



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales

"DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ENSAYO
POR HPLC CON DETECCIÓN UV PARA LA DETERMINACIÓN DE
HISTAMINA EN PRODUCTOS DERIVADOS DE LA PESCA"

Proyecto de Graduación previo a la obtención del Título de:

**MAGISTER EN MANEJO INTEGRAL DE LABORATORIO DE
DESARROLLO**

Presentado por:

Neidys Sánchez Hernández

Director:

M.Sc. Augusta Jiménez Sánchez

Guayaquil - Ecuador

2016

Agradecimientos

El primer agradecimiento es especialmente para mi tutora, Augusta Jiménez, por su dedicación y ayuda en los temas de este trabajo. A la Ph.D. Olga González por nunca rendirse con nosotros.

A mis compañeros en este proyecto de estudio que me apoyaron y acompañaron durante todo el trayecto. A todos los profesores que brindaron sus conocimientos en áreas de nuestra formación. A la Ing. Fernanda Hurtado por su ayuda en todas las etapas de esta maestría.

Un agradecimiento especial a mis hijos, mi esposo y mis padres que además de apoyarme en todo, me brindaron todo su amor y tuvieron la paciencia eterna de soportar mis noches de desvelo.

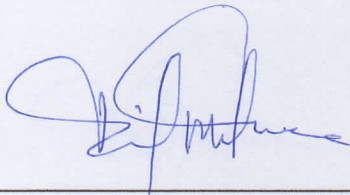
A todos los que no declaré implícitamente pero que también contribuyeron de una forma u otra en este período profesional.

Muchas gracias.


Dedicatoria

A mis hijos Cami y Ale,
sepan que el logro más importante es el que se
alcanza con su propio esfuerzo.

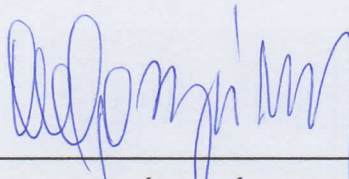
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



DAVID MATAMOROS CAMPOSANO Ph.D
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



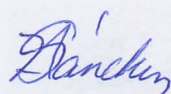
Mg. AUGUSTA JIMÉNEZ SÁNCHEZ
DIRECTOR DEL PROYECTO



OLGA GONZÁLEZ SÁNCHEZ Ph.D
VOCAL DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Graduación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo, corresponde exclusivamente a la **Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales** de la Escuela Superior Politécnica del Litoral.



Neidys Sánchez Hernández

Resumen

Con el objetivo de cuantificar el contenido de histamina en productos derivados de la pesca, se desarrolló una metodología para la determinación de este analito usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detector UV. Durante el proceso de implementación de este método, se llevaron a cabo tres etapas importantes donde se evaluaron varios parámetros para optimizar el procedimiento y desarrollar el proceso de validación.

La primera etapa consistió en la extracción de la histamina, donde se analizó el uso de tres reactivos como extrayentes: Metanol al 75%, ácido perclórico y ácido tricloro acético, sin embargo el segundo quedó descartado desde el inicio por los riesgos que involucra su manejo y desecho final.

La segunda etapa, describe el proceso de derivatización: este fue realizado para desarrollar las propiedades cromogénicas de la histamina, ya que esta no absorbe en el rango ultravioleta de forma natural. Durante este proceso fueron evaluados parámetros como tiempo de reacción, temperatura y concentración del agente derivatizante.

Por último, se eligieron las condiciones óptimas de separación y cuantificación en el sistema cromatográfico, evaluando la composición y velocidad de la fase móvil y las características del absorbente o columna.

Como resultado se obtuvo un método robusto comprobado a través de la evaluación de 5 parámetros considerados críticos: cantidad de muestra, tiempo de mezclado durante la extracción, tiempo de calentamiento durante el proceso de derivatización, estabilidad del analito luego de su reacción y el flujo de la fase móvil. Obteniéndose resultados similares en cada caso. Se

demostró además la linealidad del método en el rango de trabajo seleccionado de 1 a 200 ppm y se establecieron los límites máximos para la repetibilidad y reproducibilidad.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	II
Dedicatoria	III
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN.....	IV
DECLARACIÓN EXPRESA	V
Resumen	VI
ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	XVI
CAPÍTULO 1.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Aminas Biogénicas	1
1.2 Histamina y su relación en los productos derivados de la pesca.....	2
1.3 Agentes de Regulación y Control.....	5
1.4 Importancia del pescado para Ecuador	6
1.4 Métodos de Ensayo.....	10
1.5 Validación de métodos analíticos.....	14
CAPÍTULO 2:.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Materiales.....	23
2.1.1 Equipos.....	23
2.1.2 Materiales.....	24

2.1.3 Reactivos.....	25
2.2 Métodos.....	25
2.2.1 Preparación de soluciones.....	25
CAPÍTULO 3.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1 Proceso de extracción.....	37
3.2 Proceso de derivatización	39
3.3 Análisis Cromatográfico.....	40
3.4 Validación del método	43
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo

Agm: Agmatina

AOAC: Asociación de la comunidad Analítica

Bnz-Cl: Cloruro de benzalconio

Cad: Cadaverina

CNBF: 4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro

Dbs-Cl: Cloruro de Dabsilo

Dns-Cl: Cloruro de Dansilo

ELSD: Detector evaporativo light scattering

ESI: Ionización por electrospray

ex/em: referentes a la energía de excitación y emisión en fluorescencia

FDA: Organización para la administración de alimentos y medicamentos

FL: Fluorescencia

FMOC: Fluorometil-oxicarbono

HClO₄: Ácido perclórico

His: Histidina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IUPAC: Asociación Internacional de Química Pura y Aplicada

LC-MS: Cromatografía líquida con detector de masas

MSA: Ácido Metasulfónico

OPT: orto-ftaldialdehído

Phm: Feniletilamina

Put: Putrescina

SPE: Extracción en fase sólida

SFP: Extracción con fluidos supercríticos

Spd: Espermidina

Spm: Espermina

SSA: Ácido Sulfosalisílico

TCA: Ácido Tricloro acético

TLC: Cromatografía en placa fina

Trp: Triptofano

Tyr: Tirosina

UE: Unión Europea

UV: Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Estructura de la Histamina</i>	3
<i>Figura 2: Reacción enzimática de formación de la histamina</i>	3
<i>Figura 3: Cromatograma obtenido con la columna Lichrospher</i>	42
<i>Figura 4: Cromatograma obtenido con la columna Purospher</i>	42
<i>Figura 5: Detalle de fórmulas matemáticas para la evaluación estadística de la linealidad</i>	45
<i>Figura 6: Cromatogramas superpuestos de las 5 inyecciones correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración</i>	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Gráfico 1: Valores en Toneladas Métricas de las exportaciones del pescado fresco, congelado y en conserva.....</i>	<i>8</i>
<i>Gráfico 2: Valores en Toneladas Métricas de las exportaciones del camarón.....</i>	<i>9</i>
<i>Gráfico 3: Curva de calibración promedio con los límites máximos y mínimos de alerta</i>	<i>45</i>
<i>Gráfico 4: Valores de varianza de Horwitz para cada nivel de ensayo.....</i>	<i>48</i>
<i>Gráfico 5: Representación de la relación de HorRat dentro del rango de aceptación según los criterios de validación.....</i>	<i>49</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Brotes de escombroidosis reportados internacionalmente: Fuente, Localización geográfica, Período y casos involucrados</i>	4
<i>Tabla 2: Valores de exportación desde el año 2000 hasta Julio de 2015 para PESCADO FRESCO, CONGELADO Y CONSERVA. BALANZA COMERCIAL (Valores expresados en Toneladas Métricas) (MAGAP)</i>	8
<i>Tabla 3: Valores de exportación desde el año 2000 hasta Julio de 2015 para CAMARON (Valores expresados en Toneladas Métricas) (MAGAP)</i>	9
<i>Tabla 4: Resumen de métodos consultados</i>	13
<i>Tabla 5: Resumen de actividades para llevar a cabo el proceso de Precisión</i>	18
<i>Tabla 6: Esquema clásico de Placket y Burman</i>	21
<i>Tabla 7: Relación de reactivos según su calidad y procedencia</i>	25
<i>Tabla 8: Relación de cambios estudiados en la Robustez</i>	34
<i>Tabla 9: Resumen de la forma de evaluación de la validación</i>	35
<i>Tabla 10: Estudio de Recuperación. Valor esperado: 34.81 ppm ± 3.12 ppm</i>	39
<i>Tabla 11: Resumen de valores estadísticos obtenidos de cada curva</i>	44
<i>Tabla 12: Precisión en términos de reproducibilidad y repetibilidad</i>	47
<i>Tabla 13: Resumen del estudio de Precisión</i>	49
<i>Tabla 14: Estudio de recuperación, resultados para el primer nivel</i>	51
<i>Tabla 15: Estudio de recuperación, resultados para el segundo nivel</i>	51
<i>Tabla 16: Estudio de recuperación, resultados para el tercer nivel</i>	52
<i>Tabla 17: Estudio de recuperación, resultados para el cuarto nivel</i>	52
<i>Tabla 18: Estudio de recuperación, resultados para el material de referencia certificado</i>	53
<i>Tabla 19: Resultados de la evaluación estadística de significancia</i>	53
<i>Tabla 20: Diseño experimental de Robustez</i>	54
<i>Tabla 21: Resultados del ensayo de Robustez</i>	55

Tabla 22: Comparación estadística del ensayo de robustez56

INTRODUCCIÓN.

Ecuador es considerado uno de los países con mayores riquezas naturales debido a su ubicación geográfica y la variedad de climas. Además está favorecido por su salida al mar y la temperatura de sus aguas. Estas ventajas le ha permitido a Ecuador la apertura de un mercado internacional, el cual va dirigido con mayor frecuencia a Europa, estimándose un aporte del 26.5% del total de exportaciones en el período acumulado desde el 2008 al 2013 (Ministerio de Comercio exterior, 2014).

Sin considerar el petróleo, los productos de la pesca, el camarón y los enlatados, representaba hasta el año 2013 el rubro más importante en la exportación, con un aporte del 33% (Ministerio de Comercio exterior, 2014). Es por ello que en los tratados comerciales que se han establecido entre la Unión Europea (UE) y Ecuador, se ha hecho un énfasis especial en el desarrollo de normas que velen por la calidad de los productos alimenticios. Para ello, nuestro país adopta criterios comunitarios que ayudan a favorecer los intercambios comerciales y se establecen criterios de control armonizados para los productos alimenticios y así sustituir o mejorar los criterios nacionales.

Uno de los parámetros de control que se ha estado fortaleciendo está relacionado con el control de histamina en los productos derivados de la pesca. La histamina, es una amina biogénica que se relaciona con una calidad deficiente, contaminación o condiciones inapropiadas durante el procesamiento y almacenamientos, pudiendo provocar una intoxicación severa en personas sensibles (Yongsawatdigul, Y. J., & S., 2004).

El método aprobado nacionalmente para controlar el contenido de histamina se tomó del registro oficial de la Asociación de la Comunidad Analítica (AOAC), en donde se usa un fluorómetro luego de derivatizar la histamina. (AOAC, 2003), pero la Unión Europea, en su reglamento 2073 del 2005 además de establecer los límites, exige una metodología diferente,

Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC) (REGLAMENTO (CE) no 2073/2005, 2005).

Basándose en los acuerdos comerciales y en el tamaño del mercado, Ecuador concentra su objetivo en cumplir con las exigencias de la Unión Europea y garantizar el comercio internacional, surgiendo así la necesidad de desarrollar y validar una técnica de ensayo utilizando cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, con detección en el ultravioleta.

Problema

Durante el proceso de descomposición de los alimentos ocurre un proceso natural de formación de aminas biogénicas como la histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, entre otras, pero las intoxicaciones alimentarias se deben solo a la histamina y la tiramina (Seguridad Alimentaria, 2015). El principio de cuantificación de la histamina por el método normalizado de la AOAC usa las propiedades fluorescentes del producto de derivatización de la histamina con el orto-ftaldialdehído (OPT), lo cual no le da selectividad pues las otras aminas biogénicas presentan la misma respuesta (César de la Torre, 2013). En cambio el método sugerido por la unión Europea conlleva un proceso de separación previo que permite asegurar la cuantificación selectiva del analito de interés.

Hipótesis

El método cromatográfico con detección UV que se desarrolle y valide, permitirá cuantificar de forma selectiva y exacta la presencia de histamina luego del proceso de extracción, derivatización y separación cromatográfica, permitiéndome evaluar el grado de descomposición del pescado a través del contenido de histamina en el rango desde 1 hasta 200 ppm.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método robusto que garantice la cuantificación de histamina cumpliendo con la normativa europea y confirmando su resultado a través de materiales de referencia certificados para garantizar resultados confiables.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Desarrollar un método rápido, preciso y exacto para la determinación de histamina en productos del mar.
- ✓ Validar el método de ensayo según las normas internacionales de verificación y control para que el resultado sea verificable internacionalmente.
- ✓ Establecer el alcance del método con un rango desde 10 hasta 200 ppm.
- ✓ Verificar que se cumplen con los límites máximos establecidos para repetibilidad y reproducibilidad de 2.8 veces el valor de la desviación estándar para cada parámetro y que la exactitud medida a través de la recuperación se mantengan en el rango entre 95 y 105%.
- ✓ Estudiar el efecto de las variables analíticas del método a través de la evaluación de robustez para confirmar los puntos críticos de control.

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aminas Biogénicas

Las aminas son compuestos químicos ampliamente descritos en la naturaleza, que contienen uno o varios sustituyentes unidos a un átomo de nitrógeno. Son compuestos endógenos de las plantas que también pueden encontrarse en frutas frescas y verduras. Sin embargo, en los alimentos, las aminas se forman fundamentalmente en los procesos fermentativos, y durante el envejecimiento y la conservación, a partir de la descarboxilación microbiana de los correspondientes aminoácidos precursores, por ello se denominan biogénicas. (Izquierdo, Sandrea, Allara, González, García, & Valecillos, 2004).

El contenido de aminas biogénicas en el pescado recién capturado, es prácticamente despreciable. A modo de ejemplo, en sardina fresca la histamina está presente en niveles menores a 5 mg/100 g, la cadaverina menor que 15 mg/100 g y la putrescina menor de 1 mg/100 g. Sin embargo; inmediatamente que el pez es capturado, ya en las redes, comienza el proceso de descomposición. La carga bacteriana propia y aquella incorporada por los manejos post-captura, encuentran en el pescado dañado un excelente medio para colonizar. (Tapia Salazar & L., 2002)

Las aminas biogénicas por ser termoestables, son útiles indicadores de la baja calidad de la materia prima de productos preservados por tratamiento térmico. La formación de aminas biogénicas está más relacionada con bacterias mesófilas que psicrófilas. Por ello, las bajas temperaturas no impiden el desarrollo de bacterias con actividad por descarboxilación, pero sí las pueden retrasar. El incremento de aminas biogénicas coincide con la aparición del mal olor en el pescado y también tiene buena correlación con los valores de bases volátiles totales, trimetilaminas, hipoxantina y potencial de hidrógeno (pH). (Seguridad Alimentaria, 2015)

Debido a esta característica de termoestabilidad, las aminas biogénicas no se pueden eliminar por procesos como la cocción, enlatado, congelación o ahumado (Pooladgar., 2013). Una vez que comience el proceso de descomposición no se puede detener.

La intoxicación que suele aparecer luego de ingerir pescados contaminados por histamina se llama escombroidosis y se asocia con el deterioro del pescado de tipo scombridae, como el atún y la caballa (Hwang BS, 2003). Sin embargo, estadísticas fiables sobre su incidencia no existen debido a que los incidentes por intoxicación no suelen ser reportados por el personal médico que diagnostica. (Guizani N, 2004)

Algunas de las aminas biogénicas de interés en el control de alimentos son la histamina, agmatina, putrescina, cadaverina y tiramina que provienen de la descarboxilación de sus respectivos aminoácidos como la histidina, arginina, ornitina, lisina y tirosina respectivamente.

1.2 Histamina y su relación en los productos derivados de la pesca.

La histamina es una amina compuesta por un anillo imidazólico y un grupo etilamino como cadena lateral. El nombre químico aprobado por la Asociación Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) es 2-(4-imidazol) etilamina y su fórmula global es $C_5H_9N_3$ (Prell & Green, 1986)

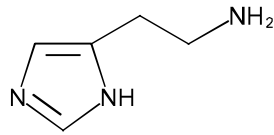
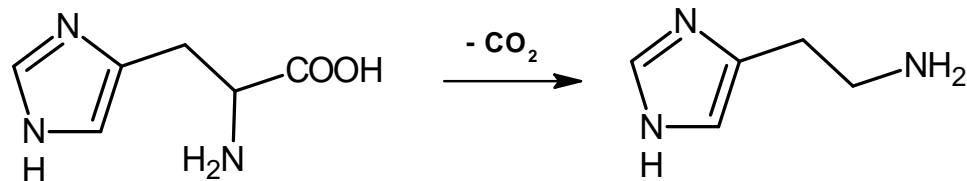


Figura 1: Estructura de la Histamina

Su aparición es debido a la descarboxilación del aminoácido histidina en presencia de su enzima catalizadora L-histidin descarboxilasa. Algunas formas de intoxicación alimentaria, se deben a la conversión de histidina en histamina en la comida descompuesta o mal refrigerada, como el pescado.



Histidina \longrightarrow descarboxilación \longrightarrow histamina

Figura 2: Reacción enzimática de formación de la histamina

La histamina es un compuesto que se encuentra naturalmente en el organismo humano, es considerado vasodilatador, mediador de reacciones alérgicas, además de tener un papel fundamental en la secreción de ácido gástrico. Esta sustancia se encuentra en el organismo en valores cercanos a las 25 ppm. (Izquierdo, Allara, & Torres, 2004).

Cuando el nivel de histamina que circula en la sangre es muy elevado, se generan desequilibrios que alteran el estado normal de las personas causando la intoxicación descrita anteriormente.

El pescado y los productos derivados de la pesca tienen un alto consumo en todo el mundo debido fundamentalmente al elevado valor nutritivo que estos poseen, ya que son ricos en proteínas (15-17%), vitaminas A, E y D y su contenido de grasa es bajo. (Navarro, 1991).

El aumento de las ciudades y de la población ha generado un incremento en la fabricación de productos procesados en diversas formas, tales como el atún, la sardina o el mismo pescado fresco en diversas presentaciones.

Una inadecuada manipulación y conservación de estos productos favorecen la contaminación y proliferación de microorganismos, que no solo desarrolla desordenes gastrointestinales sino también neurológicos y hemodinámicos. (Ben-Gigirey B, 1998).

Las bacterias productoras de histamina no forman parte de la microflora normal del intestino, piel o agalla de las especies marinas recién capturadas, sino que aparecen debido a una práctica higiénica deficiente durante la captura o durante el almacenamiento y transporte por un mal control de la temperatura. (De Sousa V, 1991); (Greif G, 1997)

La intoxicación por histamina se produce en todo el mundo y es tal vez la forma más común de infección causada por la ingestión de pescado (tabla 1).

Muchas aminas biogénicas han sido encontrados en peces, pero sólo la histamina, cadaverina y putrescina han sido identificados como influyentes con respecto a la seguridad del pescado y a su calidad. (Bulushi & al, 2009).

La aparición de la escombroidosis es típicamente de 10 min a 1 h después de consumo del pescado y puede durar de 12 h a unos pocos días. Los síntomas son variables e incluyen sabor metálico o picante, entumecimiento oral, dolor de cabeza, mareos, palpitaciones, rápido y débil pulso, disminución de la presión arterial, dificultad en la deglución y abundante sed. También se destacan alergia con síntomas tales como urticaria, erupción cutánea, rubor e hinchazón facial. (Hungerfold & Wu, 2012)

Tabla 1: Brotes de escombroidosis reportados internacionalmente: Fuente, Localización geográfica, Período y casos involucrados

Fuente de Intoxicación	Localización	Periodo	No. Casos	Referencia
Atun enlatado	USA	1973	254	(Merson MH, 1974)
Macarela, atún, anchovias,	Japón	1970-1980	4122	(Taylor, 1986)

Fuente de Intoxicación	Localización	Periodo	No. Casos	Referencia
sardinias				
Atún, Macarela	Italia	1979	250	(Molinari, 1989)
Atún (congelado/fresco y enlatado)	Inglaterra	1987-1996	243 (esporádico) y 56 familias	(Scoging, 1998)
Pescado frito	Taiwan	2007	347	(Chen h.W., 2010)
Pescado	USA	1998-2002	463	(Lynch M., 2006)

1.3 Agentes de Regulación y Control.

La Organización americana para la administración de alimentos y medicamentos (FDA) y la comisión de Salud de la Unión Europea han establecidos normas de control sanitaria que no solo deben cumplir los productores locales sino también los productos que intentan entrar en el mercado de esos países. Es así como la Unión Europea a través del Reglamento (CE) No 2073/2005 del 15 de noviembre de 2005 “Criterios microbiológicos para los productos alimenticios” (REGLAMENTO (CE) no 2073/2005, 2005) indicó que todos los productos derivados de la pesca deben ser analizado para histamina de forma que se cumplan cada uno de los ítems descritos abajo:

- ✓ Nueve muestras deben tomarse por cada lote. Estos deben cumplir los siguientes requisitos:
 - el valor promedio no debe exceder 100 ppm;
 - dos muestras pueden tener un valor superior a 100 ppm e inferior a 200 ppm;
 - ninguna muestra puede tener un valor superior a 200 ppm.

- ✓ Estos límites se aplican sólo a especies de peces de las familias siguientes: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae y Scombrosidae.

- ✓ Sin embargo, peces pertenecientes a estas familias que han sido sometidos a maduración enzimática mediante tratamiento en salmuera puede tener niveles más altos de histamina pero no más de dos veces los valores anteriores.
- ✓ Los exámenes deben realizarse por medio de un equipo HPLC, teniendo como referencia el método: Male et al., 1996 y Duflos et al., 1999.

Para la FDA, las directrices de control son otras y difieren de los europeos en los niveles de calidad. Estas normas,(FDA, 1998) expone que solo estará regularizado la histamina para los pescados, atún y mahi mahi y delimitó 500 ppm de histamina como nivel tóxico y 50 ppm como nivel de acción.

En Ecuador, el Instituto Nacional de Pesca, INP, se encarga de verificar que todos los productos derivados de la pesca, cumplan con todos los requisitos de control de exportación según los reglamentos internacionales que aplique. Sin embargo, para el control de histamina, ha establecido como punto de control el más estricto, el límite de alarma de la FDA, de esta forma se establece un muestreo de 9 controles por lote de producto y los valores deben ser inferiores a 50 ppm.

No obstante este control, en un reporte emitido el 16 de Abril de 2013 por la FDA, se informó que en el período comprendido entre enero de 2010 a abril de 2012, hubo 5 casos de rechazo de mercadería salida de Ecuador con destino a los Estados Unidos reportada como pez dorado y 13 rechazos en el período de abril de 2012 hasta abril de 2013. (García & Ibañez, 2013).

1.4 Importancia del pescado para Ecuador

Ecuador tiene entre sus múltiples beneficios, las bondades de un clima que favorece en gran medida la gran variedad de especies marinas existentes, dentro de ellas podemos mencionar a su principal producto que es el atún, además del pez espada, wahoo y el pez dorado, conocido en el mercado internacional como “mahí mahí”.

Debido a esa riqueza marina, en el país existe un numeroso grupo de empresas dedicadas a la captura, proceso, empaque y exportación de productos derivados de la pesca. Muchas de las cuales tienen más de 25 años de experiencia. Por ello, Ecuador ha llegado a ser un importante referente mundial de productos del mar y ser considerado uno de los países con mayores riquezas naturales debido a su ubicación geográfica y la variedad de climas (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, 2013).

Con esta experiencia referenciada, Ecuador ha logrado aperturas en el mercado internacional. Su mayor enfoque va dirigido a Europa, estimándose un aporte del 26.5% del total de exportaciones en el período acumulado desde el 2008 al 2013. (Ministerio de Comercio exterior, 2014).

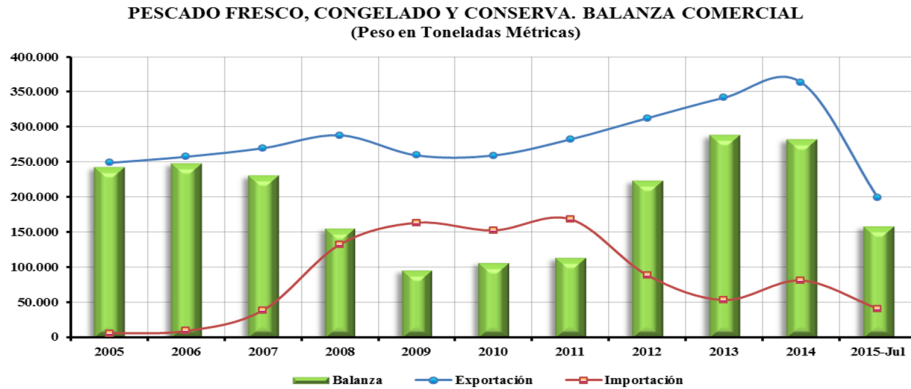
De este porcentaje, los productos de la pesca, el camarón y los enlatados (sin considerar el petróleo), representaban hasta el año 2013 el rubro más importante en la exportación, con un aporte del 33% (Ministerio de Comercio exterior, 2014). Es por ello que en los tratados comerciales que se han establecido entre esta comunidad y Ecuador, se ha hecho un énfasis especial en el desarrollo de normas que velen por la calidad de los productos alimenticios.

En la Tabla 2 podemos apreciar con detenimiento el crecimiento que ha desarrollado el mercado de exportación del pescado en conjunto (fresco, congelado y en conserva) evidenciando la importancia de este rubro para la economía nacional. Se observa un ligero decrecimiento en los años 2009 y 2010 debido a la crisis económica que se desarrolló a nivel mundial.

En el gráfico 1, puede observarse de forma más detallada el crecimiento si lo evaluamos solo como exportación y no como un conjunto de la balanza económica. (MAGAP)

La balanza económica representada es el resultado de la resta del valor de importación al de exportación.

Gráfico 1: Valores en Toneladas Métricas de las exportaciones del pescado fresco, congelado y en conserva.



Fuente: Banco Central del Ecuador (agosto 2015)

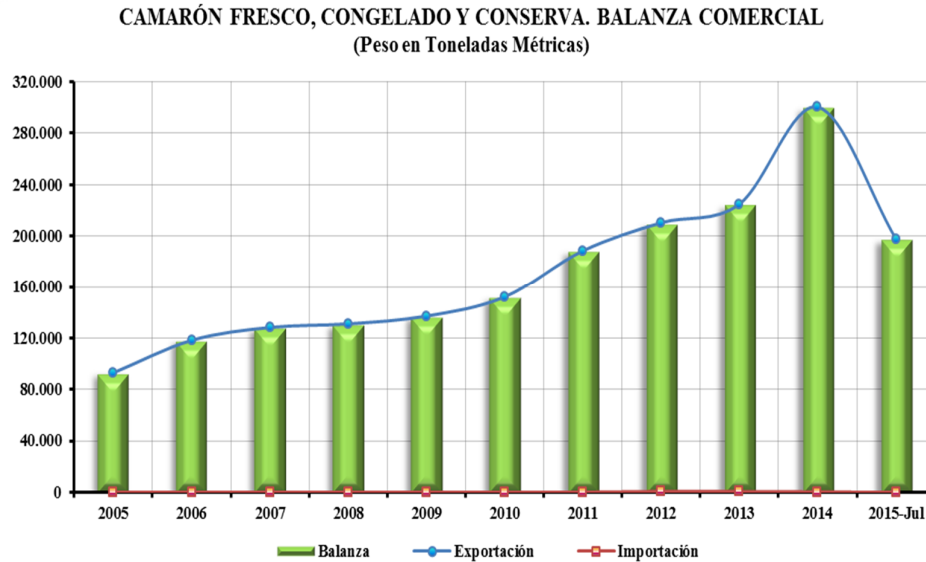
Tabla 2: Valores de exportación desde el año 2000 hasta Julio de 2015 para PESCADO FRESCO, CONGELADO Y CONSERVA. BALANZA COMERCIAL (Valores expresados en Toneladas Métricas) (MAGAP)

Año	Exportación	Importación	Balanza
2000	178.841	1.883	176.957
2001	196.204	5.715	190.490
2002	194.790	25.483	169.307
2003	225.613	27.064	198.548
2004	202.080	17.180	184.900
2005	248.669	5.354	243.315
2006	257.406	8.798	248.608
2007	269.629	38.326	231.304
2008	288.060	132.264	155.796
2009	259.324	163.181	96.144
2010	259.223	152.310	106.912
2011	282.181	168.274	113.907
2012	312.428	88.407	224.022
2013	341.651	52.935	288.716
2014	363.832	80.877	282.954
2015-Jul	199.048	40.544	158.504

Fuente: Banco Central del Ecuador (agosto-2015)

También se muestra en la Tabla 3 y el gráfico 2 los valores de exportación y la representación en barras respectivamente, de otro rubro muy importante derivado de la pesca, el camarón. El cual se ubica en el segundo puesto de importancia sin considerar el petróleo.

Gráfico 2: Valores en Toneladas Métricas de las exportaciones del camarón



Fuente: Banco Central del Ecuador (agosto-2015)

Tabla 3: Valores de exportación desde el año 2000 hasta Julio de 2015 para CAMARON (Valores expresados en Toneladas Métricas) (MAGAP)

Año	Exportación	Importación	Balanza
2000	36.047	3	36.044
2001	44.865	4	44.861
2002	45.965	0	45.965
2003	57.238	30	57.208
2004	68.564	0	68.564
2005	93.014	6	93.008
2006	118.258	0	118.258
2007	128.289	60	128.229
2008	131.037	98	130.939

Año	Exportación	Importación	Balanza
2009	137.143	59	137.084
2010	152.150	76	152.074
2011	188.583	106	188.477
2012	210.472	758	209.713
2013	224.975	614	224.360
2014	300.495	374	300.121
2015-Jul	197.862	11	197.852

Fuente: Banco Central del Ecuador (agosto-2015)

1.4 Métodos de Ensayo

La cantidad y variedad de métodos desarrollados en los laboratorios para la determinación de histamina en pescado y productos pesqueros es muy abundante.

A diferencia de muchas otras toxinas más potentes presentes en los pescados y mariscos, los niveles altos establecidos para regular el contenido de histamina, permiten su detección por una variedad de diferentes enfoques que van desde la simple y económica técnica de cromatografía en placa fina (TLC), hasta las metodologías más costosas y de gran alcance analítico como la cromatografía líquida con detección de masas (LC-MS). (Hungerford, 2010).

La mayor parte de los métodos de separación aplicados en pescado, usan la cromatografía líquida (HPLC) con derivatización pre columna o post-columna con el objetivo de producir productos fluorescentes o cromóforos fuertes que permitan la detección con detectores de fluorescencia o UV respectivamente. (Mietz & Karmas, 1978); (Hui & Taylor, 1983); (Brillantes & Samorsorn, 2001); (Cinquina & al, 2004).

Otros métodos basados en la separación incluyen cromatografía iónica (Cinquina A.L., 2004b), electroforesis capilar (Zhang L.Y., 2004), electroforesis en papel (Sato M., 2002), cromatografía de gases con detección en masas (Marks H., 2006). También existen muchos kits de ensayos basados en la determinación mediante anticuerpos selectivos. (Lehane I., 2000). Estos kits de ensayo están basados en métodos de

inmuno-ensayo y se hicieron muy populares debido a su facilidad en el uso y a la reducción de los tiempos de ensayo.

1.4.1 Preparación de la muestra

La extracción es el paso más crítico en los procedimientos de ensayo de histamina. Este es el paso donde mayor influencia negativa tiene el efecto de la recuperación. Los reactivos que más se han usado durante la extracción desde matrices sólidas son el ácido clorhídrico, el perclórico, el tricloro acético o el metanosulfónico, aunque también se ha difundido mucho el uso de solventes orgánicos como el metanol, acetona, acetonitrilo o diclorometano (Moret, Bartolomeazzi, & Lercker, 1992); (Moret S., 1996).

Algunos autores han comparado la capacidad de extracción de algunos extrayentes pero no obtuvieron resultados concluyentes. Sin embargo el efecto de la acidez de los ácidos extrayentes condujo a que el efecto de la matriz tenía una gran influencia en el tipo de ácido que se utilizara. Así se obtuvieron resultados excelentes con el ácido clorhídrico 0.1M en la extracción de la histamina desde el queso, pero ese efecto no se lograba cuando la matriz era carne o pescado (Moret S., 1996). Para este tipo de matriz, el ácido que mostró mejor recuperación fue el ácido tricloro acético al 10%.

El hecho es que como las aminas biogénicas son bases orgánicas fuertes, el uso de ácidos favorece la ruptura del enlace de la histamina con la matriz.

Otros autores demostraron la efectividad del uso del ácido perclórico en matrices de tejidos pues la ruptura de este con la amina formada era más rápido. El único inconveniente que expresaban todos, y que no es despreciable, es el efecto de peligrosidad que se añadía al método (Dadáková E., 2009).

1.4.2 Técnica de separación cromatográfica

En general, las aminas biogénicas requieren columnas de fase reversa de tipo C8 o C18 para la separación. La elección de estas depende

de la combinación de fases móviles y si estas se usan en forma de gradiente o isocrático. (Lanfranco C., 2011).

1.4.3 Sistemas de Detección

En los sistemas cromatográficos, el detector es el encargado de convertir una medida física o química en una señal medible que es proporcional a la concentración. Debido a la baja volatilidad y la débil actividad cromofórica de las aminas biogénicas, es necesario someterlas a una reacción de derivatización que le permita mejorar sus características espectrales (Swartz, 2010).

Esta derivatización puede realizarse antes del ingreso a la columna cromatográfica para la separación de los analitos de interés (pre-columna) o posterior a la separación y antes de la detección (post-columna).

Para este propósito existe una variedad muy amplia de agentes derivatizantes, tales como el orto-ftaldialdehído (OPT), cloruro de dabsilo, cloruro de dansilo, cloruro de benzoilo, fluoresceína, el fluorometiloxicarboxil (FMOC), el 2-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro (CNBF), entre otros (Onal, 2007).

El OPT es un reactivo que reacciona rápidamente con las aminas primarias, aproximadamente 30 segundos, en presencia de agentes reductores. El resultado final de esta reacción es un derivado iso-indol altamente fluorescente. Esta reacción de derivatización puede llevarse a cabo en procesos pre-columna y post-columna con la única desventaja de que el resultado del proceso es producto inestable en el tiempo (Yamaguchi M, 1999).

El uso del cloruro de dansilo, otro de los agentes derivatizantes más reportados en la literatura, muestra productos de elevada estabilidad pero con requerimientos más largos en los tiempos de reacción, por lo que su uso se limita a la derivatización pre-columna (De Mey E., 2012), (Onal, 2007), (Zaitso K., 1999).

En la tabla 4 se resume los métodos para la determinación de histamina en alimentos de origen animal. Se puede observar la gran variedad de opciones.

Tabla 4: Resumen de métodos consultados.

Tipo de muestra	Aminas Biogénicas detectadas	Extracción	Fase estacionaria	Fase Móvil/Flujo	Derivatización/ Detección	Referencia
Carnes y derivados	Tyr, His, Phm, Put, Cad, Trp, Agm, Spm, Spd	7.5% TCA	intercambio catiónico	Fase móvil con gradiente.pH 5.63. Flujo 0.8 ml/min	OPT/FL detección (Ex 330 nm, Em 465 nm)	(Trki M., 2012)
Carne Fermentada	Spm, Spd, Cad, Put, Phm, Tyr, His, Trp	0.4 M HClO ₄	C18	Fase móvil con gradiente organicoFlujo 1 ml/min	Dbs-Cl/UV	(De Mey E., 2012)
Carnes y derivados	His, Tyr, Phm, Put, Cad	0.1 mol. L ⁻¹ MSA	intercambio catiónico	MSA. Flujo 0.38 ml/min	No derivatiza /UV 276 nm	(Saccani G., 2005)
Productos carnicos	His, Tyr, Trp, Put, Cad, Spd, Spm	5% TCA	C8 (OPT) C18 (Dns-Cl)	OPT: Buffer acetato: ACN a 0,6 ml/min Dansilo: H ₂ O:ACN a 0.8 ml/min	Dns-Cl: UV 254 nm OPT: FL (Ex 330, Em 445 nm)	(Smelá D., 2002)
Pollo	Trp, Phm, Put, Cad, His, Tyr, Spm, Spd	0.4M HClO ₄	C18	0.1M amonio acetato: ACN (1:1). Flujo 0.9 ml/min	Dns-Cl/UV (254 nm)	(Rokka M., 2004)
Pollo	Put, Cad, Spd, Spm, His, Tyr	5% TCA	C18	buffer de composición 0.2M sodio acetato, 10mM octanosulfonato de sodio, MeOH, ACN. Flujo 0.6 ml/min	OPT/FL detección (Ex 340 nm, Em 445 nm)	(Silva C.M.G., 2002)
Pescado	Put, Cad	5% HClO ₄	C18	ACN:H ₂ O (42:58). Flujo: 1 ml/min	Bnz-Cl/UV (198 nm)	(Rodrigues B.L., 2013)
Pescado	Spm, Spd, Cad, Put, Phm, Tyr, His, Trp	5% TCA	C18	Formiato de amonio 15mM, acido fórmico, agua y MeOH. Flujo 0.5 ml/min	LC-ESI-MS/MS	(Sagrattini G., 2012)
Pescado	Put, His, Cad, Trp	5% TCA	C18	ACN, buffer potasio fosfato, MeOH, Agua. Flujo 2.5 ml/min	Bnz-Cl/UV (254 nm) OPT/FL (ex 320/em 523 nm)	(Tahmouzi S., 2011)
Pescado y Carnes	Spd, Put, His, Trp, Tyr	5% TCA	C18	ACN:H ₂ O (67:33). Flujo: 1.2 ml/min	Dns-Cl/UV (254 nm)	(Saaid M., 2009)
Pescado, Calamar, salami	Agm, Cad, His, Put, Spd, Spm, Tyr	0,6 MHClO ₄	C18	Formiato de amonio 100mM, acido fórmico 200 ul, agua y ACN.	SFP/ESI-MS	(Bomke S., 2005)

Tipo de muestra	Aminas Biogénicas detectadas	Extracción	Fase estacionaria	Fase Móvil/Flujo	Derivatización/ Detección	Referencia
Flujo 0.45 ml/min						
Leche	Put, Cad, Spd, His, Spm, Agm, Phm, Tyr	SSA	C18	sodio acetato, octanosulfonato de sodio y ACN. Flujo 0.8 ml/min	OPT/FL (ex 340/em 445)	(Gloria M.B.A., 2011)
Queso	Spm, Spd, Put, His, Tyr, Spd	SPE	intercambio catiónico	ACN: agua + ácido trifluoroacético. Gradiente con flujo 0.7 ml/min	Sin derivatizar/ELSD	(Spizzirri U.G., 2013)
Pescado	His	10% TCA	C18	85% buffer fosfato, MeOH y ACN. Flujo 1 ml/min	sin derivatizar/DAD (214 nm)	(Cinquina & al, 2004)

Aminas Biogénicas: Tiramina (Tyr), cadaverina (Cad), putrescina (Put), histamina (His), triptamina (Trm), agmatina (Agm), espermidina (Spd), espermina (Spm), feniletilamina (Phm).

Reactivos/procedimientos de extracción: extracción en fase sólida (SPE), ácido tricloroacético (TCA), ácido perclórico (HClO₄), ácido sulfosalicílico (SSA)

Reactivo derivatizantes: cloruro de benzoilo (Bnz-Cl), o-ftaldialdehído (OPT), Cloruro de Dabsilo (Dbs-Cl), Cloruro de Dansilo (Dns-Cl), Propionato de succinimidilferrocenil.

Fase Móvil: Metanol (MeOH), ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrilo (ACN).

Detectores cromatográficos: Ionización Electrospray (ESI), Detector de arreglo de diodos (DAD), Detector evaporador light scattering detector (ELSD), cromatografía de placa fina (TLC), espectrometría de masas (MS).

1.5 Validación de métodos analíticos.

La validación de métodos, es el proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado. (NORMA INTERNACIONAL ISO/IEC 17025:2005, 2006)

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados.

La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo.

En este caso se requiere un método cuantitativo de ensayo, por lo que es necesario que se cumplan una serie de parámetros:

- ✓ Especificidad/selectividad
- ✓ Límite de detección y cuantificación
- ✓ Precisión (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio)
- ✓ Linealidad y rango de trabajo
- ✓ Exactitud (en condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad en laboratorio)
- ✓ Recuperación
- ✓ Robustez

En el caso de que los métodos cualitativos y cuantitativos hayan de ser utilizados por más de un laboratorio, cada uno de ellos debe verificar el método y debe determinar con los otros su precisión y exactitud.

1.5.1 Especificidad (selectividad)

La selectividad y especificidad son medidas que calculan la fiabilidad de las mediciones en presencia de interferencias.

Selectividad (o especificidad) es la aptitud de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en la matriz de la muestra bajo las condiciones establecidas del ensayo (National Association of Testing Authorities (NATA), 2013).

Es la aptitud de un método para valorar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se sospecha que puedan estar presentes, por ejemplo: impurezas, degradantes, matriz, etc. (CPMP/ICH/381/95, 1995).

En general, se considera que especificidad = 100% selectividad

La confirmación de la identidad o especificidad se realiza de dos formas:

1. Analizando la muestra y los materiales de referencia usando diferentes métodos. Una vez terminado es necesario evaluar visualmente o por cálculos que la señal solo corresponde al analito de interés.
2. Analizando muestras con cantidades añadidas de otros componentes de la muestra y verificar el efecto de la adición: aumenta o inhibe la señal de los mesurandos.

Cada uno de ellos se repite solo una vez y se trata de usar metodologías diferentes para la confirmación (CPMP/ICH/381/95, 1995)

1.5.2 Límite de detección

Se trata de la concentración mínima de analito que puede ser detectada e identificada con un determinado grado de certeza. El límite de detección se define también como la concentración mínima que puede distinguirse del ruido de fondo con un determinado grado de confianza. (CPMP/ICH/381/95, 1995).

Para estimar el límite de detección pueden utilizarse varios métodos, los cuales dependen del análisis de especímenes en blanco y el examen de la relación entre la señal y el ruido.

Por lo general se acepta un requisito mínimo de relación señal/ruido de 3/1.

1.5.3 Límite de cuantificación

Es la menor cantidad que puede ser determinada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un dado nivel de confianza. Para el análisis cuantitativo debe quedar absolutamente claro que sólo se emplean valores atribuibles al analito. El límite de cuantificación es entre 3 y 10 veces el límite de detección según cada caso (CPMP/ICH/381/95, 1995)

1.5.4 Precisión

La precisión es la proximidad entre valores de una magnitud, obtenidos por mediciones replicadas, en condiciones específicas (IRAM 34552-1).

Las dos medidas de precisión más comunes son repetibilidad y reproducibilidad, que representan los dos extremos de la precisión que se pueden obtener.

La repetibilidad es la precisión más pequeña esperada. Da una idea del tipo de variabilidad que se puede esperar cuando el método es desarrollado por un mismo analista en un mismo equipo a lo largo de un periodo de tiempo corto. Un ejemplo de esto es la variabilidad esperada entre los resultados cuando la muestra es analizada por duplicado.

La reproducibilidad en cambio, es la precisión más grande esperada. Da una idea de la variabilidad que muestra un método cuando la misma muestra es analizada por diferentes laboratorios, analistas o en periodos largos de tiempo. Formalmente, excluye la variación respecto del tiempo.

La repetibilidad y la reproducibilidad dependen de la concentración de analito y en consecuencia, debieran determinarse para varias concentraciones.

A partir de la desviación estándar de la repetibilidad (σ o s_r) es útil calcular el límite de repetibilidad "lim r", el cual le permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra, realizados en condiciones de repetibilidad (ISO 5725-2, 1994).

A partir de la desviación estándar de la reproducibilidad (σ o s_R) es útil calcular el límite de reproducibilidad "lim R", el cual le permite al analista decidir si es significativa la diferencia entre análisis duplicados de una muestra, realizados en condiciones de reproducibilidad.

En la tabla 5 se resumen las actividades que deberían llevarse a cabo para completar el estudio de precisión

Tabla 5 Resumen de actividades para llevar a cabo el proceso de Precisión

Analizar	Repeticiones independientes	Calcular	Comentarios
Trabajar con materiales de referencia o muestras fortificadas en varias concentraciones a lo largo del intervalo de trabajo			
Mismo analista, equipo, laboratorio. Corto periodo de tiempo	Al menos 5 por cada nivel	Desviación estándar para cada nivel	Es necesario determinar la desv. Estándar de la repetibilidad para cada nivel
Diferentes analistas y equipos, mismo laboratorio. Mayor tiempo	Al menos 5 repeticiones por cada analista para cada nivel	Desviación estándar para cada nivel	Se determina la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel
Diferentes analistas, equipos y laboratorios. Mayor periodo de tiempo	3 por cada analista	Desviación estándar	Requiere estudios colaborativos con laboratorios ajenos. Ensayos interlaboratorios

1.5.5 Linealidad y Rango de Trabajo

La linealidad de un método se define como su aptitud para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito y el rango lineal es aquel rango de concentraciones de analito para las cuales el método brinda resultados proporcionales a la concentración.

En el extremo inferior del rango de concentraciones, los factores limitantes son los valores del límite de cuantificación.

En el extremo superior del rango de concentraciones, las limitaciones aparecen por efectos varios que dependen de la respuesta del instrumento.

Para determinar la linealidad es necesario seguir el siguiente procedimiento (CPMP/ICH/381/95, 1995):

1. Se preparan 1 blanco y 5 concentraciones diferentes del analito a determinar o 5 muestras fortificadas a varias concentraciones. Preferentemente, las soluciones se deben preparar independientemente y no a partir de diluciones sucesivas del material de referencia.
2. Se representa la señal obtenida en función de la concentración y se determina el ámbito lineal y los extremos superior e inferior del intervalo de trabajo.
3. Se repiten los pasos a y b dentro del ámbito lineal al menos 5 veces y deben hacerlo al menos dos analistas. Se efectúa un estudio estadístico de los resultados obtenidos

En general el criterio de aceptación que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación: El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son -1 y 1 . El valor máximo de 1 indica una correlación positiva perfecta (entre X e Y) con una pendiente positiva. Cuando $r=0$, no existe correlación alguna, independencia total de los valores X e Y

1.5.6 Exactitud

La exactitud (también conocida como sesgo) es la medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje.

La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos (CPMP/ICH/381/95, 1995)

Otra forma de estimar la exactitud es analizando muestras añadidas con tres concentraciones distintas (baja, media y alta) que abarquen la totalidad del rango de trabajo. La concentración de estas adiciones estándar debe ser distinta de la utilizada para preparar las curvas de calibración y debe prepararse con una solución estándar de trabajo distinta. Los criterios de aceptación de la exactitud deben ser similares a los utilizados para medir la precisión (ISO 5725-4, 1994).

1.5.7 Recuperación

Por recuperación de analitos en un ensayo se entiende a la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero. El objetivo es evaluar la eficiencia del método para detectar todo el analito presente en una muestra.

1.5.8 Robustez

Medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual (CPMP/ICH/381/95, 1995)

El ensayo de robustez es como una especie de ensayo interlaboratorio para estudiar el comportamiento de un procedimiento analítico cuando se hacen pequeños cambios en las condiciones ambientales y/o de operación. Involucra variaciones deliberadas en el método.

Permite identificar aquellas variables que provocarán cambios significativos y que deberían ser controladas más estrictamente.

Los ensayos de robustez generalmente se aplican para investigar los efectos sobre la precisión y la exactitud.

No se estudia cada variable 1 a 1, sino que se introducen varios cambios a la vez; de forma tal que se puedan investigar los efectos de cada uno de ellos.

Uno de los principales factores a tener en cuenta en este estudio es la evaluación de la estabilidad del analito en la solución. Las variables cualitativas deberán definirse detalladamente.

Para diseñar un estudio de robustez con varios factores de variabilidad, se puede recurrir al esquema clásico de Plackett y Burman. Dicho diseño otorga dos valores a siete factores o variables diferentes. Se asigna en mayúsculas los valores normales de operación para cada factor (A, B, C, D, E, F, G) y en minúsculas los factores alternativos (a, b, c, d, e, f, g). Se efectúan 8 análisis de la muestra y cada análisis es una combinación diferente de los siete factores. Para cada factor existen 4 combinaciones en mayúsculas y 4 combinaciones en minúsculas (CPMP/ICH/381/95, 1995).

Tabla 6: Esquema clásico de Plackett y Burman

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Factor								
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fuente: Notas para la guía de validación de métodos analíticos.

Este diseño muestra el estudio de 7 factores en 8 combinaciones. Los resultados se indican por las letras s, t, u, v, w, x, y, z. La comparación de las medias de los resultados revela el efecto de cambiar el valor normal por el alternativo. Así, el efecto de cambiar el factor A por a se determina restando la media de los resultados de modificar los parámetros (s+t+u+v)/4, de la media de los resultados de los parámetros sin modificar (w+x+y+z)/4

$$V_A = \frac{1}{4} (s + t + u + v) - \frac{1}{4} (w + x + y + z) = A - a$$

$$V_B = \frac{1}{4} (s + t + w + x) - \frac{1}{4} (u + v + y + z) = B - b$$

$$V_C = \frac{1}{4} (s + u + w + y) - \frac{1}{4} (t + v + x + z) = C - c$$

$$V_D = \frac{1}{4} (s + t + y + z) - \frac{1}{4} (u + v + w + x) = D - d$$

$$V_E = \frac{1}{4} (s + u + x + z) - \frac{1}{4} (t + v + w + y) = E - e$$

$$V_F = \frac{1}{4} (s + u + w + z) - \frac{1}{4} (t + u + x + y) = F - f$$

$$V_G = \frac{1}{4} (s + v + x + y) - \frac{1}{4} (t + u + w + z) = G - g$$

A continuación se hace una lista de estas diferencias ordenándolas de mayor a menor. Puede ocurrir que existan una o dos diferencias claramente superiores, lo cual significa que los respectivos factores ejercen una influencia dominante sobre la precisión de los resultados y deberán ser objeto de un control riguroso en el método analítico.

Para decidir si un factor tiene influencia importante, suele compararse el valor hallado en la tabla de diferencias.(V_A , V_B , V_G) con la expresión S , siendo S el valor de la desviación estándar hallada en el estudio de repetibilidad. $|V| > s \sqrt{2}$

Las diferencias (V_A , V_B , V_G) superiores en valor absoluto a S se consideran significativas y empezaría a considerarse como un punto crítico de control en el proceso de ensayo (CPMP/ICH/381/95, 1995).

CAPÍTULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Equipos

Para el desarrollo de la metodología se usaron los siguientes equipos:

- ❖ Equipo cromatógrafo líquido de alta resolución, HPLC. Marca HITACHI, Modelo LaChrom Elite con la siguiente configuración:
 - Bomba cuaternaria con sistema de desgasificación integrado
 - Inyector automático con sistema de enfriamiento peltier, con capacidad para 200 muestras.
- ❖ Detector UV-Vis con longitud de onda variable.
- ❖ Cartucho para HPLC de tipo reversa encapada, C18e de marca Merck, Purospher Star 150mm longitud x 4.6mm de diámetro interno, co 5µm de tamaño de partícula.

- ❖ Balanza gramera, con rango 0 a 2000g y precisión +/-0.1
- ❖ Balanza analítica, con una precisión de +/- 0.0001g
- ❖ Baño María a 60° C
- ❖ Cronómetro
- ❖ Refrigeradora
- ❖ Purificador de agua (agua tipo I)

2.1.2 Materiales

Los materiales utilizados se describen a continuación:

- ❖ Espátulas
- ❖ Papel filtro - Whatman #4 rápido de 15.0 cm de diámetro (o, Whatman 2V 12.5 cm, papel filtro equivalente)
- ❖ Embudos 65 x 65mm
- ❖ Matraces volumétricos con tapas 100ml, 200ml y 50ml
- ❖ Frascos erlenmeyer de 125 ml
- ❖ Beaker de 50 ml
- ❖ Viales de 2 ml con tapa y septum para automuestreador
- ❖ Jeringas desechables de 3 ml
- ❖ Filtros de membrana de PVDF o similar con 0.45 µm de tamaño de poro
- ❖ Filtros para jeringa de 0.45 µm de poro y 13 mm de diámetro.
- ❖ Pipeteadores automático 200-1000 µl con puntas
- ❖ Pipetas Volumétricas, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25ml y 100 ml
- ❖ Gradillas para Tubos de Ensayo de 20 ml
- ❖ Tubos de ensayo plásticos, con tapón a rosca montado de capacidad de 15 ml.
- ❖ Auxiliar de pipetado.
- ❖ Cepillos de botella
- ❖ Recipientes de plástico pequeño para pesar
- ❖ Picetas
- ❖ Máscara facial de seguridad o lentes
- ❖ Estación de lavado de ojos
- ❖ Ropa de laboratorio, guantes, y otros implementos de seguridad

2.1.3 Reactivos

Los reactivos, su calidad y procedencia se relacionan en la tabla 7

Tabla 7: Relación de reactivos según su calidad y procedencia

Calidad	Descripción	Procedencia
Para Análisis	Ácido Tricloro acético	Merck
	Acetona	Merck
	Cloruro de Dansilo	Merck
	Hidrogeno carbonato de Sodio	Merck
Grado cromatográfico	Acetonitrilo	Merck
	Metanol	Merck
Patrones	Dihidrocloruro de Histamina 99 %	Sigma
	Material de referencia de histamina con valor asignado 34.8 ppm	FAPAS

2.2 Métodos

2.2.1 Preparación de soluciones.

- ❖ **Solución ácido tricloro acético, TCA al 10 %:** Pesar 100 g de ácido tricloro acético y trasvasar cuantitativamente a un matraz de 1 litro y completar el volumen con agua destilada.
- ❖ **Solución de Cloruro de Dansilo 10 mg.ml⁻¹.** En cada muestra y estándar para la derivatización se usan 400 µl de la solución. Hacer el

volumen correspondiente para cada día de trabajo. Disolver en acetona. La solución debe prepararse fresca cada día.

Ejemplo: Se hará el análisis de 10 muestras (una de ella por duplicado) y se hará la curva con 5 estándares. Esto hace un total de 16 muestras.

Cada muestra requiere 400 µl de solución de cloruro de dansilo por lo que necesito preparar 16 muestras x 0.4 ml, 6.4 ml.

Se hace el calculo para 8 ml aproximadamente. Como necesito 10 mg por ml, se debe pesar 80 mg de cloruro de dansilo y llevar a 8 ml.

- ❖ **Solución de Hidrogenocarbonato de Sodio 0,25 M.** Pesar 5,25 g de NaHCO_3 . Trasvasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 250 ml, completar el volumen con agua HPLC y desgasificar en baño ultrasonido.

2.2.2 Preparación de la curva de calibración

Soluciones Estándar de Histamina (almacenar todas las soluciones de histamina en la refrigeradora)

- a. **Solución Stock** ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$): Pesar exactamente 169.1 mg de dihidrocloruro de histamina. Agregar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 ml, completar el volumen con ácido tricloroacético (TCA) al 10%, mezclar. Etiquetar y conservar por un máximo de 15 días.
- b. **Solución intermedia** (250 ppm): Pipetear 25 ml de la solución de stock en un matraz volumétrico de 100ml, completar el volumen con TCA 10%, mezclar. Etiquetar y conservar por un máximo de 15 días.
- c. **Soluciones de trabajo** (5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm): Preparar una nuevacada vez que se realice la curva:
 - Estándar de 200 ppm: Pipetear 20 ml de la solución intermedia en un matraz volumétrico de 25 ml, completar el volumen con tricloro acético 10%, mezclar.

- Estándar de 100 ppm: Pipetear 20 ml de la solución intermedia en un matraz volumétrico de 50ml, completar el volumen con TCA 10%, mezclar.
- Estándar de 50 ppm: Pipetear 10 ml de la solución intermedia en un matraz volumétrico de 50ml, completar el volumen con TCA 10%, mezclar.
- Estándar de 10 ppm: Pipetear 2 ml de solución intermedia en un matraz volumétrico de 50ml, completar el volumen con TCA 10%, mezclar.
- Estándar de 5 ppm: Pipetear 1 ml de solución intermedia en un matraz volumétricos de 50ml, completar el volumen con TCA 10%, mezclar.

2.2.3 Procedimiento de extracción

Para el proceso de extracción de la muestra se buscó un reactivo que fuera capaz de extraer la histamina desde la matriz:

Pesar 10.0 gramos de la muestra a analizar (pescado, atún, sardina, camarón), traspasar al vaso del mezclador o liquidador y agregar 40 ml de TCA al 10%, mezclar aproximadamente por dos (2) minutos. Al finalizar trasvasar todo el contenido a un matraz volumétrico de 50 ml utilizando el papel filtro para retener todo el material sólido. Lavar cuantitativamente el vaso del mezclador y trasvasar a través del filtro al matraz. Al finalizar enrasar al volumen con la solución de TCA al 10%. Invertir para homogenizar.

Repetir proceso para cada muestra o material de referencia que se desee analizar.

2.2.4 Reacción de derivatización

Utilizando una micropipeta, transferir a un tubo con tapa, 200µl de cada uno de los niveles de concentración del estándar y de las muestras obtenidas durante el proceso de extracción. Usar papel aluminio para protegerlo de la luz.

Luego, utilizando la micropipeta de 200 a 1000µl, transferir 800µl de la solución de bicarbonato de sodio 0.25M. En un tercer paso añadir 600µl de acetona grado reactivo y por último 400µl de la solución de cloruro de dansilo recién preparado. (Realizar las adiciones en el mismo orden especificado)

Agitar por balanceo y colocar en un baño de agua precalentado a 60°C por 60 minutos.

2.2.5. Análisis cromatográfico

Una vez completado el tiempo dejar enfriar y filtrar a través de los filtros para jeringa. Recoger el filtrado directamente en los viales. Tapar y colocar en el automuestreador para su análisis.

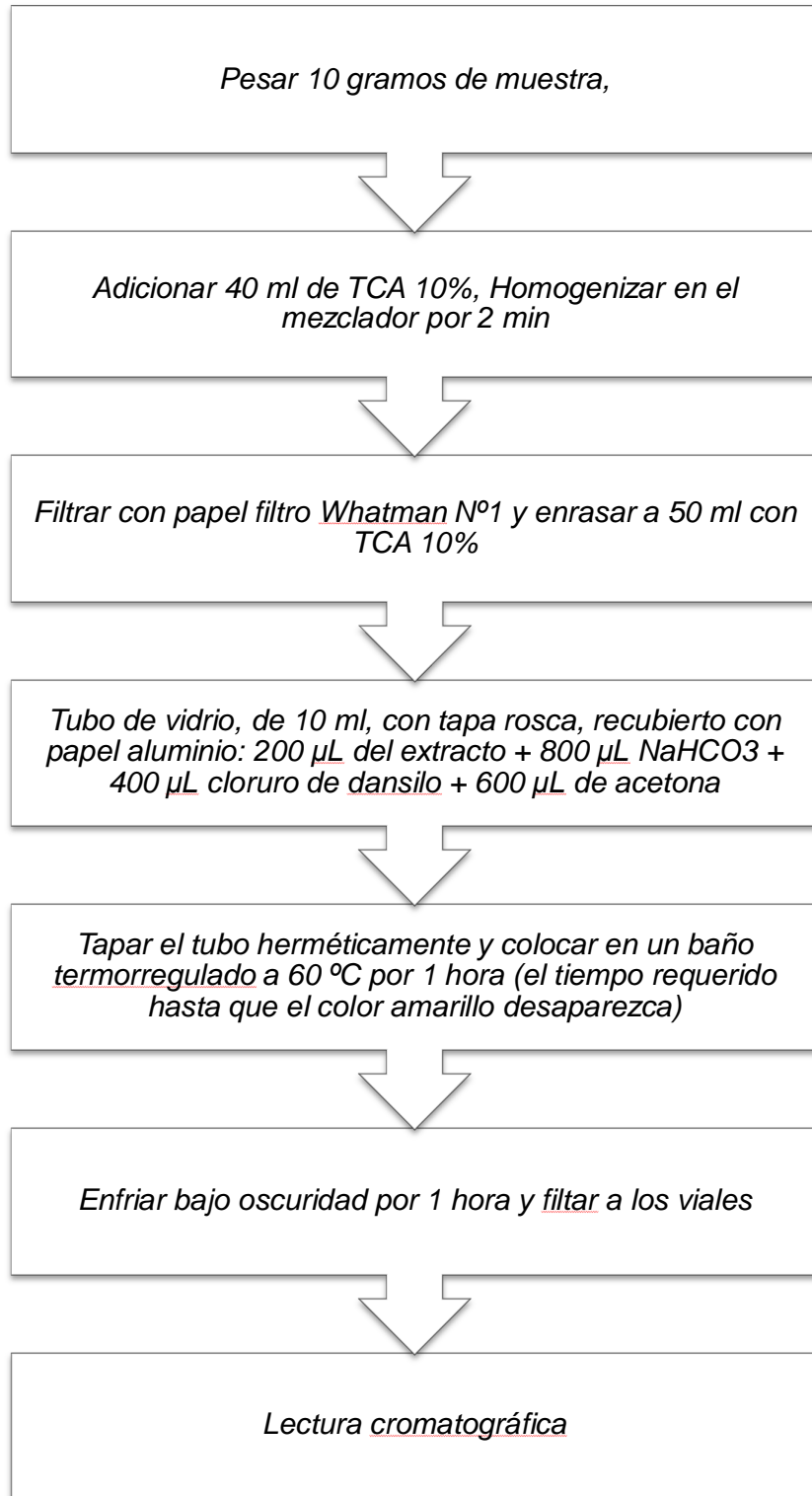
Con anterioridad se debió dejar estabilizando el sistema cromatográfico con las siguientes condiciones:

- ✓ Horno para columna: 25°C
- ✓ Temperatura del peltier del inyector: 22°C
- ✓ Flujo de la bomba: 1 ml.min⁻¹
- ✓ Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua: 80:20 v/v
- ✓ Columna: HPLC C18e Purospher Start 150mm x 4.6mm.
- ✓ Detector UV-Vis con longitud de onda fija de 254 nm
- ✓ Volumen de inyección: 10 µl

La curva de calibración debe realizarse el mismo día de los análisis de las muestras.

Planificar la secuencia de inyección para colocar los estándares en orden creciente de concentración al inicio y posteriormente las muestras y el material de referencia. Si se analizan mas de diez muestras en cada secuencia deben intercalarse estándares de diferentes concentraciones para comprobar la repetición de las condiciones cromatográficas. El intercalado debe hacerse cada 10 inyecciones de muestras desconocidas.

2.2.6 Procedimiento completo resumido en un diagrama de flujo



2.2.7. Proceso de Validación

Debido a la necesidad de asegurar la correcta aplicación del método, se procede a la validación del procedimiento y para esto analizamos los parámetros: Función de respuesta, Límite de cuantificación, Intervalo de trabajo, Reproducibilidad (R), Repetibilidad (r), Exactitud (recuperación) y Robustez.

2.2.7.1 EXACTITUD

Para la evaluación de este parámetro se analiza por replicado (mínimo 5 veces) el material de referencia certificado preferentemente con una matriz semejante a la de la muestra o en su defecto muestras enriquecidas preparadas en el laboratorio en el rango de trabajo deseado.

Se compara el promedio de los valores obtenidos (\bar{X}) con el valor de referencia (m), teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a ese material. Se determina el porcentaje de recuperación el cual es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100 % de recuperación.

Procedimiento a seguir: Para la evaluación de este parámetro se tomaron cinco muestras (una por cada nivel de calibración) y se analizaron por dos analistas diferentes. Estas muestras fueron analizadas previamente por un método ya acreditado en el laboratorio para establecer el valor de referencia.

Criterio de aceptación: 1. El porcentaje de recuperación determinado debe estar en el rango de 95% a 105%, y 2. La evaluación estadística de significancia utilizando la t de Student, que establece que el valor de t calculado usando la varianza de los resultados de los 10 valores determinados en cada nivel debe ser inferior al de referencia tabulado para 9 grados de libertad y 95% de confianza y afirmar que no existe diferencia significativa entre los valores obtenidos con el método desarrollado y el valor de referencia.

2.2.7.2 PRECISIÓN (Repetibilidad y Reproducibilidad)

Las dos medidas de precisión más comunes son **repetibilidad** y **reproducibilidad**, que representan los dos extremos de la precisión que se pueden obtener

1. La Repetibilidad, es la más pequeña precisión esperada. Da una idea del tipo de variabilidad que se puede esperar cuando el método es desarrollado por un mismo analista en un mismo equipo a lo largo de un periodo de tiempo corto para la cual se realizan mediciones sucesivas del mismo mesurando, bajo las mismas condiciones de medición.

Para ello analizaremos una muestra por cada nivel de la curva y repetiremos el ensayo 5 veces. Para hacer estas replicas se repite el mismo ensayo desde la pesada de la muestra inicial.

2. Reproducibilidad: Representa la precisión obtenida en los resultados comparado con otros laboratorios o diferentes analistas en diferentes días. Para la evaluación de este parámetro se analiza una muestra certificada por cada nivel de la curva y repetiremos el ensayo 5 veces. El ensayo lo realizan analistas diferentes.

Para reconfirmar este último proceso, es necesario participar en un ensayo interlaboratorio o Proficiency Testing.

La evaluación de este criterio se llevó a cabo analizando 6 muestras diferentes. Cada muestra fue analizada cinco veces por un analista (repetibilidad) y luego repetido el ensayo por un nuevo analista (reproducibilidad). Una vez concluidos los ensayos se calculó la desviación estándar de la reproducibilidad a partir de la concentración obtenida y se comparó con la obtenida a través de Horwitz de la siguiente forma.

$$RSD_h = 2^{(1-0.5 \times \log C)}$$

$$\frac{RSD_R}{RSD_h}$$

Donde C es el valor de la concentración promedio expresada en $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Criterio de aceptación: Si el valor del parámetro Horrat es igual o menor a 2 se puede decir que el método tiene valores aceptables de precisión intermedia (reproducibilidad)

Adicionalmente, establecemos el límite de repetibilidad y de reproducibilidad

2.2.7.3 LINEALIDAD

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. Se determina el rango lineal, es decir el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar el dosaje por interpolación en una curva estándar.

Pasos:

1. Se realizarán 5 curvas con un blanco y los cinco niveles de concentración declarados arriba en la preparación de los estándares de trabajo. Este procedimiento será realizado por dos analistas.
2. Se obtendrá la función de respuesta del instrumento por regresión lineal simple versus la concentración teórica.
3. Se calculará el grado de ajuste a través del coeficiente de regresión r^2 y la pendiente.

Criterio de aceptación: El coeficiente de correlación debe ser superior o igual 0.99. Adicionalmente como un mejor indicador se realizará una evaluación de la curva de calibración de forma global, analizando estadísticamente a través de la t-Student, concluyendo que la correlación lineal es significativa si se observa que la t_r es mayor que la t_{critica} .

Una vez evaluada la significancia de la correlación se establecerán los valores críticos de control de la pendiente y el intercepto.

2.2.7.4 LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación es la cantidad mínima inyectada de la muestra que puede ser cuantificada con precisión en cromatografía. Para ello se prepara una muestra con el valor más bajo de nuestra curva de calibración y se evalúa la repetibilidad y reproducibilidad del mismo.

No nos interesa buscar un punto más bajo, pues el valor de control ya está incluido en los puntos intermedios de la curva. Por debajo de este, no existen reglas de prohibición para la comercialización.

Este parámetro se evaluará conjuntamente con la repetibilidad y reproducibilidad.

Criterio de aceptación: Quedará determinado el valor del límite de cuantificación a la concentración más baja determinada y que cumpla con los criterios de aceptación de reproducibilidad.

2.2.7.5 ROBUSTEZ

Medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual.

Para llevar a cabo a robustez, tomamos como referencia el método de Placket y Burman. Este diseño está configurado para se realice un número de ensayos múltiplo de 4. Como solo tenemos 5 variables a modificar, repetiremos dos variables para completar el diseño.

Los parámetros a evaluar y la forma de variación están detallados a continuación, en la tabla 8. El resultado de este diseño nos hace reproducir el ensayo siete veces adicionales al proceso normal.

La letra que aparece representada en mayúscula, corresponde al valor de la variable normal y la letra minúscula corresponde al valor de la variable modificada.

Tabla 8: Relación de cambios estudiados en la Robustez

Variable	Factor/Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Peso de la muestra									
Normal 10 g.	A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
Variación 12 g									
Tiempo de extracción									
Normal 2 min	B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
Variación 1 min									
Tiempo de derivatización									
Normal 60 min	C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
Variación 45 min									
Tiempo de espera									
Normal: inmediato	D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
Variación 12 h									
Flujo									
Normal 1 ml.min ⁻¹	E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
Variación 1,25 ml.min ⁻¹									
Peso de la muestra									
Normal 10 g.	F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
Variación 8 g									
Tiempo de espera									
Normal: inmediato	G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Variación 6 h									

2.2.7.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo experimental de la validación se tomó como referencia la guía del organismo de acreditación ecuatoriano y las guías ICH de validación, la metodología a seguir esta detallada en cada capítulo del procedimiento de validación, donde se expresan además los criterios de aceptación para cada evaluación experimental.

Con el objetivo de resumir todo lo descrito con anterioridad, se resume en la tabla 9, los parámetros de evaluación durante la validación, el procedimiento de evaluación y los criterios de aceptación.

Tabla 9: Resumen de la forma de evaluación de la validación

Parámetro de Validación	Modo de evaluación	Criterio de aceptación
Precisión por niveles	<p>Análisis de 6 muestras de diferentes concentraciones. Cada muestra se analiza 5 veces. Los ensayos se repiten con otro analista. Se calcula:</p> <p>S_r, desviación estándar de la repetibilidad, S_R, desviación estándar de la Reproducibilidad. $RSD_h = 2^{(1-0.5 \times \log C)}$, Coeficiente de variación de Horwitz. $\frac{RSD_R}{RSD_h}$, relación de Horwitz.</p> <p>Establecer: Límite de reproducibilidad: $R = 2.8S_R$ Límite de repetibilidad $r = 2.8 S_r$</p>	$\frac{RSD_R}{RSD_h} \leq 2$
Exactitud (recuperación) en cada nivel	<p>Análisis de 5 muestras de diferentes concentraciones. Cada muestra se analiza 5 veces. Los ensayos se repiten con otro analista. Se calcula:</p> $\% \text{ Recuperación} = \frac{C_{obtenido}}{C_{esperado}} \times 100$ $t_{exp} = \left(\frac{100 - R}{C_v \times \sqrt{n}} \right)$	<p>%Recuperación entre 95% y 105%. $T_{exp} \leq t_{cal}$</p>
Límite de cuantificación	<p>Análisis de una muestra con concentración cercana al límite inferior. La muestra se analiza 5 veces. Los ensayos se repiten con otro analista. Se calcula:</p> <p>S_r, desviación estándar de la repetibilidad, S_R, desviación estándar de la Reproducibilidad.</p>	<p>Cumplir con los valores de reproducibilidad establecidos</p>
Linealidad / Función de respuesta	<p>Se analizan un blanco + 5 niveles en días diferentes (5 días x 2 analistas = 10 curvas) El intervalo de trabajo estará comprendido entre el límite de cuantificación y el mayor valor: 10.0 – 200.0 ppm</p>	$r^2 \geq 0.99$ $t_r \geq t_{critica}$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Proceso de extracción

Para la extracción de la histamina se evaluó la posibilidad de emplear tres tipos diferentes de reactivos:

1. Metanol al 75%.
2. Ácido tricloro acético (TCA) al 10%
3. Ácido perclórico 1 mol L⁻¹

Debido a la estructura de la histamina y a la complejidad de la matriz, el trabajo de extracción de esta amina biogénica desde el tejido no es tan sencillo pues la histamina una vez formada permanece en el sistema intracelular por lo que es necesario destruirlo para poder liberar la amina.

Cuando se utilizó la primera opción del metanol al 75% como reactivo de extracción, fue necesario añadir un paso adicional de calentamiento por al menos 60 min en baño María para garantizar el rompimiento del tejido y la

liberación de la amina. Esto significaba extender el tiempo de preparación y análisis de las muestras.

En las pruebas realizadas inicialmente en ausencia de calentamiento, se obtuvieron valores de recuperación a partir del 85% y solo se notó un incremento en la recuperación cuando se comenzó a calentar, además notamos que el incremento de la recuperación dependía del tiempo de exposición al calor, mostrando mayor recuperación mientras mayor tiempo se exponía la muestra al calentamiento.

El ensayo se realizó evaluando tiempos de calentamiento de 10, 20, 30, 45, 55 y 60 minutos, alcanzándose una recuperación de 99% a los 45 min y manteniéndose durante los tiempos superiores.

Tratando de eliminar el proceso de calentamiento durante la extracción se decidió hacer las pruebas con el ácido tricloro acético en solución al 10 %. Se tomó como referencia uno de los procedimientos citados (Cinquina & al, 2004) y descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, para ello se tomó 40 ml de la solución y se procedió a procesarla en un mezclador por 2 (dos) minutos. Luego se filtró y enrazó a volumen antes del proceso de derivatización.

En este procedimiento, se notó desde el primer ensayo recuperaciones superiores al 98% por lo que se decidió no proceder con el tercer ensayo de extracción propuesto, el ácido perclórico, debido a la peligrosidad que representa este reactivo tanto para la salud como para el medio ambiente.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 10 en forma de valores porcentuales de recuperación. Aquí se pueden observar los resultados individuales de cada ensayo que se le realizó a un material de referencia de FAPAS, donde se declara como valor medio 34.81ppm con límites máximos y mínimos establecidos de ± 3.12 ppm.

El ensayo se realizó cinco veces por dos analistas diferentes y el promedio de todos los ensayos arrojó un valor de recuperación de 99.1%. El valor promedio de las 10 repeticiones se reportó como 34.50 ppm.

Tabla 10: Estudio de Recuperación. Valor esperado: 34.81 ppm \pm 3.12 ppm

Valor de Referencia: 34.81 \pm 3.12ppm
Muestra de atún en agua. MRC

Analistas	I	II
Repetición 1	34.50 ppm	33.80 ppm
Repetición 2	34.75 ppm	34.95 ppm
Repetición 3	34.80 ppm	34.52ppm
Repetición 4	35.01 ppm	33.92 ppm
Repetición 5	34.01 ppm	34.70 ppm
Porcentaje de recuperación individual	99.44 %	98.76%
Porcentaje de recuperación total	99.10 %	

3.2 Proceso de derivatización

Las aminas biogénicas en general, y la histamina, tiene propiedades absorbentes muy reducidas en el UV y nulas en fluorescencia por lo que se puede decir que son prácticamente invisibles. Es por esta razón que aparece la necesidad de modificar la estructura de la histamina usando un agente cromogénico.

En la revisión realizada de las metodologías, los agentes derivatizantes más populares resultaron ser, el cloruro de dansilo y el orto-ftaldialdehído (OPT). Considerando la ventaja más importante del OPT sobre otros reactivos de derivatización de que reacciona rápidamente con aminas y permite a las aminas biógenas ser detectadas en niveles bajos, obtuvo la principal atención, lo cual se desestimó después debido a que el producto final de la reacción de la histamina con el OPT, da como resultado un compuesto con propiedades fluorogénicas muy inestable en el tiempo. Como resultado de esta inestabilidad, las propiedades absorbentes disminuyen con el tiempo

ofreciendo un grado de disminución de la señal no recomendable cuando realizamos un ensayo cromatográfico.

Este problema no se presenta cuando se elige como metodología de ensayo la derivatización post-columna, la cual consiste en derivatizar el principio activo después de su separación cromatográfica, a unos pocos min de la cuantificación. Esta metodología presenta el inconveniente del elevado costo del ensayo.

Alternativamente a este agente derivatizante, está el cloruro de dansilo, que reacciona selectivamente con las aminas biogénicas dando como resultado compuestos estables que no sólo tienen la capacidad de fluorescer sino también de absorber en el ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm. Esta última característica, nos da la ventaja de trabajar con equipos más comunes en el mercado local. Basandonos en lo expuesto anteriormente, escogimos como metodología la derivatización pre-columna, usando como agente derivatizante al cloruro de dansilo.

El proceso de derivatización se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos, obteniéndose resultados reproducibles y con excelente exactitud.

Adicional a este procedimiento se hicieron pruebas para demostrar la estabilidad del producto formado durante el proceso de derivatización, observándose que luego de 12 horas de espera no existían cambios en el resultado final. Este paso se incorporó como prueba de la robustez del método.

3.3 Análisis Cromatográfico.

La elección final de la metodología de ensayo fue llevada a un consenso luego de analizar los materiales y reactivos que teníamos disponibles en el laboratorio. Toda la bibliografía consultada usaba de preferencia una columna de fase reversa tipo octadecilsiloxano (C18) pero las opciones de la fase móvil y el flujo era muy variado.

En este trabajo se usó inicialmente una columna de tipo Lichrospher C18 de marca Merck e intentamos varias mezclas de fase móvil en forma de

gradiente e isocrática, entre ellas podemos mencionar buffer fosfato, agua acidulada con ácido clorhídrico, metanol y acetonitrilo.

El resultado fue inesperado. Casi todos los autores consultados obtenían excelentes resultados con una columna y condiciones como la que habíamos puesto a prueba. Sin embargo no se pudo reproducir ningún ensayo.

En las muestras de concentración conocida que se analizaron, se observó que el pico cromatográfico correspondiente al tiempo de retención a la histamina, no mostraba un crecimiento uniforme con el incremento de la concentración. Tampoco se obtuvieron resultados sin diferencias significativas comparadas con los resultados obtenidos utilizando un método acreditado y referenciado a nivel internacional.

Se procedió entonces a evaluar la señal cromatográfica de cada uno de los componentes que formaban parte de la derivatización.

Como era de esperarse, la acetona y el hidrogenocarbonato de sodio permanecieron invisibles a la longitud de onda seleccionada, 254 nm. El ácido tricloro acético presentó una lectura elevada pero no correspondía al analito de interés pues su señal se manifestaba junto con el frente de solvente, en los primeros minutos del análisis cromatográfico.

Este resultado fue diferente cuando se analizó la solución de cloruro de dansilo en ausencia de histamina manteniendo siempre las mismas condiciones de ensayo. La señal mostrada en este caso coincidía exactamente en el tiempo a la señal que mostraba el producto de la derivatización de la histamina con el cloruro de dansilo. Sólo que esta vez el área bajo la curva era mayor.

Aunque se intentó resolver estos dos picos modificando las condiciones de la fase móvil, la respuesta siempre fue negativa. Por eso se decidió hacer un cambio de columna por una de mayor pureza y resolución según especificaciones del fabricante.

La columna elegida fue la Purospher Star C18 empacada con las mismas dimensiones de la anterior.

Una vez más se procedió al ensayo para verificar la efectividad del cambio y el resultado obtenido fue la resolución completa de los picos del cloruro de dansilo y del producto derivado de la reacción de la histamina con el cloruro de dansilo. Esta verificación se realizó con el material de referencia certificado.

Las figuras 3 y 4 a continuación muestran los cromatogramas obtenidos con las dos columnas: Lichrospher y Purospher.

Figura 3: Cromatograma obtenido con la columna Lichrospher

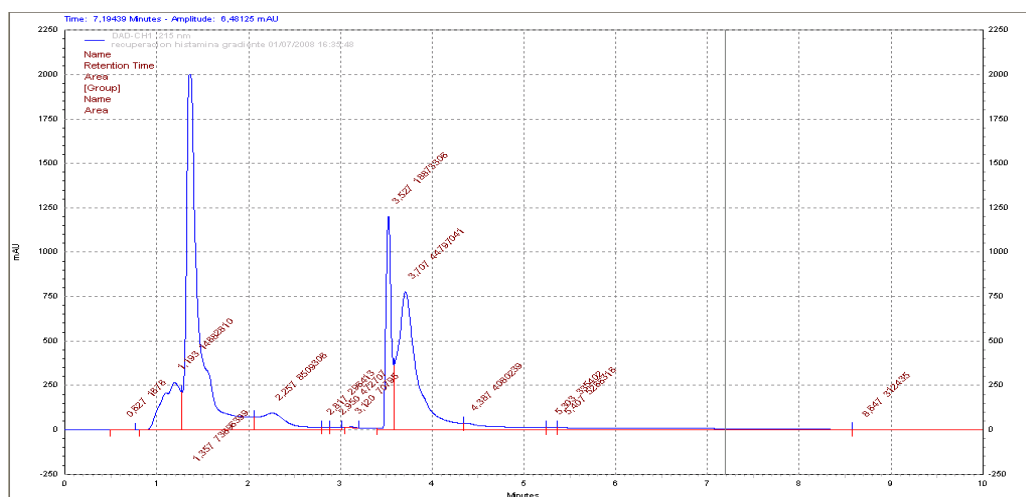
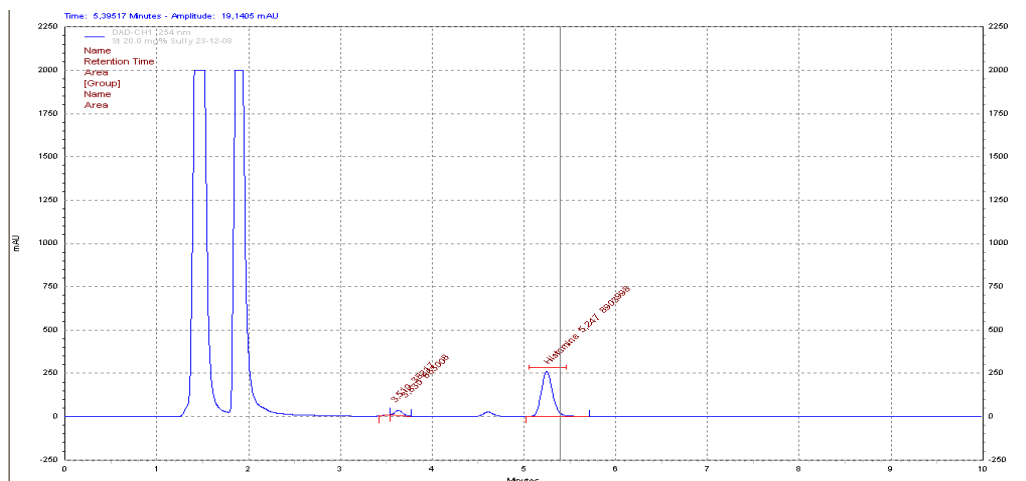


Figura 4: Cromatograma obtenido con la columna Purospher



3.4 Validación del método

3.4.1 Selectividad

La prueba de selectividad fue demostrada cuando se ponía a punta el método cromatográfico y consiste en comprobar gráficamente que en el tiempo de retención de nuestro analito de interés, no co-eluye ningún otro analito sea interferente o de interés. Esta comprobación también pudimos evaluarla inyectando individualmente cada uno de los componentes individuales de la muestras, todos bajo las mismas condiciones cromatográficas y verificando que el tiempo de retención de mi interés está designado solo para el compuesto que quiero determinar, la histamina.

3.4.2 Linealidad

Los cinco estándares preparados se inyectaron individualmente de menor a mayor concentración luego de la derivatización. Con las áreas obtenidas y los valores teóricos de concentración se procedió a graficarlos y evaluar la linealidad mediante la regresión correspondiente.

Este procedimiento se realizó cinco veces por cada analista en días diferentes completando 10 curvas de calibración. Se observó linealidad en el rango de trabajo establecido. El valor mínimo observado para el coeficiente de correlación fue de 0,9986, cumpliendo con el criterio de aceptación planteado. El resumen de los datos de cada una de las curvas se muestra en la tabla 11.

Para confirmar estadísticamente la correlación entre las variables obtenidas (Absorbancia) en función de las asignadas (concentración), se calculó la t-Student (t_r) y se comparó con el valor crítico tabulado para $n-2$ grados de libertad y 95% de confianza. Este valor crítico para 3 grados de libertad en una distribución de dos colas es de 3.182, que en todos los casos resultó ser menor que el determinado experimentalmente para cada una de las curvas. Estos valores se encuentran tabulados en la misma tabla 11.

Tabla 11 Resumen de valores estadísticos obtenidos de cada curva.

N. de Curvas.	Pendiente	Intercepto	r^2	Error tipo Sy/x	t_r
Curva 1	443494.7721	-68211.0366	0.9998	64364	157.06
Curva 2	448413.5616	-106368.1996	0.9994	104372	97.92
Curva 3	458719.3780	-53312.0593	1.0000	18338	570.20
Curva 4	443038.7063	-93901.1561	0.9997	68937	146.50
Curva 5	435424.8591	-86054.0716	0.9998	58274	170.32
Curva 6	445900.1555	-86730.7352	0.9995	91578	110.98
Curva 7	432584.0142	-82039.9040	0.9996	78179	126.12
Curva 8	432055.7991	-87382.7333	0.9995	89406	110.15
Curva 9	423448.4015	-126177.1307	0.9986	148167	65.13
Curva 10	445989.4919	-104604.2910	0.9991	121615	83.60

Para mayor efectividad de control de calidad y con el objetivo de percatarnos de una falla en el método de ensayo procedimos a calcular los valores de confianza de la pendiente y el intercepto como forma de control interno para verificar la reproducibilidad del ensayo en eventos futuros.

Todos los cálculos se realizaron mediante la ayuda del Excel teniendo en cuenta las formulas estadísticas desarrolladas para tal interés y que aparecen detalladas en la figura 5.

El gráfico 3 muestra la curva de calibración obtenida experimentalmente como promedio de los diez ensayos donde desarrollamos las curvas (color verde) y muestra también los gráficos lineales de las dependencias de la concentración con el área para los límites superiores (de color rojo) e inferiores (de color azul) que se estableció como límites superiores e inferiores de alerta.

Por último, la figura 6 muestra los cromatogramas superpuestos de los gráficos instrumentales obtenidos de la inyección de cada uno de los 5 estándares de la curva de calibración, evidenciando la repetibilidad en el tiempo de retención luego de las cinco inyecciones.

Figura 5: Detalle de fórmulas matemáticas para la evaluación estadística de la linealidad

<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p>Calculo de la pendiente b_{yx}</p> $b_{yx} = \frac{\sum\{(X_i - \bar{X}) * (Y_i - \bar{Y})\}}{\sum(X_i - \bar{X})^2}$ </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p>Calculo del Intercepto a_{yx}</p> $a_{yx} = \frac{\sum Y_i - b_{yx} \sum X_i}{n}$ </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p>Calculo del $y_{estimado}$</p> <p>Se determina a partir de la ecuación de la recta $y = a + bx$</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p>Calculo del Error Tipo S_{yx}</p> <p>Se estima a partir de :</p> $S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum(y_{obs} - y_{estm})^2}{n - 2}}$ </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p>Calculo de la Desviación Estandar S_b</p> $S_b = \frac{S_{yx}}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2}}$ </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p>Calculo de la Desviación Estandar S_a</p> $S_a = S_b \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n}}$ </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 10px;"> <p>Calculo de la Unidad de Concentración S_{xy}</p> $S_{xy} = \frac{S_{yx}}{b}$ </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;"> <p>Calculo del Coeficiente de Correlación r</p> $r = \frac{\sum(X_i - \bar{X}) * (Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2 * \sum(Y_i - \bar{Y})^2}}$ </div>
--	---

Gráfico 3: Curva de calibración promedio con los límites máximos y mínimos de alerta

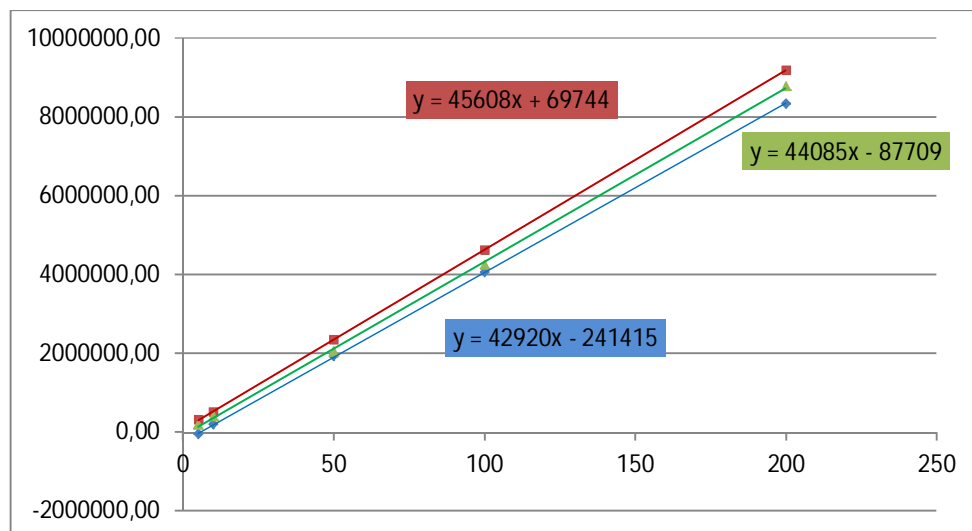
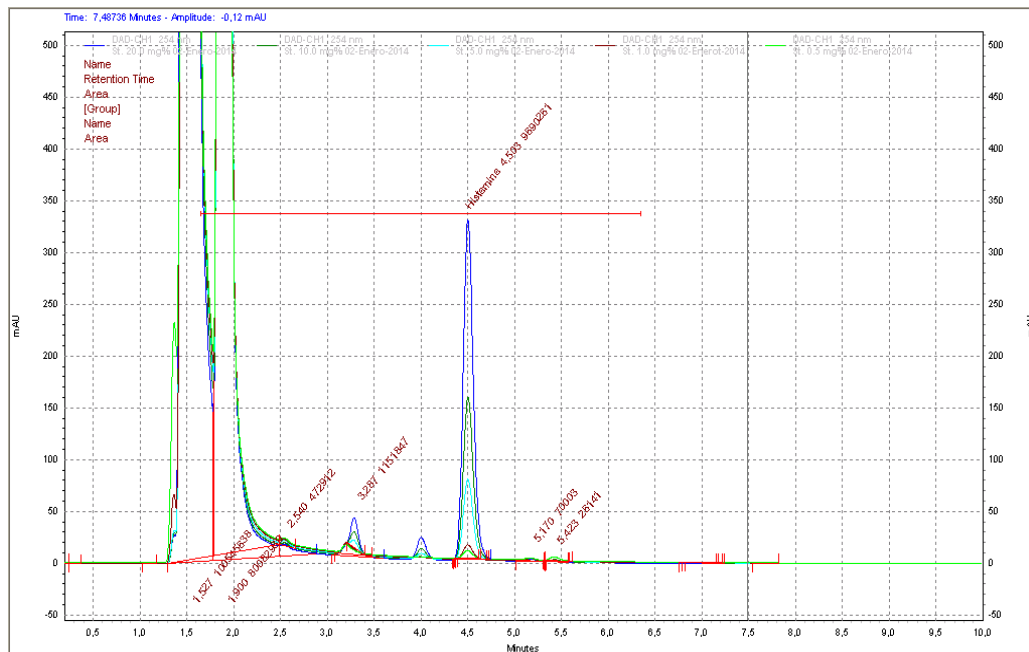


Figura 6: Cromatogramas superpuestos de las 5 inyecciones correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración.



3.4.3 Repetibilidad y Reproducibilidad del método de ensayo

Para llevar a cabo el ensayo de repetibilidad y reproducibilidad se tomaron muestras de concentraciones diferentes y conocidas. Cada una de estas muestras fue evaluada previamente por un método certificado y acreditado en el laboratorio. Entre estas muestras se incluyó un material de referencia certificado FAPAS.

El número de muestras fueron seis, tomando la primera con un valor asignado cercano a mi límite de cuantificación, la sexta, con valor asignado cerca del punto máximo de mi rango lineal y las otras cuatro en puntos cercanos a mis puntos de calibración.

Cada una de estas muestras fue analizada independientemente cinco veces por un analista para evaluar la repetibilidad y luego se añadió un nuevo analista que repitió los mismos ensayos en días diferentes y se evaluó la reproducibilidad.

La tabla 12 muestra los valores de concentración obtenidos en cada nivel de ensayo para cada analista. Al final de la tabla se muestran los resultados del análisis estadístico para la repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 12: Precisión en términos de reproducibilidad y repetibilidad

Parámetros	nivel 1	nivel 2	nivel 3	nivel 4	nivel 5	nivel 6
Analista I	9.48	14.79	39.23	67.94	100.57	149.43
	9.44	15.68	37.76	67.94	99.73	145.18
	9.46	15.62	38.95	67.34	101.52	148.77
	9.37	15.71	38.17	67.77	99.00	150.67
	9.38	15,00	38.67	66.95	99.70	154.11
Analista II	9.29	15.05	39.79	65.29	98.66	145.79
	9.33	15.61	41.53	65.21	100.66	154.33
	9.43	15.84	40.78	65.36	100.39	148.49
	9.39	15.59	39.81	67.72	100.10	149.47
	9.54	15.22	39.56	67.40	101.72	149.04
promedio	9.41	15.41	39.43	66.89	100.21	149.53
S _{ri}	0.05	0.43	0.59	0.43	0.97	3.23
S _{rii}	0.10	0.32	0.84	1.25	1.10	3.09
SR	0.07	0.36	1.14	1.15	0.98	2.98
RSD _r	0.52	2.80	1.50	0.64	0.97	2.16
RSD _R	1.03	2.08	2.12	1.87	1.10	2.07
RSD _{Horwitz}	11.42	10.60	9.20	8.50	8.00	7.53
lim r	0.21	1.06	2.03	2.62	2.91	8.86
lim R	0.22	1.12	3.89	3.62	3.16	9.69
HorRat	0.07	0.24	0.38	0.23	0.14	0.31

Las variables repetibilidad (r) y reproducibilidad (R) se evaluaron a través del cálculo de la Desviación Estándar (S) y el coeficiente de variación (RSD) para cada una.

El otro criterio que se consideró para evaluar la variación intralaboratorio (reproducibilidad) fue en base a coeficiente de variación de Horwitz (RSD_{Horwitz}), que considera aceptable la variación cuando el coeficiente de variación del método producto del ensayo de reproducibilidad (RSD_R) es inferior al determinado según la ecuación:

$$RSD_h = 2^{(1-0.5 \times \log C)}$$

Donde C es el valor de la concentración promedio expresada en $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Adicional a esto, se utilizó como forma de evaluación estadística, la relación de Horwitz (HorRat), que consiste en comparar la varianza de la reproducibilidad versus la obtenida teóricamente por la ecuación expuesta con anterioridad.

$$\frac{RSD_R}{RSD_h}$$

En este sentido se establece como criterio de aceptación que los valores resultado de esta relación deben ser inferiores a 2. Valores superiores a 2 pueden indicar falta de homogeneidad de las muestras, necesidad de optimizar el método, operaciones bajo el límite de cuantificación o un método no satisfactorio.

Los valores estadísticos de estos dos últimos parámetros están tabulados en la Tabla 10, expuesta anteriormente.

En el gráfico 4 puede observarse mediante barras el decrecimiento de la variación de Horwitz según aumentaban los valores de concentración.

Adicional, en el gráfico 5, se representa la relación de Horwitz (HorRat) para cada nivel, observándose que se mantiene dentro de los criterios de aceptación declarados en el procedimiento. Por último la tabla 13 muestra el resumen del estudio de precisión.

Gráfico 4: Valores de varianza de Horwitz para cada nivel de ensayo.

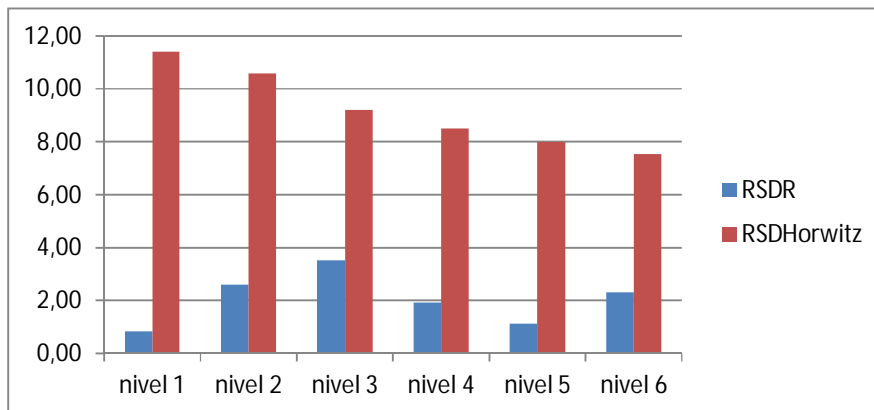


Gráfico 5: Representación de la relación de HorRat dentro del rango de aceptación según los criterios de validación

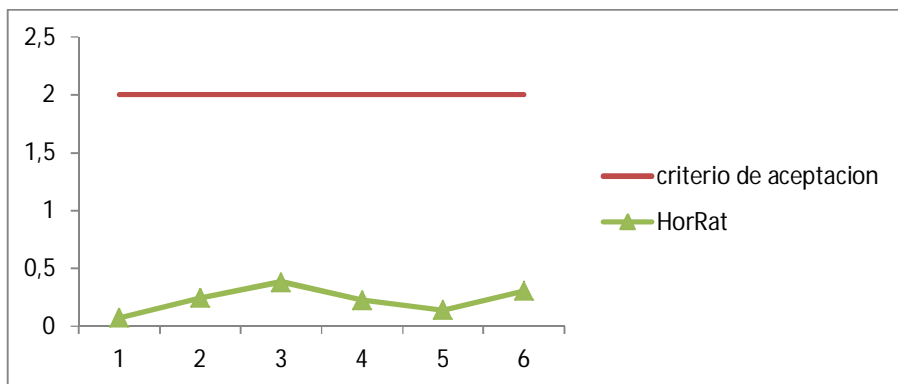


Tabla 13: Resumen del estudio de Precisión

Nivel	% RSD Experiment.	% RSD Horwitz	Criterio de precisión	Conclusión
I	1.03	11.42	$RSD_{Exp.} < RSD \text{ Horwitz}$	El método es preciso
II	2.08	10.60	$RSD_{Exp.} < RSD \text{ Horwitz}$	El método es preciso
III	2.12	9.20	$RSD_{Exp.} < RSD \text{ Horwitz}$	El método es preciso
IV	1.87	8.50	$RSD_{Exp.} < RSD \text{ Horwitz}$	El método es preciso
V	1.10	8.00	$RSD_{Exp.} < RSD \text{ Horwitz}$	El método es preciso
VI	2.07	7.53	$RSD_{Exp.} < RSD \text{ Horwitz}$	El método es preciso

3.4.4 Recuperación (Exactitud)

Realmente los ensayos de validación no representan ensayos aislados de un método pues para poder desarrollar este y establecerlo como idóneo, es necesario someterlo a una serie de pruebas para estar seguros de su efectividad. Una de las pruebas que más se hace es la recuperación

debido a que nos da información de los errores que pudimos cometer en el proceso de ensayo.

Los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad que se realizaron se llevaron a cabo con material enriquecido con un valor conocido del analito. Es por ello que tomamos los mismos datos para analizar el resultado en cuanto a la recuperación.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra.

Para evaluar la recuperación se analizó muestras de concentración conocida repetidamente por dos analistas, de forma tal que se completaron 10 repeticiones por cada nivel.

En cada uno de estos niveles evaluados, se determinó el valor de la t_{exp} según la fórmula detallada a continuación y se le comparó con la t_{tab} para 9 grados de libertad y 95% de confianza.

$$t_{exp} = \left(\frac{100 - R}{C_v \times \sqrt{n}} \right)$$

donde R es el valor de recuperación calculado para cada nivel, n corresponde al número de datos obtenidos por nivel y C_v , el coeficiente de variación.

Si $t_{exp} < t_{tab}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100 %, confirmándose la buena exactitud del método.

En las tablas de la 14 a la 18, se resume los resultados para los valores evaluados, observándose valores de recuperación en el rango desde 96.57% hasta 102.75%. Por último en la tabla 19, se muestran los resultados de la significancia usando la t de student, confirmándose la exactitud en cada rango evaluado y por lo tanto del método

Tabla 14: Estudio de recuperación, resultados para el primer nivel

Valor de referencia 15.00	
Conc (ppm)	Recuperación (%)
14.79	98.60
15.68	104.55
15.62	104.16
15.71	104.76
15.00	99.97
15.05	100.34
15.61	104.05
15.84	105.58
15.59	103.95
15.22	101.49
promedio	102.75
SD	2.42
CV%	2.36

Tabla 15: Estudio de recuperación, resultados para el segundo nivel.

Valor de referencia 39.10	
Conc (ppm)	Recuperación (%)
39.23	100.33
37.76	96.57
38.95	99.61
38.17	97.62
38.67	98.91
39.79	101.78
43.53	111.33
40.78	104.31
39.81	101.81
39.56	101.18
promedio	101.34
SD	4.16
CV%	4.10

Tabla 16: Estudio de recuperación, resultados para el tercer nivel.

Valor referencia 67.2		
Conc (ppm)	Recuperación (%)	
67.94	101.09	
67.94	101.10	
67.34	100.21	
67.77	100.84	
66.95	99.63	
65.29	97.15	
65.21	97.03	
65.36	97.26	
67.72	100.78	
68.40	101.79	
promedio	66.99	99.69
SD	1.24	1.84
CV%	1.85	1.85

Tabla 17: Estudio de recuperación, resultados para el cuarto nivel.

Valor referencia 98.9		
Conc (ppm)	Recuperación (%)	
100.57	101.68	
99.73	100.84	
101.52	102.65	
99.00	100.10	
99.70	100.81	
98.66	99.76	
100.66	101.77	
100.39	101.51	
100.10	101.22	
101.72	102.85	
promedio	100.20	101.32
SD	0.98	1.00
CV%	0.98	0.98

Tabla 18: Estudio de recuperación, resultados para el material de referencia certificado.

Valor referencia 34.81		
Conc (ppm)	Recuperación (%)	
34.50	99.11	
34.75	99.83	
34.80	99.97	
35.01	100.57	
34.01	97.70	
33.80	97.10	
34.95	100.40	
34.52	99.17	
33.92	97.44	
34.70	99.68	
promedio	34.50	99.10
SD	0.44	1.26
CV%	1.27	1.27

Tabla 19: Resultados de la evaluación estadística de significancia

Nivel evaluado	T_{exp}	t_{tab}	existe diferencia significativa
nivel 1	0.230	2.262	No
nivel 2	0.102	2.262	No
nivel 3	0.053	2.262	No
nivel 4	0.419	2.262	No
MRC	0.227	2.262	No

3.4.5 Robustez

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado y describir bajo qué condiciones analíticas se pueden obtener resultados confiables.

Los parámetros a modificar fueron expuestos en la tabla 8 del capítulo de materiales y métodos. Usando el test de Placket y Burman, los ensayos quedaron configurados de la siguiente forma, quedando configurados 8 ensayos, del cual debemos obtener 8 resultados de concentración (s al z). Ver tabla 20

Tabla 20: Diseño experimental de Robustez

	Peso muestra	Tiempo de Extracción	Tiempo Derivatización	Tiempo de espera	Flujo	Peso muestra	Tiempo de espera
Condiciones normales	10 g	extraer x 2min	derivatizar 60 min	enfriar y analizar	1ml.min ⁻¹	10 g	enfriar y analizar
Ensayo 1	10 g	extraer x 2min	derivatizar 45 min	enfriar y analizar	1.25 ml.min ⁻¹	8 g	Esperar 8h y analiza
Ensayo 2	10 g	extraer x 1min	derivatizar 60 min	Esperar 12 h y analizar	1ml. min ⁻¹	8 g	Esperar 8h y analiza
Ensayo 3	10 g	extraer x 1min	derivatizar 45 min	Esperar 12 h y analizar	1,25 ml.min ⁻¹	10 g	enfriar y analizar
Ensayo 4	12 g	extraer x 2min	derivatizar 60 min	Esperar 12 h y analizar	1,25 ml. min ⁻¹	10 g	Esperar 8h y analiza
Ensayo 5	12 g	extraer x 2min	derivatizar 45 min	Esperar 12 h y analizar	1ml. min ⁻¹	8 g	enfriar y analizar
Ensayo 6	12 g	extraer x 1min	derivatizar 60 min	enfriar y analizar	1,25 ml. min ⁻¹	8 g	enfriar y analizar
Ensayo 7	12 g	extraer x 1min	derivatizar 45 min	enfriar y analizar	1 ml.min ⁻¹	10 g	Esperar 8h y analiza

Una vez obtenido los resultados comparamos la diferencia del promedio del ensayo original con el modificado y lo comparamos con la desviación estándar de los resultados **s a z**.

Expresándolo matemáticamente, queda así:

$$A - a = V_A = \frac{1}{4}(s + t + u + v) - \frac{1}{4}(w + x + y + z)$$

$$B - b = V_B = \frac{1}{4}(s + t + w + x) - \frac{1}{4}(u + v + y + z)$$

$$C - c = V_C = \frac{1}{4}(s + u + w + y) - \frac{1}{4}(t + v + x + z)$$

$$D - d = V_D = \frac{1}{4}(s + t + y + z) - \frac{1}{4}(u + v + w + x)$$

$$E - e = V_E = \frac{1}{4}(s + u + x + z) - \frac{1}{4}(t + v + w + y)$$

$$F - f = V_F = \frac{1}{4}(s + v + w + z) - \frac{1}{4}(t + u + x + y)$$

$$G - g = V_G = \frac{1}{4}(s + v + x + y) - \frac{1}{4}(t + u + w + z)$$

Las tablas 21 y 22 muestran los resultados de la comparación, observándose que ninguno de los cambios produce resultados ficticios o fuera de rango.

Tabla 21: Resultados del ensayo de Robustez.

Variable	Clave	Valor Normal	Valor mod..	Análisis							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Peso Muestra	A/a	10 g	12 g	10 g	10 g	10 g	10 g	12 g	12 g	12 g	10 g
Tiempo extracción	B/b	2 min	1 min	2 min	2 min	1 min	1 min	2 min	2 min	1 min	1 min
Tiempo de derivatización	C/c	60 min	45 min	60 min	45 min	60 min	45 min	60 min	45 min	60 min	45 min
Tiempo de espera	D/d	Inm.	12 h	Inm.	Inm.	12 h	12 h	12 h	12 h	Inm.	Inm.
Flujo FM (ml. min ⁻¹)	E/e	1	1.25	1	1.25	1	1.25	1.25	1	1.25	1
Peso Muestra	F/f	10 g	8 g	10 g	8 g	8 g	10 g	8 g	10 g	10 g	8 g
Tiempo de espera	G/g	inm.	6 h	inm.	6 h	6 h	inm.	6 h	inm.	inm.	6 h
Resultados				s	t	u	v	w	x	y	z
				3.727	3.359	3.370	3.148	3.223	3,407	3,392	3,209

Al comparar las diferencias calculadas con el valor de la desviación estándar de los valores representados desde s hasta z , multiplicada por la raíz cuadrada de 2, podremos afirmar que el método no se afecta por el cambio representado por la letra en cuestión si los valores de las diferencias son menores al de la desviación estándar obtenida.

$$\text{Si } [V_x] < DS\sqrt{2} \text{ no hay diferencia significativa.}$$

Como podemos observar en la tabla 22, ninguno de los parámetros evaluados en la robustez mostró cambios significativos en el resultado, por lo que podemos afirmar que el método es robusto en los parámetros relacionados en la tabla.

Tabla 22: Comparación estadística del ensayo de robustez

Condición Variable		Resultados		Diferencia	Comparación
Normal	Modificado	Promedio X	Promedio x	$ X - x $	
A	a	3.401	3.287	0.115	no sensible a cambio
B	b	3.429	3.259	0.171	no sensible a cambio
C	c	3.407	3.281	0.126	no sensible a cambio
D	d	3.401	3.287	0.114	no sensible a cambio
E	e	3.428	3.260	0.169	no sensible a cambio
F	f	3.327	3.361	0.034	no sensible a cambio
G	G	3.397	3.291	0.107	no sensible a cambio
factor de comparación $DS\sqrt{2}$					0.283

3.4.6 Reporte de Validación

TIPO DE ENSAYO CUANTITATIVO <input checked="" type="checkbox"/> CUALITATIVO <input type="checkbox"/> DE IDENTIFICACIÓN <input type="checkbox"/>	PARÁMETRO: Histamina UNIDADES: ppm TIPO DE MATRIZ: Harinas de pescado, camarón crudo, pescado fresco, atún, sardinas
REFERENCIA DEL MÉTODO: (Cinquina & al, 2004)	

PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	CRITERIO	RESULTADO																																																																								
SELECTIVIDAD	Criterio cualitativo	Tiempo de retención único para el analito de interés																																																																								
LINEALIDAD	$r^2 \geq 0.99$ Establecimiento de los rangos de pendiente e intercepto	$r^2 = 0.9987$ pendiente: 42920 a 45608 intercepto: -24141 a 69744																																																																								
EXACTITUD	95 - 105 %	100.84%																																																																								
PRECISIÓN	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="3">REPETIBILIDAD</th> <th colspan="3">REPRODUCIBILIDAD</th> <th colspan="2"></th> </tr> <tr> <th>NIVEL</th> <th>Sr</th> <th>RSDr</th> <th>lim r</th> <th>SR</th> <th>RSDR</th> <th>lim R</th> <th>RSDHorwitz</th> <th>HorRat</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>I: 9.41</td> <td>0.08</td> <td>0.81</td> <td>0.21</td> <td>0.08</td> <td>0.84</td> <td>0.22</td> <td>11.42</td> <td>0.07</td> </tr> <tr> <td>II: 15.41</td> <td>0.38</td> <td>2.47</td> <td>1.06</td> <td>0.40</td> <td>2.58</td> <td>1.12</td> <td>10.60</td> <td>0.24</td> </tr> <tr> <td>III: 39.43</td> <td>0.72</td> <td>1.84</td> <td>2.03</td> <td>1.39</td> <td>3.52</td> <td>3.89</td> <td>9.20</td> <td>0.38</td> </tr> <tr> <td>IV: 66.89</td> <td>0.94</td> <td>1.40</td> <td>2.62</td> <td>1.29</td> <td>1.93</td> <td>3.62</td> <td>8.50</td> <td>0.23</td> </tr> <tr> <td>V: 100.21</td> <td>1.04</td> <td>1.04</td> <td>2.91</td> <td>1.13</td> <td>1.13</td> <td>3.16</td> <td>8.00</td> <td>0.14</td> </tr> <tr> <td>VI: 149.53</td> <td>3.16</td> <td>2.12</td> <td>8.86</td> <td>3.46</td> <td>2.32</td> <td>9.69</td> <td>7.53</td> <td>0.31</td> </tr> </tbody> </table>			REPETIBILIDAD			REPRODUCIBILIDAD					NIVEL	Sr	RSDr	lim r	SR	RSDR	lim R	RSDHorwitz	HorRat	I: 9.41	0.08	0.81	0.21	0.08	0.84	0.22	11.42	0.07	II: 15.41	0.38	2.47	1.06	0.40	2.58	1.12	10.60	0.24	III: 39.43	0.72	1.84	2.03	1.39	3.52	3.89	9.20	0.38	IV: 66.89	0.94	1.40	2.62	1.29	1.93	3.62	8.50	0.23	V: 100.21	1.04	1.04	2.91	1.13	1.13	3.16	8.00	0.14	VI: 149.53	3.16	2.12	8.86	3.46	2.32	9.69	7.53	0.31
		REPETIBILIDAD			REPRODUCIBILIDAD																																																																					
	NIVEL	Sr	RSDr	lim r	SR	RSDR	lim R	RSDHorwitz	HorRat																																																																	
	I: 9.41	0.08	0.81	0.21	0.08	0.84	0.22	11.42	0.07																																																																	
	II: 15.41	0.38	2.47	1.06	0.40	2.58	1.12	10.60	0.24																																																																	
	III: 39.43	0.72	1.84	2.03	1.39	3.52	3.89	9.20	0.38																																																																	
	IV: 66.89	0.94	1.40	2.62	1.29	1.93	3.62	8.50	0.23																																																																	
V: 100.21	1.04	1.04	2.91	1.13	1.13	3.16	8.00	0.14																																																																		
VI: 149.53	3.16	2.12	8.86	3.46	2.32	9.69	7.53	0.31																																																																		
RANGO DE TRABAJO	10 a 200 ppm																																																																									
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	9.41 ppm																																																																									
ROBUSTEZ	<ul style="list-style-type: none"> ✓ El método es robusto al modificar el peso de muestra de 10 g a 12 g ✓ El método es robusto al modificar el flujo de la fase móvil de 1.0 a 1.25 ml. min⁻¹ ✓ El método es robusto al modificar el tiempo de extracción de 2 a 1 min. ✓ El método es robusto al modificar el tiempo de derivatización de 60 min a 45 min. ✓ El método es robusto al modificar el tiempo de espera desde inmediato a 12 h. ✓ El método es robusto al modificar el peso de muestra de 10 g a 8 g. ✓ El método es robusto al modificar el tiempo de espera desde inmediato a 6 h. 																																																																									
CONCLUSIONES	El método cumple con los parámetros de validación propuestos según los Criterios de Aceptación a un nivel de Confianza de 95 %.																																																																									

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método rápido, sencillo y con alto nivel de precisión y recuperación para la determinación de histamina en productos derivados de la pesca. Se logró optimizar los tiempos totales de ensayo y la reducción del uso de reactivos y solventes.
2. La técnica propuesta se validó según los criterios internacionales de la Unión Europea y la FDA, de esta forma se lograron los objetivos propuestos para exactitud, selectividad, precisión y linealidad en el rango de trabajo desde 10 hasta 200 ppm.
3. El límite de cuantificación establecido de 10 ppm fue apropiado pues puede reproducirse con facilidad y está por debajo del valor máximo de control establecido por los entes de regulación y control nacionales.
4. El método desarrollado y validado, usando cromatografía líquida de alta resolución, cumple con las especificaciones establecida por la Unión Europea a través del reglamento número 2073 del año 2005 para el control de productos alimenticios.

5. Se comprobó la exactitud en todo el rango de trabajo establecido usando material de referencia certificado y muestras enriquecidas, obteniéndose una recuperación promedio de entre 99 y 101%.

6. Por último, se demostró la robustez del método al comprobar que se obtenían resultados reproducibles al modificar las variables analíticas más importantes del método.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones. (2013). *Análisis del sector Pesca*.
2. AOAC, O. M. (2003). Histamine in seafood. *AOAC*, 35.1.32.
3. Ben-Gigirey B, C. C. (1998). Histamine formation in Albacore muscle analyzed by AOAC and enzymatic methods. *Journal of Food Sciences* (63) 2, 210-214.
4. Bomke S., S. B. (2005). Determination of biogenic amines in food samples using derivatization followed by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and food Chemistry v. 53*, 247-256.
5. Brillantes, S., & Samorsorn, W. (2001). Determination of histamine in fish souce from Thailand using a solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Fish Sci.* 67, 1163-1168.
6. Bulushi, A., & al, e. (2009). Biogenic amines in fish, roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 369-377.

7. César de la Torre, C. C.-J. (2013). Chromatographic methods for biogenic amines determination in foods of animal origin. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo*, v. 50, n. 6, 430-446.
8. Chen h.W., e. a. (2010). Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Control* 21, 13-18.
9. Cinquina A.L., e. a. (2004b). Determination of Biogenic amines in fish tissue by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *J.Chromatogr.* 1032, 73-77.
10. Cinquina, A. L., & al, e. (2004). Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *J. Chromatogr. v. 1032*, 79-85.
11. CPMP/ICH/381/95. (1995). *Note for guidance on validation of analytical methods: Definitions and Terminology*. LONDON: ICH.
12. Dadáková E., K. M. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry v 116* , 365-370.
13. De Mey E., e. a. (2012). Dabsyl derivitization as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry v 130*, 1017-1023.
14. De Sousa V, B. M. (1991). Las aminas biogénicas como medida de la calidad de los productos pesqueros. *Alimentaria 2 (32)*, 51-58.
15. FDA. (1998). APPENDIX 5: FDA and EPA Safety Levels in Regulations and Guidance.
16. García, E., & Ibañez, G. (2013). La Importación de Alimentos de EE.UU. Requisitos y procedimientos de la FDA. *FDA*.

17. Gloria M.B.A., S. P. (2011). Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. *International Journal of Dairy Technology*. v. 64, 45-51.
18. Greif G, G. M. (1997). Determination of biogenic amines in foods of animal origin by HPLC. *Czech J. Food Sci* 15 (2), 119-129.
19. Guizani N, A.-B. M.-B. (2004). The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Research International*, 38, 215-222.
20. Hui, J. L., & Taylor, S. (1983). High Pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in food. *J. AOAC Int.* 66, 853-857.
21. Hungerford, J., & Wu, W. H. (2012). Comparison study of three rapid test kits for histamine in fish. *Food Control* 25, 448-457.
22. Hungerford, J. M. (2010). Scambroid poisoning: a review. *Toxicon* 56, 231-243.
23. Hwang BS, W. J. (2003). A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish product. *Food Chemistry*, 82, 329-334.
24. ISO 5725-2. (1994). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.*
25. ISO 5725-4. (1994). *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part4: Basic method for the determination of the trueness of a standard measurement method.*
26. Izquierdo, P., Allara, M., & Torres, G. (2004). Aminas Biogénicas y crecimiento Bacteriano en carne de hamburguesas. *Revista Científica FCV-LUZ vol 14*, 07-11.

27. Izquierdo, P., Andrea, L., Allara, M., González, P., García, A., & Valecillos, Y. (2004). EVALUACIÓN BACTERIOLÓGICA Y CONTENIDO DE HISTAMINA EN PESACADO DESMENUZADO PRECOCIDO EN VENEZUELA. *Revista Científica no 005*, 467-473.
28. Jeya Shakila R., V. T. (2001). A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry v. 75*, 255-259.
29. Lanfranco C., M. S. (2011). HPLC in food analysis. En C. D., *Handbook of HPLC* (págs. 562-649). Boca Ratón: CRC Press.
30. Lehane I., a. O. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol. 58*, 1-37.
31. Lucía Cruz, D. R. (s.f.). *Programa Maricultura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León*. Recuperado el 28 de 11 de 2015, de http://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/20cru2.pdf
32. Lynch M., e. a. (2006). Surveillance for foodborne-disease outbreaks, United Stated, 1998-2002. *MMWR CDS Surveill Summ 33*, 1-34.
33. MAGAP. (s.f.). *COMERCIO EXTERIOR*. Recuperado el 28 de 11 de 2015, de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/pescado-ce>
34. Marks H., a. A. (2006). Rapid determination and confirmation of biogenic amines in tuna loin by gass chromatography/mass spectrometry using ethylchloroformate derivative. *J.AOAC Int 81*, 1591-1599.
35. Merson MH, e. a. (1974). Scambroid fish poisoning, outbreak traced to commercially canned tuna fish. *J. Am. Med. Assoc. 228*, 1268-1269.
36. Mietz, J. L., & Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of descomposition. *J. AOAC Int. 61*, 139-145.

37. Ministerio de Comercio exterior. (2014). *COMERCIO EXTERIOR*. Recuperado el 22 de noviembre de 2015, de <http://www.comercioexterior.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/05/Plan-Estrategico-Institucional-2014-2017-4.compressed.pdf>
38. Molinari, e. a. (1989). Hygienic and health importance of histamine as an unhealthy factor in several food products. *Ann. Ig.* 1, 637-646.
39. Moret S., C. L. (1996). High performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food and analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A.* vol 729, 363-369.
40. Moret, S., Bartolomeazzi, R., & Lercker, G. (1992). Improvement of extraction procedures for biogenic amines in food and their high-performance liquid chromatographic determination. *Journal of Chromatography A.* v591, 174-180.
41. National Association of Testing Authorities (NATA), I. (2013). *Guideline Technical Note 17 - Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods*. Australia: Copyright National Association of Testing Authorities.
42. Navarro, M. (1991). Valor Nutritivo del pescado. Pesado fresco. *Revista Agroquímica Tecnología de Alimentos* V 31, 330-342.
43. NORMA INTERNACIONAL ISO/IEC 17025:2005. (2006). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. Suiza: INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARIZATION.
44. Onal, A. (2007). A review: current analytical method for the determination of biogenic amines in food. *Food Chemistry* v. 103 n.4, 1475-1486.

45. Pooladgar., e. a. (2013). The changes evaluation of biogenic amines (histamine) by HPLC, in shanak yellow fin fish (ACANTHOPAGRUS LATUS) within 18 days of ice storage. *Ind. J. Sci. Res. and Tech.*, 29-34.
46. Prell, G. D., & Green, J. P. (1986). Histamine as a neuroregulator. *Annu Rev. Neurosci.* 9, 209-254.
47. Quineche, F. (s.f.). AMINOACIDOS EN LA HARINA DE PESCADO. En FAO.
48. REGLAMENTO (CE) no 2073/2005. (2005). Reglamento relativo a los criterios microbiológicos aplicable a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, 11-14.
49. Rodrigues B.L., e. a. (2013). Concentration of biogenic amines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) preserved in ice and its relationship with physicochemical parameters of quality. *Journal of Aquaculture, Research and Development*. V.4, 174.
50. Rokka M., e. a. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere package broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. B. Biogenics amines as quality indicating metabolites. *Food Control* v 15, 601-607.
51. Saaid M., S. B. (2009). Determination of biogenic amines in selected Malasyan food. *Food Chemistry* v. 113, 1356-1362.
52. Saccani G., T. E. (2005). Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by suppressed ion chromatography-mass spectrometry usion a cation-exchange column. *Journal of Chromatography A* v. 1082, 43-50.
53. Sagratini G., e. a. (2012). Simultaneous determination of eighth underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 13, 537-534.
54. Sato M., T. Z. (2002). A rapid method of histamine analysis of seafoods by paper electrophoresis. *ITE Lett. Batt. New Tech. Med.* 3, 889-892.

55. Scoging, A. C. (1998). Scombrototoxic (histamine) fish poisoning in the United Kingdom. *Commun. Dis. Public Health*, 204-205.
56. *Seguridad Alimentaria*. (28 de nov de 2015). Recuperado el 28 de 11 de 2015, de Seguridad Alimentaria: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia>
57. Silva C.M.G., G. M. (2002). Bioactive amines in chicken breasts and thigh after slaughter and during storage at 4±1°C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry* v. 78, 241-248.
58. Smelá D., P. P. (2002). Liquid Chromatographic determination of biogenic amines in a meat product during fermentation and long-term storage. *Czech Journal of Food Science* v.21, 167-175.
59. Spizzirri U.G., R. D. (2013). Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *Journal of food Composition and Analysis* v. 29, 43-51.
60. Swartz, M. (2010). HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography and related Technologies* v 33, 1130-1150.
61. Tahmouzi S., K. R. (2011). Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*Katsuwonus pelamis*). *Food Chemistry* v. 126, 756-761.
62. Tapia Salazar, M., & L., C. S. (2002). ¿Son las aminas biogénicas responsables de reducir el rendimiento del camarón azul? *Ciencia UANL*, vol 5, 165-172.
63. Taylor, S. L. (1986). Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Cri. Rev. Toxicol.* 17, 91-128.
64. Trki M., e. a. (2012). Optimization of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system. *Food Chemistry* v 130, 1066-1073.

65. Yamaguchi M, I. (1999). Reagent for FL detection. En T. T.O., *Modern derivatization methods for separation sciences* (págs. 99-190). New York: Jhon Wiley and Son.
66. Yongsawatdigul, J., Y. J., C., & S., U. (2004). Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephourus indicus*). *J. Food Sci.* 69(4), 312-319.
67. Zaitsu K., K. M. (1999). Reagent for UV-Vis detection. En T. T.O., *Modern derivatization methods for separation sciences* (págs. 63-80). New York: Jhon Wiley and Sons.
68. Zhang L.Y., a. S. (2004). Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphtalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1040, 133-140.

