



Facultad de Ciencias Veterinarias

-UNCPBA-

**Determinación de histamina en conservas de
pescado mediante la técnica de cromatografía en
capa delgada**

Manterola, Julieta; Bó, María Alejandra; Sanzano, Pablo

Mayo, 2017

Tandil

Determinación de histamina en conservas de pescado mediante la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC).

Tesis de la Carrera de Licenciatura en Tecnología de los Alimentos, presentada como parte de los requisitos para optar al título de grado de Licenciado del estudiante: Manterola, Julieta.

Director: **M. V. Sanzano Pablo.**

Codirectora: **Dra. Bó María Alejandra.**

Evaluador: **Dra. Agüería, Daniela**

Agradecimientos:

Al Departamento de Tecnología y Calidad de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por formarme profesionalmente.

A mi director Pablo Sanzano, por su tiempo, dedicación y por acompañarme en esta etapa final de la carrera.

Al Centro Regional Buenos Aires Sur (SENASA) de la ciudad de Mar del Plata por permitirme realizar mi residencia en su establecimiento.

A la Dra. María Alejandra Bó por su tiempo, enseñanza, calidez y generosidad.

A Rafael Bonavigna, por su ayuda y predisposición.

A mi familia y amigos, por su apoyo incondicional.

Resumen:

Las proteínas que componen la carne del pescado contienen todos los aminoácidos esenciales por lo que es considerada de alto valor biológico. Es un medio muy propicio para el desarrollo de bacterias, algunas de las cuales intervienen en la formación de una variedad de aminas, como resultado de la descarboxilación directa de los aminoácidos. La descarboxilación de la histidina por enzimas bacterianas resulta en histamina, una amina biógena con propiedades tóxicas, en ciertos niveles, para el humano. Normalmente, los pescados involucrados son aquellos con un alto contenido de histidina libre como los pertenecientes a la familia *Scombridae* y otros distintos como los de la familia *Clupeidae* y *Scaridae*. La mayoría de las bacterias productoras de histamina pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Luego de ser capturado, el pescado puede contaminarse por contacto con superficies no higiénicas y exposición a temperaturas inadecuadas por largos períodos. Consumida en cantidades mayores a las permitidas por el decreto 4238/68 del SENASA puede afectar la salud del consumidor. Uno de las técnicas empleadas para la determinación de esta amina biógena es la cromatografía, un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una estacionaria y otra que se mueve en una dirección definida. En el presente trabajo se determinó el contenido de histamina en conservas de pescado mediante la técnica de cromatografía en capa delgada, según Torry Research Station. Se analizaron muestras de conservas de atún, caballa, bonito y sardina argentina, recibidas en el Laboratorio del Departamento de Físico-química del Centro Regional Buenos Aires Sur (SENASA) de la ciudad de Mar del Plata, en el período comprendido entre abril y julio del año 2016. Como resultado, se obtuvo una proporción de muestras aptas ampliamente superior a las no aptas.

Palabras claves:

Histamina; conservas; pescado; cromatografía en placa delgada

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 El pescado	3
2.1.1 Composición química	3
2.1.2 Clasificación	4
2.2 Artes de pesca	5
2.2.1 Red de cerco	6
2.2.2 Lámpara	6
2.2.3 Red de arrastre	7
2.3 Ficha técnica de especies	8
2.3.1 Caballa (<i>Scomber japonicus</i>)	8
2.3.2 Bonito (<i>Sarda sarda</i>)	10
2.3.3 Anchoíta (<i>Engraulis anchoíta</i>)	12
2.3.4 Atún (<i>Thunnus sp</i>)	14
2.4 Calidad de conservas	16
2.5 Formación de histamina	17
2.6 Métodos de detección de histamina	20
2.6.1 Método inmunoenzimático	20
2.6.2 Método enzimático	21
2.6.3 Método colorimétrico	21
2.6.4 Cromatografía en capa delgada o fina (TLC)	22
2.6.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Método de cromatografía en placa delgada	26
3.1.1 Preparación de soluciones	27
3.1.2 Preparación de las muestras	28
3.1.3 Preparación y activación de la placa	30
4. RESULTADOS	34
4.1 Determinaciones	34
4.1.1 Análisis organoléptico	34

4.1.2 Análisis de peso	34
4.1.3 Análisis de histamina	34
5. CONCLUSIONES	36
6. ANEXOS	37
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUCCIÓN

En Argentina, durante el 2015, se capturaron más de 760.000 toneladas entre más de 100 especies de peces, lo que demuestra una tendencia declinante en comparación con los dos años anteriores, con una caída del 3,2 % con respecto al 2014 y un 7,5 % con el 2013. Para tener una mayor perspectiva, puede apuntarse que las toneladas del año 2015 suponen una caída del 10 % respecto a la media de los últimos quince años, que se ubicó en 846.021 toneladas (Redes & Seafood, 2016).

En el 2015, se exportaron 460.000 toneladas, teniendo como principales destinos a España, China, Estados Unidos, Japón, Italia y Brasil. En cuanto a la importación, el valor arrojado fue de alrededor de 45.000 toneladas cuyo origen son Chile, Ecuador, Tailandia y Brasil como más destacados.

El consumo local per cápita se estima entre los 7 y 8 kilos anuales, incrementándose en aquellas comunidades con mayor historia pesquera (Ministerio de Agroindustria, 2016).

Las proteínas que componen la carne del pescado contienen todos los aminoácidos esenciales por lo que es considerada de alto valor biológico. Es un medio muy propicio para el desarrollo de bacterias, algunas de las cuales intervienen en la formación de una variedad de aminas, como resultado de la descarboxilación directa de los aminoácidos (Huss, 1998).

La descarboxilación de la histidina por enzimas bacterianas resulta en histamina, una amina biógena con propiedades tóxicas, en ciertos niveles, para el humano. Esta intoxicación se denominó intoxicación por escómbridos debido a la asociación con peces de la Familia *Scombridae*, entre los que se incluyen el atún y la caballa (Huss, 1997).

La temperatura de mantenimiento, el paso del tiempo y las condiciones higiénicas, son factores que afectan directamente la formación de este compuesto químico en la materia prima, por lo que resultan imprescindibles las buenas prácticas de manufactura (INTI, 2011a).

Niven *et al.* (1981) sostienen que las bacterias productoras de histamina son casi todas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y dichos microorganismos no pertenecen a la flora normal del pez, el cual podría contaminarse por contacto con

superficies no higiénicas y exposición a temperaturas inadecuadas por largos períodos.

La intoxicación por histamina es un problema de alcance mundial en los países donde los consumidores ingieren pescado que contiene altos niveles de la misma. Es una enfermedad cuyo período de incubación es muy corto, de pocos minutos a pocas horas. Los síntomas más comunes son los cutáneos, como el rubor facial o bucal, urticaria, o edema localizado, pero también puede verse afectado el tracto gastrointestinal con aparición de náuseas, vómitos, diarrea, o producirse complicaciones neurológicas como dolor de cabeza, hormigueo y sensación de quemazón en la boca (Huss, 1997).

Para asegurar la inocuidad, el decreto 4238/68 del SENASA, establece que el valor medio de un conjunto de muestras de un mismo lote para histamina en pescados frescos, deberá ser inferior a los 100 ppm y ninguna muestra podrá tener un valor superior a 200 ppm.

Una de las técnicas empleadas para la determinación es la cromatografía, que comprende una serie de métodos de separación de analitos de una muestra, los cuales se distribuyen de acuerdo a su afinidad diferencial entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, para poder ser identificados y/o cuantificados (Christian, 2009).

Objetivo general:

- Determinar el contenido de histamina en conservas de pescado mediante la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El pescado

Los peces generalmente se definen como vertebrados acuáticos, que utilizan branquias para obtener oxígeno del agua y poseen aletas con un número variable de elementos esqueléticos llamados radios (Thurman y Webber, 1984, citado por Huss, 1998).

Son los más numerosos de los vertebrados; existiendo por lo menos 20.000 especies conocidas y más de la mitad (58%) se encuentra en el ambiente marino (Huss, 1998).

2.1.1 Composición química

La carne de pescado es un alimento con características nutricionales muy favorables que contribuyen a mantener y mejorar el estado de salud. Sus principales nutrientes presentan atributos beneficiosos para toda la población, desde niños hasta adultos (Alimentos Argentinos, 2014).

La composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año. Estas variaciones están estrechamente relacionadas con la alimentación, migración, desarrollo gonadal y desove.

En cuanto a los nutrientes del pescado, el mismo suministra una gran cantidad de agua, entre un 66 % y un 81% aproximadamente, lo que favorece el crecimiento de microorganismos y a su vez lo vuelve un producto altamente susceptible al deterioro. Por otro lado, la fracción lipídica es el componente que muestra la mayor variación, entre un 0,2 % y un 25%. El contenido de lípidos en filetes de pescado magro es bajo y estable, mientras que el contenido de lípidos en filetes de especies grasas varía considerablemente. Sin embargo, la variación en el porcentaje de grasas se refleja en el porcentaje de agua, dado que la grasa y el agua normalmente constituyen el 80 % del filete (Huss, 1998). El contenido de grasa en el pescado, independientemente de que sea magro o graso, tiene consecuencias sobre las características tecnológicas post mortem, ya que a diferencia de los animales de sangre caliente, los lípidos del

pescado se encuentran en estado líquido, debido a la gran cantidad de ácidos grasos insaturados que éstos contienen, haciéndolos más susceptibles a la oxidación. Los lípidos presentes en mayor cantidad son los fosfolípidos y los triglicéridos (Zavalza Ortega, 1994).

El contenido de carbohidratos en el músculo del pescado es muy bajo, generalmente menor al 0,5%. Esto es típico del músculo estriado, en el cual los carbohidratos se encuentran en forma de glucógeno y como parte de los constituyentes químicos de los nucleótidos. Estos últimos son la fuente de ribosa liberada como consecuencia de los cambios autolíticos post mortem (Huss, 1998).

El contenido proteico en el pescado es alto, representa entre un 16 % y un 21 %, teniendo las proteínas un excelente balance de aminoácidos esenciales, por lo cual están clasificadas como de alta calidad; siendo además, altamente digeribles debido a las fibras cortas del músculo (Henrickson, 1978; Dean, 1990 citado por Zavalza Ortega, 1994). Las proteínas del pescado son muy susceptibles a la desnaturalización; éstas pueden degradarse fácilmente debido a las condiciones de manejo del músculo, mediante procesos físicos, químicos y mecánicos (Zavalza Ortega, 1994).

La cantidad de vitaminas y minerales es específica de la especie y, además, puede variar con la estación del año. En general, la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A y D. Respecto a los minerales, la carne de pescado es considerada una fuente particularmente valiosa de calcio y fósforo, así como también de hierro y cobre. A su vez, los peces de mar tienen alto contenido de yodo (Huss, 1998).

2.1.2 Clasificación

Los peces generalmente se pueden clasificar de acuerdo a la naturaleza de su esqueleto en cartilagosos y teleósteos.

Los peces cartilagosos, también conocidos como condricios, son una clase de peces caracterizados por tener su esqueleto formado por cartílago. Este grupo incluye animales marinos muy conocidos, por ejemplo: los tiburones y las rayas.

Los peces óseos, también conocidos como osteíctios, poseen esqueleto formado por huesos óseos. Este grupo incluye a la caballa, atún, bonito, sardinas, merluza, entre otros.

De acuerdo a las aguas que habitan, los peces pueden clasificarse en marítimos, continentales y diádromos. Los peces marítimos representan el mayor porcentaje y son aquellos que habitan en el mar, como por ejemplo merluza, sardina, caballa, entre otros. Los peces continentales son aquellos que habitan las aguas dulces, como el pejerrey, el pacú, el sábalo. Los peces diádromos son aquellos que pueden vivir una etapa de su vida en el mar y otra en agua dulce, como el salmón o la lisa (Huss, 1998). Los peces de mar se clasifican a menudo de acuerdo con la profundidad en la que normalmente habitan, lo que influye a su vez sobre el método utilizado para capturarlos. Los peces bentónicos viven principalmente en el fondo del mar y ejemplos son el bacalao, la raya, la pescadilla y el lenguado. Los peces demersales viven generalmente a medias aguas, como por ejemplo la polaca, la merluza y el abadejo. Los peces pelágicos viven en las superficies de los mares, entre los que podemos mencionar al arenque, la caballa, la anchoa, la sardina y el atún. Los peces bentónicos y demersales normalmente son llamados pescado “blanco” o “magro”, lo que indica que contienen menos del 1% de lípidos en carne y almacenan la grasa sólo en el hígado; mientras que los peces pelágicos son pescados “azules” o “grasos”, el contenido de lípidos en carne de estos pescados varía considerablemente (mayor a 9%), y almacenan grasas en células distribuidas en otros tejidos del cuerpo, aunque existen muchas excepciones. Estas especies pelágicas se procesan en su mayoría como conservas (Footitt y Lewis, 1995).

2.2 Artes de pesca

Los artes de pesca generalmente se clasifican en dos categorías principales: pasivas y activas. Esta clasificación se basa en el comportamiento relativo de la especie objeto de la pesca y el arte de pesca. Con los artes pasivos, la captura de peces por lo general se basa en el movimiento de la especie objetivo de la pesca hacia el arte; mientras que con los artes activos la captura por lo general involucra una persecución dirigida a la especie objetivo de la pesca.

Las propiedades de los artes de pesca y la manera en que son operados también afectan la calidad de la captura, teniendo así un efecto indirecto sobre el ecosistema a través del mal uso de los recursos naturales (FAO, 2005a).

2.2.1 Red de cerco

Los peces pelágicos tienden a formar grupos donde se reúne un gran número de miembros de la misma especie, haciendo posible su localización por los pescadores que suelen aprovechar este comportamiento rodeando al banco con una red, denominada red de cerco. Como se refleja en la figura 1, la operación de captura comienza con el lanzamiento de una boya de superficie con una cuerda conectada al extremo de la red. Conforme el barco avanza, la resistencia de la cuerda de la boya arrastra la red de cerco por la borda y la red es largada en un círculo alrededor del cardumen. Cuando se completa el lance, se recoge la boya y se jala el cable de jareta, lo que cierra el fondo de la red (Footit y Lewis, 1995).

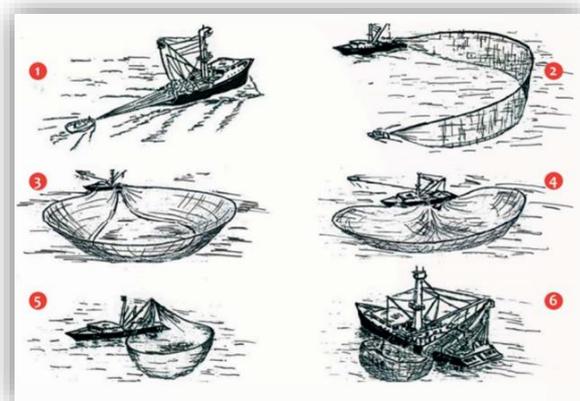


Figura 1: Maniobra de red de cerco. Fuente: Sostenibilidad de flota a flota (CEPESCA,2010).

2.2.2 Lámpara

Es una red de cerco sin jareta. Tiene un copo central en forma de cuchara con dos alas laterales que permiten retener los cardúmenes de peces cuando se jalan las dos alas al mismo tiempo (figura 2).

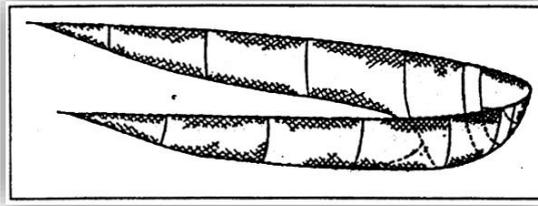


Figura 2: Red de cerco sin jareta (lámpara) (FAO, 1996).

2.2.3 Red de arrastre

Arrastre es el nombre dado al arte de pesca que consiste en remolcar la red a través de un banco de peces de modo que éstos entren por la boca de la red. Los de tamaño inferior a la medida pasarán a través de la malla de la red, mientras que los de tamaño comercial serán capturados en el fondo de la misma. La red de arrastre a media agua, como se observa en la figura 3, tiene forma de cono, siendo la boca de la red de forma más o menos ovalada o cuadrada dependiendo del diseño. Para ayudar a mantener abierta la boca de la red, se disponen de boyas especiales en los cables de arrastre. Además, posee flotadores en la relinga superior y pesos en la relinga inferior.

El tamaño de la trama, dependerá de la especie a capturar, aunque es bastante común emplear para la primera porción una trama amplia; en el cuerpo principal una trama intermedia, y en el fondo una malla más pequeña y resistente.

Un aspecto crucial es determinar el momento de izarla. Si la red se iza a bordo demasiado pronto, se capturará una cantidad escasa de pescado; si se iza demasiado tarde, la captura será excesiva, lo que puede hacerla demasiado pesada para ser izada a bordo. Además, un número de peces en la red demasiado alto puede producir daños en el pescado por aplastamiento. Las redes de arrastre pueden ser remolcadas por un único barco o por una pareja (Footit y Lewis, 1995).

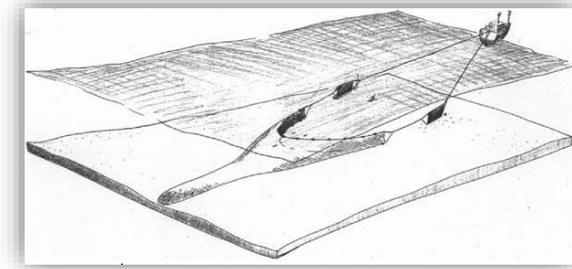


Figura 3: Funcionamiento de red de arrastre (FAO,1995).

2.3 Ficha técnica de especies (INIDEP, s.f.)

2.3.1 CABALLA (*Scomber japonicus*)

Familia Scombridae



Nombre científico sinónimo todavía en uso

Scomber japonicus marplatensis

Caracteres externos distintivos

Posee cuerpo alargado, fusiforme, robusto, ligeramente comprimido y cubierto con escamas diminutas. La línea lateral es bien evidente. Su cabeza es pequeña, y su boca desprovista de dientes, terminal, cuyos extremos posteriores no alcanzan el nivel del borde posterior de los ojos. Éstos son laterales, grandes y están protegidos por una membrana adiposa transparente que tiene una abertura central de contorno oval. Tiene dos aletas dorsales, la primera espinosa y la segunda formada por radios blandos. En cuanto a su coloración, tiene el dorso azul verdoso con un dibujo marmorado en tonos más oscuros; la parte inferior de los costados y vientre es blanco iridiscente. Sus aletas son transparentes, amarillo claro.

Tamaño

La talla máxima de los individuos es de alrededor de 45 cm de longitud total y el peso total máximo, de unos 930 g.

Otros datos biológicos

La reproducción tiene lugar en primavera tardía y principios del verano, sólo de noche, con una temperatura en superficie de alrededor de 16-17 °C. Cada ejemplar efectúa unas 4 a 5 puestas parciales hasta completar el proceso. Se reproducen a partir de los 24- 27 cm de longitud total (1 – 2 años de edad).

Se alimentan de organismos del plancton, peces y calamaretos. Entre los peces la especie dominante es la anchoíta, aunque también ingieren sureles, cornalitos y pampanitos juveniles.

El crecimiento es rápido, en los dos primeros años de vida alcanza algo más del 50 % de su talla máxima. La mayor edad observada es de 13 años pero el mayor porcentaje en los desembarques comerciales, al menos en las últimas temporadas, estuvo comprendido entre 2 y 4 años.

Distribución geográfica y comportamiento

Los adultos aparecen en el área costera de Mar del Plata entre los meses de septiembre-febrero cuando migran para reproducirse y alimentarse intensamente. Se ha observado, en agosto, la presencia de grandes cardúmenes al sur de la Provincia de Buenos Aires (El Rincón) y en el norte patagónico. Los juveniles son capturados durante todo el año en la zona costera uruguaya y en la bonaerense hasta por lo menos la altura de Mar del Plata, aunque también se han detectado juveniles en El Rincón, que podrían pertenecer a un efectivo diferente del marplatense.

Los desplazamientos de los adultos en esta área costera están condicionados por la temperatura del agua, cuando ésta sobrepasa en superficie los 20° C no se acercan a la costa lo suficiente como para ser accesibles a la flota, condicionando de esta manera el éxito en las capturas. En invierno se la encuentra en la plataforma, a una profundidad de entre 100 y 200 m, desplazándose en verano hacia la costa, estableciendo un movimiento en sentido antihorario. En la zona de El Rincón, durante agosto y septiembre, se la detecta alrededor de la isobata de 50 m, con salinidades más altas que las de su entorno.

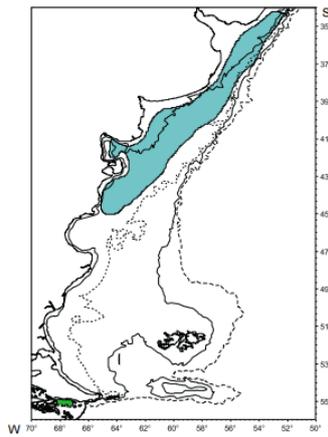


Figura 4: Área de distribución de la caballa (Perrota, 2000).

Tamaño del recurso

Grande

Flota pesquera y artes de captura

El número de embarcaciones que actúan sobre este recurso es variable y depende de la disponibilidad del efectivo de caballa y de las necesidades del mercado. En el área marplatense son de rada o ría. Debido a su pequeño tamaño, el área de pesca es muy restringida. El arte de pesca es la lámpara. Antes de cada operación se echa sebo al mar para lograr el ascenso y la concentración de la caballa y de esta forma hacer efectivo el cerco. En cambio, en el área de El Rincón la capturan con redes de arrastre de fondo con buques de altura.

Formas de utilización

Su destino principal es la conserva, para ser comercializada en el mercado interno.

2.3.2 BONITO (*Sarda sarda*)

Familia Scombridae

Nombres científicos sinónimos todavía en uso

Ninguno



Caracteres externos distintivos

Posee cuerpo fusiforme y robusto, cubierto de pequeñas escamas cicloideas y con un corset, compuesto por escamas modificadas, que nace a continuación de la cabeza y que no supera el fin de la aleta pectoral. Tiene dos aletas dorsales, la primera consta de 19 a 23 radios espinosos de longitud decreciente en dirección anteroposterior; la segunda nace muy cerca del final de la primera, es más corta y comprende de 12 a 19 radios, a continuación aparecen de 7 a 9 aletillas. Las aletas pectorales son cortas, nacen casi a la misma altura que la primera aleta dorsal, en tanto que las ventrales se insertan por debajo de la base de las pectorales.

En cuanto a su coloración, los dos tercios superiores de los lados son celeste azulado, cruzados por líneas oscuras ascendentes hacia la región posterior, aclarándose hasta hacerse celeste grisáceo en el tercio inferior y amarillento grisáceo en la línea media ventral. Las aletas dorsales, pectorales y ventrales son de un tinte azul oscuro, mientras que la anal presenta una tonalidad similar al dorso y la caudal es también celeste azulada en su centro, virando al amarillo grisáceo hacia las puntas.

Tamaño

Las tallas máximas y mínimas registradas a partir de los bonitos desembarcados en el puerto de Mar del Plata fueron de 77 cm y 33 cm respectivamente.

Otros datos biológicos

El bonito que habita en aguas argentinas se reproduce entre noviembre y enero. Su longevidad ha sido estimada en 10 años. Los adultos se alimentan principalmente de peces, aunque en algunos lugares, como el Golfo de México, también predan sobre calamares y cangrejos. Tanto adultos como juveniles son caníbales.

Distribución geográfica y comportamiento

El bonito vive en aguas tropicales y templadas a ambos lados del Océano Atlántico, incluso en el Golfo de México y en los mares Mediterráneo y Negro.

Se trata de un pez epipelágico, nerítico, que forma cardúmenes, capaz de tolerar cambios grandes de temperatura (entre 12° y 27° C) y salinidad (entre 14 y 39 gramos

por litro). Los cardúmenes de bonito penetran en aguas argentinas durante el verano austral procedentes del Brasil.

Tamaño del recurso

Pequeño

Flota pesquera y artes de captura

Participan en la captura las tres flotas (de rada o ría, costera y de altura), pero en los últimos años han sido importantes las capturas de la primera.

El arte de pesca específico es la red de cerco. También se obtienen bonitos cuando se practica la pesca de otras especies mediante líneas, nasas y redes de arrastre.

Formas de utilización

Su destino principal es la conserva, comercializada para mercado interno.

2.3.3 ANCHOITA (*Engraulis anchoita*)

Familia Engraulidae



Nombres científicos sinónimos todavía en uso

No se conocen

Caracteres externos distintivos

Posee cuerpo alargado, fusiforme, cubierto de escamas cicloideas, grandes y de estructura delicada, que se desprenden con suma facilidad.

Tiene cabeza grande, ojos cubiertos por una fina película y hocico puntiagudo que se proyecta hacia adelante formando sobre la boca una ligera prominencia. Boca amplia, con una hilera de dientes agudos y diminutos.

Tiene una aleta dorsal ubicada aproximadamente en la mitad del cuerpo. En lo que refiere a su coloración, tiene el dorso de la cabeza y el lomo oscuros; costados de color azul violáceo verdoso, con brillo iridiscente y el resto del cuerpo plateado. Sus aletas son transparentes.

Tamaño

Las tallas más frecuentes en las capturas comerciales se encuentran dentro del rango de 14 a 19 cm.

Otros datos biológicos

Es un reproductor parcial, con un sucesivo número de puestas a lo largo del período de desove. La reproducción tiene lugar durante todo el año en una extensa área. Adquieren el aspecto de los adultos a los 33 – 34 mm de largo total. Se alimenta de organismos del plancton, incluyendo larvas y postlarvas de la misma especie. La edad máxima observada es de 8 años, pero los ejemplares mayores de 4 años son muy poco abundantes, dominando en los desembarques comerciales las edades entre 2 y 4 años.

Distribución geográfica y comportamiento

Tiene una distribución muy amplia, que comprende desde el sur de Brasil hasta la Patagonia y en profundidad desde aguas someras hasta fuera del talud continental, ha sido observada a distancias de 450 millas de la costa. Tolera un rango muy marcado de salinidad (14-35 gramos por litro) y de temperatura (9-23° C). Las mayores concentraciones ocurren en áreas donde estos factores muestran marcados gradientes. Durante el día, forman densos cardúmenes a profundidad variable; por la noche ascienden hasta cerca de la superficie y se dispersan para alimentarse. Constituye al menos dos grupos poblacionales, el bonaerense y el patagónico, separados aproximadamente hacia los 41° S. El grupo norteño cumple un ciclo migratorio anual: se concentra en invierno en el norte, desciende en primavera hacia el sur, a lo largo de la costa bonaerense para reproducirse, se dispersa en el verano en alta mar para alimentarse y luego asciende por aguas exteriores hacia el área de concentración invernal. Los desplazamientos de la anchoíta de la población patagónica no se conocen.

Tamaño del recurso

Bonaerense: muy grande; norpatagónica: grande

Flota pesquera y artes de captura

La flota tradicional está constituida por cerca de un centenar de embarcaciones pesqueras pequeñas, con asiento en Mar del Plata y Quequén, que realizan salidas diarias y utilizan lámpara. También la capturan barcos de altura con red de arrastre de media agua en las regiones bonaerense y norpatagónica.

Formas de utilización

Se la utiliza principalmente para el salado madurado, fuertemente orientado a la exportación y en menor escala al mercado interno. La industria conservera la utiliza en menor proporción con destino al mercado interno. Una pequeña proporción se exporta congelada y se ha comenzado la exportación de anchoíta marinada.

2.3.4 ATÚN (*Thunnus spp.*) (EcuRed, s.f.)

Familia Scombridae



Nombres científicos sinónimos todavía en uso

No se conocen

Caracteres externos distintivos

Poseen cuerpo fusiforme. Cabeza pronunciada en forma de pirámide triangular y boca relativamente pequeña con respecto al desarrollo del cráneo. Las escamas que cubren su dura y muy resistente piel son pequeñas, poco evidentes y lisas; la piel está lubricada con un "mucus" que reduce la fricción con el agua.

La forma del cuerpo les permite nadar grandes distancias y alcanzar altas velocidades de hasta 70 kilómetros por hora.

Su piel se encuentra lubricada con un mucus que reduce la fricción con el agua. Poseen dos aletas dorsales muy próximas, rígidas y robustas, y una aleta caudal fuerte con forma de arco terminado en dos zonas puntiagudas que le dan aspecto de media luna.

Su coloración es típica de los peces pelágicos: el dorso azul oscuro y el vientre blanco plateado con reflejos irisados. Sus aletas van del pardo al amarillo.

Dentro del género *Thunnus*, las principales especies comerciales son el atún blanco (*T. alalunga*), el patudo (*T. obesus*), el atún rojo del Atlántico (*T. thynnus*), el atún aleta azul del Pacífico (*T. orientalis*), el atún rojo del sur (*T. maccoyii*) y el rabil (*T. albacares*) (FAO, 2005b).

Tamaño

La especie más grande puede llegar a medir 3 m de longitud y pesar alrededor de 680 kg.

Otros datos biológicos

En el cardumen, la hembra se separa para desova; el macho también se aísla y fecunda los huevos que tienen una gota de grasa que les permite flotar. De éstos, sale la larva, que se alimenta primero del saco vitelino y posteriormente del plancton. Muchas de estas larvas mueren al ser comidas por otras especies o por el mismo atún. Los reproductores vuelven al banco de peces y los juveniles nadan cerca de la superficie durante 4 o 5 años; después se dirigen a las profundidades hasta alcanzar su estado adulto y mayor talla. Su reproducción se lleva a cabo en las zonas de concentración durante los meses de primavera y verano, aunque puede cambiar de época según las especies.

Las gónadas son muy grandes y los ovarios pueden contener entre 15 y 18 millones de óvulos esféricos con diámetro de uno a 1.5 milímetros. El tiempo de desarrollo y maduración sexual cambia con las especies.

Distribución geográfica y comportamiento

Los atunes se localizan, según la especie, en aguas templadas o cálidas, cuyas temperaturas van de los 17 a los 33°C. El atún común vive distribuido por todo el Atlántico y también se localizan bancos de atunes en el Mar Negro y en el Mediterráneo, donde es conocido como atún rojo. El atún de aletas amarillas habita en las aguas del Océano Índico, Atlántico y Pacífico, mientras que el denominado bonito del norte se puede pescar en el Atlántico, desde el Golfo de Vizcaya hasta Sudáfrica, e incluso en el mar Mediterráneo y el océano Pacífico. El atún patudo es un pez tropical que se encuentra principalmente en las aguas del Océano Pacífico.

Los atunes constituyen uno de los grupos de peces que ha logrado su adaptación total al medio donde vive, lo que les permite distribuirse como especie cosmopolita en todos los mares.

Las migraciones de los atunes que en ocasiones puede ser de 14 a 50 kilómetros diarios, se presentan en dos etapas: primero, un viaje de concentración genética, donde los atunes se reúnen en ciertos lugares favorables para la reproducción y después, el viaje de alimentación siguiendo las aguas que les ofrecen mejores posibilidades. Estas migraciones determinan las condiciones de pesca de los atunes. Son peces que forman grandes cardúmenes para nadar juntos de manera paralela, dejando una distancia muy corta entre un pez y otro. Se ha observado que el tamaño y forma del cardumen cambia con las características del medio.

Tamaño del recurso

Sin datos

Flota pesquera y artes de captura

La especie es capturada fundamentalmente por la flota de altura. El arte de pesca principal es la red de cerco, aunque también se utilizan otros artes como la pesca con anzuelos.

Formas de utilización

Su destino principal es la conserva. El mayor porcentaje del atún producido y consumido en el país es importado desde Brasil y Ecuador en lomos congelados.

2.4 Calidad de conservas

Una conserva se define como el producto alimenticio que envasado herméticamente y sometido a un tratamiento térmico no se altera ni representa peligro alguno para la salud del consumidor bajo condiciones habituales de almacenamiento, durante un tiempo prolongado. El producto no debe sufrir deterioro durante las pruebas de la estufa (Decreto 4238/68 17.1).

En el caso de las conservas de pescado, éstas pueden ser al natural, cuyo líquido de cobertura es una salmuera de baja concentración que puede estar adicionada o no de sustancias aromáticas; al aceite, cuando su líquido de cobertura sea aceite vegetal; en salsa, cuando en la conserva de pescado sean adicionadas salsas.

Con el nombre de conserva mixta, se entiende la conserva alimenticia preparada con productos de la pesca y vegetal conjuntamente, cualquiera sea la proporción en que dichos productos intervengan. No comprende esta definición el agregado a las conservas de pescado y/o mariscos de salsa o aditivos de origen vegetal (Decreto 4238/68 capítulo 23).

Aunque la calidad es un concepto amplio, en el que se tiene en cuenta un conjunto de características y no una característica única, el control de ésta en los productos de la pesca debe abarcar desde la impresión general, sensorial, hasta los análisis físico-químicos y microbiológicos.

Dentro de los controles del producto terminado se pueden mencionar:

- Control de pesos: bruto, neto y escurrido
- Control del envase: vacío, calidad de cierre, barniz interior, sulfuración y corrosión, etc.
- Control del líquido de cobertura: color, índice de refracción, exudado acuoso, presencia de sólidos, turbidez, acidez, etc.
- Control organoléptico en producto terminado
- Control de estabilidad: prueba de incubación
- Determinación de metales
- Determinaciones microbiológicas y biológicas
- Control de histamina.

2.5 Formación de histamina

Luego de que el pescado es capturado, comienza a sufrir una serie de cambios químicos, produciéndose variaciones en sus características organolépticas (sabor, olor, color), debido a procesos de autólisis, oxidación, hidrólisis de las grasas y desarrollo microbiano.

Uno de los métodos para retrasar estos procesos consiste en reducir la temperatura del producto, por refrigeración o congelación después de su captura. La temperatura es el factor ambiental que más influencia ejerce en el correcto mantenimiento de este producto.

Una inadecuada manipulación y conservación del pescado influye favorablemente en el desarrollo bacteriano. Existen, además de estos factores extrínsecos de descomposición, otros factores que se denominan intrínsecos: alta actividad de agua, pH neutro post mortem, altas concentraciones de nitrógeno no proteico (NNP) y la condición del pescado como organismo poiquilotermo.

Dentro de la gran cantidad de especies bacterianas que pueden crecer bajo estas condiciones, existe un conjunto de bacterias que generan un producto de su metabolismo que es la endoenzima histidina descarboxilasa y por lo tanto pueden producir histamina a partir de la reacción con histidina libre (figura 5). Esta amina biógena es la responsable de la intoxicación por histamina, cuando su concentración en el músculo del pescado sobrepasa las 200 partes por millón (ppm) (Izquierdo *et al.*, 2001).

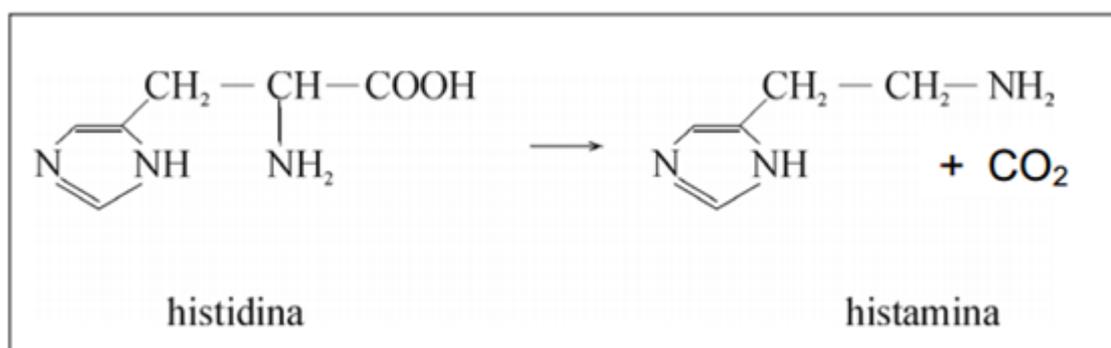


Figura 5: Descarboxilación de la histidina.

Normalmente, los pescados involucrados son aquellos con un alto contenido de histidina libre como los pertenecientes a la familia *Scombridae* y otros distintos como los de la familia *Clupeidae* y *Scaridae*.

Entre las bacterias productoras de histamina se pueden mencionar a grupos de *Enterobacteriaceae*, ciertos *Vibrio* sp., *Clostridium* y *Lactobacillus* sp. Las productoras más potentes de histamina son *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia*

alvei (Huss,1997). Existen naturalmente en las branquias, en las superficies externas y en el intestino de los peces de agua salada vivos, sin dañarlos. Tras la muerte, los mecanismos de defensa de los peces ya no inhiben el crecimiento bacteriano en el músculo y dichas bacterias pueden comenzar a crecer, dando como resultado la producción de histamina. La evisceración y la eliminación de las branquias pueden reducir, pero no eliminar, el número de bacterias formadoras de histamina (FDA, 2011).

Una vez producida la histamina en el pescado, el riesgo de que se provoque la enfermedad es muy alto. La histamina es muy resistente al calor, y aunque el pescado se haya cocido, enlatado o haya sido sometido a cualquier otro tratamiento térmico antes de su consumo, la histamina no se destruye (Huss, 1997).

La intoxicación por histamina aparece a las pocas horas de ser ingerido el alimento y los síntomas pueden persistir varios días. Generalmente es un desorden benigno con una variedad de síntomas primarios cutáneos (sarpullido, urticaria, edemas, inflamación localizada), gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas) y neurológicos (jaqueca, quemaduras bucales, sudor y acaloramiento). Complicaciones más serias como palpitaciones cardíacas ocurren con poca frecuencia. La mayoría de las personas que han sufrido una intoxicación por histamina, experimentan solamente algunos de los síntomas ya señalados y su severidad depende de la dosis ingerida y de la susceptibilidad del individuo.

A pesar de la toxicidad, la histamina no es una sustancia extraña al cuerpo humano, la misma está almacenada en células especializadas, donde es regulada su liberación. El mayor depósito son los mastocitos y basófilos de la sangre. Tiene un papel fisiológico importante en los procesos alérgicos, inflamatorios y de microcirculación, además es necesaria en cantidades pequeñas, ya que controla los niveles de ácido clorhídrico en el estómago.

Esta se vuelve tóxica cuando supera los valores normales, ya sea por la liberación de la misma a partir de los mastocitos y basófilos durante una reacción alérgica o bien cuando es ingerida en cantidades excesivas en un alimento (Valls, 2002).

2.6 Métodos de detección de histamina

Para garantizar la seguridad de un alimento en base al contenido de histamina, existen una serie métodos que permiten detectarla. La elección de la técnica a utilizar requiere de un análisis sobre sus ventajas y desventajas, esto implica su eficiencia, sensibilidad, sencillez, rapidez, costo de los materiales y reactivos a utilizar, entre otros. Sin embargo, es necesario definir los límites del método elegido y validar su fiabilidad en comparación con un método oficial o un método de referencia. Actualmente se dispone de muchas técnicas rápidas y sencillas; sin embargo, en la normativa de la UE se especifica que "los exámenes deben realizarse de acuerdo con métodos fiables y científicamente reconocidos, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)". El resultado del análisis debe expresarse claramente, es decir, histamina en mg / kg con la referencia del método utilizado y detalles sobre el muestreo (naturaleza, fecha, lugar) (SEAFOODplus, 2006).

2.6.1 Método inmunoenzimático

La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático. Una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de antígeno marcado con enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos revestidos sobre los pocillos. Después de la incubación, los pocillos se lavan para detener la reacción de la competencia. Luego del lavado, se agrega un sustrato el cual reacciona con el conjugado unido a la enzima para producir color azul. Si la muestra presenta un color azul intenso significa que la muestra contiene poca histamina. Los resultados se pueden determinar directamente usando la curva estándar. Este principio tiene las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos, posee especificidad entre reactivo y analito, reproducibilidad de resultados, sencillez, rapidez y permite analizar varias muestras simultáneamente. Brinda resultados de ensayos confiables y seguros, con límites de cuantificación muy bajos para pescado (2,5 ppm).

Además, con la utilización de este kit inmunoenzimático, no sólo se pueden determinar niveles de histamina en pescado fresco y enlatado, sino también en otras matrices como por ejemplo en vinos blancos, tintos y espumantes (INTI, 2011b).

2.6.2 Método enzimático

Otro método sencillo para el análisis de histamina es mediante el uso de reacciones enzimáticas acopladas. Estos tipos de ensayos pueden ser muy específicos, rápidos y semicuantitativos. La base de esta técnica es que la enzima diamina oxidasa cataliza la conversión de histamina en imidazol acetaldehído con la conversión simultánea de oxígeno en peróxido de hidrógeno (figura 6). El peróxido de hidrógeno se convierte de nuevo en oxígeno y agua por la acción de la HRP (peroxidase horse-radish). Concomitante a esta reacción es la oxidación de leuco-cristal violeta (un compuesto incoloro) a cristal violeta, un compuesto intensamente púrpura. El color formado debe ser directamente proporcional a la cantidad de histamina presente (FAO, 1985).

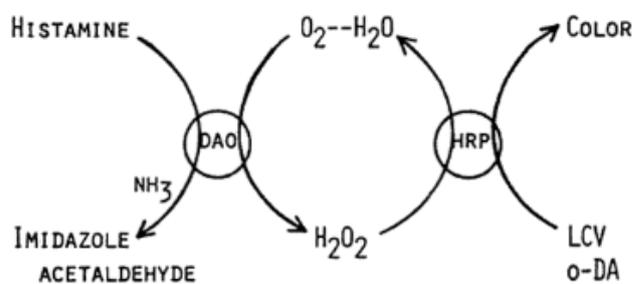


Figura 6: Base del método enzimático para el análisis de histamina (FAO,1985).

2.6.3 Método colorimétrico

La determinación colorimétrica de la histamina se basa en la reacción de la histamina con algún reactivo para producir un complejo de color.

Se realiza una extracción salina de histamina, seguida de una centrifugación, una extracción de n-butanol y una evaporación antes de la reacción colorimétrica con sulfonato de p-fenildiazonio. La intensidad de color rosa-naranja se puede evaluar

visualmente mediante la comparación de una escala de color de referencia, que se observa en la figura 7, o por una lectura con espectrofotómetro a 496 nm (SEAFOODplus, 2006).

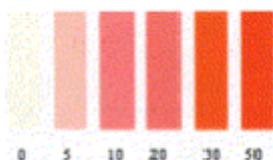


Figura 7: Escala de color de referencia para histamina (concentración en $\mu\text{g} / \text{ml}$) (Patange *et al*, 2004 citado por SEAFOODplus, 2006).

2.6.4 Cromatografía en capa delgada o fina (TLC)

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos físicos de separación, que permite aislar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con facilidad. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

La cromatografía en capa fina (TLC) es un procedimiento rápido y sencillo para separar mezclas de sustancias y para identificar/ caracterizar o para determinar semicuantitativamente componentes individuales, por lo que frecuentemente se utiliza como procedimiento de screening.

Como en el caso de otros métodos cromatográficos, la separación se basa en que las sustancias investigadas se reparten de modo diferencial entre una fase estacionaria y

otra móvil: en la TLC el eluyente (fase móvil) se desplaza por una fina capa del sorbente (fase estacionaria), transportando así los componentes individuales de la mezcla de sustancias más o menos lejos dependiendo de la solubilidad y/o de su comportamiento frente a la adsorción. Hay que señalar que, al contrario que en la cromatografía en columna, el proceso separativo transcurre en un sistema abierto, la placa separativa plana. El recorrido particular de cada sustancia se emplea así para su identificación.

Las separaciones se realizan generalmente por el procedimiento “ascendente”, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa.

Las placas cromatograficas constan de un soporte liso, inerte (placas de vidrio, láminas de aluminio o de fibra) sobre las que se dispone el sorbente formando un espesor lo más homogéneo posible (por lo general 0,25 mm); dependiendo la separación a realizar, se tratará de silicagel, óxido de aluminio, poliamida, celulosa, etc., o mezclas de las mismas.

El eluyente, cuya composición depende de cada problema concreto, se pone en la cubeta cromatográfica por lo menos 30 min antes del principio de la separación hasta una altura de 0,5 cm. La cubeta se cierra con su tapa para que se sature con los vapores del disolvente y se coloca en un lugar adecuado.

Para desarrollar la placa, su extremo inferior se introduce en el eluyente y se vuelve a cerrar la cubeta inmediatamente. Para evitar eluciones, las manchas cargadas deberán estar completamente por encima del nivel del eluyente.

2.6.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En la cromatografía líquida de alta resolución, una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde dicha muestra es introducida. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido.

Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando.

Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.

El papel esencial de las bombas es impulsar a la fase móvil con presión y flujo constante. En cuanto a los detectores, su papel fundamental es indicar la aparición de los diferentes componentes que constituyen la muestra, y calificarlos tanto cuantitativa como cualitativamente.

Este método se caracteriza por su gran sensibilidad, su capacidad para proporcionar determinaciones cuantitativas exactas y su gran utilidad a la hora de separar sustancias no volátiles o termolábiles. Sin embargo, no es un método rápido, sencillo, ni de bajo costo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Físico-química del Centro Regional Buenos Aires Sur (SENASA) de la ciudad de Mar del Plata, en el período comprendido entre abril y julio del año 2016.

Las determinaciones de histamina se realizaron en conservas de diferentes especies pesqueras, tales como: caballa (*Scomber japonicus*), atún (*Thunnus spp.*), bonito (*Sarda sarda*) y sardina argentina (*Engraulis anchoita*), que corresponde a las anchoítas preparadas y comercializadas como sardinas en Argentina.

La toma de muestras fue realizada por inspectores de SENASA en empresas conserveras de la ciudad de Mar del Plata, de acuerdo a un protocolo establecido.

Al laboratorio ingresaban 9 muestras de cada partida, de las que en un primer momento eran utilizadas sólo 3. Las muestras restantes eran almacenadas para repetir el ensayo en caso de resultados positivos.

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, se procedió a realizar el ingreso de las latas en la planilla de trabajo de conservas (ver anexo) y el posterior rotulado y pesado de las mismas para obtener el peso total. Luego se abrieron las latas y se

invertieron sobre un filtro para poder escurrir el líquido de cobertura (figura 8 y 9). Luego de escurridas, se volvieron a pesar para obtener el peso escurrido. Los pesos fueron registrados en una planilla.

Se tomaron 10 gr de muestra de cada lata y luego se vació el contenido sobrante de cada lata en bolsas rotuladas, analizando las características organolépticas (olor al momento de abrir el envase y luego sobre el pescado desmenuzado en la bolsa; color y sabor), de acuerdo a un protocolo establecido por el SENASA. Se observó también, el aspecto del envase, tanto interno como externo y su barniz sanitario. Estos datos fueron registrados en su planilla correspondiente. Luego se procedió a pesar las latas vacías. Dicho peso se registró en planilla. Las bolsas fueron reservadas en freezer por si era necesario repetir el ensayo.



Figura 8 y 9: Escurrido del líquido de cobertura

Se realizó la técnica TLC, que se trata de un método semicuantitativo, descrito en Torry Research Station por FAO, (1985).

En base a los resultados, se analizaron datos de aptitud para el consumo de latas de conserva, determinado por la cuantificación de histamina.

Se estimó la asociación entre el contenido de histamina y la especie utilizada para realizar la conserva, por medio del Test Exacto de Fisher. Se utilizó el Procedimiento PROC FREQ del software estadístico SAS 9.3.

3.1 Método de cromatografía en placa delgada, según Torry Research Station.

La técnica realizada utiliza la sílica gel como fase estacionaria, mientras que como fase móvil utiliza una solución de cloroformo - metanol - amoníaco y es desarrollada por medio de una solución de ninhidrina. Algunas de las soluciones utilizadas en esta técnica fueron preparadas en el momento de su uso debido a que pueden llegar a perder sus principios activos con el tiempo; es el caso de la solución de arrastre y los estándares de histamina, mientras que el resto de las soluciones utilizadas fueron preparadas con anterioridad.

A continuación, se detallan los equipos y materiales utilizados:

- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Baño termostático regulable
- Estufa eléctrica regulable
- Campana para extracción de gases
- Compresor eléctrico de flujo regulable
- Aparato para siembra de muestras (concentrador)
- Homogeneizador manual con recipientes
- Cuba de vidrio con tapa para TLC
- Micropipeta automática regulable (10-100 μ L y 20-200 μ L)
- Termómetro de columna de mercurio (0-100°C)
- Equipo para pulverizar (matraz y ampolla de vidrio)
- Tubos de propileno de 5 y 30 ml de capacidad con tapa
- Probetas de vidrio graduadas de 100 ml
- Vasos de precipitado de 100 ml
- Pipetas graduadas de 1 y 5 ml
- Matraz de vidrio aforado de 100 ml con tapa
- Dispenser automática de volumen variable
- Propipetas
- Tips de plástico (10-100 μ L)
- Frascos de propileno y de vidrio color caramelo

- Espátulas de acero inoxidable (cucharita y punta de flecha)
- Varillas de vidrio
- Pissetas
- Papel aluminio
- Regla, tijera y lápiz de punta fina
- Trozos de papel radiográfico

La pureza de los reactivos tiene gran importancia en los resultados de un análisis, ya que participan directamente en la realización de una técnica analítica y en función de su calidad podrán influir positiva o negativamente en los resultados de la determinación. Es por esta razón que los reactivos utilizados en el procedimiento son reactivos pro análisis (p.a), cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice. Los reactivos y drogas que utilizaremos para determinar histamina son los siguientes:

- Cromatoplasmas de silicagel 60 de aluminio de 20 x 20 cm
- Metanol p.a. (bajo contenido de agua)
- Cloroformo p.a.
- Amoníaco p.a.
- Butanol p.a.
- Ninhidrina p.a.
- Ácido clorhídrico p.a. (~37%)
- Agua metilada
- Material de control: Histamina diclorhidrato p.a.

3.1.1 Preparación de soluciones.

-De arrastre: se colocaron en un erlenmeyer de 125 ml: 70 ml de cloroformo, 30 ml metanol y 5 ml de amoníaco. Se agitó hasta homogeneizar la solución.

-De revelado: se pesaron en un vaso de precipitado de 100 ml, aproximadamente 0,5 g de ninhidrina en balanza granataria. Se disolvieron con una porción de 20 o 30 ml de butanol y se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml, que se enrasó con butanol.

Esta solución se debe envasar en frascos de color caramelo o cubierto con papel aluminio para resguardarla de la luz y así no sufrir deterioro.

-HCl 0,1 N: Se pipetearon con pipeta de 1 ml, 0,85 ml de ácido clorhídrico y fueron transferidos a un matraz aforado de 100 ml. Se enrasó con agua destilada. Esta solución es utilizada en su totalidad para la preparación de la siguiente solución.

-Stock de histamina: Se pesaron en un vaso de precipitado de 100 ml, 165,60 mg de histamina diclorhidrato en balanza analítica. Se disolvieron con una porción de 20 o 30 ml de la solución de HCl 0,1 N y se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml. Se enrasó con la misma solución de HCL. Se envasó en frasco de polipropileno y se mantuvo bien cerrado y en heladera (Concentración final: 1mg hist/ml sol.).

-Estándares de histamina: Se confeccionaron patrones con la concentración deseada a partir de la solución stock.

50 ppm: 50 μ L de solución stock, se llevó a 1 ml con metanol.

100 ppm: 100 μ L de solución stock, se llevó a 1 ml con metanol.

200 ppm: 200 μ L de solución stock, se llevó a 1 ml con metanol.

Se agitó para homogeneizar.

3.1.2 Preparación de las muestras.

Los 10 gr de muestra obtenidos de cada lata (cada muestra se realiza por triplicado) se colocaron en tubos de polipropileno de 30 ml (figura 10).



Figura 10: Colocación de muestra en tubos de propileno.

Se agregaron 10 ml de metanol con dispenser y se homogeneizaron con varilla de vidrio (figura 11). Los tubos fueron sumergidos en un baño termostático a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 15 min (figura 12), con el objetivo de que la histamina que pudiese llegar a encontrarse en la muestra pasara a la solución de metanol. Se dejó enfriar para que decante (figura 13).



Figura 11: Colocación de metanol y homogeneización



Figura 12: Baño termostático



Figura 13: Enfriado y decantación

Una vez preparada, la solución de arrastre se colocó en la cuba 1 hora antes de la colocación de las placas sembradas para que ésta se saturara. Dichos pasos pueden observarse en las figuras 14 y 15.



Figura 14 y 15: Colocación de solución de arrastre en cuba y saturación

3.1.3 Preparación y activación de la placa.

Para la activación de las placas cromatográficas se cortó la placa de 20x20 cm por la mitad (10x20) y se trazó, a 1 cm de distancia de uno de los bordes mayores, una línea recta con un lápiz (línea de siembra). Luego, como se visualiza en la figura 17, se colocó en estufa eléctrica a 100-105°C durante 60 minutos para su activación.



Figuras 16 y 17: Preparación y activación de las placas

Transcurrido ese tiempo, la placa activada se colocó sobre el concentrador (figura 18), mientras que se verificó la correcta decantación de las muestras (sobrenadante límpido) antes de la siembra. Al cabo de 3-5 minutos se sembró sobre la línea previamente marcada, con pipeta automática, 10 μ l de cada muestra (se pipetea del

sobrenadante, evitando tocar el precipitado) dejando 2 o 3 mm entre cada una de ellas (figura 19). De igual forma se realizó la siembra de los tres patrones estándares de concentraciones conocidas (50, 100 y 200 ppm). Las muestras se sembraron por triplicado. Luego la placa se colocó en estufa a 100-105 °C durante 2 o 3 min.



Figura 18: Colocación de placa en concentrador



Figura 19: Siembra de muestras

Pasados los minutos de estufa, la placa se colocó en la cuba de corrida con la línea de siembra hacia abajo y se tapó (figura 20). Se retiró cuando el frente de arrastre llegó a 5 mm del borde superior y se secó en estufa a 100-105 °C durante 2 o 3 minutos, se retiró y se dejó en la oscuridad al menos 30 minutos, para que se definiera bien la corrida.



Figura 20: Colocación de placa sembrada en la cuba

En las figuras 21 y 22 se puede observar el revelado. La placa se colocó dentro de la campana de extracción, para luego ser pulverizada con la solución de revelado. Dicho pulverizado debe ser lo mas homogéneo posible, evitando excesos de solución sobre la placa que pueden producir manchas innecesarias.

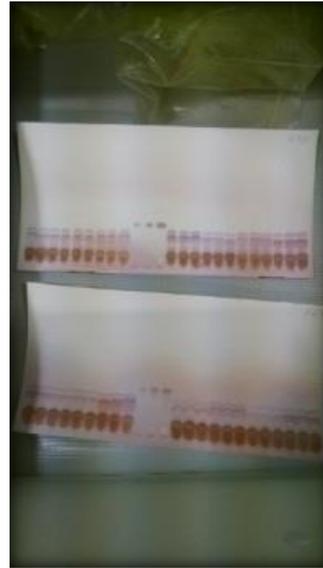


Figuras 21 y 22: Pulverizado con ninhidrina

Luego de pulverizar la placa, ésta se dejó secar en la campana. Para la aparición de las manchas características se puede proceder de tres maneras diferentes:

- Llevar a estufa 100-105 °C durante 2 ó 3 min.
- Calentar en el concentrador
- Dejar a temperatura ambiente durante unas horas a oscuras.

Como se puede observar en las figuras 23 y 24, las manchas son de color rojo-violáceo y desaparecen al día siguiente de ser pulverizadas . Los resultados se registran en la planilla de trabajo de histamina (ver anexo).



Figuras 23 y 24: Aparición de las manchas.

Durante el período en el que se realizó la práctica se analizaron un total de 168 muestras, de las cuales 112 latas correspondían a atún, 44 a caballa, 8 a sardina y 4 a bonito. De cada especie hubo diversas presentaciones como al natural, en aceite, sin sal agregada, con salsa de tomate, entre otras.

Según el decreto 4238/68, los pescados en conservas no deberán contener más de 100 ppm de histamina según el promedio de la unidad de muestra analizada y también, ninguna unidad de muestra deberá contener una concentración de histamina superior a 200 ppm.

4. RESULTADOS

4.1 Determinaciones

4.1.1 Análisis organoléptico

De todas las muestras analizadas, se evaluaron las características sensoriales del producto, dando un resultado normal en todos los casos.

4.1.2 Análisis de peso

Con los pesos obtenidos de las muestras analizadas se determinó el porcentaje de masa y de cobertura, obteniendo como resultado un 35,7 % de muestras que no se encontraban dentro de los pesos permitidos, teniendo la mayoría exceso en su líquido de cobertura.

4.1.3 Análisis de histamina

Del total de muestras analizadas, se determinó mediante el análisis de histamina que el 5,3% no resultaron aptas para el consumo humano.

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de histamina en las distintas especies en conservas examinadas. Si bien las muestras analizadas durante el período de residencia implicaron varias especies como bonito, caballa, atún y sardina, para el análisis desde el punto de vista estadístico, sólo se tuvieron en cuenta las muestras de caballa y atún. Esto se debió a que la cantidad de las latas recibidas de las otras especies era relativamente baja y su análisis no sería representativo. De todas maneras, de las latas analizadas de bonito y sardina, se obtuvieron resultados elevados en contenido de histamina en ambos casos.

Tabla 1. Aptitud para consumo de acuerdo a los resultados de histamina en distintas especies de pescado en conserva.

Especie utilizada	Total de muestras	Aptas	No aptas
Atún	112	110	2
Caballa	44	41	3
Bonito	4	2	2
Sardina argentina	8	6	2
Total	168	159	9

De acuerdo al Test Exacto de Fisher, la asociación entre el contenido de histamina y la especie utilizada para la conservas de atún y caballa no fue significativo ($p=0,1367$). En la siguiente figura, se puede observar la aptitud para el consumo de las conservas basada en la relación entre el contenido de histamina y la especie utilizada en la conserva.

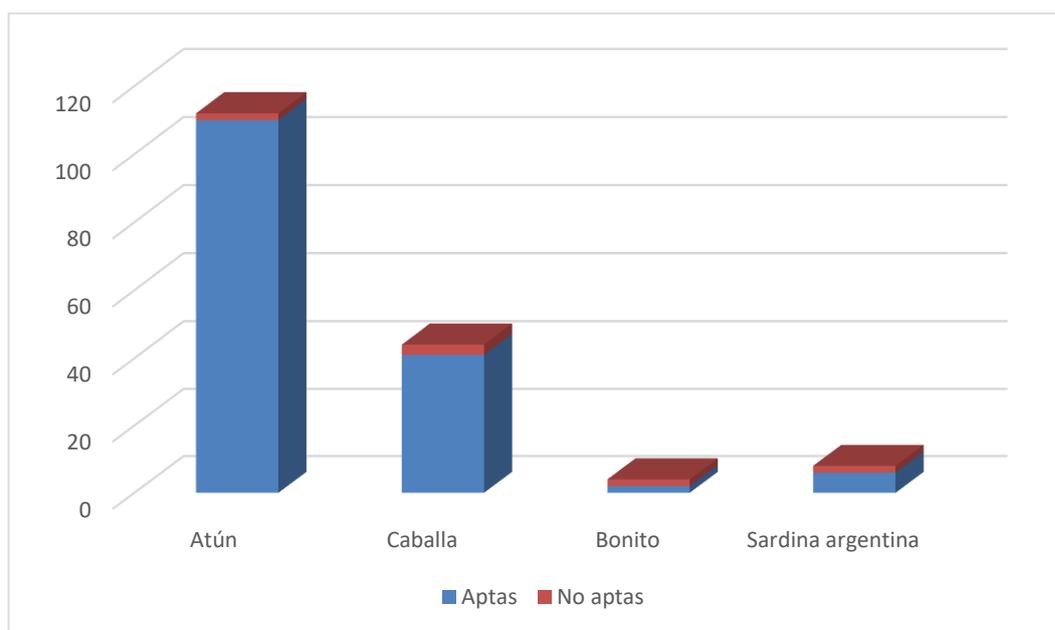


Figura 25: Aptitud para el consumo basada en la relación entre el contenido de histamina y la especie utilizada.

5. CONCLUSIONES

- Las características sensoriales de las muestras no se correlacionaron con la presencia o no de histamina, esto podría deberse a que las concentraciones detectadas no fueron lo suficientemente elevadas para que puede detectarse por los sentidos.
- La cromatografía en capa delgada es una técnica sencilla, sensible, eficiente, de bajo costo y confiable.
- La proporción de muestras aptas superó ampliamente a las de no aptas.
- Los porcentajes de no aptos en la evaluación de aptitud de las muestras determinada por el contenido de histamina, resultaron más elevados para la caballa en comparación con el atún. Esto podría deberse a las distintas formas de conservación de la materia prima, luego de ser capturada y durante el proceso de elaboración.

El análisis de rutina de histamina en establecimientos que elaboran conservas a partir de especies grasas es de suma importancia para la prevención de intoxicaciones histamínicas.

6. ANEXOS

	Formulario LRG MDQ FQ Hoja de trabajo de conservas.	Hoja <u>109</u> de <u>200</u>
DIRECCION GENERAL DE LABORATORIOS Y CONTROL TECNICO	LABORATORIO REGIONAL MAR DEL PLATA	Departamento de Fisico-Quimica

FECHA DE INGRESO: _____ N° DE ORDEN DE ANÁLISIS _____

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO: _____

PESO NETO DECLAR. _____ g
 FECHA DE ELABORACIÓN ____/____/____
 PESO ESCURR. DECLAR. _____ g

CARACTERES SENSORIALES: _____
 ASPECTO EXTERNO DEL ENVASE: _____
 ASPECTO INTERNO DEL ENVASE: _____
 BARNIZ SANITARIO: _____

DETERMINACIÓN DE % DE MASA Y COBERTURA

Nº DE LATA	PESO TOTAL	PESO ESCURRIDO	PESO LATA VACÍA
1			
2			
3			

	PESO TOTAL	PESO ESCURR.	P.L. VAC.	P. NETO OBT.	P. ESCUR. OBT.	%MASA	%COBERT
PROMEDIO							

HISTAMINA 1	HISTAMINA 2	HISTAMINA 3
ppm	ppm	ppm

REGISTR. PLAN. de TRABAJO N° _____ POSICIÓN ____ al ____ FECHA _____
 OBSERV: _____

FECHA _____

FIRMA ANALISTA RESPONSABLE

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alimentos Argentinos (2014). Nutrición y educación alimentaria. Ficha N° 27. Incluí pescado en tu alimentación. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Nutricion/fichaspdf/Ficha_27_pescados.pdf. Fecha de consulta: 30/08/2016.
- Cepesca (2010). Sostenibilidad flota a flota. Disponible en: <http://www.cepesca.es/download-doc/87436>. Madrid.16p. Fecha de consulta: 03/02/2017.
- Christian D. Gary (2009). Química analítica. Sexta edición. Ed. McGraw-Hill/Interamericana, S. A. de C. V. Delegación Alvaro Obregón, México.
- Decreto 4238/68 y modif. (SENASA). Reglamento de inspección de productos subproductos y derivados de origen animal. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/decreto-423868>. Fecha de consulta: 29/08/2016
- EcuRed (s.f.). Disponible en: <https://www.ecured.cu/At%C3%BA>. Fecha de consulta: 15/02/2017.
- FAO (1985). Histamine in marine products: production by bacteria, measurement and prediction of formation. (Bonnie Sun Pan and David James). Fisheries Technical Paper 252.
- FAO (1995). Código de conducta para la pesca responsable. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/v9878s/v9878s00.htm>. Fecha de consulta: 26/12/2016.
- FAO (1996). Seguimiento, control y vigilancia de la ordenación pesquera. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/V4250S/V4250S08.htm>. Fecha de consulta: 26/12/2016.

- FAO (2005a). Guía del administrador pesquero medidas de ordenación y su aplicación. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y3427s/y3427s04.htm#bm04.2.1>. Fecha de consulta: 30/08/2016.
- FAO (2005b). Examen de la situación de los recursos pesqueros marinos mundiales. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/009/y5852s/Y5852S09.htm>. Fecha de consulta: 15/02/2017.
- Footitt R.J.; Lewis A.S. (1995). Enlatado de pescado y carne. Editorial Acribia, S.A., Apartado 466 50080 Zaragoza, España.
- FDA (2011). Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Fourth Edition. University of Florida, Gainesville, Florida. 113p.
Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM251970.pdf>.
Fecha de consulta: 09/02/2017.
- Gozzi, M. S.; Piacente, M. L.; Cruces, V. y Díaz, E. G. (2011) Influencia de la Temperatura de Conservación sobre la Formación de Histamina en Caballa (*Scomber japonicus*). Instituto de Tecnología, Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas, Universidad Argentina de la Empresa (UADE), Lima 717, AAO1073, Buenos Aires-Argentina. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v22n6/art06.pdf>. Fecha de consulta: 11/03/2017
- Huss, H.H. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. *Documento Técnico de Pesca*. No. 334. Roma, FAO. 174p.
- Huss, H.H. (1998). El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. *Documento Técnico de Pesca*. No. 348. Roma, FAO. 202 p.

- INIDEP (s.f.). Nombre científico, común y biología de especies de interés pesquero del Mar Argentino. Disponible en: <http://www.inidep.edu.ar/especies/> Fecha de consulta: 26/09/2016.
- INTI (2011a). Noticiero tecnológico semanal, Histamina ¿Cómo controlarla? Disponible en: <http://www.inti.gob.ar/noticiero/noticiero269.htm> Fecha de consulta: 29/04/2016.
- INTI (2011b). Determinación de histamina en pescados para asegurar su calidad. Disponible en: http://www.inti.gob.ar/noticiero_mdq/2011/nmdq14.htm. Fecha de consulta: 21/02/2017.
- Izquierdo, P.; Allara, M.; Torres, G.; Fernández, A.; Paulinkevicius, M.; Fuenmayor, J. (2001) Bacterias productoras de histamina en tres especies de pescado. Revista científica, FCV-LUZ. Vol. XI, N°5, 431-435, Maracaibo, Venezuela.
- Ministerio de Agroindustria (2016). Exportaciones e importaciones pesqueras-2015. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/pesca_maritima/04=informes/05- Fecha de consulta: 28/07/2016.
- Niven, C.F.; Jeffrey, M.B & Corlett, D.A. (1981). Differential plating médium for quantitative detection of histamine producing bacteria. Applied and Environmental Microbiology 13 (7): 321-322.
- Perrotta, R. (2000). Caballa (*Scomber japonicus*). Pesquerías de Argentina, 1997-1999: 217-225. Disponible en: <http://www.inidep.edu.ar/wp-content/uploads/Caballa.pdf>. Fecha de consulta: 26/12/2016.
- Redes & Seafood (2016). Evolución de los desembarques. Ed. n°202 Ene/Feb 2016. Pág. 14.

- SEAFOODplus (2006). Traceability. Valid. Methods for chemical quality assessment. Methodology for histamine and biogenic amines analysis. Monique Etienne, Ifremer, Nantes, France Feb.
- Statistical Analysis Systems, Version 9.3. (2014) (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Valls, J. (2002). Histamina en Atún y otros grandes pelágicos. Métodos para su cuantificación. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Universidad Central de Venezuela. Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jaime_Valls_Puig/publication/307633908_Histamina_en_atun_y_otros_grandes_pelagicos_Metodos_para_su_cuantificacion/links/57db08fb08ae72d72ea37065.pdf. Fecha de consulta: 07/02/2017.
- Zavalza Ortega, K. E. (1994). Aspectos toxicológicos durante el ahumado de pescado. Disponible en: <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/1303/Capitulo4.pdf>. Fecha de consulta: 05/09/2016