

I. INTRODUCCIÓN

La industria salmonera es uno de los casos insignes del crecimiento industrial chileno, debido a que ha logrado una enorme expansión en apenas una década. De registrar exportaciones mínimas en 1980, Chile ha llegado a ser el segundo país productor del mundo, después de Noruega. Las dos especies de salmónes más cultivados en Chile son: del Atlántico o Salar y del Pacífico o Plateado, específicamente el Salmón coho (PUC, 2003). Entre los productos más demandados en el exterior destacan el salmón fresco refrigerado destinado a Estados Unidos y el salmón congelado a Japón (Cideiber, 1999).

El músculo del pescado es altamente susceptible a contaminarse durante el almacenamiento, debido principalmente al crecimiento y actividad de microorganismos. Generalmente, la frescura del pescado es evaluada por métodos sensoriales, los cuales tienen la desventaja de ser inherentemente subjetivos. Por esta razón es necesario utilizar métodos químicos para evaluar la frescura del pescado, siendo uno de ellos la medición de los niveles de aminas volátiles (trimetilamina, dimetilamina) y aminas no volátiles o aminas biogénicas (Baixas-Nogueras y col., 2002).

Las aminas biogénicas son un grupo de bases orgánicas de bajo peso molecular presentes en todos los organismos. Son formadas y degradadas durante el proceso metabólico normal de la vida de la célula y por lo tanto son ubicuas en animales, plantas y microorganismos (Krizek y Pelikánová, 1998).

Las principales aminas biogénicas son histamina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, tiramina, triptamina y fenil etilamina. Éstas son constituyentes normales en alimentos fermentados (chucrut, quesos, vinos, cerveza, etc). En alimentos no fermentados son indicadores de la calidad y marcan su descomposición. Usualmente, en este tipo de alimentos, las aminas biogénicas, son producidas por la actividad descarboxilante de enzimas microbianas sobre aminoácidos de estructura alifática, aromática o heterocíclica (Krizek y Pelikánová, 1998).

En la presente investigación se utilizó dos técnicas analíticas HPLC y CZE. Uno de los objetivos fue realizar una validación limitada de ambos métodos. Una vez que se demostró que las características de la técnica analítica cumplen con las especificaciones relacionadas con el uso posterior del resultado analítico, se procedió a aplicar estos métodos de ensayo en el estudio del contenido de histamina en muestras de Salmón coho, durante su etapa de almacenamiento refrigerado (0 y 2°C) por un período de 24 días.

1.1. MARCO TEÓRICO

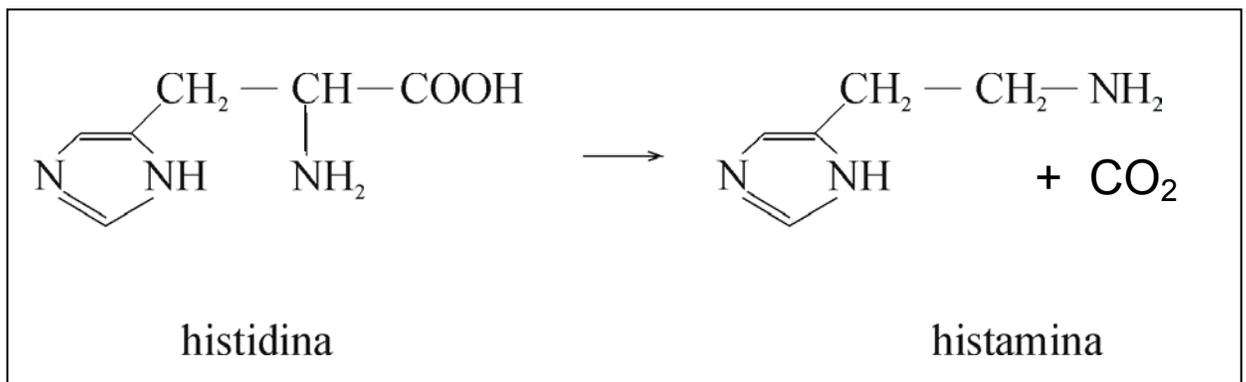
1.1.1. Histamina

En los EEUU, la histamina tiene diferentes implicancias toxicológicas, porque es la responsable del 5 % de todas las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y del 37% de las ETA provocadas por productos del mar (Noltkamper, 2003).

La histamina es la única amina biogénica que tiene un nivel establecido en la regulación de productos del mar: para pescado fresco, la Unión Europea establece que el contenido de histamina no debe sobrepasar en promedio de 100 mg/kg en pescados pertenecientes a las familias *Scombridae* y *Scomberesocidae* y la FDA establece un nivel de 50 mg/kg para pescados escómbridos y relacionados con escómbridos (Silva y col., 1998; FDA, 2001; Baixas-Nogueras y col., 2001 y 2002). En Chile, SERNAPESCA, establece niveles de histamina de 100 mg/kg, aplicable sólo a clupeidos, escómbridos y jurel (SERNAPESCA, 2005).

Las aminas biogénicas son producidas por la descarboxilación de ciertos aminoácidos libres, presentes en el músculo de pescados y crustáceos en la etapa post mortem. La histamina es una diamina que se genera por la descarboxilación de la histidina (figura N°1) (FDA, 2001).

Figura N°1: Descarboxilación de la histidina



El proceso de descarboxilación puede ser producido por dos caminos bioquímicos: por la enzima descarboxilasa endógena que naturalmente está presente en el músculo de los pescados y crustáceos o por la enzima exógena liberada por diferentes microorganismos asociados con productos marinos (FDA, 2001).

La producción endógena es insignificante cuando es comparada con la exógena. La naturaleza de la microflora y la composición del producto afectan la cantidad de descarboxilasa que una bacteria puede liberar (FDA, 2001).

Muchas bacterias poseen una limitada actividad de la histidina descarboxilasa, pero sólo *Proteus morgani*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alvei* han sido implicadas como organismos causantes de la formación de niveles de histamina toxicológicamente significativos. Sin embargo, los intentos para aislar e identificar las bacterias que producen histamina, se han realizado sólo en unas pocas muestras obtenidas de incidentes de alimentos envenenados. Consecuentemente, aún existen las posibilidades, de identificar otras especies de bacterias, que pueden ser consideradas como importantes productores de histamina (Behling y Taylor, 1982).

En la industria pesquera, la producción bacteriana de histamina es controlada principalmente por el uso de bajas temperaturas de almacenamiento. La producción de histamina por bacterias, aparentemente, reside en las agallas y/o intestinos del pescado y un almacenamiento prolongado a elevadas temperaturas genera una acción bacteriana sobre el tejido de la histidina (Behling y Taylor, 1982).

La histamina ejerce sus efectos atacando a los receptores en las membranas celulares en los sistemas respiratorios, cardiovasculares, gastrointestinales, hematológicos e inmunológicos y en la piel. Los síntomas, generalmente aparecen poco después que el alimento es ingerido con una duración de hasta 24 h. Los cuales pueden ser gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas), circulatorios (hipotensión), cutáneos (erupción, urticaria, edema, inflamación localizada), y neurológicos (dolor de cabeza, palpitaciones, hormigueos, bochornos). Los antihistamínicos se pueden utilizar con eficacia para tratar los síntomas (FDA, 2001).

1.1.2. Validación

Todas las mediciones tienen una incertidumbre asociada que resulta de errores que se originan en los diferentes estados de muestreo y análisis y del conocimiento imperfecto de factores que afectan el resultado. Para que las mediciones sean valores prácticos es necesario tener algún conocimiento de su fiabilidad o incertidumbre (Eurachem, 2002).

Al adoptar un método de ensayo se debe verificar que se dispone de las capacidades requeridas para ejecutarlo adecuadamente. La validación consiste en la confirmación mediante examen y entrega de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos particulares para el uso previsto (NCh-ISO 17025, 2001). Este proceso puede tener dos alcances: validación total y validación limitada (Eurachem, 2000).

Se realiza una validación total cuando se utiliza un método no estándar o el método es estándar pero ha sido modificado sustancialmente. Es decir, se evalúa los parámetros como: límite de detección y de cuantificación, exactitud, precisión, linealidad, sensibilidad, intervalo, selectividad, medida de la incertidumbre y robustez (Eurachem, 2000).

En cambio cuando se utiliza un método estándar o bien establecido, se realiza una validación limitada para la confirmación de su funcionamiento. Es decir, se evalúa los parámetros como: límite de detección, linealidad, intervalo, exactitud y precisión (Eurachem, 2000).

1.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

HPLC es el modo de cromatografía más ampliamente utilizado. Se define como una técnica de separación que involucra una transferencia de masa entre una fase estacionaria y una fase móvil (Kazakevich y McNair, 2002).

En HPLC se utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de una mezcla. Estos componentes (o analitos) son disueltos en un solvente y forzados a fluir a través de una columna cromatográfica sometidos a alta presión, donde la mezcla es resuelta en sus componentes. La resolución es dependiente de la extensión de la interacción entre los solutos y la fase estacionaria. La fase estacionaria es definida como el material inmóvil empacado en la columna. La interacción del analito con ambas fases puede ser manejada a través de la elección del solvente y de la fase estacionaria (Kazakevich y McNair, 2002).

Cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes: interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria (Quattrocchi y col., 1992).

Los detectores utilizados en HPLC pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de una propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad propia del analito, por ejemplo los detectores: UV, de fluorescencia y electroquímico (Quattrocchi y col., 1992).

La derivatización es una reacción química que se produce entre el analito y un reactivo determinado ya sea dentro o fuera del equipo cromatográfico y se utiliza para detectar aquellos compuestos que no poseen grupos cromóforos o fluoróforos. Si se efectúa antes de inyectar la muestra dentro del cromatógrafo, la derivatización se denomina pre-columna y los derivados ya formados se separan en la columna cromatográfica. También puede realizarse después de inyectar la muestra, en cuyo caso se denomina post-columna. Esta última se efectúa separando al analito en la

columna y luego mezclando el eluyente de la columna con un reactivo apropiado en la misma línea del cromatógrafo, antes de efectuarse la detección (Quattrocchi y col., 1992).

Como resultado, HPLC adquiere un alto grado de versatilidad que no se ha encontrado en otro sistema cromatográfico y tiene la habilidad para separar eficazmente una amplia variedad de mezclas analíticas (Kazakevich y McNair, 2002).

1.1.4. Electroforesis capilar zonal (CZE)

La electroforesis capilar se ha aplicado en separaciones analíticas de la industria biotecnológica y en la investigación biológica y bioquímica (Skoog y col., 2001).

Una separación electroforética se lleva a cabo inyectando una pequeña parte de la muestra en una disolución tampón que está alojada en un tubo estrecho (soporte) poroso y plano, como por ejemplo, un capilar, un papel o un gel semisólido. Seguidamente, se aplica un elevado potencial de corriente continua, a través del tampón, mediante dos electrodos situados en los extremos del soporte. El potencial impulsa a los iones de la muestra a migrar hacia uno u otro de los electrodos. La velocidad de migración de una especie dada depende de su carga y tamaño, las separaciones en consecuencia, se basan en las diferencias en la relación carga-tamaño entre los diferentes analitos presentes en la muestra. Cuanto mayor es esta relación, más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. En electroforesis capilar los analitos una vez separados, llegan al detector que está situado en el extremo opuesto a aquél por donde se ha introducido la muestra. (Skoog y col., 2001).

Cuando se aplica un potencial elevado a través de un capilar que contiene un tampón, se origina normalmente un flujo electroosmótico (FEO), gracias al cual el tampón migra hacia el cátodo o el ánodo. La causa de este flujo es la doble capa eléctrica que se forma en la interfase sílice/disolución. A valores de pH por encima de 3, la pared interna del capilar de sílice presenta carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol (Si-OH) de la superficie. Los cationes del tampón se agrupan sobre la superficie negativa del capilar de sílice para formar la doble capa eléctrica. Los cationes, situados en la capa exterior difusa de la doble capa, son atraídos hacia el cátodo o electrodo negativo, y dado que los cationes están solvatados arrastran al resto de la disolución con ellos, a lo largo del capilar. Aunque los analitos migran según sus cargas dentro del capilar, la velocidad del FEO es normalmente suficiente como para arrastrar a todas las especies, las cargadas positivamente, las neutras y las cargadas negativamente hacia el mismo extremo del capilar, de tal forma que todas ellas pueden detectarse al pasar por un punto común. El electroferograma resultante es similar a un cromatograma (Skoog y col., 2001).

Se conocen diferentes tipos de electroforesis capilar, entre ellos, el más utilizado es la electroforesis capilar zonal, probablemente debido a su simplicidad y poder de separación. El potencial aplicado hace que los diferentes componentes iónicos de la mezcla migren cada uno según su propia movilidad y se separen en zonas que puedan estar completamente resueltas o parcialmente solapadas. Su principal inconveniente es que no permite separar los compuestos neutros (Skoog y col., 2001).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

- ✓ Aplicación de los métodos analíticos de HPLC y CZE para la determinación del contenido de histamina en Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) refrigerado, almacenado por 24 días.

1.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Validación limitada del método de cuantificación de histamina por HPLC.
- ✓ Validación limitada del método de cuantificación de histamina por CZE.
- ✓ Estudiar la evolución del contenido de histamina en Salmón coho entero HG durante 24 días de almacenamiento refrigerado (0 -2°C).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS

Se cosecharon 40 ejemplares de Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*), cuyo peso fue entre 2.800 y 3.500 g, en la planta de cultivo de Ewos Innovation ubicada en Colaco, los cuales fueron procesados inmediatamente en la planta Fitz Roy de la exportadora Mainstream S.A., (ubicada, también, en Colaco). A cada individuo se le cortó la cabeza y se le extrajo las vísceras y agallas, se clasificaron según peso y sexo, y se enfriaron a 4°C, obteniéndose el salmón entero HG refrigerado. Se colocaron en cajas de plumavit (10 individuos en c/u) y se cubrieron con bolsas de hielo. Posteriormente, se trasladaron a Santiago, al estado fresco – refrigerado, dónde se almacenaron en cámara refrigerada (0 - 2°C) de Prinal S.A., durante 24 días.

Se realizaron controles de histamina a los a los 0, 3, 6, 10, 12, 17, 19 y 24 días de almacenamiento. En cada día de control se analizaron 5 individuos, a los cuales se les identificó con letras (A, B, C, D y E). De cada individuo, se extrajo músculo claro del corte noruego NQC (Einen y Thomassen, 1998), se pesó, por duplicado 10 g que se sometieron al proceso de extracción.

La cuantificación de histamina se realizó por dos técnicas analíticas, HPLC y CZE, las cuales, previamente, fueron validadas para demostrar la confiabilidad de sus resultados.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.2.1.1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos procedentes de Merck: Ácido Tricloroacético (TCA), Bicarbonato de Sodio (NaHCO_3), Cloruro de Dansilo, Acetona HPLC, Metanol HPLC y Acetonitrilo HPLC. De Sigma, se utilizó el estándar de histamina: Histamine Dihydrochloride.

2.2.1.2. Preparación de soluciones

- ✓ TCA 10%: Pesar 50 g de TCA y llevar a 500 ml con agua Mili-Q.
- ✓ NaHCO_3 0,25 M: Pesar 10,5 g de NaHCO_3 y llevar a 500 ml con agua Mili-Q.
- ✓ Cloruro de Dansilo 10 mg/ml: Pesar 0,1 g de Cloruro de Dansilo y llevar a 10 ml con acetona grado HPLC. Usualmente se forma un precipitado insoluble el cual hay que dejar decantar. Guardar refrigerado y protegido de la luz.
- ✓ Solución madre histamina 1000 mg/L: Pesar 0,1656 g del estándar de histamina y llevar a 100 ml con solución TCA 10%. Puede ser guardada refrigerada por un mes.
- ✓ Solución estándar histamina 100 mg/L: Tomar 5 ml de solución madre histamina 1000 mg/L y llevar a 50 ml con solución TCA 10%. Puede ser guardada refrigerada por una semana.
- ✓ Solución estándar histamina de concentración < 100 mg/L: Medir la alícuota correspondiente de la solución estándar histamina 100 mg/L y llevar a 10 ml con solución TCA 10%. Puede ser guardada refrigerada por una semana.
- ✓ Fase móvil: metanol/agua (75/25): En una probeta de 1L medir 750 ml de metanol, agregar 250 ml de agua Mili-Q medidos en una probeta de 250 ml.

2.2.1.3. Equipos

- ✓ Moulinex Somela
- ✓ Balanza analítica precisa Swiss Quality 1620 D
- ✓ Homogeneizador: Ultraturrax T 25 Janke & Kunkel
Ika-Labortechnik
- ✓ Baño de agua termorregulado
- ✓ Cromatógrafo Waters™ 600 Controller Millipore
Model Code 6 CE
Ser N° HX4HM9789M
Style Code
- ✓ Detector: Waters™ 996 Photodiode Array Detector Millipore
Model Code 996
Ser N° MX4HMO975M
Style Code
- ✓ Columna: Precolumna y Columna μ Bondapak™ C-18
3,9 x 150 mm column
Part. N° Wat 086684 - Waters

2.2.2. Electroforesis capilar zonal (CZE)

2.2.2.1. Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos procedentes de Merck: Ácido Perclórico (HClO_4), Hidróxido de Sodio (NaOH), Hidróxido de Potasio (KOH), Ácido Fosfórico (H_3PO_4), Fosfato disódico hidrogenado (Na_2HPO_4) y Acetonitrilo. De Sigma se utilizó el estándar de histamina: Histamine Dihydrochloride.

2.2.2.2. Preparación de soluciones

- ✓ HClO_4 6%: Medir 43 ml de HClO_4 70% y llevar a 500 ml con agua Mili-Q.
- ✓ KOH 30%: Pesar 30g de KOH y disolver en 70 ml de agua Mili-Q.
- ✓ Tampón fosfato 0,1 M: Pesar 0,7098 g de Na_2HPO_4 y disolver en agua Mili-Q, ajustar a pH 2,4 con H_3PO_4 y llevar a 50 ml con agua Mili-Q.
- ✓ Tampón fosfato 0,075 M: Pesar 0,5324 g de Na_2HPO_4 y disolver en agua Mili-Q, ajustar a pH 2,4 con H_3PO_4 y llevar a 50 ml con agua Mili-Q.
- ✓ Fosfato 0,05 M: Pesar 1,7745 g de Na_2HPO_4 y llevar a 250 ml con agua Mili-Q.
- ✓ H_3PO_4 0,05 M: Medir 290 μL de H_3PO_4 y llevar a 100 con agua Mili-Q.
- ✓ Tampón fosfato 0,05 M: Medir 100 ml de fosfato 0,05 M, adicionar 60 ml de H_3PO_4 0,05 M, ajustar a pH 2,4 con H_3PO_4 y agregar un 10% de acetonitrilo.
- ✓ NaOH 0,5 M: Pesar 1 g de NaOH y llevar a 50 ml con agua Mili-Q.
- ✓ NaOH 0,1 M: Pesar 0,2 g de NaOH y llevar a 50 ml con agua Mili-Q.
- ✓ Solución madre histamina 1000 mg/L: Pesar 0,1656 g del estándar de histamina y disolver en HClO_4 6%; neutralizar a pH 6,8 con KOH 30%; filtrar con papel filtro Whatmann N°1 y enrasar a 100 ml con agua Mili-Q. Puede ser guardada refrigerada por un mes.
- ✓ Solución estándar histamina 100 mg/L: Tomar 5 ml de solución madre histamina 1000 mg/L y llevar a 50 ml con agua Mili-Q. Puede ser guardada refrigerada por una semana.

- ✓ Solución estándar histamina de concentración < 100 mg/L: Medir la alícuota correspondiente de la solución estándar histamina 100 mg/L y llevar a 10 ml con agua Mili-Q. Puede ser guardada refrigerada por una semana.

2.2.2.3. Equipos

- ✓ Moulinex Somela
- ✓ Balanza analítica precisa Swiss Quality 1620 D
- ✓ Homogeneizador: Ultraturrax T 25 Janke & Kunkel
Ika-Labortechnik
- ✓ pHmetro Microprocessor pH Meter pH 537
- ✓ Agitador mecánico Bronstead / Thermolyne
2555 Kerper Boulevard
Duduque IA J2001 USA
- ✓ Equipo de Electroforesis Capilar WatersTM Capillary Ion Analyzer
Millipore Waters Chromatography
- ✓ Capilar de sílica fundida, de las siguientes dimensiones:
Diámetro interno: 50 µm
Largo total: 67 cm
Largo efectivo: 60 cm

2.3. MÉTODOS

2.3.1. Validación limitada de los métodos de cuantificación

Se realizó una validación limitada de ambas técnicas analíticas, donde se determinó: linealidad, límite de detección, precisión, exactitud e intervalo (Eurachem, 2000), usando la metodología de Díaz y Barrera (2001).

Se estableció un intervalo de trabajo de 5 – 75 mg/L de histamina, de acuerdo a los límites máximos establecidos por la legislación nacional e internacional y se consideró que el salmón posee un bajo contenido de histamina ya que no pertenece a la familia de los pescados escómbridos (Mietz y Karmas, 1978; De la Hoz y col., 2000; Vigel y col., 2000) y en este estudio se ha mantenido refrigerado (0 – 2°C).

2.3.1.1. Linealidad

Se determina por análisis de muestras con concentraciones del analito que comprenden el intervalo demandado por el método. Los resultados son usados para calcular una regresión lineal contra el analito calculado por el método de los mínimos cuadrados (Huber, 1994; Eurachem, 2002).

Se preparó una serie de nueve diluciones del estándar de histamina en el intervalo de 5 a 75 mg/L. Se determinó una curva de calibración, preparando e inyectando un duplicado del estándar.

En las figuras N°2 y N°3 se indica la preparación del estándar utilizada para el cálculo de la linealidad en cada técnica analítica.

Figura N°2: Preparación del estándar para la determinación de la linealidad por HPLC

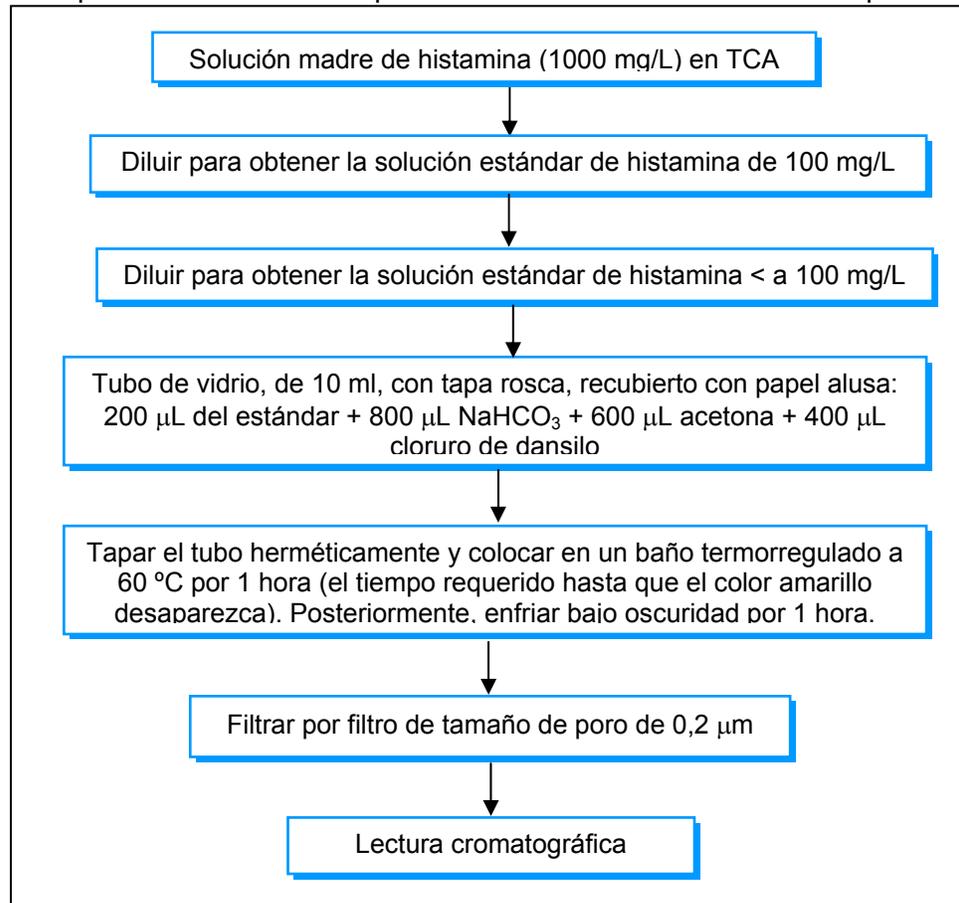
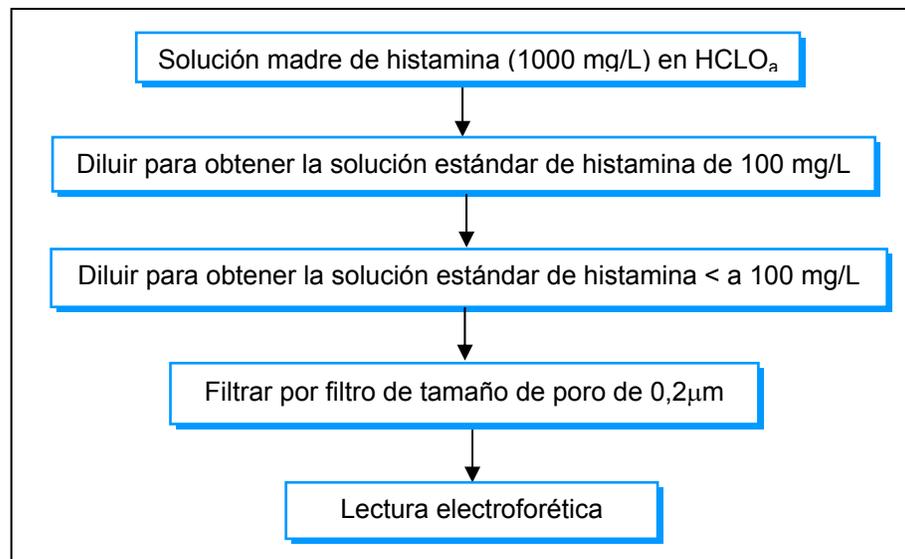


Figura N°3: Preparación del estándar para la determinación de la linealidad por CZE



Se evaluaron los estimadores de regresión en el nivel de confianza $p \leq 0,05$ (Quattrocchi y col., 1992).

✓ Coeficiente de regresión lineal (r), se determinó para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto:

$$y = bx + a \quad (1)$$

La pendiente (b) indica la sensibilidad del método y la ordenada al origen (a) evalúa la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio (Quattrocchi y col., 1992).

Como indicador del modelo lineal se calculó un test estadístico t_r con $n-2$ grados de libertad y se comparó con el valor t tabulado para el nivel de confianza $p \leq 0,05$. En este caso la hipótesis nula es la no correlación entre “ x ” e “ y ”. Si t_r es mayor que t_{tabla} , se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada (Quattrocchi y col., 1992).

$$t_r = \frac{|r|(n-2)^{1/2}}{(1-r^2)^{1/2}} \quad (2)$$

Donde: r = coeficiente de regresión lineal y n = número de datos.

Se definen los valores S_{xx} y S_{yy} como la suma de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media de los valores individuales de x e y . Es decir: (Skoog y col., 2001).

$$S_{xx} = \sum x_i^2 - [(\sum x_i)^2/N] \quad (3)$$

$$S_{yy} = \sum y_i^2 - [(\sum y_i)^2/N] \quad (4)$$

A partir de S_{xx} y S_{yy} pueden calcularse los siguientes parámetros:

✓ Desviación estándar de la regresión (S_r):

$$S_r = (S_{yy} - b^2 S_{xx}/N - 2)^{1/2} \quad (5)$$

✓ Desviación estándar de la pendiente (S_b):

$$S_b = S_r / (S_{xx})^{1/2} \quad (6)$$

- ✓ Desviación estándar de la ordenada en el origen (S_a):

$$S_a = s_r [1/(N - (\sum x_i)^2/\sum x_i^2)]^{1/2} \quad (7)$$

2.3.1.2. Límite de detección

El límite de detección (LD) es la menor concentración de analito en la muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse y se expresa en unidades de concentración (% , mg/L, μ g/L, etc.) (Quattrocchi y col., 1992; Huber, 1994; Eurachem, 2002).

También se determinó el límite de cuantificación (LC), el cual es la menor concentración de analito que puede determinarse con exactitud y precisión razonables en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración (% , mg/L, μ g/L, etc.) (Quattrocchi y col., 1992; Huber, 1994; Eurachem, 2002).

El límite de detección y cuantificación se estimó a partir de la curva de regresión, considerando concentraciones bajas del estándar, por extrapolación a concentración cero: (Quattrocchi y col., 1992).

- ✓ Se determinó la pendiente de la curva de calibración (concentración vs respuesta):
b.
- ✓ Se obtuvo una 2º curva de calibración, considerando sólo las concentraciones bajas del estándar (5, 10 y 15 mg/L de histamina), inyectando cada punto por triplicado. Se determinó la ecuación de esta nueva recta de calibración y se extrapoló la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco: Y_{bl} .
- ✓ Se determinó la desviación estándar correspondiente a cada concentración de la 2º curva de calibración. Se calculó la recta, desviación estándar vs concentración y se extrapoló a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calculó el límite de detección (3 desviaciones estándar del blanco) y el límite de cuantificación (10 desviaciones estándar del blanco) para n' medidas individuales: (Quattrocchi y col., 1992).

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3 * S_{bl}}{b} \times \frac{1}{n'^{1/2}} \quad ; \text{ donde } n'=1 \quad (8)$$

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10 * S_{bl}}{b} \times \frac{1}{n'^{1/2}} \quad ; \text{ donde } n'=1 \quad (9)$$

2.3.1.3. Precisión

Corresponde a la proximidad de concordancia entre resultados de pruebas mutuamente independientes y usualmente es expresada en términos de desviación estándar (Eurachem, 2002).

La desviación estándar medida puede dividirse en dos categorías, repetitividad y reproducibilidad. La repetitividad se obtiene si el análisis se lleva a cabo en un laboratorio por un operador, utilizando un solo equipo en un relativamente corto período de tiempo. La reproducibilidad se define como la variabilidad a lo largo del proceso de medida, que puede determinarse para un método ejecutado dentro de un único laboratorio, pero en días diferentes (Huber, 1994).

La precisión se expresa como la desviación estándar (s) o desviación estándar relativa (RSD) (Quattrocchi y col., 1992).

$$s = [\sum (X_i - \bar{X})^2 / n - 1]^{1/2} \quad (10)$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y \bar{X} el estimador de la media poblacional, calculado como: (Quattrocchi y col., 1992)

$$\bar{X} = (\sum X_i / n) \quad (11)$$

La desviación estándar relativa (RSD) se calcula como: (Quattrocchi y col., 1992)

$$RSD = (s * 100 / \bar{X}) \quad (12)$$

La precisión se determinó realizando un estudio interdía, que permite evaluar la reproducibilidad y de un estudio intradía, que permite evaluar la repetitividad.

Dentro del intervalo dado por la curva de calibración, se seleccionaron tres concentraciones del estándar de histamina (20 - 30 - 50 mg/L) para calcular ambas expresiones de la precisión:

- ✓ Estudio interdía: Se realizó en un período de seis días seguidos. Cada día, se prepararon los estándares y se calculó su dispersión obtenida de las inyecciones realizadas diariamente.
- ✓ Estudio intradía: Dentro de un día, se prepararon los estándares y se calculó su dispersión obtenida de seis inyecciones.

Los límites de aceptación para ambas expresiones de la precisión fueron obtenidos según la fórmula empírica de Horwitz, donde la desviación relativa es:

$$\text{RSD (\%)} = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (13)$$

Donde C es la concentración del analito expresada en potencias de 10 (Quattrocchi y col., 1992).

2.3.1.4. Exactitud

La exactitud de un método analítico corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. Se establece por análisis de un material de referencia apropiado. Cuando no se dispone del material de referencia, una estimación de la exactitud puede ser obtenida mediante ensayos de recuperación del estándar químico en una matriz negativa (Quattrocchi y col., 1992; Huber, 1994; Eurachem, 2002).

Se determinó realizando una medición de la recuperación de la extracción, expresada por:

$$\text{Recuperación: } R = \frac{\overline{X}}{\widehat{X}} * 100 \quad (14)$$

Donde \overline{X} es el valor medio y \widehat{X} el valor verdadero (Quattrocchi y col., 1992).

La exactitud, se expresó como el porcentaje obtenido entre el valor medio versus el valor verdadero. Se evaluó en tres niveles de concentración (20 – 30 – 50 mg/L) inyectando cada uno por triplicado.

Se considera como \overline{X} el promedio de los resultados obtenidos a partir de la muestra adicionada de estándar de histamina a la matriz negativa durante la etapa de extracción. Se considera matriz negativa a la muestra de Salmón coho, correspondiente al día cero, ya que su contenido de histamina sería insignificante (Mietz y Karmas, 1978; De la Hoz y col., 2000; Vigel y col., 2000).

Se considera como valor verdadero la concentración de la cantidad agregada de estándar de histamina a la matriz negativa.

En las figuras N°4 y N°5 se indica la preparación de la muestra utilizada para el cálculo de la exactitud en cada técnica analítica.

Figura N°4: Preparación de la muestra para la determinación de la exactitud por HPLC

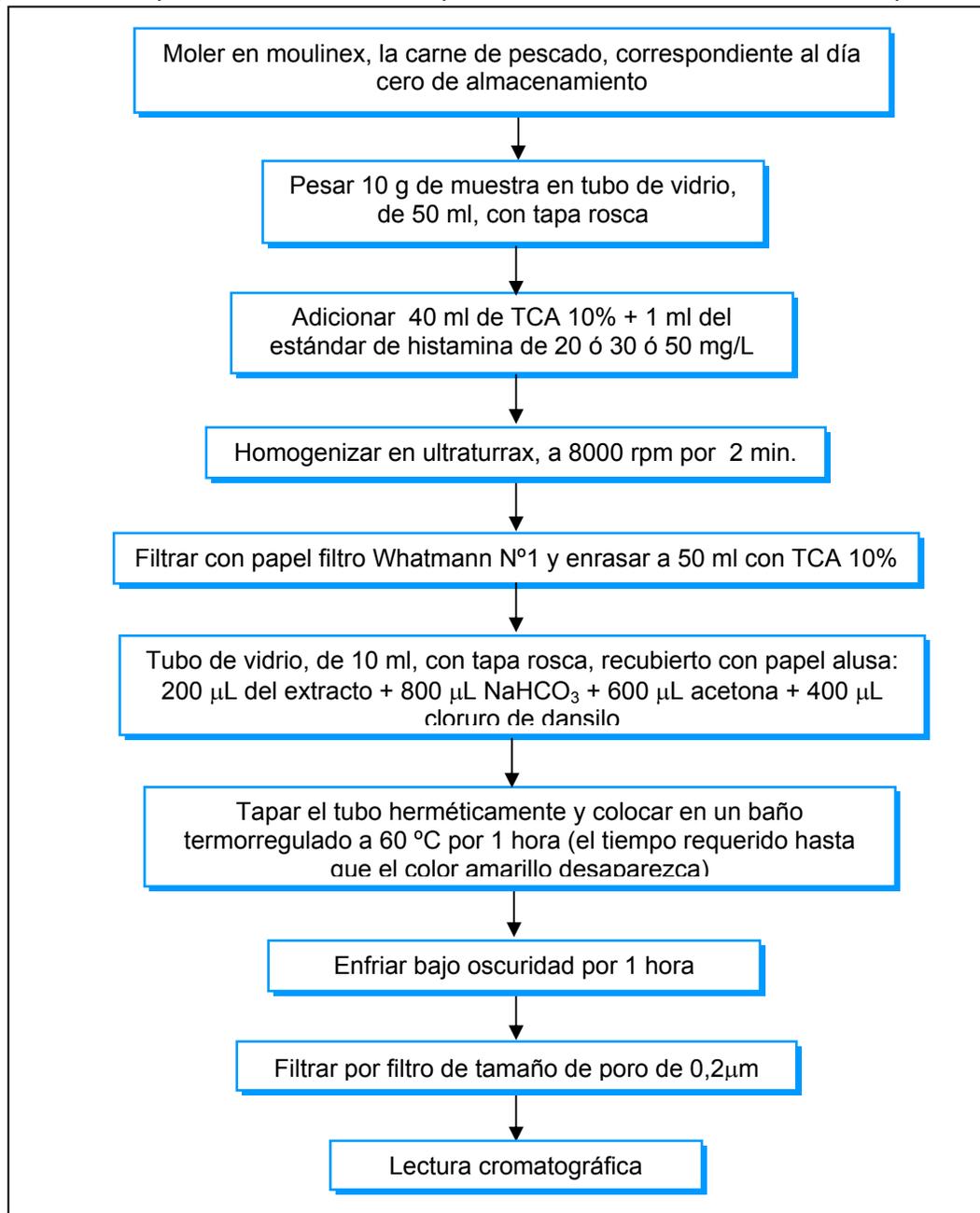
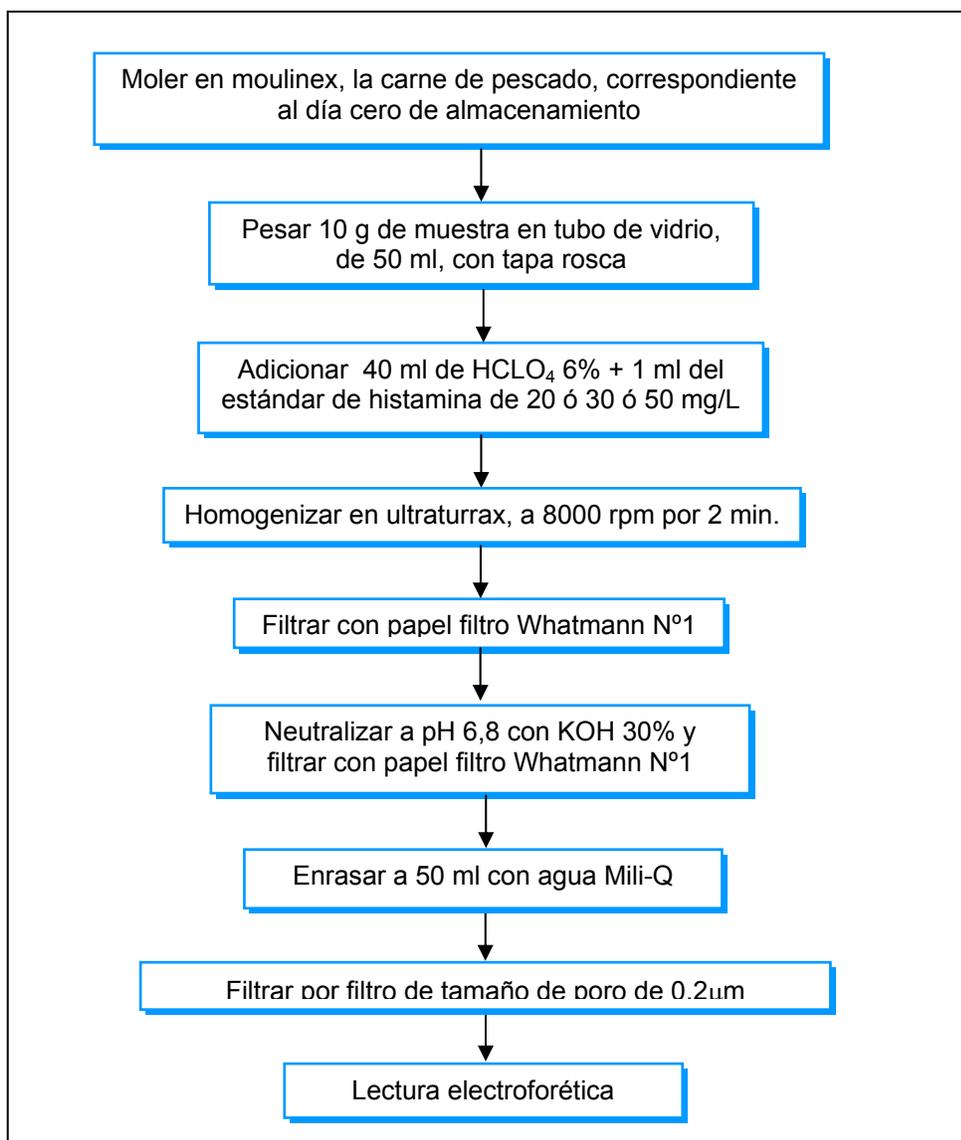


Figura N°5: Preparación de la muestra para la determinación de la exactitud por CZE



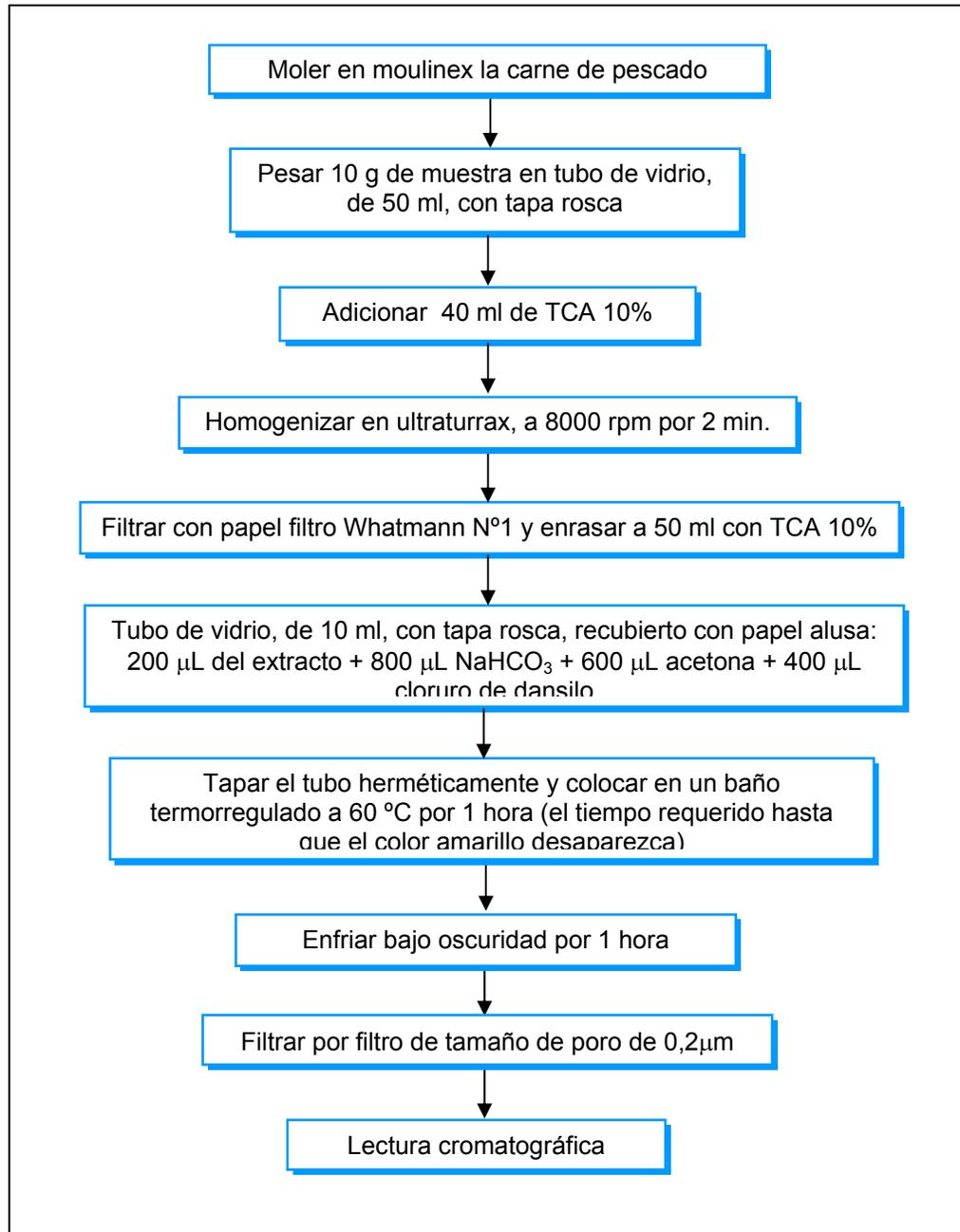
2.3.1.5. Intervalo

Se determina por análisis cuantitativos de muestras con diferentes concentraciones del analito. Estableciéndose el intervalo de concentración para el cual se obtiene una exactitud y precisión aceptable (Huber, 1994; Eurachem, 2002).

2.3.2. Cuantificación de histamina por HPLC (NCh 2637 of 2001; Manual de Calidad-Secretaría Regional Ministerial de Salud R.M., 2001)

El método se basa en determinar el contenido de histamina del alimento mediante la extracción con TCA 10%, derivatización pre-columna con cloruro de dansilo y posterior análisis de los derivados dansilados en HPLC por detección UV a 254 nm. En la figura N°6 se señala la descripción de la preparación de la muestra.

Figura N°6: Determinación de histamina por HPLC en músculo claro de Salmón coho



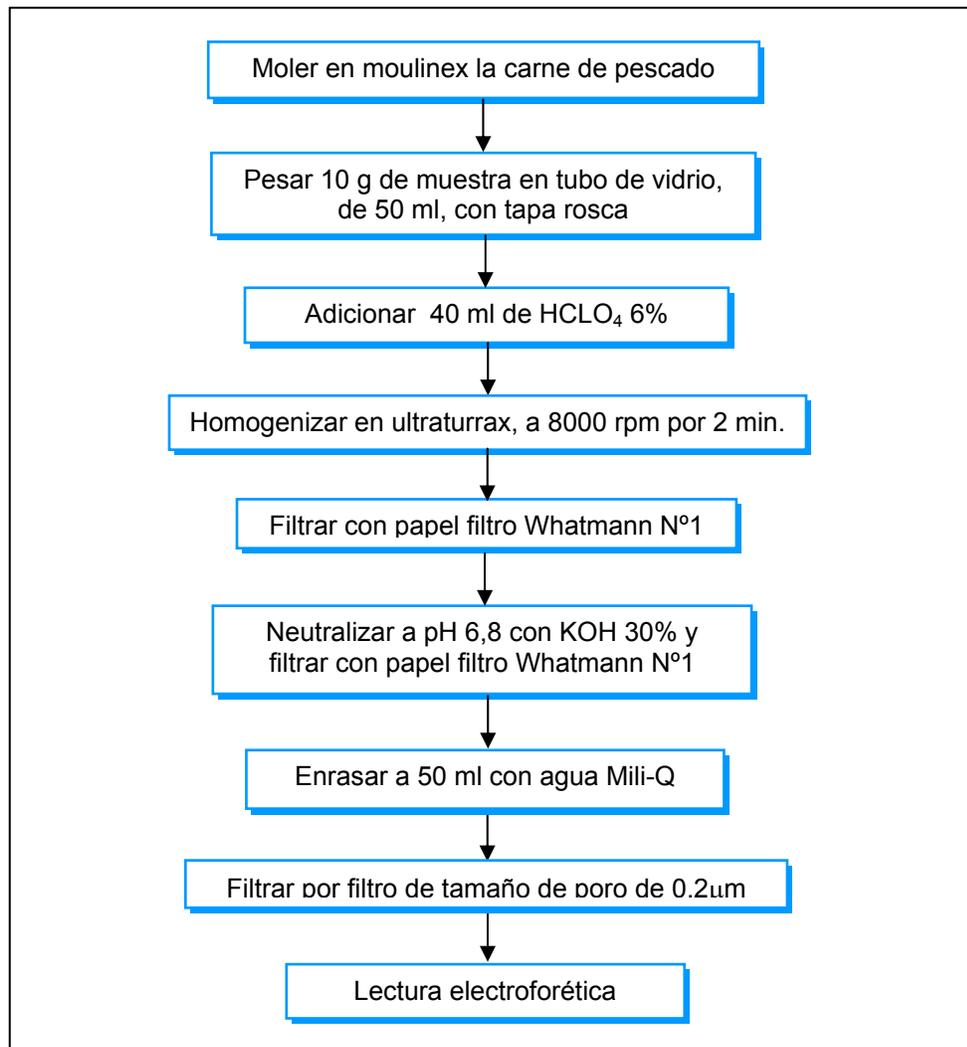
2.3. 2.1. Condiciones cromatográficas

- ✓ Detección UV: 254 nm
- ✓ Fase móvil – sistema isocrático: metanol/agua (75/25)
- ✓ Flujo: 1 ml/min
- ✓ Presión: 1300 – 1400 psi
- ✓ Temperatura: 30°C
- ✓ Inyección: 20 µL (limpiar la jeringa y el inyector con agua después de cada inyección)
- ✓ Tiempo de corrida: 10 min
- ✓ Lavado de columna: Utilizar acetonitrilo o metanol/agua (70/30)
Tiempo de lavado: 15 min.

2.3.3. Cuantificación de histamina por CZE (Gallardo y col., 1997)

El método se basa en determinar el contenido de histamina del alimento mediante la extracción en HClO_4 6% y neutralización con KOH. Utilizando un tampón fosfato de pH 2,4 y una detección UV a 214 nm. En la figura N°7 se señala la descripción de la preparación de la muestra.

Figura N°7: Determinación de histamina por CZE en músculo claro de Salmón coho



2.3.3.1. Condiciones electroforéticas

- ✓ Lámpara: 214 nm (de Zinc)
- ✓ Filtro: 214 nm
- ✓ Fuente: Positiva
- ✓ Voltaje: 25 kv
- ✓ Inyección: Hidrostática
- ✓ Tiempo de inyección: 20 segundos
- ✓ Tiempo de corrida: 10 min
- ✓ T°: 25°C
- ✓ Corriente registrada: 115 - 135 μ A
- ✓ Tampón fosfato 0,05 M de pH 2,4 con un 10% de acetonitrilo
- ✓ Activación del capilar: 10' NaOH 0,5 M; 10' agua Mili-Q; 10' NaOH 0,5 M; 10' agua Mili-Q; 10' NaOH 0,1 M; 10' agua Mili-Q; 3' tampón fosfato 0,1M; 3' tampón fosfato 0,075 M; 30' tampón fosfato 0,05 M.
- ✓ Lavado inicial: 2' NaOH 0,5 M; 1' agua Mili-Q; 10' NaOH 0,1 M; 3' agua Mili-Q; 3' tampón fosfato 0,1M; 3' tampón fosfato 0,075 M; 10' tampón fosfato 0,05 M.
- ✓ Lavado entre muestras: 2' NaOH 0,5 M; 3' agua Mili-Q; 5' tampón fosfato 0,05 M.
- ✓ Lavado final: 15' agua Mili-Q.

2.3.4. Parámetros analíticos

2.3.4.1. Cálculo de la eficiencia

La eficiencia de la columna o del capilar está dada por el número de platos teóricos (N), dado por: (Skoog y col., 2001)

$$N = 16 * (t_x/W)^2 \quad (15)$$

Donde: en HPLC, $t_x = t_r$ = tiempo de retención, expresado en minutos.

en CZE, $t_x = t_m$ = tiempo de migración, expresado en minutos.

W = ancho de la base del pick, expresado en minutos.

2.3.4.2. Cálculo del factor de capacidad y de la movilidad electroforética

En HPLC la medición del factor de capacidad (k') es una operación muy frecuente, ya que su valor se emplea tanto para evaluar la retención como para ajustar la separación. El valor de k' , puede ser ajustado modificando la fuerza de elución de la fase móvil (Quattrocchi y col., 1992).

El k' está dado por la siguiente expresión: (Quattrocchi y col., 1992)

$$k' = \frac{(t_n - t_0)}{t_0} \quad (16)$$

Donde : t_n = tiempo de retención.

t_0 = tiempo muerto.

En electroforesis capilar, el movimiento de un analito a través de un capilar se describe por el tiempo de migración y movilidad efectiva, comparables con el tiempo de retención y factor de capacidad en cromatografía (Huber, 1994).

La movilidad electroforética (μ_{ep}) está dada por la siguiente expresión: (Gallardo y col., 1997)

$$\mu_{ep} = (L_d / t_m) / (V / L_t) \quad (17)$$

Donde: L_d = largo del capilar hasta el detector, expresado en cm.

t_m = tiempo de migración, expresado en segundos.

V = voltaje, expresado en volts.

L_t = largo total del capilar, expresado en cm.

2.3.5. Análisis estadístico

2.3.5.1. Análisis de varianza de una variable

Para evaluar la variabilidad de la concentración de histamina entre los duplicados de los individuos, se realizó un análisis de ANOVA de una variable, en un nivel de confianza $p \leq 0,05$, en el programa Statgraphics plus 4.0.

2.3.5.2. Análisis de varianza de variables múltiples

Para evaluar la variabilidad de la concentración de histamina con respecto a las variables día de almacenamiento, individuo, estrato-peso (anexo N°3, figura N°17) y sexo, se realizó un análisis de ANOVA de variable múltiple, en un nivel de confianza $p \leq 0,05$, en el programa Statgraphics plus 4.0.

2.3.5.3. Test de rango múltiple

Se realizó el test de Tukey, en el programa Statgraphics plus 4.0, para las variables que mostraron diferencia significativa ($p \leq 0,05$) en el análisis de ANOVA de variable múltiple.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. VALIDACIÓN LIMITADA DE LA TÉCNICA HPLC

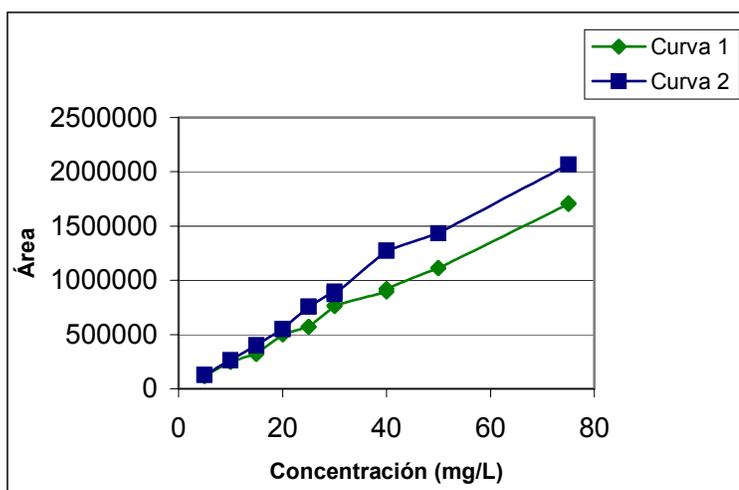
3.1.1. Linealidad

En el intervalo 5 a 75 mg/L se prepararon dos curvas de calibración donde se evaluaron los estimadores de regresión en un nivel de confianza $p \leq 0,05$, que se presentan en la siguiente tabla y sus respectivos gráficos en la figura N°8.

Tabla N°1: Estimadores de regresión de las curvas de calibración de histamina por HPLC

Estimadores	Curva N°1	Curva N°2
Pendiente (b)	22450,4872	28375,7962
Intercepto (a)	21592,1624	11038,3932
R^2	0,9954	0,9915
r	0,9976	0,9957
t_r	867,56	468,58
s_r	571562046,11	1687069495,40
S_b	36638,5927	108145,48
S_a	48851456,93	144193973,97

Figura N°8: Curvas de calibración de histamina por HPLC
(tabla de datos: anexo N°1, tabla N°12)



El coeficiente de regresión lineal (r), de las curvas de calibración, es semejante a 0,9959; obtenido en otro estudio donde se aplicó HPLC, para la determinación de histamina (Veciana-Nogués y col., 1995).

De acuerdo al número de mediciones y en un nivel de confianza $p \leq 0,05$, el valor de t tabulado es: $t_{\text{tabla}} = 2,120$ (O'Mahoney, 1986). Los valores obtenidos para t_r son mayores que el valor de t tabulado, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (no correlación entre "x" e "y"), siendo las correlaciones lineales significativas.

Al comparar ambas curvas de calibración, se aprecia que la curva N°1 es más satisfactoria, porque su coeficiente de regresión es más cercano a 1 y por la menor magnitud de los estimadores de la desviación estándar: S_r , S_b y S_a .

3.1.2. Límite de detección

✓ Cálculo de la pendiente de la curva de calibración:

La pendiente de la curva de calibración N°1 es **$b = 22450,4872$** .

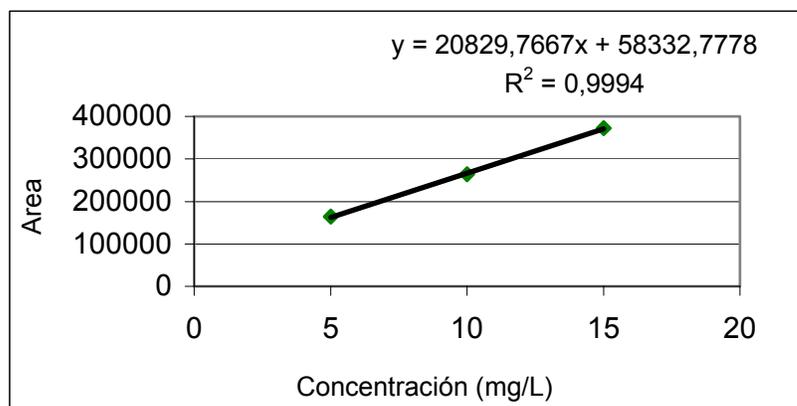
✓ Cálculo de la respuesta a concentración cero:

Según lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.2., considerando los valores medios de área, se obtiene una 2ª curva de calibración, la cual es graficada en la figura N°9.

La estimación de la respuesta a concentración cero es **$Y_{bl} = 58332,7778$** .

Figura N°9: Promedio del área versus concentración del estándar de histamina

(tabla de datos: anexo N°1, tabla N°13)

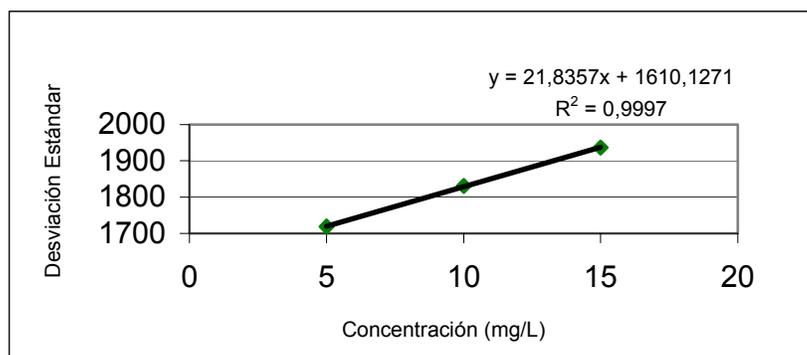


✓ Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.2., se obtiene la recta dada por la desviación estándar vs concentración, la cual es graficada en la figura N°10.

La estimación de la desviación estándar a concentración cero: $S_{b1} = 1610,1271$.

Figura N°10: Desviación estándar versus concentración del estándar de histamina
(tabla de datos: anexo N°1, tabla N°13)



Aplicando las ecuaciones N°8 y N°9, se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC): **LD = 2,8 mg/L** y **LC = 3,3 mg/L**.

En otra investigación de determinación de histamina por HPLC, realizada en condiciones cromatográficas semejantes, se obtuvo un LD dentro del rango de 1 a 5 mg/L (Eerola y col., 1993), lo cual es coincidente con los resultados del presente estudio. Sin embargo, si esta técnica analítica, es aplicada en otras condiciones cromatográficas (derivatización post-columna), el LD alcanza valores menores a 1 mg/L (Veciana-Nogués y col., 1995).

3.1.3. Precisión

Se determinó evaluando la reproducibilidad y repetitividad de las concentraciones seleccionadas en la curva de calibración N°1.

En las tablas N°2 y N°3 se indican los valores de la RSD (ecuación N°12) obtenidos para los tres niveles de concentraciones en las pruebas de reproducibilidad (ensayos intradía) y repetitividad (ensayos interdía).

Tabla N°2: RSD (%) de las pruebas de la reproducibilidad para la determinación de la precisión por HPLC

Día	Concentración de Histamina		
	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
1	21,4	33,0	53,1
2	23,6	34,0	54,0
3	22,0	34,2	54,2
4	23,4	34,0	53,8
5	21,6	31,8	53,5
6	23,4	34,5	54,3

	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
Número de datos (n)	6	6	6
Media (\bar{X}) (mg/L)	22,6	33,6	53,8
Desviación estándar (s)	1,01	1,00	0,46
RSD (%)	4,47	2,97	0,85
Intervalo de confianza del 95% de la media	(22,3;22,7)	(33,4;33,8)	(53,6;53,9)

Tabla N°3: RSD (%) de las pruebas de la repetitividad para la determinación de la precisión por HPLC

Repetición	Concentración de Histamina		
	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
1	24,8	34,1	53,8
2	25,5	34,4	53,5
3	24,4	34,9	53,3
4	25,5	35,1	54,2
5	25,6	35,3	54,2
6	25,9	34,0	54,3

	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
Número de datos (n)	6	6	6
Media (\bar{X}) (mg/L)	25,3	34,6	53,9
Desviación estándar (s)	0,57	0,54	0,41
RSD (%)	2,27	1,57	0,76
Intervalo de confianza del 95% de la media	(25,2;25,4)	(34,5;34,7)	(53,8;54,0)

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.3., a través de la ecuación de Horwitz (ecuación N°13), se calculó los límites de aceptación de la desviación estándar relativa (RSD), en cada nivel de concentración, requeridos para las pruebas de reproducibilidad y repetitividad.

En la tabla N°4, se señala la comparación entre los valores de RSD obtenidos y sus límites de aceptación, para los tres niveles de concentración, en ambas pruebas.

Tabla N°4: Valores de RSD (%) para la determinación de la precisión por HPLC

[Histamina] (mg/L)	Límite RSD (%)	RSD (%) reproducibilidad	RSD (%) repetitividad
20	10,2	4,5	2,3
30	9,6	3,0	1,6
50	8,9	0,9	0,8

Se observa, que la desviación estándar de la reproducibilidad es dos o tres veces más grande que aquella para la repetitividad (Huber, 1994).

Los resultados obtenidos, para ambas expresiones de la precisión, presentan un valor de RSD, que está dentro del límite dado por la ecuación de Horwitz, es decir la variabilidad a largo plazo (reproducibilidad) y corto plazo (repetitividad) es aceptable, por lo cual los resultados que se obtengan se pueden considerar confiables.

3.1.4. Exactitud

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.4., la exactitud se calculó realizando un ensayo de recuperación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de recuperación de las concentraciones seleccionadas se indican en la tabla N°5.

Tabla N°5: Recuperación del estándar de histamina en muestras de Salmón coho en la determinación de la exactitud por HPLC

Valor Referencia [Histamina] (mg/L) (agregada)	Valor Obtenido [Histamina] (mg/L)	Recuperación (R) (%)	Promedio R (%)	RSD (%)
20	20,3	101,5	100,8	0,97
20	20,2	101,2		
20	19,9	99,7		
30	30,7	102,4	102,6	0,24
30	30,9	102,9		
30	30,8	102,6		
50	50,0	100,0	100,2	0,37
50	50,3	100,7		
50	50,0	100,1		

En los tres niveles de concentración, los resultados de las pruebas de recuperación son satisfactorios, ya que están alrededor del 100%.

En otra investigación en la cual se aplicó HPLC, para la determinación de histamina, en el cálculo de la exactitud, se obtuvo un valor de RSD (%) de 5,8 (Eerola y col., 1993); el cual es más alto que el obtenido en el presente estudio, probablemente debido a que, los investigadores realizaron un mayor número de mediciones en el cálculo de la recuperación.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios de aplicación de esta técnica, en los cuales se registran valores de recuperación de 96% (Eerola y col., 1993) y 99,2% (Veciana-Nogués y col., 1995).

3.1.5. Intervalo

Mediante los resultados obtenidos en los parámetros mencionados anteriormente, se aprecia que esta técnica analítica presenta una precisión y exactitud aceptable dentro del intervalo de 5 a 75 mg/L.

3.2. VALIDACIÓN LIMITADA DE LA TÉCNICA CZE

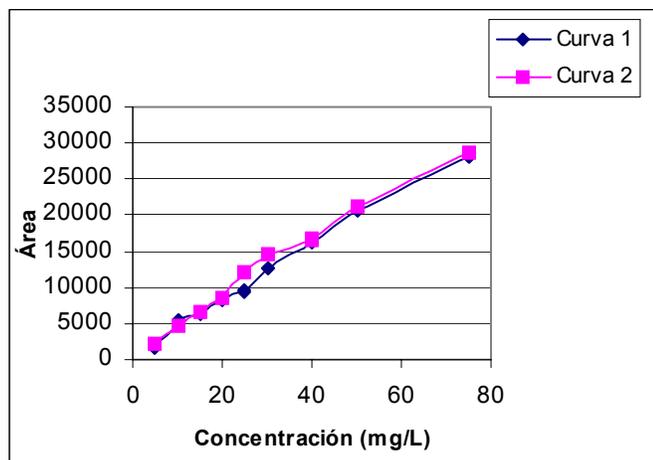
3.2.1. Linealidad

En el intervalo 5 a 75 mg/L se prepararon dos curvas de calibración donde se evaluaron los estimadores de regresión en un nivel de confianza $p \leq 0,05$, que se presentan en la siguiente tabla y sus respectivos gráficos en la figura N°11.

Tabla N°6: Estimadores de regresión de las curvas de calibración de histamina por CZE

Estimadores	Curva N°1	Curva N°2
Pendiente (b)	376,2032	380,8051
Intercepto (a)	815,5150	1371,0684
R^2	0,9920	0,9842
r	0,9959	0,9920
t_r	497,99	251,16
s_r	277039,384	568179,577
S_b	17,7589349	36,4217677
S_a	23678,5798	48562,357

Figura N°11: Curvas de calibración de histamina por CZE
(tabla de datos: anexo N°1, tabla N°14)



El coeficiente de regresión lineal (r), de las curvas de calibración, es un poco más bajo que el valor de 0,99956; obtenido en otro estudio donde se aplicó CZE, para la determinación de histamina (Gallardo y col., 1997); lo que, podría explicarse por las diferencias en las condiciones analíticas utilizadas en la medición.

De acuerdo al número de mediciones y en un nivel de confianza $p \leq 0,05$, el valor de t tabulado es: $t_{\text{tabla}} = 2,120$ (O'Mahoney, 1986). Los valores obtenidos para t_r son mayores que el valor de t tabulado, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (no correlación entre "x" e "y"), siendo las correlaciones lineales significativas.

Al comparar ambas curvas de calibración, se aprecia que la curva N°1 es más satisfactoria, porque su coeficiente de regresión es más cercano a 1 y por la menor magnitud de los estimadores de la desviación estándar: S_r , S_b y S_a .

3.2.2. Límite de detección

✓ Cálculo de la pendiente de la curva de calibración:

La pendiente de la curva de calibración N°1 es **$b = 376,2032$** .

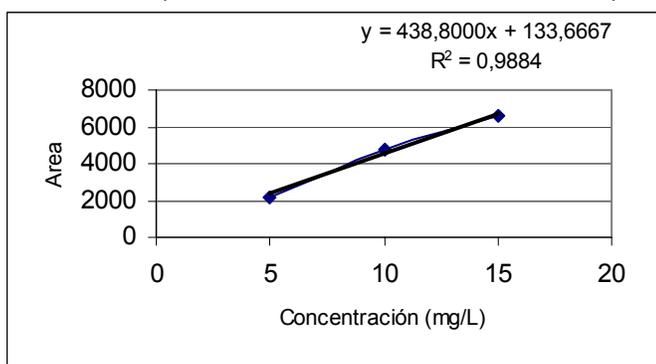
✓ Cálculo de respuesta a concentración cero:

Según lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.2., considerando los valores medios de área, se obtiene una 2ª curva de calibración, la cual es graficada en la figura N°12.

La estimación de la respuesta a concentración cero es **$Y_{bl} = 133,6667$** .

Figura N°12: Promedio del área versus concentración del estándar de histamina

(tabla de datos: anexo N°1, tabla N°15)

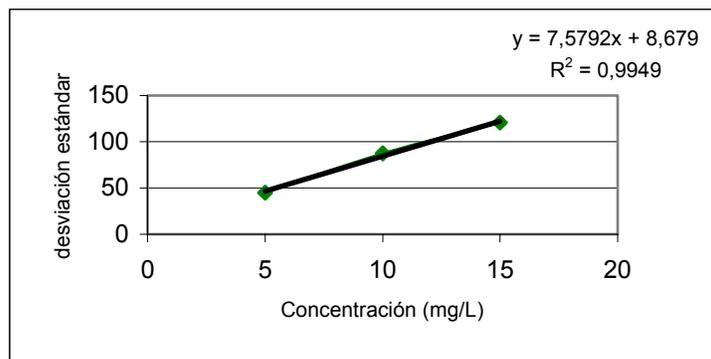


✓ Cálculo de la desviación estándar de la respuesta a concentración cero:

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.2., se obtiene la recta dada por la desviación estándar vs la concentración, la cual es graficada en la figura N°13.

La estimación de la desviación estándar a concentración cero es $S_{bl} = 8,679$.

Figura N°13: Desviación estándar versus concentración del estándar de histamina
(tabla de datos: anexo N°1, tabla N°15)



Aplicando las ecuaciones N°8 y N°9, se determinó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC): **LD = 0,4 mg/L** y **LC = 0,6 mg/L**.

En otra investigación de determinación de histamina por CZE, se obtuvo un LD de 0,25 mg/L (Gallardo y col., 1997), el cual es semejante al obtenido en el presente estudio.

3.2.3. Precisión

Se determinó evaluando la reproducibilidad y repetitividad de las concentraciones seleccionadas en la curva de calibración N°1.

En las tablas N°7 y N°8 se indican los valores de la RSD (ecuación N° 12) obtenidos para los tres niveles de concentraciones en las pruebas de reproducibilidad (ensayos interdía) y repetitividad (ensayos intradía).

Tabla N°7: RSD (%) de las pruebas de reproducibilidad para la determinación de la precisión por CZE

Día	Concentración de Histamina		
	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
1	23,8	37,6	53,2
2	23,1	34,2	49,7
3	23,6	34,5	50,5
4	22,6	36,9	52,8
5	23,6	36,4	52,5
6	22,3	33,1	52,9

	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
Número de datos (n)	6	6	6
Media (\bar{X}) (mg/L)	23,2	35,4	51,9
Desviación estándar (s)	0,59	1,76	1,44
RSD (%)	2,57	4,96	2,78
Intervalo de confianza del 95% de la media	(23,0;23,3)	(35,0;35,8)	(51,6;52,2)

Tabla N°8: RSD (%) de las pruebas de repetitividad para la determinación de la precisión por CZE

Repetición	Concentración de Histamina		
	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
1	20,1	36,7	55,0
2	20,3	37,0	54,0
3	20,0	36,4	55,1
4	20,3	35,9	54,3
5	20,2	36,6	55,7
6	20,0	37,3	56,1

	20 mg/L	30 mg/L	50 mg/L
Número de datos (n)	6	6	6
Media (\bar{X}) (mg/L)	20,1	36,6	55,0
Desviación estándar (s)	0,14	0,46	0,82
RSD (%)	0,70	1,26	1,49
Intervalo de confianza del 95% de la media	(20,1;20,2)	(36,5;36,7)	(54,8;55,2)

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.3., a través de la ecuación de Horwitz (ecuación N°13), se calculó los límites de aceptación de la desviación estándar relativa (RSD), en cada nivel de concentración, requeridos para las pruebas de reproducibilidad y repetitividad.

En la tabla N°9, se señala la comparación entre los valores de RSD obtenidos y sus límites de aceptación, para los tres niveles de concentración, en ambas pruebas.

Tabla N°9: Valores de RSD (%) para la determinación de la precisión por CZE

[Histamina] (mg/L)	Límite RSD (%)	RSD (%) reproducibilidad	RSD (%) repetitividad
20	10,2	2,6	0,7
30	9,6	5,0	1,3
50	8,9	2,8	1,5

Se observa, que la desviación estándar de la reproducibilidad es dos o tres veces más grande que aquélla para la repetitividad (Huber, 1994).

Los resultados obtenidos, para ambas expresiones de la precisión, presentan un valor de RSD, que está dentro del límite dado por la ecuación de Horwitz, es decir la variabilidad a largo plazo (reproducibilidad) y corto plazo (repetitividad) es aceptable, por lo cual los resultados que se obtengan se pueden considerar confiables.

3.2.4. Exactitud

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.1.4., la exactitud se calculó realizando un ensayo de recuperación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de recuperación de las concentraciones seleccionadas se indican en la tabla N°10.

Tabla N°10: Recuperación del estándar de histamina en muestras de Salmón coho para la determinación de la exactitud por CZE

Valor de Referencia [Histamina] (mg/L) (agregada)	Valor Obtenido [Histamina] (mg/L)	Recuperación (R) (%)	Promedio R (%)	RSD (%)
20	19,8	98,8	98,8	1,39
20	19,5	97,4		
20	20,0	100,2		
30	30,3	100,8	101,4	0,54
30	30,6	101,9		
30	30,4	101,4		
50	49,6	99,1	99,4	0,68
50	50,1	100,1		
50	49,4	98,9		

En los tres niveles de concentración, los resultados de las pruebas de recuperación son satisfactorios, ya que están alrededor del 100%.

En otra investigación en la cual se aplicó CZE, para la determinación de histamina, en el cálculo de la exactitud, se obtuvo un valor de RSD (%) de 1,55 (Gallardo y col., 1997); el cual es más alto que el obtenido en el presente estudio, probablemente debido a que, los investigadores realizaron un mayor número de mediciones en el cálculo de la recuperación.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios de aplicación de esta técnica, en los cuales se registran valores de recuperación de 103,5% (Mopper y Sciacchitano, 1994) y 99,65% (Gallardo y col., 1997).

3.2.5. Intervalo

Mediante los resultados obtenidos en los parámetros mencionados anteriormente, se aprecia que esta técnica analítica presenta una precisión y exactitud aceptable dentro del intervalo de 5 a 75 mg/L.

3.3. CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA EN SALMÓN COHO

Una vez que las técnicas analíticas HPLC y CZE fueron validadas y se demostró que son confiables, se utilizaron para la cuantificación de histamina en Salmón coho fresco refrigerado, conservado a 0 – 2°C por un período de 24 días.

A través de los resultados obtenidos en las pruebas de linealidad por HPLC, se obtuvo el cromatograma del estándar de histamina y su tiempo de retención, el cual se comparó con los cromatogramas de las muestras de Salmón coho para determinar su contenido de histamina (anexo N°6, figuras N°22 - N°25).

A través de los resultados obtenidos en las pruebas de linealidad por CZE, se obtuvo el electroferograma del estándar de histamina y su tiempo de migración, el cual se comparó con los electroferogramas de las muestras de Salmón coho para determinar su contenido de histamina (anexo N°6, figuras N°26 - N°29).

En los cromatogramas obtenidos por HPLC y en los electroferogramas obtenidos por CZE se observa que el pick del estándar de histamina no interfiere con los otros pick de la muestra, por lo cual, en ambas técnicas no se presentaron dificultades en la cuantificación de esta amina.

En la tabla N°11 se indica el tiempo de retención (t_r) para el pick de histamina en el estándar y en muestras de salmón, ambos obtenidos en la cuantificación por HPLC. También se indica el tiempo de migración (t_m) para el pick de histamina en el estándar y en muestras de salmón, ambos obtenidos en la cuantificación por CZE. Se

aprecia que la técnica de CZE presenta una menor desviación estándar en su tiempo de migración.

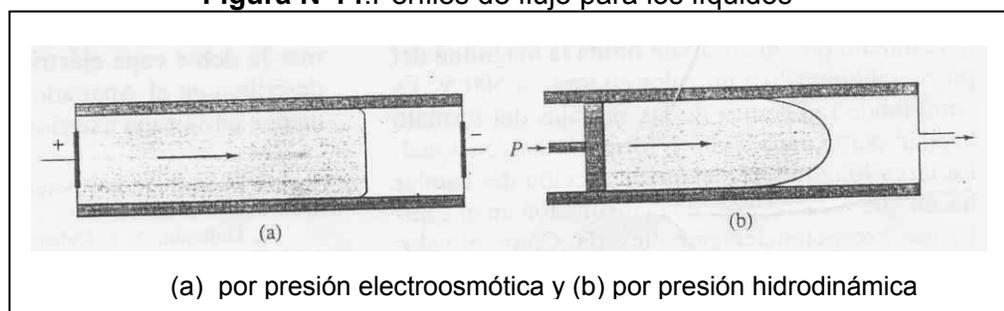
Tabla N°11: Comparación del tiempo de retención obtenido en HPLC versus el tiempo de migración obtenido en CZE, en el pick de histamina en el estándar y en muestras de salmón

	HPLC			CZE	
	Estándar (n = 18)	Muestra (n = 36)		Estándar (n = 18)	Muestra (n = 36)
$\overline{T_r}$ (min)	7,592	6,944	$\overline{T_m}$ (min)	4,505	4,654
Desv. Est. (s)	0,356	0,279	Desv. Est. (s)	0,086	0,109
RSD (%)	4,683	4,015	RSD (%)	1,908	2,340

Al comparar los cromatogramas con los electroferogramas del estándar de histamina (anexo N°6, figuras N°22 y N°26), se observa resultados más satisfactorios por la técnica de CZE, ya que el pick de interés se presenta más agudo y se obtiene en un menor tiempo. En cambio, en el cromatograma obtenido por HPLC se aprecia un pick de base ancha, lo que dificulta determinar su área con la precisión y exactitud requerida.

En CZE, la electroósmosis conduce a un flujo en la disolución que tiene un perfil plano, perpendicular al capilar, a diferencia del perfil parabólico del flujo en cromatografía líquida, cuyo origen es la presión. Debido a este perfil esencialmente plano, el flujo electroosmótico no contribuye de manera significativa al ensanchamiento de banda del modo en que lo hace el flujo conducido por la presión en cromatografía (Figura N°14) (Skoog y col., 2001).

Figura N°14:Perfiles de flujo para los líquidos



Al realizar una comparación de la eficiencia, a través del cálculo del número de platos teóricos (N), según lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.4.1., se

obtiene $N = 1.573$ para la técnica de HPLC y $N = 26.570$ para la técnica de CZE, por lo tanto, la CZE es más eficiente, ya que a través de ella se obtiene un mayor número de platos teóricos.

En la determinación por HPLC se realizó una derivatización pre-columna con cloruro de dansilo, el cual es un reactivo que posee grupos fluoróforos que pueden ser detectados por un detector de fluorescencia. En el anexo N°7 se presenta el cromatograma del estándar de histamina obtenido por este tipo de detector, en el cual se aprecia una mejor detección, ya que aumenta la altura del pick; sin embargo, se mantiene la base ancha que se reflejaría en un bajo número de platos teóricos y por lo tanto sería una determinación poco eficiente.

A pesar del reciente desarrollo de la electroforesis capilar se observan ciertas ventajas de esta técnica frente a la de HPLC:

- a)** La mayoría de los métodos de HPLC utilizan derivatizaciones pre o post-columna, con agentes fluorescentes de derivatización, los cuales aseguran la sensibilidad y selectividad del método; sin embargo, las técnicas de derivatización consumen una mayor cantidad de tiempo, requieren condiciones controladas de reacción y los agentes utilizados generan productos de condensación con el grupo alfa-amino de la histamina, que podrían presentar problemas de estabilidad (Mopper y Sciacchitano, 1994; Gallardo y col., 1997).
- b)** La CZE es un método simple, debido a que en su realización la muestra es analizada en un capilar relleno sólo con una solución de electrolito a un determinado valor de pH, lo cual significa que casi no se utilizan solventes, en particular no son empleados solventes orgánicos, por lo tanto el costo de reactivos y capilar es reducido comparado con la columna y solventes de HPLC (Gallardo y col., 1997, Medina y col., 2000).

De acuerdo a lo explicado en la metodología, en el punto 2.3.4.2., se determinó el valor de k' para HPLC y de μ_{ep} para CZE. El cálculo del k' (ecuación N°16) para histamina fue $k' = 5,8$. Este valor está dentro del rango de 2 a 10 para mezclas de poco componentes, por lo cual se puede deducir, que las condiciones cromatográficas aplicadas, permiten obtener una retención satisfactoria del analito (Quattrocchi y col., 1992). El cálculo de la μ_{ep} (ecuación N°17) para histamina fue $\mu_{ep} = 5,95 * 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$,

este valor es semejante a $\mu_{ep} = 4,85 * 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$, obtenido en otro estudio, que utilizó esta técnica, aplicando casi las mismas condiciones (Gallardo y col., 1997).

Los resultados de la cuantificación de histamina, en muestras de Salmón coho obtenidos por ambas técnicas analíticas, en los controles realizados a los 0,3,6,10,12,17,19 y 24 días de almacenamiento refrigerado, se presentan en el anexo N°2. De acuerdo a lo explicado en el punto 2.3.5.1., se realizó el ANOVA, el cual demostró que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los duplicados de cada individuo, por lo tanto se pueden promediar los resultados (HPLC: anexo N°4, tabla N°19 y CZE: anexo N°5, tabla N°24).

De acuerdo a lo explicado en el punto 2.3.5.2., se realizó el ANOVA, el cual demostró que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la concentración de histamina con respecto al individuo, estrato-peso y sexo; y que si existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) con respecto al día de almacenamiento (HPLC: anexo N°4, tabla N°21 y CZE: anexo N°5, tabla N°26).

Habiendo establecido estadísticamente que el contenido de histamina de los salmones en estudio sólo incide significativamente los días de almacenamiento, se discute a continuación la evolución de histamina a través del tiempo.

En las figuras N°15 y N°16 se indican los resultados promedios obtenidos de la cuantificación de histamina en las muestras de Salmón coho refrigerado (0 - 2°C) por un período de 24 días, encontrándose resultados similares entre ambas técnicas analíticas.

Figura N°15: Evolución de la histamina por HPLC en Salmón coho refrigerado (0 - 2°C) a través del tiempo

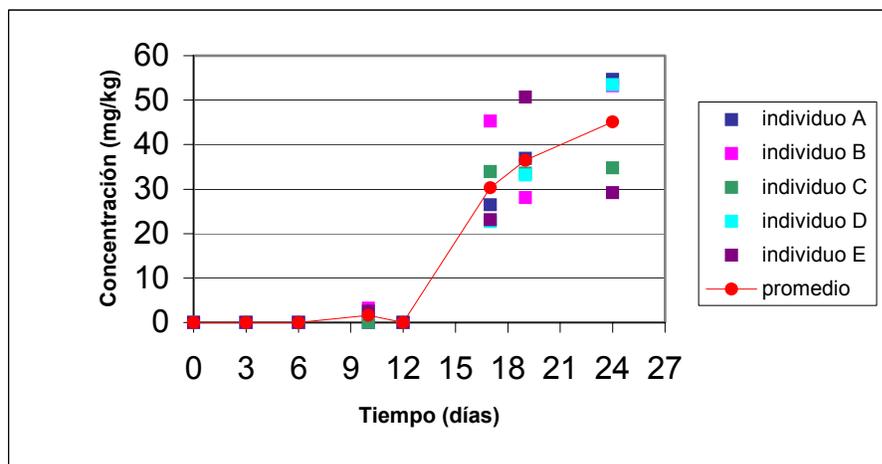
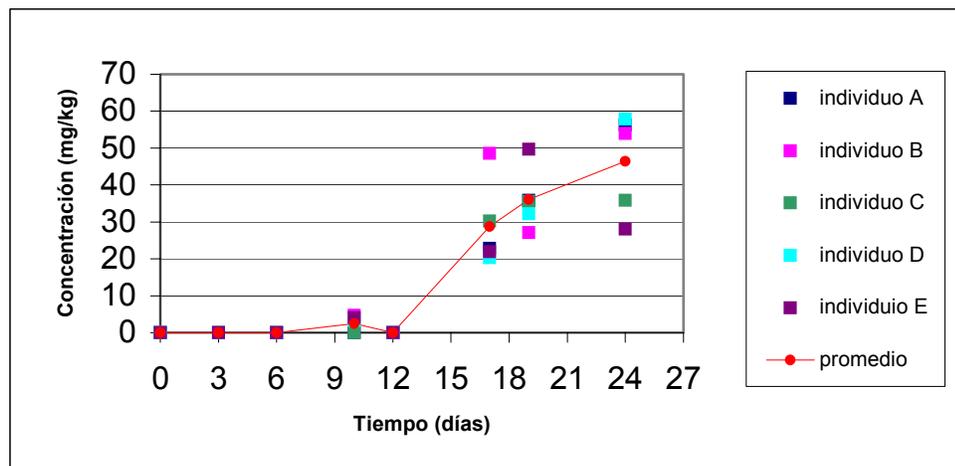


Figura N°16: Evolución de la histamina por CZE en Salmón coho refrigerado (0 - 2°C) a través del tiempo



Al considerar, el promedio de los resultados, (figuras N°15 y N°16), se observó que la concentración de histamina aumenta a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, lo cual concuerda con otros estudios de determinación de histamina en pescado (Gallardo y col., 1997; De la Hoz y col., 2000; Du y col., 2002a).

En el presente estudio la concentración de histamina, generada en el Salmón coho, conservado al estado fresco - refrigerado, está por bajo del límite establecido por la Unión Europea y SERNAPESCA, de 100 mg/kg, pero algunas muestras correspondientes al día 24 de almacenamiento (figuras N°14 y N°15), sobrepasan los límites más estrictos establecidos por la FDA de 50 mg/kg (FDA, 2001). Es decir, la

histamina sería un peligro potencial en el Salmón coho cuando se conserva refrigerado por un período prolongado.

Estos resultados demuestran, que el contenido de histamina en Salmón coho, es menor que el registrado en las especies de pescados, pertenecientes a las familias *Scombridae* (tales como: caballa, atún, albacora, etc.) y *Clupeidae* (tales como: sardinas, arenque, etc.), bajo las mismas condiciones de almacenamiento. Por ejemplo: en sardinas almacenadas por 15 días y en atunes almacenados por 9 días, se registraron niveles de histamina de 211,52 y 95,5 mg/kg respectivamente (Gallardo y col., 1997; Silva y col., 1998; Du y col., 2002a). Sin embargo, a pesar que este pescado no es escómbrido porque pertenece a la familia Salmonidae, debería conservarse congelado cuando el período de almacenamiento es prolongado para disminuir el riesgo de formación de histamina.

En las mismas muestras de salmón de este estudio (pero de otra sección de cada salmón), conservadas al estado fresco refrigerado, Maier (2005) demostró que a los 24 días se presentó un recuento de aerobios mesófilos (RAM) inferior a los límites máximos permitidos por SERNAPESCA (2005); sin embargo, de acuerdo a los análisis sensoriales se le estimó una vida útil de 12 días. La producción de histamina no está relacionada con la carga bacteriana, pero sí está influenciada por el número de bacterias capaces de sintetizar la histidina descarboxilasa (Du y col., 2002b). Esta relación se aprecia en los resultados obtenidos, porque a pesar que todas las muestras de Salmón coho tienen una carga bacteriana aceptable; algunas de ellas, correspondientes al día 24 de almacenamiento tienen una concentración de histamina que es superior a los límites de la FDA. Se recomienda estudiar la existencia de bacterias formadoras de histamina y su correlación con el contenido de histamina en el Salmón coho.

En una visita inspectiva realizada a la empresa Mainstream S. A., que procesó los Salmones coho entero (HG) para este estudio, se comprobó la correcta implementación del sistema HACCP. Esto fue confirmado por Maier (2005) quien encontró bajos valores RAM y explica los bajos valores de histamina registrados inicialmente.

En un estudio referente a la evaluación de la calidad de filetes de Salmón atlántico (*Salmo salar*), aplicando electroforesis capilar, se determinó la concentración

de histamina, en muestras almacenadas a -20 , 4 y 10°C por 14 días, los resultados indicaron que a -20 y 4°C no se detectó, (dentro de los 14 días), formación de histamina. En cambio, a 10°C se registraron concentraciones de histamina dentro del rango de $0,5$ a $54,7$ mg/kg (Du y col., 2002b). Los resultados para el estado refrigerado (4°C) son semejantes a los del presente estudio ($0 - 2^{\circ}\text{C}$).

En un estudio sobre la generación de histamina, en diferentes tipos de pescados (caballa, albacora, mahi-mahi y salmón), inoculados con *Morganella morganii* (principal bacteria asociada con producción de histamina), y luego almacenados a distintas temperaturas (4 , 15 , 25 y 37°C), se demostró que en el Salmón atlántico (*Salmo salar*) se registran las concentraciones más bajas de histamina, por ejemplo en las muestras almacenadas a 4°C , a las 14 horas de almacenamiento, en el salmón se registran valores de 40 mg/kg; en cambio en las otras especies se alcanzaron concentraciones en el intervalo de 45 a 75 mg/kg (Kim y col., 2002). Es decir, debido a que el músculo del salmón contiene una baja cantidad del aminoácido histidina, posee menos probabilidades de generación de altas concentraciones de histamina.

En lo que se refiere a la influencia de la temperatura en la formación de histamina, en pescados conservados al estado fresco refrigerado se inhibe la generación de histamina (Veciana-Nogués y col., 1997; Du y col., 2001, 2002a y 2002b). En cambio, en pescados sometidos a temperatura ambiente elevada aumenta el contenido de histamina (Jeyasekaran y col., 2004; Shakila y col., 2005). En este estudio hasta el día 12 no se detectó histamina, pero a partir del día 17 hubo un aumento significativo (30 mg/kg), que se elevó a un valor promedio de 46 mg/kg el día 24.

Según la FDA, la ausencia de descomposición en el pescado, suministra un producto inocuo. Es decir, un producto inocuo no debería tener evidencias de contaminación, que incluyan olores de descomposición, altos niveles de histamina y de otras aminas asociadas con la descomposición, tales como cadaverina y putrescina, las cuales son capaces de aumentar la toxicidad histamínica (FDA, 2001).

Los avances de la tecnología, ofrecen ventajosas alternativas frente a los tradicionales procedimientos, de este modo se conocen otros medios de conservación, tales como el envasado al vacío y bajo atmósfera modificada, que permiten extender la vida útil de los productos refrigerados. Se ha demostrado, que estos nuevos medios

de conservación inhiben el crecimiento de aminos biogénicas (De la Hoz y col., 2000; Özogul y col., 2002).

IV. CONCLUSIONES

- ♦ La validación limitada, permite demostrar que la cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis capilar zonal, son dos técnicas analíticas idóneas para la cuantificación de aminos biogénicos. Sin embargo, CZE presenta ciertas ventajas, ya que permite una resolución más eficiente del pick del analito, no requiere reacciones de derivatización y posee un bajo costo de operación.
- ♦ La formación de histamina en Salmón coho almacenado refrigerado (0 – 2°C), es nula hasta el día 12 de almacenamiento; pero aumenta progresivamente a partir del día 17.
- ♦ El Salmón coho es apto para el consumo hasta los 24 días, conservado al estado fresco – refrigerado, porque el contenido de histamina es inferior a los límites establecidos por SERNAPESCA para productos pesqueros de exportación (aplicable sólo a pescados clupeidos, escómbridos y jurel). Sin embargo, los niveles de histamina, registrados en algunas muestras del día 24, señalan que estas muestras no son aptas para el consumo, porque sobrepasan los límites máximos de la FDA, para pescados escómbridos y relacionados con escómbridos.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. BAIXAS-NOGUERAS, S. BOVER-CID, S., VIDAL-CAROU, M.C., VECIANA-NOGUÉS, M.T. Volatile and nonvolatile amines in mediterranean hake as a function of their storage temperature. Journal of Food Science 66 (1): 83 – 88, enero - febrero 2001.
2. BAIXAS-NOGUERAS, S., BOVER-CID, S., VECIANA-NOGUÉS, T., VIDAL-CAROU, M.C. Chemical and sensory changes in mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6 - 8°C) and stored in ice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50 (22): 6504 - 6510, octubre 2002.
3. BEHLING, A. y TAYLOR, S. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. Journal Food of Science 47 (4): 1311 – 1314, julio – agosto 1982.
4. CIDEIBER. Chile. Actividades del primario-sector pesquero [en línea] <<http://www.cideiber.com/infopaises/chile/chile-04-04.html>> [consulta: 16 mayo 2005]
5. DE LA HOZ, L. LÓPEZ-GÁLVEZ, D.E., FERNÁNDEZ, M., HIERRO, E., ORDOÑEZ, J.A. Use of carbon dioxide enriched atmospheres in the refrigerated storage (2°C) of salmon (*Salmo salar*) steakes. Eur Food Res Technol 210:179 -188, 2000.
6. Díaz C., C.; Barrera H., G. Detección y cuantificación de fenilbutazona y furosemda por HPLC en orina de caballos finos de carrera. Tesis (Químico Farmacéutico) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2001.
7. DU, W.-X., HUANG, T.-S., KIM, J., MARSHALL, M.R., WEI, C.-I. Chemical, microbiological, and aromascan evaluation of mahi-mahi fillets under various storage conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (1): 527 - 534, enero 2001.
8. DU, W.-X., LIN, C.-M., HUANG, T., KIM, J., MARSHALL, M., WEI, C.I. Potential application of the electronic nose for quality assessment of salmon fillets under various storage conditions. Journal of Food Science 67 (1): 307 - 312, enero - febrero 2002b.

9. DU, W.-X., LIN, C.-M., PHU, A.-T., CORNELL, J.A., MARSHALL, M.R., WEI, C.-I. Developed of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. Journal of Food Science 67 (1): 292 - 301, enero - febrero 2002a.
10. EEROLA, S., HINKKANEN, R., LINDFORS, E., HIRVI, T. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. Journal of AOAC International 76 (3): 575 – 577, mayo - junio 1993.
11. EINEN, O. y THOMASSEN, M. Starvation prior to slaughter in atlantic salmon (*Salmo salar*) II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. Aquaculture 169: 37 – 53, 1998.
12. EURACHEM (2000). Annex B-2 of the combine manual: validation of an established analytical method for chemistry [en línea] <<http://www.helcom.fi/Monas/CombineManual2/PartB/AnnexB-2.htm>> [consulta: 15 diciembre 2003].
13. EURACHEM (2002). Guide to Quality in Analytical Chemistry, an aid to accreditation [en línea] <http://www.eurachem.ul.pt/guides/CITAC%20EURACHEM%20GUIDE.pdf> [consulta: 15 diciembre 2003].
14. FDA. Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish potential hazards in cold - smoked fish: biogenic amines [en línea] <<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift2amin.html>> [consulta: 15 marzo 2004].
15. GALLARDO, J.; SOTELO, C.; PEREZ-MARTIN, R. Determination of histamine by capillary zone electrophoresis using a low-pH phosphate buffer: application in the analysis of fish and marine products. Z. Lebensm Unters Forsch A 204: 336 - 340, 1997.
16. HUBER, L. Validación de método. En su: Buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. Holanda, Hewlett Packard, 1994. pp. 53 – 64.
17. JEYASEKARAN, G., GANESAN, P., MAHESWARI, K., SHAKILA, R.J., SUKUMAR, D. Effect of delayed icing on the microbiological quality of tropical fish: Barracudas (*Sphyrena barracuda*). Journal of Food Science 69 (7): M197 – M200, septiembre 2004.

18. KAZAKEVICH, Yuri y McNAIR, Harold. HPLC – state of the art [en línea] Analytical Chemistry <<http://hplc.chem.shu.edu>> [consulta: 20 diciembre 2003].
19. KIM, S.H., PRICE, R.J., MORRISSEY, M.T., FIELD, K.G., WEI, C.I., AN, H. Histamine production by *morganella morganii* in mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. Journal of Food Science 67 (4): 1522-1528, mayo 2002.
20. KRIZEK, M. y PELIKÁNOVÁ, T. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. Journal Chromatography A 815: 243-250, 1998.
21. MAIER Neumann, Liliana Cristina. Evolución de la calidad e inocuidad de Salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) conservado al estado refrigerado. Tesis (Magíster en Ciencias de los Alimentos) Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2005.
22. MEDINA, I.; AUBOURG, S.; GALLARDO, J.M. Evolution of capillary zone electrophoresis profiles of methanol soluble compounds during fish chilling: relation to freshness. Eur Food Res Technol 210: 353 – 358, 2000.
23. MIETZ, J. y KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicador of decomposition. Journal of the AOAC 61 (1):139 –145, enero 1978.
24. MOPPER, B. y SCIACCHITANO, C.J. Capillary zone electrophoretic determination of histamine in fish. Journal of the AOAC International 77 (4): 881 – 884, julio-agosto 1994.
25. NCh 2637 of 2001. Productos hidrobiológicos: Determinación de histamina y otras aminas biogénicas – Método HPLC con detector UV. Diario Oficial del 22 de enero del 2002.
26. NCh-ISO 17025 of 2001. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Diario Oficial del 30 de junio del 2001.
27. NOLTKAMPER, D. Histamine Intoxication [en línea] <www.emedicine.com/PED/topic1012.htm> [consulta: 20 diciembre 2003].
28. O' MAHONEY, Michael. Sensory evaluation of food. Statistical methods and procedures. USA, Marcel Dekker Inc., 1986. pp. 416.

29. ÖZOGUL, F., TAYLOR, K.D.A., QUANTICK, P., ÖZOGUL, Y. Changes in biogenic amines in herring stored under modified atmosphere and vacuum pack. Journal Food of Science 67 (7): 2497 – 2501, septiembre 2002.
30. PUC. Salmón [en línea] <www.profesorenlinea.cl/fauna/salmon.htm> [consulta: 20 diciembre 2003].
31. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, R. Bases de la separación. En su: Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. Argentina, Artes Gráficas Farro S. A., 1992. pp. 39 – 63.
32. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, R. Preparación de muestras. En su: Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. Argentina, Artes Gráficas Farro S. A., 1992. pp. 203 – 239.
33. QUATTROCCHI, O.; ABELAIRA, S.; LABA, R. Validación de métodos. En su: Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. Argentina, Artes Gráficas Farro S. A., 1992. pp. 301 – 328.
34. SECRETARÍA Regional Ministerial de Salud R.M. Departamento: Métodos de análisis y Química Bromatológica. Manual de Calidad LSA-QB-M060. Laboratorio de Salud Ambiental. Gobierno de Chile, 26 de marzo del 2001.
35. SERNAPESCA. Programa de control de producto final. Norma técnica, Sección 1: Requisitos generales para la certificación sanitaria de los productos pesqueros de exportación. Departamento de Sanidad Pesquera [en línea] Servicio Nacional de Pesca. Chile. <www.sernapesca.cl> [consulta: 20 marzo 2005].
36. SHAKILA, R.J., JEYASEKARAN, G., PRINCY VYLA, S.A., KUMAR, R.S., Effect of delayed processing on changes in histamine and other quality characteristics of 3 commercially canned fishes. Journal of Food Science 70 (1): M25 – M29, enero – febrero 2005.
37. SILVA C., C.; DA PONTE D., J.B.; ENES DAPKEVICIUS, M. Storage temperature effect on histamine formation in big eye tuna and skipjack. Journal of Food Science 63 (4): 644 – 647, julio – agosto 1998.
38. SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. Apéndice 1: Evaluación de datos analíticos. En su: Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. España, M^c Graw Hill, 2001. pp. 919 – 940.

39. SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. Electroforesis capilar y electrocromatografía. En su: Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. España, M^c Graw Hill, 2001. pp. 843 -862.
40. SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. Introducción a las separaciones cromatográficas. En su: Principios de Análisis Instrumental. 5ª ed. España, M^c Graw Hill, 2001. pp. 730 – 757.
41. VECIANA-NOGUÉS, M.T., HERNANDEZ-JOVER, T., MARINE-FONT, A., VIDAL-CAROU, M.C. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. Journal of AOAC International 78 (4): 1045 – 1050, julio-agosto 1995.
42. VECIANA-NOGUÉS, M.T.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45 (6): 2036 – 2041, junio 1997.
43. VIGEL J., L.; DALGAARD, P.; HUSS, H. Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(6): 2448 - 2453, junio 2000.

ANEXO N°1
RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN LIMITADA DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

I. Validación limitada de HPLC

1.1. Linealidad

Tabla N°12: Concentración del estándar de histamina versus área obtenida

Concentración (mg/L)	Área	
	Curva 1	Curva 2
5	116937	129393
5	116845	128965
10	249410	261932
10	248980	262205
15	322396	401692
15	321421	401576
20	501518	551530
20	501387	549985
25	572531	758478
25	569830	757877
30	763395	896040
30	770127	871980
40	897136	1273224
40	921123	1273345
50	1113341	1433889
50	1110987	1434103
75	1705148	2066635
75	1709410	2068772

1.2. Límite de detección

Tabla N°13: Concentración del estándar de histamina versus área obtenida

Concentración (mg/L)	Area			Promedio	Desv. Est.(s)	RSD (%)
5	163501	162527	165868	163965	1718,22	1,0479
10	261932	263370	265567	263623	1830,66	0,6944
15	370028	373443	373318	372263	1936,58	0,5202

ANEXO N°1
RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN LIMITADA DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

II. Validación limitada de CZE

2.1. Linealidad

Tabla N°14: Concentración del estándar de histamina versus área obtenida

Concentración (mg/L)	Área	
	Curva 1	Curva 2
5	1662	2235
5	1695	2192
10	5373	4776
10	5402	4672
15	6314	6628
15	6441	6486
20	8373	8458
20	8330	8409
25	9572	12209
25	9352	12079
30	12674	14698
30	12609	14494
40	16205	16509
40	16148	16886
50	20726	21226
50	20566	21112
75	28158	28573
75	28229	28672

2.2. Límite de detección

Tabla N°15: Concentración del estándar de histamina versus área obtenida

Concentración (mg/L)	Area			Promedio	Desv. Est.(s)	RSD (%)
5	2145	2192	2235	2190,67	45,0148124	2,05484536
10	4894	4767	4726	4795,67	87,5918565	1,82647925
15	6667	6441	6628	6578,67	120,807009	1,83634488

ANEXO N°2
CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA

I. Cuantificación por HPLC

Tabla N°16: Concentración de histamina en Salmón coho, conservado al estado refrigerado por 24 días

Día	Individuo	Réplica	Area	[Histamina] por curva (mg/L de extracto)	[Histamina] (mg/kg de músculo)
0	A	1	0	0	0
0	A	2	0	0	0
0	B	1	0	0	0
0	B	2	0	0	0
0	C	1	0	0	0
0	C	2	0	0	0
0	D	1	0	0	0
0	D	2	0	0	0
0	E	1	0	0	0
0	E	2	0	0	0
3	A	1	0	0	0
3	A	2	0	0	0
3	B	1	0	0	0
3	B	2	0	0	0
3	C	1	0	0	0
3	C	2	0	0	0
3	D	1	0	0	0
3	D	2	0	0	0
3	E	1	0	0	0
3	E	2	0	0	0
6	A	1	0	0	0
6	A	2	0	0	0
6	B	1	0	0	0
6	B	2	0	0	0
6	C	1	0	0	0
6	C	2	0	0	0
6	D	1	0	0	0
6	D	2	0	0	0
6	E	1	0	0	0
6	E	2	0	0	0
10	A	1	0	0	0
10	A	2	0	0	0
10	B	1	0,667595205	3,0751	3,3
10	B	2	0,704476364	3,4566	
10	C	1	0	0	0
10	C	2	0	0	
10	D	1	0,48252127	2,3079	2,2
10	D	2	0,435618056	2,0328	
10	E	1	0,529469026	2,6664	2,5
10	E	2	0,504614332	2,3705	

Continuación tabla N°16

Día	Individuo	Réplica	Area	[Histamina] por curva (mg/L de extracto)	[Histamina] (mg/kg de músculo)
12	A	1	0	0	0
12	A	2	0	0	0
12	B	1	0	0	0
12	B	2	0	0	0
12	C	1	0	0	0
12	C	2	0	0	0
12	D	1	0	0	0
12	D	2	0	0	0
12	E	1	0	0	0
12	E	2	0	0	0
17	A	1	146986	5,5854	25,4
17	A	2	148021	5,6315	27,6
17	B	1	245496	9,9732	43,4
17	B	2	243675	9,8921	47,1
17	C	1	179093	7,0155	35,6
17	C	2	177046	6,9243	32,2
17	D	1	126116	4,6557	22,9
17	D	2	127074	4,6984	22,6
17	E	1	126728	4,6830	24,9
17	E	2	125450	4,6261	21,3
19	A	1	191563	7,5709	37,6
19	A	2	185815	7,3149	36,2
19	B	1	151962	5,8070	28,4
19	B	2	148828	5,6674	27,8
19	C	1	186229	7,3333	36,4
19	C	2	185920	7,3196	30,8
19	D	1	176237	6,8883	32,8
19	D	2	172786	6,7345	33,6
19	E	1	266159	10,8936	51,6
19	E	2	265236	10,8525	49,7
24	A	1	273226	11,2084	54,5
24	A	2	263108	10,7577	54,9
24	B	1	256276	10,4534	54,3
24	B	2	267961	10,9739	52,2
24	C	1	197717	7,8450	36,3
24	C	2	185225	7,2886	33,4
24	D	1	287956	11,8645	54,0
24	D	2	257935	10,5273	53,2
24	E	1	162839	6,2915	30,9
24	E	2	161700	6,2407	27,5

ANEXO N°2
CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA

II. Cuantificación por CZE

Tabla N°17: Concentración de histamina en Salmón coho, conservado al estado refrigerado por 24 días

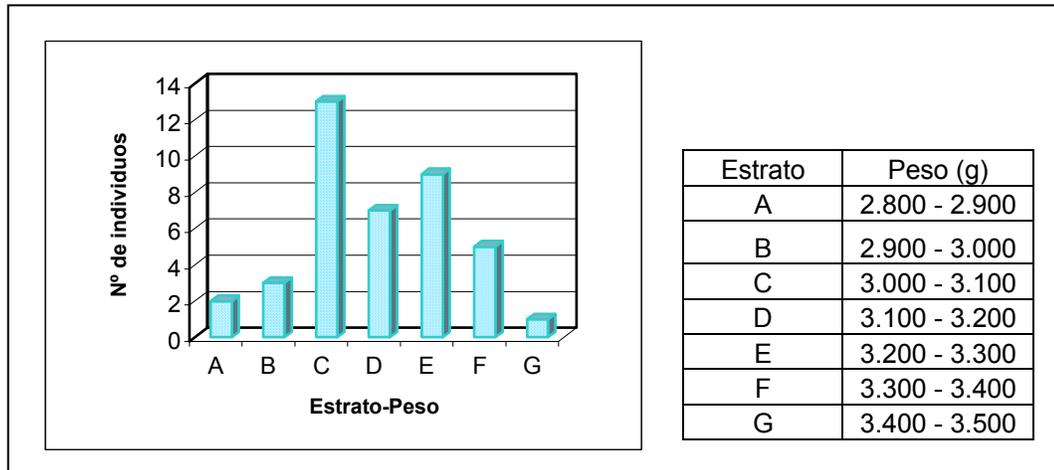
Día	Individuo	Réplica	Area	[Histamina] por curva (mg/L de extracto)	[Histamina] (mg/kg de músculo)
0	A	1	0	0	0
0	A	2	0	0	0
0	B	1	0	0	0
0	B	2	0	0	0
0	C	1	0	0	0
0	C	2	0	0	0
0	D	1	0	0	0
0	D	2	0	0	0
0	E	1	0	0	0
0	E	2	0	0	0
3	A	1	0	0	0
3	A	2	0	0	0
3	B	1	0	0	0
3	B	2	0	0	0
3	C	1	0	0	0
3	C	2	0	0	0
3	D	1	0	0	0
3	D	2	0	0	0
3	E	1	0	0	0
3	E	2	0	0	0
6	A	1	0	0	0
6	A	2	0	0	0
6	B	1	0	0	0
6	B	2	0	0	0
6	C	1	0	0	0
6	C	2	0	0	0
6	D	1	0	0	0
6	D	2	0	0	0
6	E	1	0	0	0
6	E	2	0	0	0
10	A	1	0	0	0
10	A	2	0	0	0
10	B	1	1190	0,9954	4,8
10	B	2	1166	0,9316	4,6
10	C	1	0	0	0
10	C	2	0	0	0
10	D	1	1066	0,6658	3,2
10	D	2	1093	0,7376	3,5
10	E	1	1139	0,8599	4,2
10	E	2	1125	0,8227	4,0

Continuación tabla N°17

Día	Individuo	Réplica	Área	[Histamina] por curva (mg/L de extracto)	[Histamina] (mg/kg de músculo)
12	A	1	0	0	0
12	A	2	0	0	0
12	B	1	0	0	0
12	B	2	0	0	0
12	C	1	0	0	0
12	C	2	0	0	0
12	D	1	0	0	0
12	D	2	0	0	0
12	E	1	0	0	0
12	E	2	0	0	0
17	A	1	2575	4,6770	22,6
17	A	2	2650	4,8763	23,3
17	B	1	4567	9,9720	47,7
17	B	2	4647	10,1846	49,6
17	C	1	3139	6,1761	29,6
17	C	2	3214	6,3755	31,1
17	D	1	2398	4,2065	20,3
17	D	2	2401	4,2144	20,2
17	E	1	2532	4,5627	22,0
17	E	2	2507	4,4962	21,9
19	A	1	3665	7,5743	36,9
19	A	2	3552	7,2740	35,0
19	B	1	2962	5,7057	27,5
19	B	2	2918	5,5887	26,9
19	C	1	3596	7,3909	36,8
19	C	2	3481	7,0852	34,5
19	D	1	3364	6,7742	33,1
19	D	2	3252	6,4765	31,4
19	E	1	4581	10,0092	49,5
19	E	2	4697	10,3175	50,1
24	A	1	5204	11,6652	56,7
24	A	2	5181	11,6041	55,8
24	B	1	4968	11,0379	53,1
24	B	2	5107	11,4074	54,7
24	C	1	3628	7,4760	36,1
24	C	2	3567	7,3138	35,7
24	D	1	5265	11,8273	57,4
24	D	2	5394	12,1702	58,4
24	E	1	2913	5,5754	27,6
24	E	2	2989	5,7774	28,4

ANEXO N°3
CLASIFICACIÓN DE LOS SALMONES SEGÚN PESO

Figura N°17: Histograma de peso-vivo de las muestras de Salmón coho



ANEXO N°4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC

I. Análisis estadístico de los resultados con réplica

Tabla N°18: Resultados con réplica

Día	Individuo	Réplica	[Histamina] (mg/kg)
0	A	1	0
0	A	2	0
0	B	1	0
0	B	2	0
0	C	1	0
0	C	2	0
0	D	1	0
0	D	2	0
0	E	1	0
0	E	2	0
3	A	1	0
3	A	2	0
3	B	1	0
3	B	2	0
3	C	1	0
3	C	2	0
3	D	1	0
3	D	2	0
3	E	1	0
3	E	2	0
6	A	1	0
6	A	2	0
6	B	1	0
6	B	2	0
6	C	1	0
6	C	2	0
6	D	1	0
6	D	2	0
6	E	1	0
6	E	2	0
10	A	1	0
10	A	2	0
10	B	1	3,1
10	B	2	3,5
10	C	1	0,0
10	C	2	0,0
10	D	1	2,3
10	D	2	2,0
10	E	1	2,7
10	E	2	2,4

Día	Individuo	Réplica	[Histamina] (mg/kg)
12	A	1	0
12	A	2	0
12	B	1	0
12	B	2	0
12	C	1	0
12	C	2	0
12	D	1	0
12	D	2	0
12	E	1	0
12	E	2	0
17	A	1	25,4
17	A	2	27,6
17	B	1	43,4
17	B	2	47,1
17	C	1	35,6
17	C	2	32,2
17	D	1	22,9
17	D	2	22,6
17	E	1	24,9
17	E	2	21,3
19	A	1	37,6
19	A	2	36,2
19	B	1	28,4
19	B	2	27,8
19	C	1	36,4
19	C	2	30,8
19	D	1	32,8
19	D	2	33,6
19	E	1	51,6
19	E	2	49,7
24	A	1	54,5
24	A	2	54,9
24	B	1	54,3
24	B	2	52,2
24	C	1	36,3
24	C	2	33,4
24	D	1	54,0
24	D	2	53,2
24	E	1	30,9
24	E	2	27,5

ANEXO N°4
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC

Tabla N°19: ANOVA de la concentración de histamina versus réplica

ANOVA Table for Concentracion by Replica					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4,56013	1	4,56013	0,01	0,9126
Within groups	29318,7	78	375,881		
Total (Corr.)	29323,3	79			

ANEXO N°4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC

II. Análisis estadístico de los resultados promediados

Tabla N°20: Resultados promediados

Día	Individuo	Estrato Peso	Sexo	Promedio [Histamina] (mg/kg)
0	A	C	H	0
0	B	E	H	0
0	C	B	M	0
0	D	B	H	0
0	E	F	M	0
3	A	A	H	0
3	B	F	H	0
3	C	C	H	0
3	D	E	M	0
3	E	A	M	0
6	A	D	M	0
6	B	D	M	0
6	C	E	M	0
6	D	E	H	0
6	E	F	H	0
10	A	C	H	0
10	B	E	H	3,3
10	C	C	M	0
10	D	C	H	2,2
10	E	C	M	2,5
12	A	D	M	0
12	B	C	M	0
12	C	C	M	0
12	D	B	H	0
12	E	C	H	0
17	A	G	H	26,5
17	B	D	H	45,3
17	C	D	M	33,9
17	D	E	M	22,7
17	E	D	H	23,1
19	A	E	H	36,9
19	B	C	H	28,1
19	C	F	H	33,6
19	D	D	M	33,2
19	E	C	H	50,7
24	A	C	M	54,7
24	B	C	M	53,2
24	C	E	M	34,8
24	D	E	H	53,6
24	E	F	H	29,2

ANEXO N°4
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC

Tabla N°21: ANOVA del promedio de la concentración de histamina versus día de almacenamiento, individuo, estrato-peso y sexo

Analysis of Variance for Promedio Concentracion - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Dia	12043,1	7	1720,45	34,95	0,0000
B:Estrato peso	156,215	6	26,0359	0,53	0,7800
C:Individuo	40,5695	4	10,1424	0,21	0,9322
D:Sexo	1,13154	1	1,13154	0,02	0,8809
RESIDUAL	1033,63	21	49,2206		
TOTAL (CORRECTED)	14634,9	39			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

III. Test de Rango múltiple con respecto a la variable “Dia”

Tabla N°22: Test de tukey

Multiple Range Tests for Promedio Concentracion by Dia			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
12	5	-2,87748	X
10	5	-1,2833	X
0	5	-1,09502	X
3	5	-0,148405	X
6	5	0,0573278	X
17	5	30,2329	X
19	5	35,2758	X
24	5	44,343	X

ANEXO N°4

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR HPLC

Figura N°18: Promedio de la concentración de histamina con respecto al día de almacenamiento

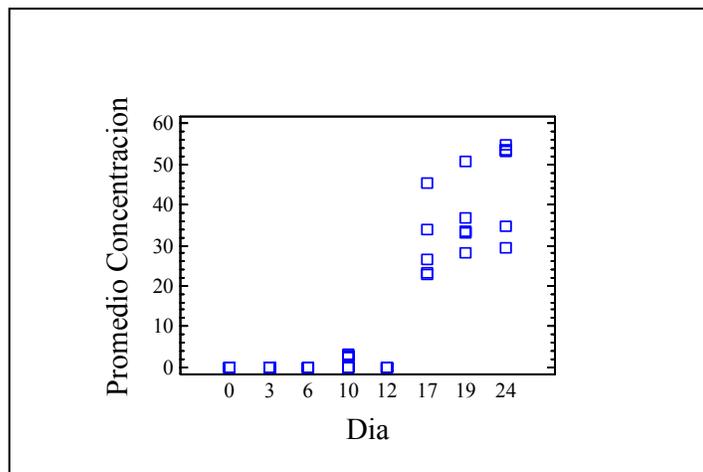
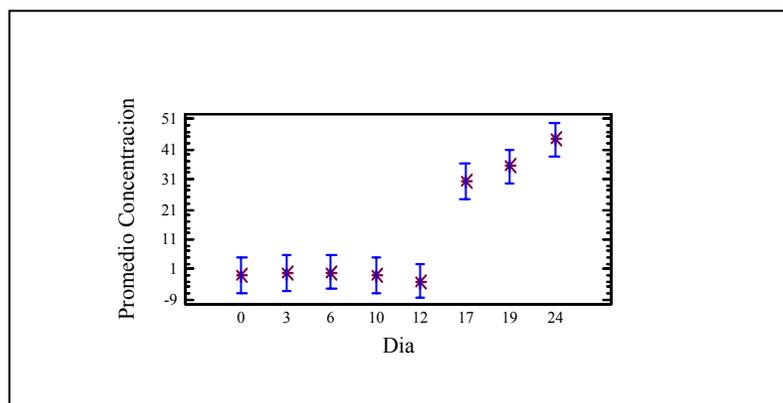


Figura N°19: Gráfico de las medias del promedio de la concentración de histamina con respecto al día de almacenamiento



ANEXO N°5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR CZE

I. Análisis estadístico de los resultados con réplica

Tabla N°23: Resultados con réplica

Día	Individuo	Réplica	[Histamina] (mg/kg)	Día	Individuo	Réplica	[Histamina] (mg/kg)
0	A	1	0	12	A	1	0
0	A	2	0	12	A	2	0
0	B	1	0	12	B	1	0
0	B	2	0	12	B	2	0
0	C	1	0	12	C	1	0
0	C	2	0	12	C	2	0
0	D	1	0	12	D	1	0
0	D	2	0	12	D	2	0
0	E	1	0	12	E	1	0
0	E	2	0	12	E	2	0
3	A	1	0	17	A	1	22,6
3	A	2	0	17	A	2	23,3
3	B	1	0	17	B	1	47,7
3	B	2	0	17	B	2	49,6
3	C	1	0	17	C	1	29,6
3	C	2	0	17	C	2	31,1
3	D	1	0	17	D	1	20,3
3	D	2	0	17	D	2	20,2
3	E	1	0	17	E	1	22,0
3	E	2	0	17	E	2	21,9
6	A	1	0	19	A	1	36,9
6	A	2	0	19	A	2	35,0
6	B	1	0	19	B	1	27,5
6	B	2	0	19	B	2	26,9
6	C	1	0	19	C	1	36,8
6	C	2	0	19	C	2	34,5
6	D	1	0	19	D	1	33,1
6	D	2	0	19	D	2	31,4
6	E	1	0	19	E	1	49,5
6	E	2	0	19	E	2	50,1
10	A	1	0	24	A	1	56,7
10	A	2	0	24	A	2	55,8
10	B	1	4,8	24	B	1	53,1
10	B	2	4,6	24	B	2	54,7
10	C	1	0	24	C	1	36,1
10	C	2	0	24	C	2	35,7
10	D	1	3,2	24	D	1	57,4
10	D	2	3,5	24	D	2	58,4
10	E	1	4,2	24	E	1	27,6
10	E	2	4,0	24	E	2	28,4

ANEXO N°5
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR CZE

Tabla N°24: ANOVA de la concentración de histamina versus réplica

ANOVA Table for Concentracion by Replica					
Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
Within groups	29967,2	78	384,194		
Total (Corr.)	29967,2	79			

ANEXO N°5
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR CZE

II. Análisis estadístico de los resultados promediados

Tabla N°25: Resultados promediados

Día	Individuo	Estrato Peso	Sexo	Promedio [Histamina] (mg/kg)
0	A	C	H	0
0	B	E	H	0
0	C	B	M	0
0	D	B	H	0
0	E	F	M	0
3	A	A	H	0
3	B	F	H	0
3	C	C	H	0
3	D	E	M	0
3	E	A	M	0
6	A	D	M	0
6	B	D	M	0
6	C	E	M	0
6	D	E	H	0
6	E	F	H	0
10	A	C	H	0
10	B	E	H	4,7
10	C	C	M	0
10	D	C	H	3,3
10	E	C	M	4,1
12	A	D	M	0
12	B	C	M	0
12	C	C	M	0
12	D	B	H	0
12	E	C	H	0
17	A	G	H	22,9
17	B	D	H	48,6
17	C	D	M	30,3
17	D	E	M	20,3
17	E	D	H	21,9
19	A	E	H	35,9
19	B	C	H	27,1
19	C	F	H	35,6
19	D	D	M	32,2
19	E	C	H	49,7
24	A	C	M	56,3
24	B	C	M	53,9
24	C	E	M	35,9
24	D	E	H	57,9
24	E	F	H	28,0

ANEXO N°5
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR CZE

Tabla N°26: ANOVA del promedio de la concentración de histamina versus día de almacenamiento, individuo, estrato-peso y sexo.

Analysis of Variance for Promedio Concentracion - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Dia	12134,0	7	1733,43	27,45	0,0000
B:Estrato peso	176,861	6	29,4768	0,47	0,8250
C:Individuo	50,4671	4	12,6168	0,20	0,9356
D:Sexo	8,94641	1	8,94641	0,14	0,7104
RESIDUAL	1325,89	21	63,1375		
TOTAL (CORRECTED)	14960,9	39			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

III. Test de Rango múltiple con respecto a la variable “Dia”

Tabla N°27: Test de Tukey

Multiple Range Tests for Promedio Concentracion by Dia			
Method: 95,0 percent Tukey HSD			
Dia	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
12	5	-2,923	X
0	5	-1,15685	X
3	5	-0,685508	X
10	5	-0,613123	X
6	5	-0,314455	X
17	5	28,5261	X
19	5	34,3982	XX
24	5	45,5663	X

ANEXO N°5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINA POR GZE

Figura N°20: Promedio de la concentración de histamina con respecto al día de almacenamiento

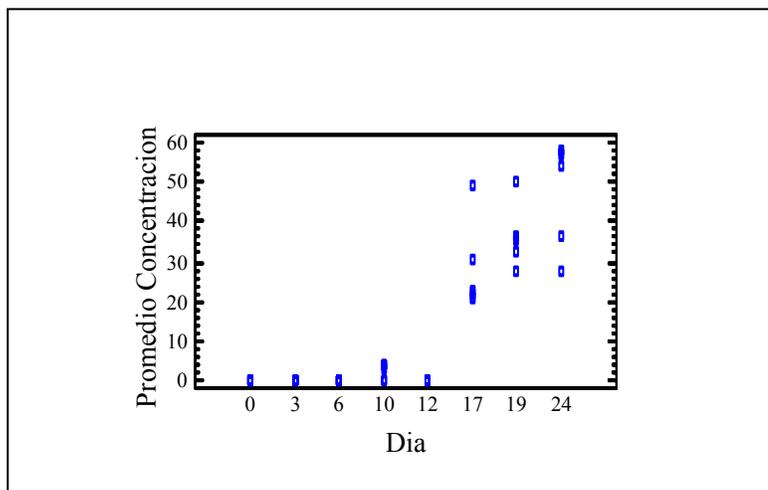
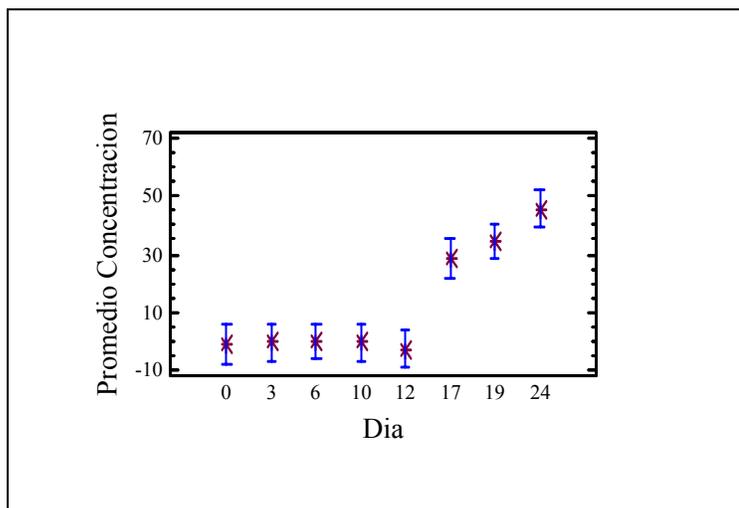


Figura N°21: Gráfico de las medias del promedio de la concentración de histamina con respecto al día de almacenamiento



ANEXO N°6

CROMATOGRAMAS Y ELECTROFEROGRAMAS

I. Resultados de HPLC: Cromatogramas

Figura N°22: Estándar de histamina de 50 mg/L

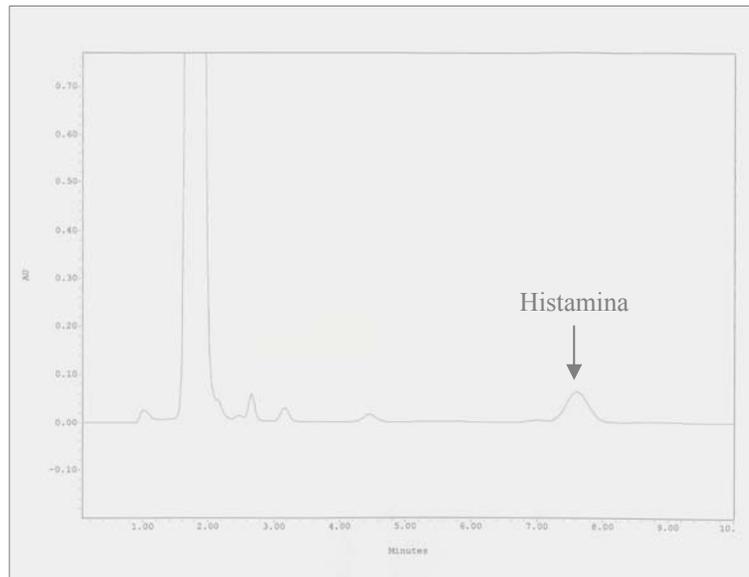
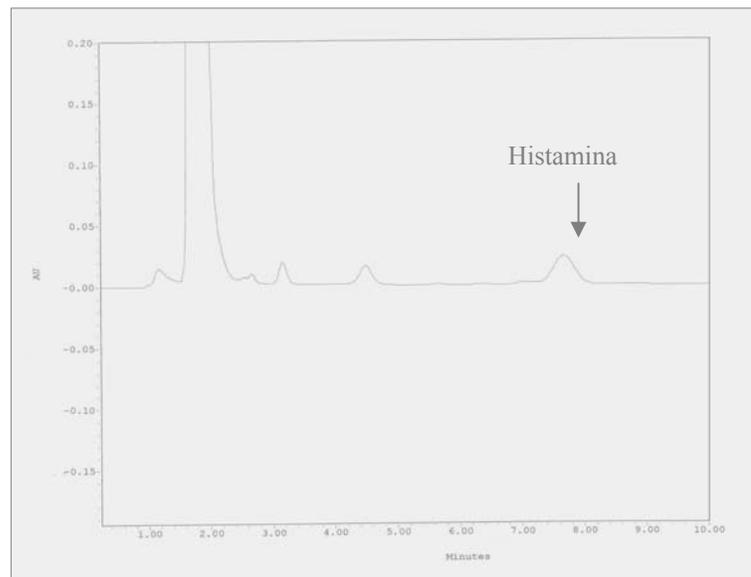


Figura N°23: Muestra de Salmón coho, marcada con estándar de histamina



ANEXO N°6

CROMATOGRAMAS Y ELECTROFEROGRAMAS

I. Resultados de HPLC: Cromatogramas

Figura N°24: Muestra de Salmón coho, del día 3 de almacenamiento

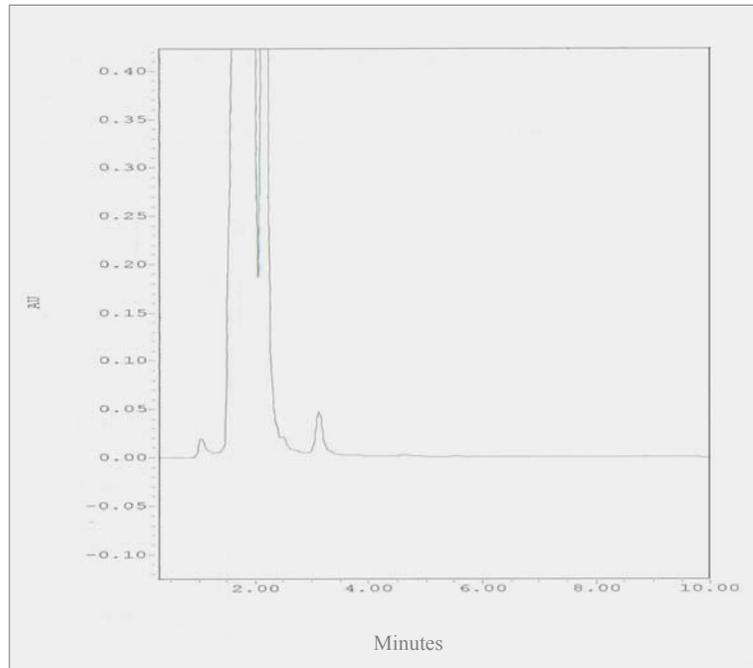
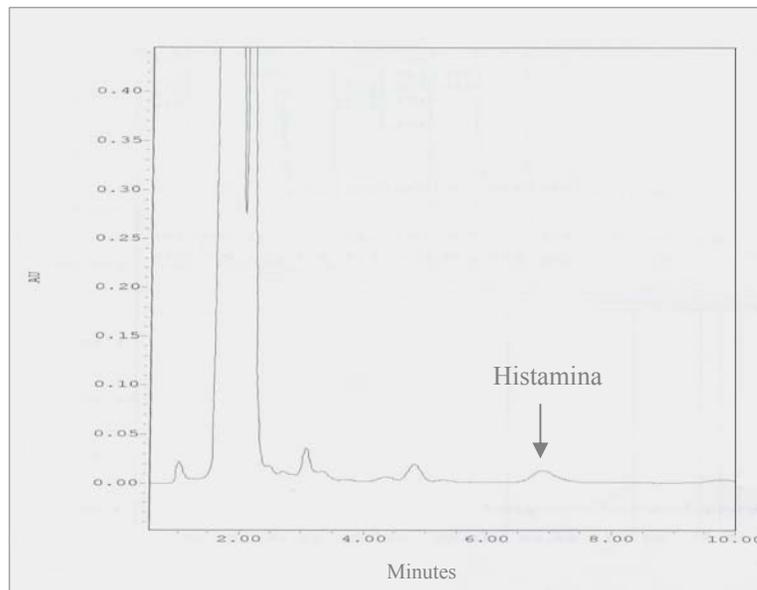


Figura N°25: Muestra de Salmón, del día 24 de almacenamiento



ANEXO N°6

CROMATOGRAMAS Y ELECTROFEROGRAMAS

II. Resultados de CZE: Electroferogramas

Figura N°26: Estándar de histamina de 50 mg/L

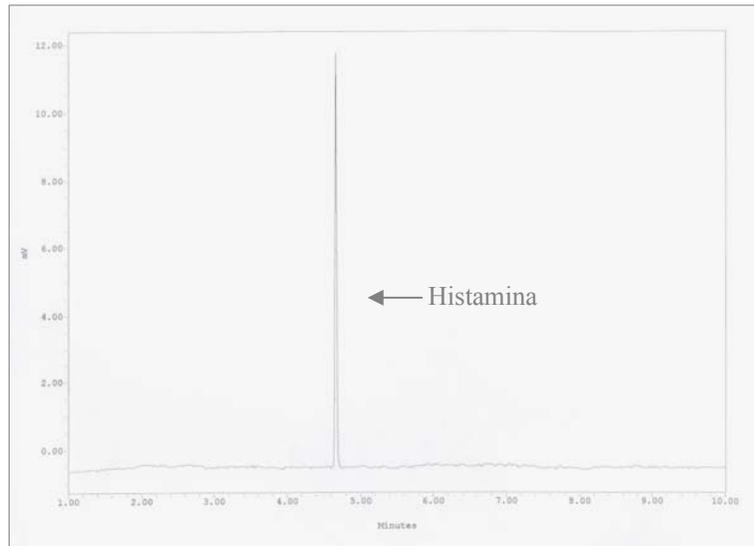
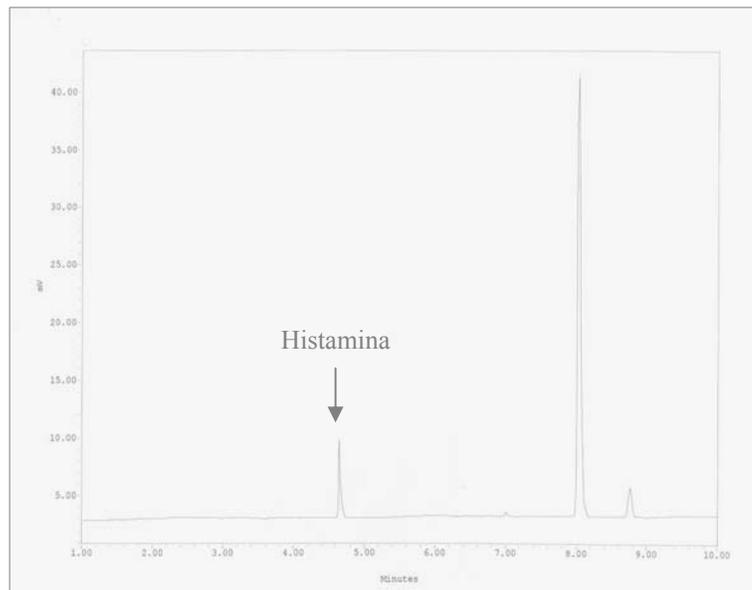


Figura N°27: Muestra de Salmón coho, marcada con estándar de histamina



ANEXO N°6

CROMATOGRAMAS Y ELECTROFEROGRAMAS

II. Resultados de CZE: Electroferogramas

Figura N°28: Muestra de Salmón coho del día 0 de almacenamiento

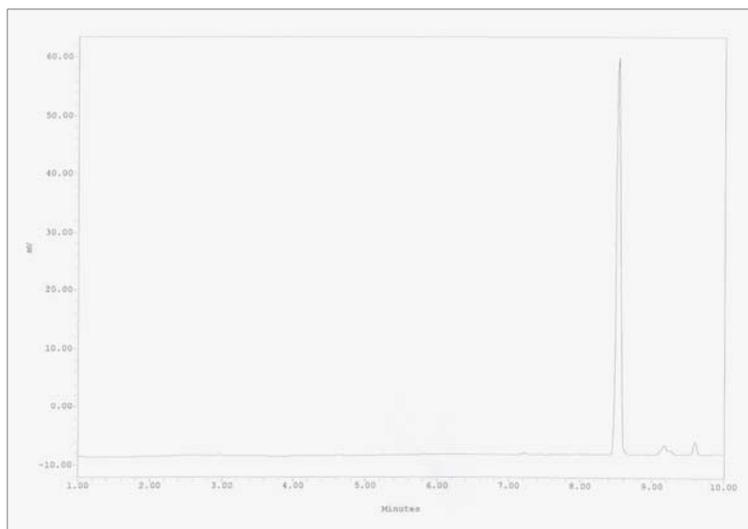
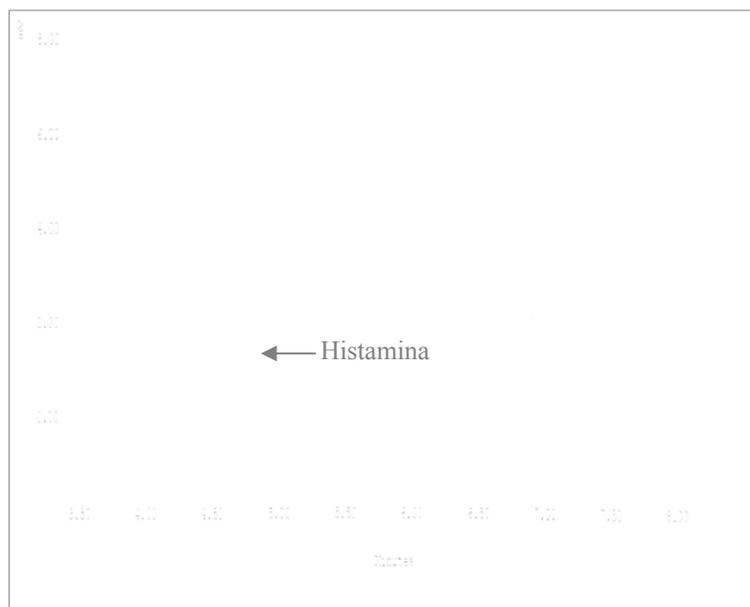


Figura N°29: Muestra de Salmón coho del día 24 de almacenamiento



ANEXO N°7
DETERMINACIÓN POR HPLC CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA

Figura N°30: Estándar de histamina de 240 mg/L

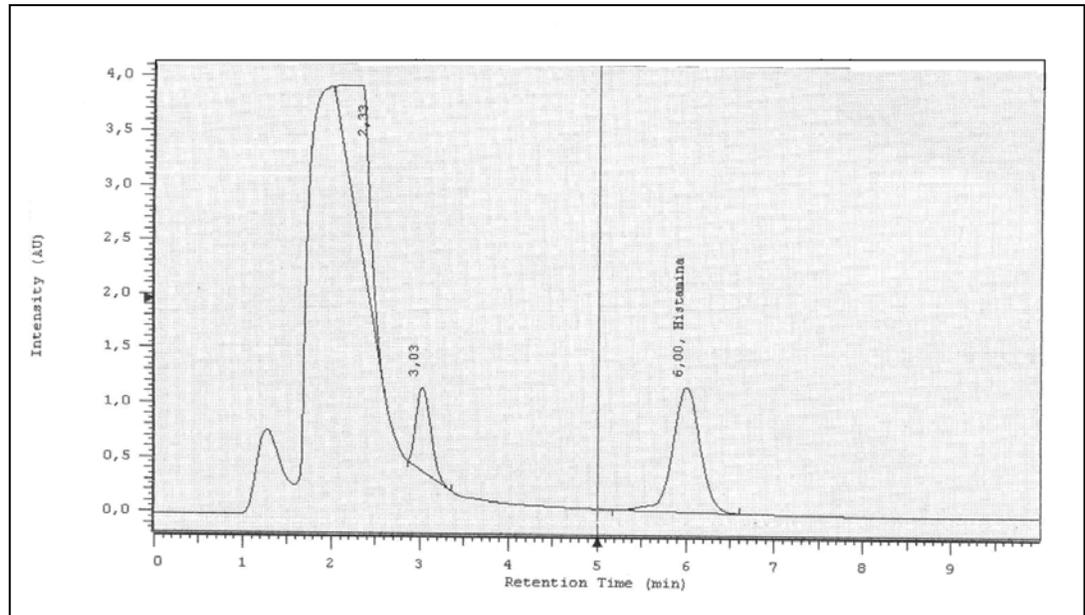


Figura N°31: Estándar de histamina de 120 mg/L

