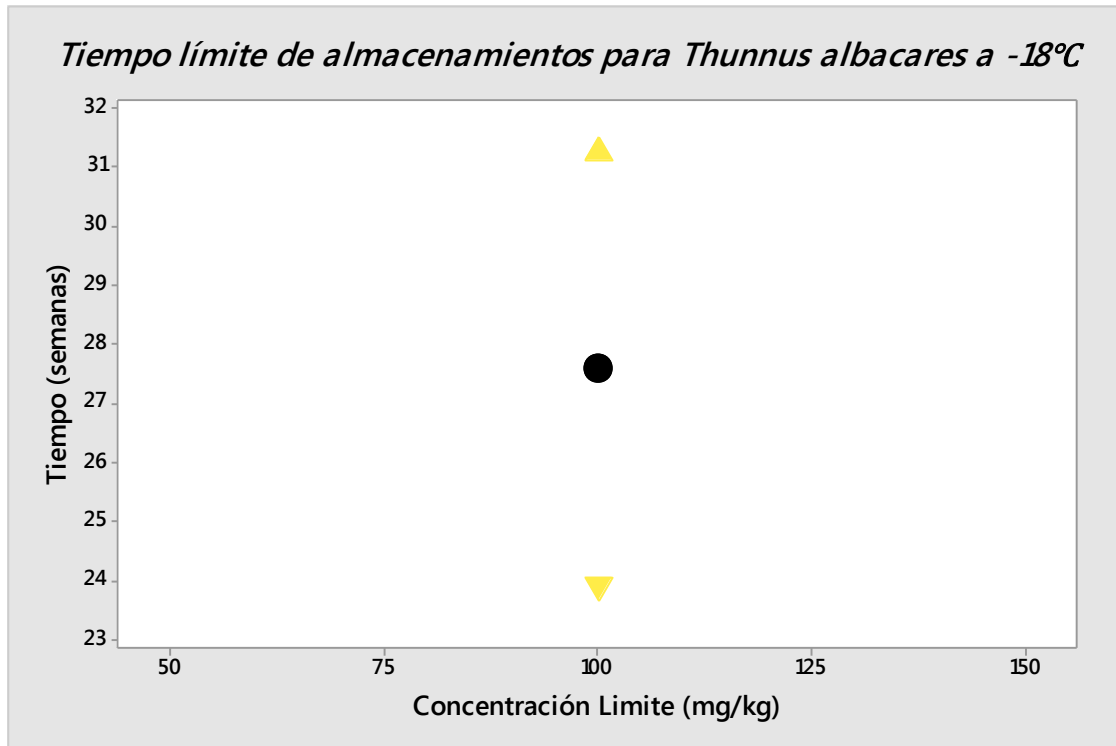
Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Tabla XXIII. ***Thunnus albacares* almacenado a una temperatura de -18 °C**

| | | |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Límite Superior | $\ln C = 0.0933t + 2.3737$ | $\frac{dC}{dt} = 0.0933[C]$ |
| Media | $\ln C = 0.0933t + 2.0319$ | $\frac{dC}{dt} = 0.0933[C]$ |
| Límite Inferior | $\ln C = 0.0933t + 1.6907$ | $\frac{dC}{dt} = 0.0933[C]$ |
| Tiempo Límite | [23.91,31.23] | |

Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

Figura 36. **Tiempo límite de almacenamiento para *Thunnus albacares* a -18 °C**



Fuente: elaboración propia, empleando MiniTab 18.

5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Con el propósito de estimar el tiempo de almacenamiento adecuado para dos especies de atún, *Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares*, a dos diferentes temperatura de almacenamiento, 4 y -18 grados Celsius. Para evitar que sobre los 100 mg/kg pasen la concentración de histamina, los cuales pueden ocasionar una intoxicación severa al consumidor o ser rechazado un lote de producción que lo contenga.

5.1. Caracterización de la producción de histamina a 4 y -18 grados Celsius para ambas especies

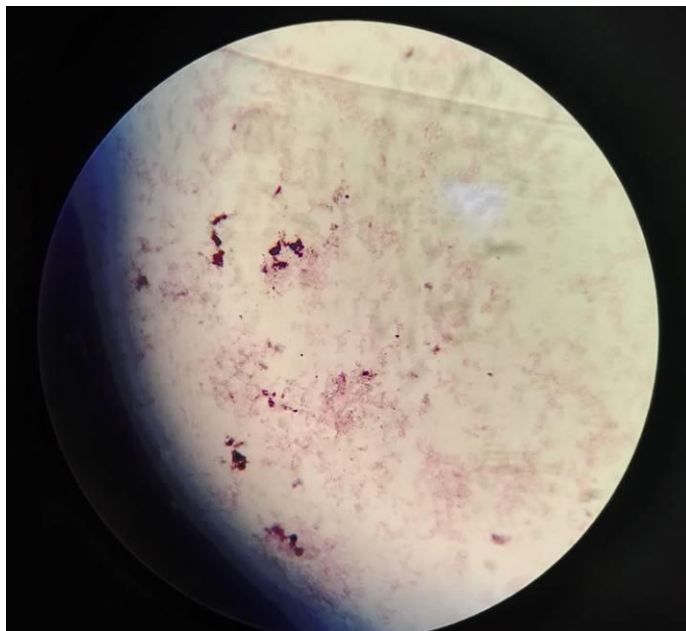
En la tabla IX y X se muestran que las concentraciones iniciales de histamina de las muestras analizadas son 15,33 y 9,53 mg/kg para *Katsuwonus pelamis* y *Thunnus albacares* respectivamente. Lo anterior indica que los atunes pertenecientes al atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) posiblemente fueron capturados recientemente, ya que se concentración inicial es menor a 10 mg/kg, a comparación de la otra especie, pero para ambas sus concentraciones son menores a 20 mg/kg de histamina por lo que se puede afirmar que su almacenamiento se realizó bajo las condiciones y manipulación adecuada.

En las figuras 8, 9 y 10 se puede observar que la concentración inicial de histamina en el lomo de ambas especie cambia significativamente debido a posibles factores ajenos a su manipulación y variables de control de la investigación, como la edad del atún, tamaño, fecha de captura, tiempo de almacenaje posterior a su captura y si portaba algún tipo de enfermedad, ya que a mayor tamaño, mayor será la superficie con tejidos que contienen el

reactivo histidina y las bacterias fisiológicas típicas para llevarse a cabo la reacción de descarboxilación, lo que aumenta la probabilidad de alcanzar el nivel máximo permitido de histamina en un menor tiempo y causar una intoxicación a cualquier ser humano que lo consuma.

A pesar que la presencia de histamina inicial es mayor en las muestras del *Katsuwonus pelamis* con respecto al *Thunnus albacares*, este mostró cambios menores en su concentración a lo largo del tiempo de análisis, pudiendo ser diferente el género de Enterobacterias presentes en el organismo de cada animal. Es decir, hay una variación en la descomposición de histidina a histamina y dependiendo del género o tipo de bacteria Gram negativa será su comportamiento cinético con el cual se lleva a cabo la reacción y el tiempo de realizar dicho proceso.

Figura 37. **Imagen bacterias Gram negativas**



Fuente: elaboración propia.

El argumento anterior posiblemente sea el propósito que provocara que el género o tipo de Enterobacterias contenidas en la especie *Thunnus albacares* causaran que el tiempo de almacenaje promedio a una temperatura de 4 grados Celsius sea menor a comparación de la especie *Katsuwonus pelamis*. En la figura 34 se observa que al día aproximadamente 16 se alcanza el límite permisible de 100 mg/kg, ya que aparentemente realizan con mayor velocidad la producción de histamina

A pesar que ha sido establecido por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) que a -18 grados Celsius la actividad bacteriana se detiene significativamente, se obtuvieron cambios en la concentración de histamina en el lomo de ambas especies (figuras 9 y 10). Esto se debe muy probablemente a que no es posible detener la descomposición después de la muerte de un organismo.

A la temperatura de -18 grados Celsius se observa el mismo comportamiento descrito para 4 grados, por lo tanto, a partir de modelo matemático de mayor ajuste se infiere que la especie *Thunnus albacares* alcanza la concentración permitida en menor tiempo con una diferencia aproximada de 8 semanas. Lo anterior sugiere que dicha especie es propensa a producir mayores niveles de la amina biogénica en menor tiempo, independientemente de sus condiciones de almacenamiento a comparación del atún bonito (*Katsuwonus pelamis*).

5.2. Caracterización del efecto de la temperatura en la producción de histamina en el lomo de una misma especie

Con el fin de determinar el efecto de las variables temperatura, tiempo y especie se realizó un análisis de varianza con ajuste a un modelo lineal

utilizando un valor de significancia del 95 %. En la tabla XIV se presentan los resultados de dicho análisis, tomando como parámetro determinante el valor p. Para el modelo lineal, la temperatura es la variable que tiene mayor efecto en la producción de histamina, posteriormente el tiempo y la especie no tienen efecto alguno siendo su valor p mayor a 0,05.

Debido que el modelo lineal utilizado presenta cierta inexactitud, se procedió a realizar un ajuste utilizando el logaritmo o inverso de la concentración de histamina. En la tabla XV se presenta los resultados del segundo análisis de varianza realizado, obteniendo que la especie es la variable con mayor efecto. El resultado anterior se debe a que cada especie de atún contiene su propio género o tipo de bacterias y debido a que ellas son el medio de la realización de la reacción química tenga un impacto mayor que las variables tiempo y temperatura.

Por otra parte, para ambas especies estudiadas se comprueba que el tiempo de conservación del atún crudo se aumenta aproximadamente 14 veces más conservándolo a -18 grados Celsius en un congelador, en comparación en un refrigerador convencional que generalmente se encuentra a aproximadamente a 4 grados Celsius.

Lo anterior evidencia en los modelos obtenidos para caracterizar dicho comportamiento. Para la especie *Thunnus albacares* se infiere que los modelos cinéticos respectivos a las temperaturas de análisis son de primer grado, variando entre ellos la constante de equilibrio cinética, que al final reflejan un alargamiento del tiempo de conservación.

Por otro lado, para la especie *Katsuwonus pelamis* los modelos cinéticos son distintos para ambas temperaturas, siendo el de cuatro grados Celsius de

segundo orden y el otro de primer orden, lo cual puede ser consecuencia del efecto de la temperatura en la actividad bacteriana acelerando su desplazamiento hacia el lomo del atún. Esto posiblemente provoca que las partículas del reactivo histidina colisionen con mayor frecuencia entre ellas y reaccionen en menor tiempo a comparación de lo descrito con el modelo de primero orden.

CONCLUSIONES

1. La producción de concentración de histamina en el lomo del atún *Katsuwonus pelamis* presenta una tendencia inversa y logarítmica respecto al tiempo de almacenamiento para una temperatura aproximada de 4 y -18 grados Celsius respectivamente.
2. La producción de histamina en el lomo del atún *Thunnus albacares* presenta una tendencia logarítmica respecto al tiempo de almacenamiento para ambas temperaturas de 4 y -18 grados Celsius.
3. La reducción de temperatura de almacenamiento de 4 a -18 °C tiene un efecto significativo, disminuyendo la producción de histamina en lomo del atún *Katsuwonus pelamis* hasta 14 veces.
4. La reducción de temperatura de almacenamiento de 4 a -18 °C tiene un efecto significativo, disminuyen la producción de histamina en lomo del atún *Thunnus albacares* hasta 12 veces.
5. El tiempo estimado de almacenamiento adecuado de los atunes pertenecientes a la especie *Katsuwonus pelamis* a una temperatura de 4 °C es de 17 días.
6. El tiempo estimado de almacenamiento adecuado de los atunes de especie *Katsuwonus pelamis* a una temperatura de -18 °C es de 35 semanas.

7. El tiempo estimado de almacenamiento adecuado de los atunes pertenecientes a la especie *Thunnus albacares* a una temperatura de 4 °C es de 17. días.

8. El tiempo estimado de almacenamiento adecuado de los atunes de especie *Thunnus albacares* a una temperatura de -18 °C es de 27 semanas.

RECOMENDACIONES

1. Realizar los análisis microbiológicos necesarios con el fin de identificar los tipos de bacterias Gram negativas presentes en las especies estudiadas y reconocer cuales realizan con mayor facilidad la reacción de descarboxilación del amino ácido histidina.
2. Se recomienda mantener siempre la cadena de frío y evitar los cambios bruscos de temperaturas, así mismo, cuidar de la manipulación de las muestras al ser analizadas, ya que esto puede incrementar la descomposición acelerada de la carne y obtener datos erróneos.
3. Para mayor exactitud y precisión en la estimación del modelo matemático y tiempos adecuados de almacenamiento realizar la cuantificación de los niveles de histamina utilizando métodos cromatográficos validados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuerdo Ministerial no. 0271-2010. *Programa nacional de monitoreo para la detección de histamina en carne de atunes y dorado en establecimientos*. Guatemala: Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación, 2007. 4 p.
2. ALTIERI, I.; SEMERARO, A.; SCALISE, F.; CALDERARI, I. *European official control of food: determination of histamine in food products by a HPLC—UV-DAD method*. Italia: Food Chemistry, 2016. 699 p.
3. FABIÁN, César. *Determinación de los niveles de la biotoxina histamina en la carne de pescado dorado (Coryphanea hippurus) de venta en tres mercados municipales de la Ciudad de Guatemala*. Trabajo de graduación de Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2014. 58 p.
4. FLORES, Harold. *Determinación de los niveles de histamina presentes en muestras de lomo de atún de peces (familia Escombridae) provenientes de la industria atunera guatemalteca*. Trabajo de graduación de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2009. 89 p.
5. FOGLER, Scott. *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. 4a ed. México: Pearson Educación, 2008. 1120 p.

6. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products*. Italia: FAO headquarters, 2013. 138 p.
7. FREEMAN, B.A. *Microbiología de Burrows*. 22a ed. USA: Interamericana McGraw-Hill, 1988. 1181 p.
8. GALLEGUILLLOS, Mónica. *Aminas Biogénicas – Nuevos Indicadores Químicos utilizados como criterios de calidad en la harina de pescado control de calidad de insumos y dietas acuícolas*. México: FAO- No. 16, 1994. 269 p.
9. HELFMAN, Gene; COLLETTE, Bruce; FACEY, Douglas; BOWEN, Brian. *The diversity of fishes*. Massachusetts, Estados Unidos: Blackwell Science, 1997. 737 p.
10. HUNGERFORD, James. *Scombroid poisoning: a review*. Estados Unidos: Journal of the International Society of Toxinology LVI, 2010. 243 p.
11. HUSS, Hans. *Evaluación de la calidad del pescado*. Dinamarca: FAO documento Técnico de pesca, 1999. 348 p.
12. IZQUIERDO, Pedro; SANDREA, Lisette; ALLARA, María; GONZÁLEZ, Peggy; GARCÍA, Aiza; VALECILLOS, Yalitza. *Evaluación bacteriológica y contenido de histamina en pescado desmenuzado precocido en Venezuela*. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia, 2004. 473 p.

13. KIM, Min-Ki; MAH, Jae-Hyung y HWANG, Han Joon. *Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish*. Corea del Sur: Food Chemistry, 2009. 95 p.
14. KNIZE-MG, Felton. *Chromatographic methods for the analysis of the heterocyclic amine food mutagens/carcinogens*. [en línea]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1494008>>. [Consulta: 3 de mayo de 2019].
15. LÁZARO, César; CONTE, Carlos. *Métodos cromatográficos para determinar aminos biogénicos en alimentos de origen animal*. Brazil: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2003. 446 p.
16. N, Sayem-el-Daher; RE, Simard; L, L'Heureux; AG. Roberge. *Determination of mono-, di- and polyamines and foods using a single column amino acid autoanalyzer*. [en línea]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833418>>. [Consulta: 3 de mayo de 2019].
17. RAWLES, Dafne; FLICK, George. *Biogenic amines in fish and shellfish*. Estados Unidos. Advances in Food and Nutrition Research, 1996. 265 p.
18. ROSITO, María. *Diseño y validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de histamina en carne de pescado*. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, 2017. 42 p.

19. SKOOG, Douglas; WEST, Donald; HOLLER, James. *Fundamentos de Química Analítica*. España: Reverté, 2005. 833 p.
20. STANDNICK, Joanna; DOLATOWSKI, Zbigniew. *Biogenic amines in meat and fermented meat products*. Polonia: Food Science and Human Nutrition, 2010. 263 p.
21. TAYLOR, Steve. *Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects*. [en línea]. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3530640>>. [Consulta: 3 de mayo de 2019].

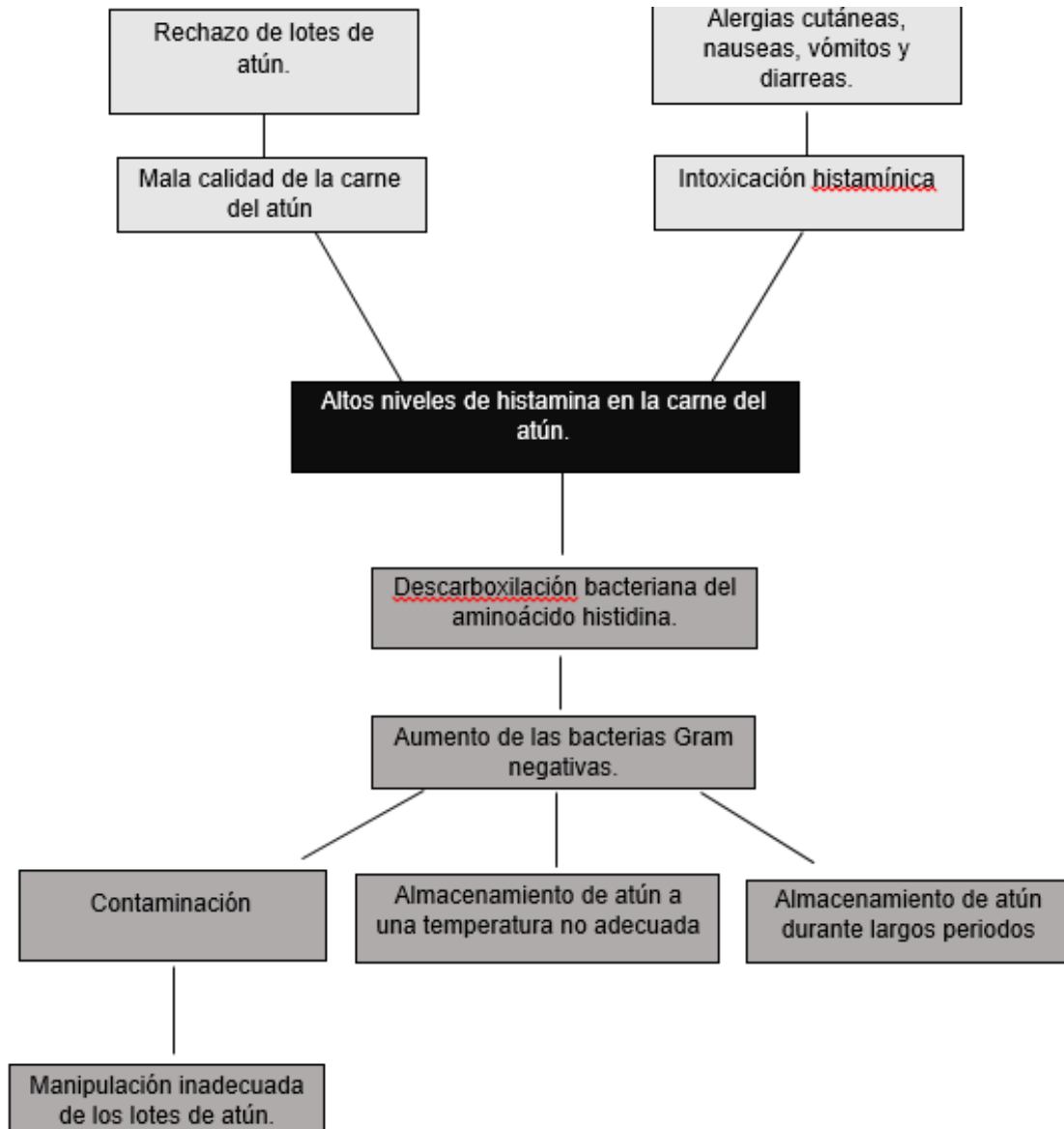
APÉNDICES

Apéndice 1. Requisitos académicos

| 1er paso | 2do paso | 3er paso | 4to paso | 5to paso | 6to paso |
|--------------------|---------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|---|
| Carrera | Área | Tema genérico | Tema específico | Especificación | Problema a resolver |
| Ingeniería química | Fisicoquímica | Laboratorio de fisicoquímica 2 | Espectrofotometría | Absorción | Modelización del comportamiento cinético de la producción de histamina en el lomo de dos especies de atún (<i>katsuwonus pelamis</i> y <i>thunnus albacares</i>) por medio de la prueba específica de elisa y análisis multivariado |
| | Área complementaria | Estadística i | VARIABLES aleatorias discretas unidimensionales | Distribución normal | |
| | Fisicoquímica | Cinética de procesos químicos | Ley de velocidad de reacciones y estequiometría | Modelos de velocidad de reacción | |
| | Fisicoquímica | Fisicoquímica ii | Cinética química | Análisis de resultados cinéticos | |

Fuente: elaboración propia.

Apéndice 2. Árbol de problemas



Fuente: elaboración propia.