

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA CON ÉNFASIS EN
TOXICOLOGÍA ANALÍTICA Y FORENSE

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA PRODUCIDOS EN PESCADO NO
PROCESADO DE LA REGIÓN DE PANAMÁ CENTRO DEL DISTRITO DE PANAMÁ
MEDIANTE LA TÉCNICA DE HPLC-FLD.

AMARELYZ VILLALBA
C.I.P. 8-815-2300

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA.

2026

APROBACIÓN

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA PRODUCIDOS EN PESCADO NO PROCESADO DE LA REGIÓN DE PANAMÁ CENTRO DEL DISTRITO DE PANAMÁ MEDIANTE LA TÉCNICA DE HPLC-FLD.

PRESENTADO POR: AMARELYZ VILLALBA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA CON ÉNFASIS EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA Y FORENSE.

JURADO CALIFICADOR:

XXXXXXX Director (a) de Tesis _____

XXXXXXX Miembro del Jurado _____

XXXXXXX Miembro del Jurado _____

REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN _____
Y POSTGRADO

COORDINADOR (A) DE POST GRADO _____

Fecha _____

Dedicatoria

A mí amado hijo Mateo, mi mayor inspiración y motivo de esfuerzo. Que este trabajo sea un testimonio del amor que me impulsa a construir un mejor futuro para ti.

A mi madre, cuyo apoyo incondicional hizo posible que pudiera dedicar el tiempo necesario para culminar este logro. Su entrega y compañía han sido un regalo invaluable.

A Dios, por darme la sabiduría, la paciencia y la fortaleza para avanzar incluso en los momentos más difíciles. A él encomiendo cada logro alcanzado.

Agradecimientos

Doy gracias a Dios, fuente de fortaleza y sabiduría, por permitirme culminar esta investigación y acompañarme en cada etapa del proceso.

A mi asesor principal el MSc. Antonio Bruno, por su apoyo y por gestionar con esmero todos los recursos necesarios para que este proyecto pudiera desarrollarse sin contratiempos. Su compromiso fue fundamental para alcanzar los objetivos propuestos.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, institución que brindó las instalaciones, equipos necesarios para llevar a cabo cada etapa de la investigación. Asimismo, valoro profundamente el respaldo institucional que me permitió desarrollar este trabajo en un entorno científico adecuado para garantizar la calidad de los resultados.

Al Dr. Orlando Leone, asesor metodológico por parte de la Universidad de Panamá, le agradezco por su apoyo académico y guía constante, por sus aportes en la revisión metodológica y los resultados. Su compromiso permitió fortalecer y dar solidez científica a este estudio.

A mi asesora internacional la MSc. Carol Guzmán, por guiarme durante el proceso de redacción, revisión y corrección del documento, aportando una perspectiva valiosa que enriqueció significativamente este trabajo.

A la Dra. Hilda Acosta coordinadora del programa de maestría, le expreso mi agradecimiento por gestionar las pasantías internacionales, que enriquecieron mis conocimientos y permitieron ampliar mi experiencia investigativa. Extiendo mi agradecimiento a las instituciones que me acogieron durante dichas estancias: la unidad de Residuos y Contaminantes en Alimentos de origen Acuático (RECAA, LANASEVE), Costa Rica, y en Centro de Excelencia en Productos y Procesos (CEPROCOR), Argentina. En ambas instituciones fui recibida con afecto, dedicación y profesionalismo, lo que contribuyó de manera significativa a mi formación académica y práctica.

A todas las personas que, de una u otra manera, brindaron apoyo, ánimo y acompañamiento durante este proceso. Cada gesto y palabra fueron esenciales para culminar esta etapa.

Índice general

Portada.....	i
Aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice general.....	v
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xiii
Índice de gráficas	xv
Abreviaturas	xvii
Resumen.....	1
Introducción.....	2
CAPÍTULO I	4
1. Antecedentes del estudio.	5
1.1. Aspectos generales.....	5
1.1.1. Planteamiento del problema.	5
1.1.2. Justificación del estudio.....	6
1.1.3. Hipótesis de trabajo.....	7
1.1.4. Objetivos del estudio.	7
1.2. Cobertura del estudio.	8
CAPÍTULO II	9
2. Descripción general de la histamina.	10
2.1. Definición.	10
2.2. Microorganismos implicados en la producción de histamina.	10
2.3. Factores que influyen en la acumulación y formación de la histamina.....	11
2.4. Daños sobre la salud humana.....	12

2.5.	Normativa existente y límites máximos permitidos de histamina en peces.	13
2.5.1.	Normativas nacionales.	13
2.5.2.	Normativas internacionales.	14
2.5.3.	Normativas regionales.	14
2.6.	Técnicas analíticas empleada para la determinación de histamina	14
2.6.1.	Parámetros para validación de la metodología.	17
CAPÍTULO III		19
3.	Metodología.....	20
3.1.	Tipo y diseño de estudio.	20
3.1.1.	Universo.	20
3.1.2.	Descripción de las variables.	21
3.1.3.	Operacionalización de variables.	22
3.2.	Área de estudio y muestra.	23
3.2.1.	Lugar de estudio.....	23
3.2.2.	Selección de muestra.	25
3.2.3.	Tamaño de muestra.	26
3.2.4.	Distribución proporcional de la muestra.	27
3.2.5.	Muestreo y preservación de las muestras.	29
3.3.	Materiales y equipos empleados para la determinación de histamina.	30
3.3.1.	Reactivos.	30
3.3.2.	Material de vidrio e insumos.	30
3.3.3.	Equipos.	31
3.4.	Selección del método.	31
3.4.1.	Evaluación preliminar del método analítico.....	33
3.5.	Optimización del método.....	33
3.5.1.	Reacción de derivatización.....	34

3.5.2.	Proporción de la fase móvil.	35
3.5.3.	Determinación del tiempo muerto (t_m).	35
3.5.4.	Cálculo del factor de retención (k').	35
3.5.5.	Resolución (R_s) y número de platos teóricos (N).	36
3.5.6.	Barrido espectral para la selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.	37
3.5.7.	Flujo de la fase móvil.	37
3.5.8.	Estabilidad de la señal derivada.	38
3.6.	Validación del método.	39
3.6.1.	Selectividad.	39
3.6.2.	Linealidad.	39
3.6.3.	Límite de detección (LOD).	40
3.6.4.	Límite de cuantificación (LOQ).	41
3.6.5.	Precisión.	41
3.6.6.	Sensibilidad analítica.	42
3.6.7.	Exactitud o veracidad.	42
3.6.8.	Robustez.	43
3.6.9.	Estimación de la incertidumbre de la medición	44
3.7.	Método analítico empleado para la determinación de histamina.	45
3.7.1.	Procesamiento y extracción de la muestra.	45
3.7.2.	Proceso de derivatización.	46
3.7.3.	Condiciones cromatográficas.	46
3.8.	Control de calidad.	47
3.9.	Aspectos éticos.	48
CAPÍTULO IV		50
4.	Resultados y discusión.	51

4.1.	Resultados de la evaluación preliminar del método analítico.....	51
4.1.1.	Parámetros cromatográficos del sistema.....	51
4.1.2.	Estabilidad de la señal derivada.....	52
4.1.3.	Linealidad de la respuesta.....	54
4.1.4.	Límites de detección y cuantificación.....	56
4.1.5.	Precisión (repetibilidad).....	58
4.1.6.	Sensibilidad analítica.....	59
4.2.	Discusión.....	62
4.3.	Resultados de la optimización del método.....	65
4.3.1.	Reacción de derivatización.....	65
4.3.2.	Proporción de la fase móvil.....	68
4.3.3.	Barrido espectral para la selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.....	70
4.3.4.	Flujo de la fase móvil.....	73
4.3.5.	Extracción de la muestra.....	77
4.3.6.	Estabilidad de la reacción de derivatización.....	82
4.4.	Discusión.....	85
4.5.	Resultados de la validación de la metodología.....	90
4.5.1.	Selectividad.....	90
4.5.2.	Linealidad.....	92
4.5.3.	Límite de detección (LD).....	101
4.5.4.	Límite de cuantificación (LOQ).....	102
4.5.5.	Precisión.....	102
4.5.6.	Sensibilidad analítica.....	106
4.5.7.	Exactitud o veracidad.....	108
4.5.8.	Robustez.....	110

4.5.9.	Estimación de la incertidumbre de la medición	111
4.6.	Discusión.	113
4.7.	Resultados del análisis de las muestras.....	122
4.7.1.	Niveles de histamina encontrados en las muestras por especie.	122
4.7.2.	Niveles de histamina encontradas en pescado no procesado por corregimiento y estrato socioeconómico.....	129
4.7.3.	Análisis estadístico de las concentraciones de histamina entre estratos socioeconómicos.....	138
4.7.4.	Comparación con normativas.....	144
4.8.	Discusión.	146
4.9.	Limitaciones.....	148
CONCLUSIONES.....		151
RECOMENDACIONES.....		154
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		156
ANEXOS		163

Índice de tablas

Tabla 1. Toxicidad según su concentración de histamina.	13
Tabla 2. Comparación de los métodos de prueba más utilizados para la determinación de los niveles de histamina.	16
Tabla 3. Operacionalización de las variables consideradas en el estudio.	22
Tabla 4. Cadenas de supermercados ubicados en el área de estudio.	23
Tabla 5. Metodología del cálculo para el número de muestra por estrato.	27
Tabla 6. Listado de los establecimientos por corregimiento y estrato socioeconómico. .	28
Tabla 7. Criterio para la codificación de las muestras.	29
Tabla 8. Diseño de los factores seleccionados y los niveles evaluados.	43
Tabla 9. Condiciones cromatográficas.	46
Tabla 10. Ensayo de estabilidad de señal fluorescente.	53
Tabla 11. Curva de calibración histamina.	55
Tabla 12. Señal del blanco (n = 20).	57
Tabla 13. Límites de detección y cuantificación calculados.	57
Tabla 14. Repetibilidad a concentración fija (n=6).	58
Tabla 15. Pendiente (m) calculada para cada curva de calibración.	60
Tabla 16. Comparación de criterios de aceptación vs. Resultados obtenidos en la verificación del método.	64
Tabla 17. Resultados de la optimización del pH.	66
Tabla 18. Resultados de la optimización del tiempo de reacción.	67
Tabla 19. Resultados de la evaluación de las diferentes proporciones de la fase móvil.	68
Tabla 20. Resumen del ensayo de barrido espectral para establecer las longitudes de onda máximas.	71

Tabla 21. Resumen del ensayo de barrido espectral, intensidad de fluorescencia en cada barrido.	72
Tabla 22. Ecuación de Van Deemter y parámetros para el cálculo del flujo óptimo.	74
Tabla 23. Parámetros evaluados para determinar el flujo óptimo.	75
Tabla 24. Resultados obtenidos para el cálculo del flujo óptimo.	76
Tabla 25. Resultados del efecto del pH del buffer dilución sobre el pico cromatográfico	80
Tabla 26. Resultados del ensayo de estabilidad del derivado fluorescente de histamina.	83
Tabla 27. Comparación de criterios de aceptación y resultados obtenidos en la optimización del método.	89
Tabla 28. Rango de concentración para evaluar el intervalo de trabajo del instrumento.	93
Tabla 29. Puntos seleccionados para el intervalo de trabajo del método.	94
Tabla 30. Curvas de calibración n=3 para cada nivel.	96
Tabla 31. Hipótesis para prueba de Levene.	97
Tabla 32. Interpretación para prueba de Cochran.	97
Tabla 33. Varianza entre réplicas en cada nivel.	98
Tabla 34. Puntos de la curva de calibración de histamina solución y matriz de pescado.	99
Tabla 35. Valores de muestras blanco de matriz de pescado (n = 20).	101
Tabla 36. Resultados de la repetibilidad instrumental en solución estándar por nivel de concentración (n = 6 para cada nivel).	102
Tabla 37. Resultados de la repetibilidad del método en muestras de pescado por nivel de concentración (n = 6 para cada nivel).	103

Tabla 38. Resultados de la evaluación de la precisión intermedia en solución estándar de concentración 0.400 µg/mL.	104
Tabla 39. Resultados de la evaluación de la precisión intermedia en muestras de pescado enriquecidas a 100 mg/kg.....	105
Tabla 40. Evaluación de la pendiente de la curva de calibración.	107
Tabla 41. Resultados de los % de recuperación por nivel fortificado.	109
Tabla 42. Resultados de la evaluación de robustez mediante el procedimiento de Youden y Steiner.	110
Tabla 43. Resumen de las principales fuentes de incertidumbre.	111
Tabla 44. Resumen de los resultados obtenidos en la verificación del método.....	120
Tabla 45. Resultados obtenidos en las muestras de Atún aleta amarilla.	123
Tabla 46. Resultados obtenidos en las muestras de Dorado.	125
Tabla 47. Resultados obtenidos en las muestras de Sierra.	127
Tabla 48. Resumen de los resultados obtenidos en las muestras de pescado por especie.	129
Tabla 49. Distribución de las muestras por corregimiento, especie y estrato socioeconómico.....	130
Tabla 50. Mapa de calor de la distribución de los niveles de histamina por especie y corregimientos del estrato bajo.....	131
Tabla 51. Mapa de calor de la distribución de los niveles de histamina por especie y corregimientos del estrato alto.....	132
Tabla 52. Niveles de histamina encontrados en las especies de pescado analizadas por estrato socioeconómico.	136
Tabla 53. Comparación de concentraciones de histamina entre estratos socioeconómicos mediante prueba t con corrección de Welch.	143

Índice de figuras

Figura 1. División político-administrativa de la República de Panamá, Provincia de Panamá distrito de Panamá, por corregimiento año: 2010. Región de Panamá Centro..	8
Figura 2. Estructura química de la histamina y mecanismo de síntesis.	10
Figura 3. Mapa de la distribución de los supermercados ubicados en el distrito de Panamá, la región de Panamá Centro.....	24
Figura 4. Método analítico seleccionado.....	32
Figura 5. Cromatograma de la solución estándar de histamina (0.250 µg/mL) bajo condiciones cromatográficas iniciales.....	51
Figura 6. Cromatograma de histamina con fase móvil en proporción 70:30.....	69
Figura 7. Cromatograma de histamina con fase móvil en proporción 60:40.....	70
Figura 8. Cromatograma a longitud de onda de excitación de 285 y emisión de 425.....	72
Figura 9. Cromatograma a longitud de onda de excitación de 285 y emisión de 455.....	73
Figura 10. Altura del plato teórico (H) frente a la velocidad lineal de flujo, para determinar el flujo óptimo.	76
Figura 11. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el análisis de la muestra por el método A.....	78
Figura 12. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el análisis de la muestra por el método B.....	78
Figura 13. Cromatograma del método A donde se utiliza ácido perclórico 0.2 M.....	79
Figura 14. Cromatograma del método B donde se utiliza una mezcla metanol:HCl 0.1 M (80:20 v/v).	79
Figura 15. Diagrama de flujo de las condiciones y los pasos seguidos para el ensayo de estabilidad.	82

Figura 16. Cromatograma correspondiente a soluciones estándar de tiramina (Tr = 4.78), histamina (Tr = 6.59), putrescina (Tr = 9.34) y cadaverina (Tr = 11.19).	90
Figura 17. Cromatograma obtenido tras la derivatización de una solución estándar mezcla de aminas biogénicas. Tiramina (Tr = 4.77), histamina (Tr = 6.57) y cadaverina (Tr = 8.89).	91
Figura 18. Distribución espacial relativa de los niveles de histamina en Atún aleta amarilla en Panamá Centro.	133
Figura 19. Distribución espacial relativa de los niveles de histamina en Dorado en Panamá Centro.	134
Figura 20. Distribución espacial relativa de los niveles de histamina en Sierra en Panamá Centro.	135

Índice de gráficas

Grafica 1. Ensayo de estabilidad de señal fluorescente (Área vs Tiempo).....	54
Grafica 2. Curva de calibración histamina.....	55
Grafica 3. Gráfico de residuos.	56
Grafica 4. Evaluación de la precisión a concentración fija (Repetibilidad).....	59
Grafica 5. Evaluación de la sensibilidad analítica.	60
Grafica 6. Gráfico control de sensibilidad analítica.	61
Grafica 7. Determinación del pH óptimo.	66
Grafica 8. Determinación del tiempo óptimo de reacción.	67
Grafica 9. Efecto del pH del buffer dilución sobre el pico cromatográfico.....	81
Grafica 10. Estabilidad del derivado fluorescente de histamina - % Variación vs Tiempo.	84
Grafica 11. Evaluación del intervalo de trabajo del instrumento.....	93
Grafica 12. Puntos seleccionados como intervalo de trabajo del método.	94
Grafica 13. Comportamiento de los residuos de la regresión.....	95
Grafica 14. Distribución de los residuos por nivel de concentración.....	95
Grafica 15. Comparación de las curvas de calibración de histamina en solución y en matriz de pescado.....	100
Grafica 16. Evaluación de la sensibilidad analítica.	107
Grafica 17. Niveles de histamina encontrados en muestras de atún aleta amarilla.....	124
Grafica 18. Niveles de histamina encontrados en muestras de Dorado.	126
Grafica 19. Niveles de histamina encontrados en muestras de Sierra.	128

Grafica 20. Distribución del contenido de histamina en las especies Atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>), Dorado (<i>Coryphaena hippurus</i>) y Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>) según el estrato socioeconómico del área de procedencia.	137
Grafica 21. Distribución de las concentraciones de histamina (mg/kg) en Atún aleta amarilla según estrato socioeconómico.	139
Grafica 22. Distribución de las concentraciones de histamina (mg/kg) en Dorado según estrato socioeconómico.	141
Grafica 23. Distribución de las concentraciones de histamina (mg/kg) en Sierra según estrato socioeconómico.	142
Grafica 24. Distribución porcentual de las muestras según concentración de histamina y cumplimiento de los valores normativos.	145

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
% R	Porcentaje de recuperación
µg/mL	Microgramos por mililitro
ACN	Acetonitrilo
ANOVA	Análisis de varianza
C (Cochran)	Estadístico del test de Cochran
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
DGNTI-COPANIT	Dirección General de Normas y Tecnología Industrial – Comisión Panameña de Normas Industriales y Técnicas
EURACHEM	Organización Europea para la Validación de Métodos Analíticos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (Food and Drug Administration)
FLD	Detector de Fluorescencia (Fluorescence Detector)
FM	Fase móvil
H	Altura equivalente de un plato teórico (HETP o Height Equivalent to a Theoretical Plate)
H ₀	Hipótesis nula
H ₁	Hipótesis alterna
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography)
IC	Intervalo de confianza
ICH	Consejo Internacional para la Armonización (International Council for Harmonisation)
ISO	Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization)
k'	Factor de retención
LOD	Límite de detección (Limit of Detection)

Abreviatura	Significado
LOQ	Límite de cuantificación (Limit of Quantification)
mAU	Milésima de unidad de absorbancia
MeOH	Metanol
mg/kg	Miligramos por kilogramo
min	Minutos
mL/min	Mililitros por minuto
n	Número de muestra
N	Número de platos teóricos
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
OPA	<i>o</i> -ftalaldehído
p	Valor p (probabilidad)
pH	Potencial de hidrógeno (medida de acidez o alcalinidad)
ppm	Partes por millón
R^2	Coefficiente de determinación
Rs	Resolución
S/N	Relación señal/ruido
Std	Estándar
T	Temperatura
T _m	Tiempo muerto
T _r	Tiempo de retención
UF	Unidades de fluorescencia
W	Ancho del pico
W (Levene)	Estadístico de Levene para homocedasticidad
α	Factor de selectividad
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación

Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los niveles de histamina en muestras de pescado no procesado comercializado en la región de Panamá Centro mediante la técnica de HPLC-FLD. Se analizaron 74 muestras pertenecientes a las especies atún aleta amarilla, sierra y dorado, recolectadas en 27 supermercados clasificados por estrato socioeconómico. La validación del método confirmó un desempeño analítico robusto conforme con los criterios de la guía EURACHEM (2023), linealidad ($R^2 \geq 0.9999$), precisión ($CV \leq 2.5 \%$), veracidad (90.3-98.5 %) y límites de detección y cuantificación de 0.30 y 0.91 mg/kg, respectivamente. Los resultados evidenciaron un incumplimiento de la normativa nacional según la especie analizada. En el caso del atún, de las 27 muestras evaluadas, 15 superaron el límite máximo permitido, lo que representa el 56 % de las muestras, con concentraciones promedio de 289 mg/kg. A diferencia de las especies dorado y sierra, donde se encontraron valores promedio inferiores al límite normativo, con valores de 110 mg/kg y 57.7 mg/kg respectivamente. Estos hallazgos demuestran que la acumulación de histamina depende de la especie y de las condiciones de almacenamiento durante su comercialización, también destaca la necesidad de fortalecer el control sanitario para garantizar la inocuidad de los productos pesqueros en Panamá.

Summary

This study aimed to evaluate histamine levels in unprocessed fish samples marketed in the Panama Centro region using the HPLC-FLD technique. A total of 74 samples of yellowfin tuna, Sierra and Mahi-Mahi were collected from 27 supermarkets classified by socioeconomic stratum. Method validation demonstrated robust analytical performance according to EURACHEM (2023) guidelines, showing excellent linearity ($R^2 \geq 0.9999$), precision ($CV \leq 2.5 \%$), accuracy (90.3–98.5 %), and detection and quantification limits of 0.30 and 0.91 mg/kg, respectively. The results revealed non-compliance with national regulations according to the species analyzed. For yellowfin tuna, 15 out of 27 samples (56 %) exceeded the maximum permitted limit, with an average concentration of 289 mg/kg. In contrast, Mahi-Mahi and sierra samples showed average values below the regulatory limit, with concentrations of 110 mg/kg and 57 mg/kg, respectively. These findings demonstrate that histamine accumulation is primarily influenced by fish species and storage conditions during commercialization. The study highlights the need to strengthen sanitary control measures to ensure the safety of fishery products in Panama.

Introducción

La seguridad alimentaria constituye una preocupación creciente a nivel global, particularmente en lo referente a la presencia de compuestos tóxicos derivados del metabolismo microbiano en alimentos perecederos. Entre estos, la histamina, una amina biógena formada por la descarboxilación del aminoácido histidina, ha sido ampliamente documentada por su potencial efecto adverso en la salud humana, especialmente en productos de origen marino como el pescado fresco y no procesado (FAO, 2024; U.S. Department of Health and Human Services (FDA), 2024).

El consumo de alimentos con altos niveles de histamina puede provocar intoxicaciones alimentarias conocidas como escombroidosis, los signos y síntomas suelen presentarse en las 2 horas siguientes a la ingestión de un pescado y duran entre 12 y 48 horas. Esta intoxicación es caracterizada por síntomas como enrojecimiento de la piel, cefalea, náuseas y en casos severos dificultades respiratorias y complicaciones cardiovasculares en personas sensibles (Traylor J, 2023).

Dada la resistencia de la histamina al calor, los métodos de cocción convencionales no eliminan su presencia, lo que sugiere la importancia de su detección y control en productos pesqueros. Organismos internacionales como la Comisión del Codex Alimentarius y la Unión Europea han establecido límites máximos permitidos de histamina en pescado fresco, generalmente entre 100 y 200 mg/kg, para garantizar la seguridad alimentaria (De Beer et al., 2021).

En Panamá, el pescado constituye una parte esencial de la dieta, lo que resalta la necesidad de implementar métodos analíticos confiables para la detección de histamina. Entre las técnicas disponibles, la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) se destaca por su sensibilidad, especificidad y aplicabilidad para este tipo de compuestos.

La validación de métodos analíticos es fundamental para asegurar la confiabilidad de los resultados. Guías internacionales como las emitidas por EURACHEM y la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) han establecido directrices que deben evaluarse para los métodos analíticos que incluyen parámetros como linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación, entre otros (Cantwell, 2025).

En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo implementar y validar un método analítico para la determinación de histamina en pescado fresco y pescado no procesado basado en HPLC-FLD, siguiendo las directrices internacionales mencionadas. La implementación de este método contribuirá al fortalecimiento de los sistemas de control de calidad en la industria pesquera panameña y a la protección de la salud pública.

CAPÍTULO I
MARCO CONCEPTUAL

1. Antecedentes del estudio.

1.1. Aspectos generales.

1.1.1. Planteamiento del problema.

El consumo de pescado es altamente recomendado debido a sus beneficios para la salud ya que puede proporcionar nutrientes de alta calidad como son un alto contenido de proteínas y aminoácidos esenciales, vitaminas (especialmente B y D) y minerales como el calcio, el zinc, el hierro, el yodo, el magnesio, el potasio, el fósforo y el selenio. Especies como la sardina, la caballa, el salmón y el atún son fuentes adecuadas de ácidos grasos omega 3 (FAO, 2024).

El pescado también puede ser fuente de diversos contaminantes que constituyen importantes amenazas para la salud pública, uno de ellos es la histamina, que también es un indicador de la frescura y de la inocuidad del pescado para el consumo (Madejska et al., 2022).

El pescado es uno de los alimentos de origen animal más perecederos que existe, por lo que debemos de cuidar que el producto llegue en condiciones aptas para el consumo de la población, las actividades enmarcadas para el procesamiento y manipulación del pescado desde su captura hasta su comercialización deben estar dirigidas a mantener la calidad y la inocuidad del producto. (Balbuena Edgar Daniel, 2014). Las condiciones inadecuadas durante el almacenamiento, el transporte y el procesamiento del pescado después de su colecta son las causas más comunes de producción de histamina.

El consumo de grandes cantidades de histamina provoca una intoxicación denominada escombroidosis, relacionada principalmente con peces de la familia *Scombridae*. La histamina es tóxica para los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso. Esta amina causa vasodilatación, lo que provoca hipotensión, enrojecimiento de la piel, cefalea y anafilaxia. La histamina también puede causar contracciones del músculo liso del tracto gastrointestinal, lo que provoca dolor abdominal, diarrea y vómitos (Shulpekova et al., 2021).

En el contexto nacional no se cuenta con datos sobre los niveles de histamina presente en el pescado comercializado en los diferentes puntos de venta o distribución, por lo que

tampoco se ha evaluado si estos productos cumplen con las normativas o exigencias legales vigentes.

Existen métodos analíticos efectivos para cuantificar los niveles de histamina, por lo que el control y la prevención son posibles.

Luego de realizar el planteamiento del problema, surgen las siguientes interrogantes:

- ¿Son aceptables los niveles de histaminas presentes en el pescado no procesado comercializado en la región de Panamá centro?
- ¿Los niveles de histamina presentes en el pescado no procesado cumplen con las normativas nacionales e internacionales?
- ¿Es necesario establecer un plan de monitoreo continuo?

1.1.2. Justificación del estudio.

En Panamá, el consumo per cápita de pescado es relativamente alto, superior al promedio mundial. Se estima que un panameño consume alrededor de 20.5 kilos de pescado al año, siendo superado solo por la ingesta de pollo (FAO, 2019).

A nivel nacional se cuenta con pocos estudios relacionados con la histamina en los diversos productos pesqueros susceptibles a esta por lo que se considera un factor que pone en riesgo la salud de los consumidores (Bartuano et al., 2018).

Es por esta razón que el departamento de Química de Alimentos y Aguas del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud por medio de este estudio se propone validar e implementar una metodología analítica que permita determinar de manera confiable el contenido de histamina presentes en los pescados de la familia de escómbridos por ser los que están asociados a la intoxicación por histamina y son de consumo rutinario por la población.

Los resultados obtenidos por medio de este estudio buscan establecer si las concentraciones de histamina presentes en el pescado no procesado consumido por la población superan los niveles establecidos en el reglamento nacional COPANIT o en el Codex Alimentarius. Niveles de histamina presente en el pescado no procesado por encima de lo establecidos en el reglamento justificaría la necesidad de desarrollar controles de calidad e implementar medidas correctivas en la cadena de distribución,

almacenamiento y comercialización por parte de los distribuidores para garantizar la calidad e inocuidad del producto de consumo local.

Teniendo en cuenta que el Ministerio de Salud en su rol de vigilancia sanitaria para la población se apoya en los resultados generados por el Departamento de Química de Alimentos y Aguas, los datos obtenidos en este estudio permitirán a las autoridades sanitarias tomar decisiones que le permitan prevenir intoxicaciones y aplicar medidas correctivas.

1.1.3. Hipótesis de trabajo.

H₀: Las concentraciones de histamina presentes en el pescado no procesado comercializado en la región de Panamá centro no superan los límites máximos (200 mg/kg) establecidos por la normativa nacional vigente.

H₁: Las concentraciones de histamina presentes en el pescado no procesado comercializado en la región de Panamá centro superan los límites máximos (200 mg/kg) establecidos por la normativa nacional vigente.

1.1.4. Objetivos del estudio.

1.1.4.1. Objetivo General:

Evaluar las concentraciones de histamina en muestras de pescado no procesado comercializado en la región de Panamá Centro mediante la técnica de HPLC-FLD para determinar su cumplimiento con la normativa vigente.

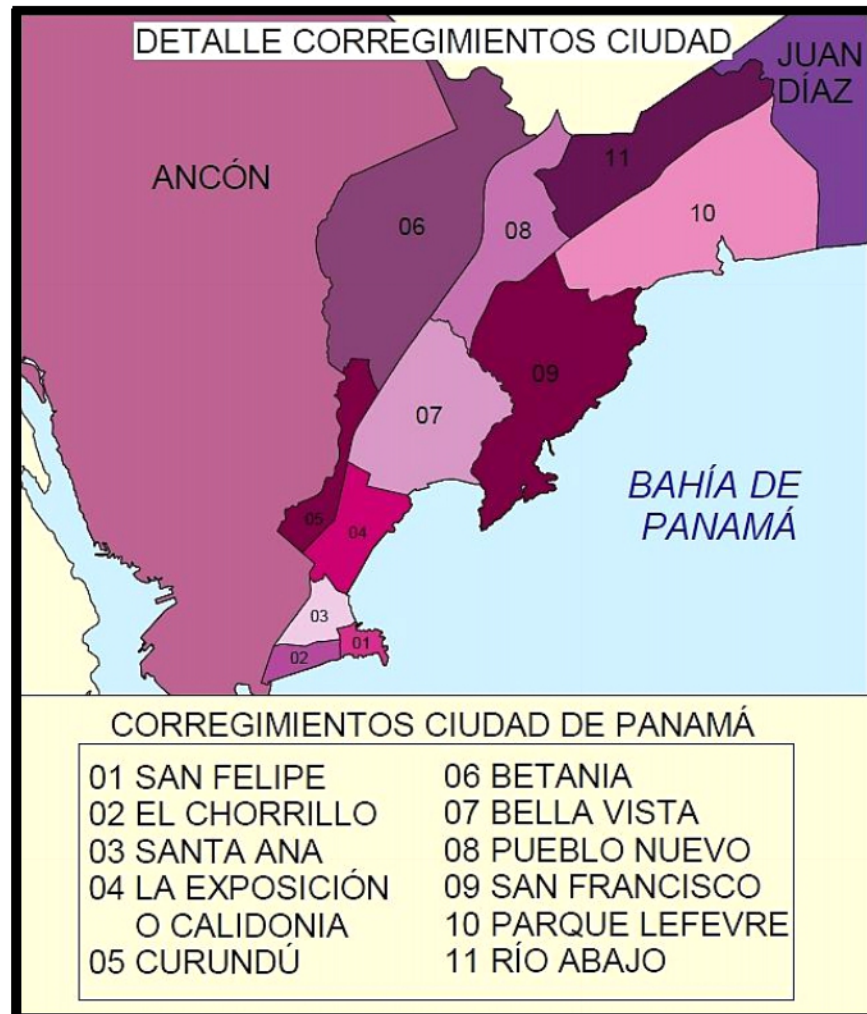
1.1.4.2. Objetivos Específicos:

- ✓ Validar e implementar una metodología analítica para la determinación de histamina en pescado no procesado mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de fluorescencia (HPLC-FLD).
- ✓ Obtener muestras representativas de pescado no procesado a partir de los diferentes puntos de distribución comercial en supermercados de la región de Panamá Centro.
- ✓ Evaluar el cumplimiento de los niveles máximos de histamina en pescado no procesado comercializado en la región de Panamá Centro, de acuerdo con lo establecido en la norma técnica DGNTI-COPANIT 351-98 y el CODEX STAN 36-1981.

1.2. Cobertura del estudio.

Este estudio se llevó a cabo en la región de Panamá centro del distrito de Panamá, la cual está conformado por los corregimientos de: San Felipe, El Chorrillo, Santa Ana, La Exposición o Calidonia, Curundú, Betania, Bella Vista, Pueblo Nuevo, San Francisco, Parque Lefevre y Río Abajo, según la división político-administrativa de la República de Panamá.

Figura 1. División político-administrativa de la República de Panamá, Provincia de Panamá distrito de Panamá, por corregimiento año: 2010. Región de Panamá Centro.



*Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Censo de Panamá (INEC), 2012.

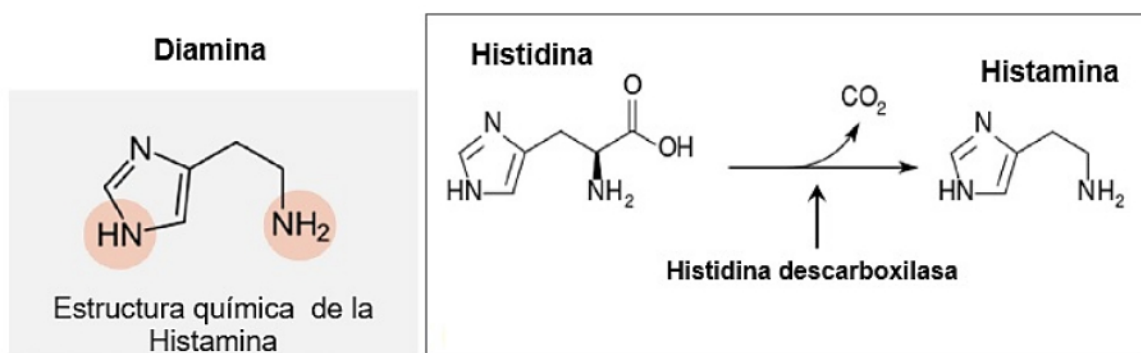
CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO-REFERENCIAL

2. Descripción general de la histamina.

2.1. Definición.

La histamina pertenece al grupo de las aminas biógenas, las cuales son compuestos nitrogenados de pequeño tamaño con actividad biológica que se forman por la descarboxilación enzimática de ciertos aminoácidos. Es una diamina sintetizada a partir del aminoácido histidina mediante una reacción catalizada por la enzima histidina descarboxilasa (HDC), que elimina el grupo carboxilo de la histidina (Figura 2) (Huang et al., 2018).

Figura 2. Estructura química de la histamina y mecanismo de síntesis.



*Fuente: Molecular Regulation of Histamine Synthesis, Huang H et al., 2018.

2.2. Microorganismos implicados en la producción de histamina.

Las aminas biógenas se encuentran presentes en todos los seres vivos, en los que participan en procesos biológicos de gran importancia. No obstante, debido al metabolismo de algunos microorganismos, estos compuestos se pueden acumular en alimentos en concentraciones elevadas, constituyendo un riesgo para la salud de los consumidores (Río et al., 2020).

La formación no deseada de histamina por microorganismos presentes en los alimentos depende de la disponibilidad del aminoácido libre histidina, la presencia de microorganismos con actividad descarboxilasa y condiciones favorables para la descarboxilación de aminoácidos. Se ha descrito que numerosas bacterias y algunas

levaduras expresan actividad histidina descarboxilasa, lo que les permite formar histamina, entre las bacterias se encuentran varias especies de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas* y *Salmonella* (Prasad Rai Krishna et al., 2013).

En la literatura científica se reportan las siguientes especies como las más propensas a producir histamina: *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium fosforeum*, *Raoultella planticola* y *Hafnia alvei* (FAO/WHO, 2013).

Los tipos de bacterias que están asociados con la formación de histamina existen de forma natural en las branquias, en superficies externas, y en el intestino de peces de agua salada, sin causar daño a los peces. Al morir, los mecanismos de defensa del pescado dejan de inhibir el crecimiento bacteriano en el tejido muscular y las bacterias formadoras de histamina pueden comenzar a crecer, lo que ocasiona la producción de histamina. La evisceración y la extracción de las branquias pueden reducir, aunque no eliminar la cantidad de bacterias formadoras de histamina. Empacar la cavidad visceral con hielo puede ayudar a enfriar pescados grandes en los que las temperaturas musculares internas no se pueden reducir fácilmente. Sin embargo, cuando se realizan incorrectamente estos pasos pueden acelerar el proceso de desarrollo de histamina en las partes comestibles del pescado al propagar las bacterias desde la cavidad visceral a la carne del pescado (U.S. Department of Health and Human Services (FDA)), 2021).

2.3. Factores que influyen en la acumulación y formación de la histamina.

El nivel de histamina en el pescado y los productos pesqueros depende principalmente de la especie de pescado y del control del tiempo y la temperatura, por esta razón el factor más importante que el productor debe controlar durante los procesos de manipulación del pescado es el mantenimiento de la cadena de frío y dicha condición debe iniciarse con la muerte del animal hasta la culminación del proceso de mercadeo (procesamiento, conservación y exposición del producto para la venta) (Balbuena Edgar Daniel, 2014).

El proceso de formación de histamina incluye tres condiciones fundamentales:

- Presencia de histidina libre en el tejido del pescado.
- Presencia de microorganismos con actividad histidina descarboxilasa.
- Condiciones ambientales favorables para la proliferación bacteriana.

Las bacterias productoras de histamina son capaces de crecer y producir histamina en un amplio rango de temperaturas. Sin embargo, el crecimiento de esta amina es más rápido a temperaturas altas ($> 21.1^{\circ}\text{C}$ o más) que a temperaturas moderadas ($> 7.2^{\circ}\text{C}$) (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019).

Por lo tanto, la acumulación de histamina en productos pesqueros constituye un indicador clave de deterioro microbiológico y es reflejo de prácticas inadecuadas de manipulación y almacenamiento post captura.

2.4. Daños sobre la salud humana.

Con la recomendación de aumentar el consumo de pescado debido a sus beneficios para la salud, es probable que la intoxicación por histamina desempeñe un papel más importante en la salud y seguridad pública y también un problema comercial. Se han informado varios brotes de la enfermedad en muchos países, y es una de las formas más prevalentes de enfermedades transmitidas por pescados y mariscos en todo el mundo. Muchos incidentes no se informan debido a la levedad de la enfermedad, la falta de informes obligatorios y el diagnóstico erróneo. Los síntomas pueden confundirse con la salmonelosis y la alergia alimentaria, este tipo de intoxicación es responsable del 40% de las intoxicaciones por consumo de pescado (Evangelista et al., 2016).

Debe recalcar que, 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 (Arciniega, 2016).

Algunos de los síntomas descritos para la intoxicación por escombrotóxina incluyen hormigueo o ardor en la boca o la garganta o alrededor de ella; sarpullido o urticaria en la parte superior del cuerpo; caída de la presión arterial; dolor de cabeza; mareo; picazón de la piel; náuseas; vómitos; diarrea; construcción del paso del aire similar a la del asma;

palpitación del corazón y dificultad respiratoria. Los síntomas suelen aparecer entre unos minutos y unas pocas horas después del consumo y duran entre 12 horas y unos pocos días (U.S. Department of Health and Human Services (HHS) et al., 2011).

Algunos estudios epidemiológicos toman como guía la siguiente escala (Tabla 1) para determinar la toxicidad del pescado según su concentración de histamina:

Tabla 1. Toxicidad según su concentración de histamina.

Concentración	Observación
<5 mg/100g	Consumo seguro
5-20 mg/100g	Posiblemente tóxico
20-100 mg/100g	Probablemente tóxico
>100 mg/100g	Tóxico

*Fuente: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, como se cita en Bartuano et al., 2018.

2.5. Normativa existente y límites máximos permitidos de histamina en peces.

El control de la histamina en los productos pesqueros es crucial para garantizar la seguridad alimentaria y proteger la salud de los consumidores. A nivel mundial, existen diversas normativas y estándares que establecen los límites máximos de histamina en pescado para prevenir intoxicaciones, particularmente por escombroidosis (De Beer et al., 2021).

2.5.1. Normativas nacionales.

En Panamá la norma nacional COPANIT 351-98R de 1998, indica que el pescado destinado al consumo humano deberá estar exento de toxinas tales como histamina. En gaceta oficial digital No 26307 del 2009, se establece que los niveles máximos de histamina se aplicarán únicamente a los pescados de las familias de los Escómbridos, Clupeidos y Mahi-mahi. El valor medio deberá ser inferior a 100 mg/kg (100 ppm), con muestras individuales permitidas entre 100 y 200 ppm, y ninguna muestra por encima de 200 ppm, según el plan de muestreo. También indica que las pruebas se llevarán a cabo con métodos fiables, como el método de cromatografía de alta resolución en fase líquida (HPLC) (Ministerio de Comercio e Industrias (MICI), 2009).

2.5.2. Normativas internacionales.

El Codex Alimentarius, desarrollado por la FAO y la OMS, establece las directrices internacionales para la seguridad alimentaria. En su "Código de Prácticas para la Higiene de los Productos Pesqueros" (Codex Stan 36-1981), se recomienda que el contenido de histamina en los pescados no debe superar los 200 mg/kg (ppm) para evitar riesgos de intoxicación. Este límite está basado en estudios científicos que han demostrado que concentraciones superiores a este valor pueden causar efectos adversos en la salud humana (FAO y OMS, 2022).

2.5.3. Normativas regionales.

La Administración de Alimentos y Medicamentos fijó el nivel de seguridad de la histamina en 50 mg/kg (50 ppm) para garantizar la seguridad de los productos, pero recientemente actualizó los niveles de orientación para la presencia de histamina reduciendo de 50 ppm a 35 ppm. Si las muestras tienen 35 ppm o más de histamina se puede considerar que el pescado es inadecuado para el consumo humano, ya que la histamina a ese nivel indica una descomposición significativa y una manipulación inadecuada del pescado. Además, la adopción de un nivel de histamina de 200 ppm basándose en la posibilidad de enfermedad humana a ese nivel o por encima (U.S. Department of Health and Human Services (FDA), 2024).

La Unión Europea (UE/CE, 2005) en el Reglamento (CE) No 2073/2005 establece límites similares a los del Codex Alimentarius para los productos de pescado destinados al consumo humano, el contenido medio de histamina en productos pesqueros procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina no debe superar los 100 mg/kg y ninguna muestra puede contener más de 200 mg/kg (Unión Europea, 2005).

2.6. Técnicas analíticas empleada para la determinación de histamina

Existen diversos métodos de prueba para la determinación de los niveles de histamina en peces, como son el método fluorométrico AOAC 977.13 de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) el cual es ampliamente aceptado; el método espectrofluorímetro; el método de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); la prueba enzimática colorimétrica; y los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permiten medir múltiples aminas biógenas de manera simultánea.

Si bien cada método tiene sus ventajas y desventajas, y varían en términos de costo, experiencia del operador, tiempo para obtener un resultado, portabilidad, etc. (véase la Tabla 2). No obstante, la mayoría de los métodos ofrecen una buena concordancia y permiten medir de forma fiable la histamina en mariscos a los niveles de interés. Las normas del Codex proponen el uso del método fluorométrico (AOAC 977.13) u otros métodos validados científicamente equivalentes (FAO/WHO, 2013).

En este estudio utilizaremos el método de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a fluorescencia (HPLC-FLD), desarrollado y validado por los investigadores Ayoub Kounnoun y Mohamed El Maadoudi en su estudio “Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Histamine in Fish Samples Using Fluorescence Detection with Pre-column Derivatization”, *Chromatographia*, 83(7), 893–901. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03909-9> (Kounnoun et al., 2020).

Tabla 2. Comparación de los métodos de prueba más utilizados para la determinación de los niveles de histamina.

	Método AOAC 977.13	Método HPLC	Espectrofluorímetro	ELISA	Método colorimétrico
Tiempo necesario para una prueba.	1 - 2 horas	1 - 2 horas	1 hora	1 hora	1 hora
Equipo.	Fluorómetro	HPLC	Espectrofluorómetro	Espectrofluorómetro	Espectrofluorómetro
Límite de cuantificación.	1 - 5 mg/kg	1.5 - 5 mg/kg	1.5 µg/kg	2 - 5 mg/kg	20 mg/kg
Rango.	1 - 150 mg/kg	5 - 2500 mg/kg	1.5 µg/kg - 100 mg/kg	0 - 500 mg/kg	0.8 - 300 mg/kg
Ventajas generales.	Robusto, repetible, exacto, preciso.	Cuantificación de todas las aminas biógenas, exactitud, precisión.	Precisión, exactitud, buena recuperación, no es costoso.	Fácil (kit), rápido, bajo coste del equipo y posibilidad de realizar múltiples pruebas simultáneamente.	Fácil (kit), rápido, bajo costo del equipo y posibilidad de realizar múltiples pruebas simultáneamente. Calibración sencilla y posibilidad de evaluación semicuantitativa mediante colorimetría visual.

*Fuente: Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS), 2012.

La determinación de histamina en alimentos, especialmente en pescado y productos pesqueros, es esencial para garantizar la seguridad alimentaria y el cumplimiento de la normativa vigente, la disponibilidad de métodos de análisis no parece limitar la detección de histamina en el pescado.

2.6.1. Parámetros para validación de la metodología.

La validación de un método analítico es un proceso fundamental que permite demostrar que un procedimiento es adecuado para su propósito previsto. En este estudio, se adoptarán los criterios establecidos por la guía EURACHEM titulada “La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados”, que proporciona un marco para la validación de métodos en laboratorios analíticos.

Parámetros de validación:

- **Selectividad:** Es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016).
- **Linealidad:** Habilidad del método para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango determinado.
- **Límite de detección (LOD):** La concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016).
- **Límite de cuantificación (LOQ):** Es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016).
- **Precisión:** Grado de concordancia entre resultados independientes, obtenidos bajo condiciones similares (Skoog et al., 2015). Incluye:

- Repetibilidad: Precisión bajo las mismas condiciones operativas en un corto intervalo de tiempo.
- Precisión intermedia: Evaluación en diferentes días, por distintos analistas o equipos, pero en el mismo laboratorio.
- Sensibilidad analítica: es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (por ejemplo, una concentración de analito), es decir, el gradiente de la curva de respuesta (Cantwell, 2025).
- Exactitud o veracidad: Cercanía entre el valor obtenido y el valor real o de referencia (Skoog et al., 2015), evaluada generalmente mediante el % de recuperación en muestras fortificadas.
- Robustez: Es una medida de la capacidad de un método para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016).
- Incertidumbre de medida: La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo (Cantwell, 2025).

Adoptando estos parámetros de validación se garantiza que el método utilizado en este estudio (HPLC-FLD), cumple con los requisitos de calidad analítica para la cuantificación de histamina en productos pesqueros.

CAPÍTULO III
MARCO METODOLÓGICO

3. Metodología.

3.1. Tipo y diseño de estudio.

Corresponde a un estudio cuantitativo y descriptivo, utilizando como unidad de medida de análisis mg/kg.

El diseño experimental incluye la optimización y validación de un método cromatográfico (HPLC-FLD) para la cuantificación de histamina, seguido del análisis de muestras recolectadas en puntos estratégicos. El estudio permite obtener datos analíticos confiables con el propósito de evaluar el cumplimiento de los límites máximos permitidos según normativas nacionales e internacionales y de esta manera identificar tendencias que puedan representar riesgos para la salud de los consumidores.

3.1.1. Universo.

El universo de estudio está constituido por pescado no procesado perteneciente a las familias Scombridae y Coryphaenidae que se comercializan en la región de Panamá centro.

Estos productos corresponden a especies consumidas por la población y que se encuentran en el listado de la FDA de especies susceptibles a la formación de histamina y que están reguladas por las normativas alimentarias nacionales e internacionales.

Para el término pescado no procesado se utilizará la definición de la PAHO de alimentos naturales o no procesados, donde se indica que pueden ser de origen vegetal o de origen animal (pescados, mariscos, carnes de bovino, aves de corral, entre otros). Una condición necesaria para ser considerados como no procesados es que estos alimentos no contengan otras sustancias añadidas como son: azúcar, sal, grasas, edulcorantes o aditivos (Organización Panamericana de la Salud (PAHO), 2017).

3.1.2. Descripción de las variables.

A continuación, se presentan las variables principales (Tabla 3) que serán consideradas en este estudio:

Variable dependiente:

- Concentración de histamina (mg/kg en muestras de pescado no procesado).
- Cumplimiento de la norma (Comparación con límite normativo).

Variables independientes:

- Especie de pescado (Thunnus albacares, Scomberomorus sierra, Coryphaena hippurus).
- Área de localización (Corregimiento).
- Establecimiento de procedencia (Supermercado).
- Temperatura de conservación (Refrigerado o congelado).

Variables controladas:

- Técnica de muestreo.
- Método analítico estandarizado.
- Manipulación y transporte de las muestras bajo condiciones controladas.

Estas variables permitirán evaluar la presencia de histamina en función de las condiciones de venta y tipo de pescado, aportando datos relevantes sobre su seguridad alimentaria.

3.1.3. Operacionalización de variables.

Tabla 3. Operacionalización de las variables consideradas en el estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Unidad de medida	Instrumento de medición
Concentración de histamina.	Cantidad de histamina presente en pescado no procesado.	Valor numérico de histamina determinado en muestras de pescado.	Dependiente (principal)	mg/kg	HPLC-FLD
Cumplimiento de la norma.	Clasificación que indica si la concentración está dentro del límite regulatorio permitido.	Cumple si ≤ 100 mg/kg (según norma Codex y COPANIT); No cumple si > 100 mg/kg.	Dependiente (derivada)	Categórica (Sí / No)	Comparación con límite normativo
Especie de pescado.	Clasificación taxonómica de los peces según su especie.	Thunnus albacares, Scomberomorus sierra, Coryphaena hippurus.	Independiente	Categórica nominal	Registro según etiquetado
Área de localización.	Área de localización del punto de venta.	Corregimiento dentro de Panamá centro.	Independiente	Categórica nominal	Registro de ubicación
Establecimiento de procedencia.	Lugar o tipo de punto de venta donde se obtiene la muestra.	Supermercado	Independiente	Categórica nominal	Registro de ubicación
Temperatura de conservación.	Rango de temperatura al que se mantiene el pescado al momento de la compra.	Medición puntual de temperatura del pescado en el área de almacenamiento.	Independiente	°C	Termómetro infrarrojo digital

*Fuente: Elaborado por los autores (mayo, 2025).

3.2. Área de estudio y muestra.

3.2.1. Lugar de estudio.

El Lugar de estudio son los supermercados ubicados en la región de Panamá Centro del distrito de Panamá, a continuación, se presenta un listado de los supermercados ubicados en el área de estudio y las cantidades de establecimientos presentes (Tabla 4).

Tabla 4. Cadenas de supermercados ubicados en el área de estudio.

#	Nombre del establecimiento	Cantidad de establecimientos
1	Supermercado El Rey	6
2	Súper Xtra	5
3	El Machetazo	3
4	Súper 99	8
5	Riba Smith	3
6	Casa de la Carne	2
Total =		27

*Fuente: Autoridad de protección al Consumidor y Defensa de la Competencia (ACODECO), 2022.

La lista de cadenas de supermercados fue extraída del informe elaborado por la Autoridad de protección al Consumidor y Defensa de la Competencia (ACODECO), titulado: “Costos más bajos de la canasta básica familiar de alimentos (CBFA) en los distritos de Panamá y San Miguelito: enero de 2022” (Autoridad de protección al Consumidor y Defensa de la Competencia (ACODECO), 2022).

Figura 3. Mapa de la distribución de los supermercados ubicados en el distrito de Panamá, la región de Panamá Centro.



*Fuente: Elaborado por los autores (Julio, 2023).

3.2.2. Selección de muestra.

La muestra es el pescado fresco o no procesado perteneciente a las familias *Scombridae* y *Coryphaenidae* que se comercializan en la región de Panamá centro.

Criterios de inclusión: Únicamente muestras de pescado fresco y pescado no procesado de las especies: atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), Sierra (*Scomberomorus sierra*) y Dorado o Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) que pertenecen la familia *Scombridae* y *Coryphaenidae* y estos deben ser de producción local.

Criterios de exclusión: Pescado procesado, así como pescado fresco y pescado no procesado que no corresponda a las especies atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), Sierra (*Scomberomorus sierra*) y Dorado o Mahi-Mahi (*Coryphaena hippurus*) o que provenga de importación.

Para este estudio se utilizaron las siguientes definiciones:

- Pescado fresco: pescado recién capturado que no ha sido objeto de ningún tratamiento de conservación o que ha sido conservado solamente con enfriamiento (Ministerio de Comercio e Industrias (MICI), 1998).
- Alimentos naturales o productos no procesados: son de origen vegetal o de origen animal, para ser considerados como no procesados estos alimentos no deben contener sustancias añadidas como son: azúcar, sal, grasas, edulcorantes o aditivos (Organización Panamericana de la Salud (PAHO), 2017).
- Productos procesados: definido como aquellos productos alterados por la adición o introducción de sustancias (sal, azúcar, aceite, preservantes y/o aditivos) que cambian la naturaleza de los alimentos originales, con el fin de prolongar su duración, hacerlos más agradables o atractivos (Organización Panamericana de la Salud (PAHO), 2017).

3.2.3. Tamaño de muestra.

Se utilizó un muestreo probabilístico, Para el calcular de tamaño de muestra se utilizó la siguiente ecuación (Skoog et al., 2015):

$$N = \frac{t^2 s_s^2}{\bar{X}^2 \sigma_r^2}$$

Donde:

- N = tamaño de muestra requerido.
- t = valor de t de Student para un nivel de confianza del 95%.
- s_s = desviación estándar del muestreo.
- $\bar{X}$ = valor promedio de las concentraciones de histamina.
- σ_r = desviación estándar relativa.

Para calcular N para una población infinita con un nivel de confianza del 95 %, t de Student tiene un valor de 1.96, para el valor de la desviación estándar relativa (σ_r) se utilizó el valor de 2 % de acuerdo con lo recomendado como criterio de aceptación.

El valor de desviación estándar del muestreo (s_s) y el valor promedio ($\bar{X}$), es conocida a partir de determinaciones previas realizadas en el laboratorio de química de alimentos y aguas donde el valor medio fue $\bar{X} = 9.92$ mg/kg y la desviación estándar del muestreo calculada fue $s_s = 0.84$.

Con estos datos se obtiene un $N \approx 68.86$, se recomienda una N de muestras de 69 unidades para cumplir con el nivel de confianza del 95% y la precisión relativa del 2%. Sin embargo, para fortalecer la representatividad y robustez estadística del estudio, se decidió trabajar con un tamaño de muestra ajustado de 74 unidades. Este valor fue distribuido proporcionalmente entre los supermercados seleccionados en la región de Panamá Centro, atendiendo a la densidad de establecimientos por estrato socioeconómico.

3.2.4. Distribución proporcional de la muestra.

La población total de supermercados se dividió por estratos según el nivel socioeconómico dentro del área de estudio, se clasificaron como estrato alto y estrato bajo.

La clasificación en estratos alto y bajo se realizó con base en el tipo de supermercado y su ubicación geográfica en corregimientos con características socioeconómicas diferenciadas, según información disponible de Autoridad de Protección al Consumidor y Defensa de la Competencia (ACODECO) y estudios nacionales sobre ingreso y nivel de vida como son los estudios del Banco Mundial (Panamá: Diagnóstico del nivel de vida y desigualdad, 2018) y CEPAL (Panorama Social de América Latina, 2020).

Posteriormente, se asignó el tamaño de muestra de forma proporcional al número de supermercados presentes en cada estrato, utilizando la fórmula de pesos relativos (Llorente & Rivero, 2017):

$$Wh = \frac{Nh}{N}$$

Donde:

- Wh : Representa el peso del estrato.
- Nh : El número de supermercados en el estrato.
- N : El total de supermercados en el área de estudio.

Tabla 5. Metodología del cálculo para el número de muestra por estrato.

Estrato	Tamaño (Supermercado por estrato)	Wh = Proporción (Tamaño de estrato/Total de supermercados)	Tamaño de muestra asignado (Proporción ×Tamaño de la muestra)
Bajo	6	0.22	16
Alto	21	0.78	58
Total	27	1.00	74

*Fuente: Elaborado por los autores (diciembre, 2023).

Esta ponderación permitió asignar proporcionalmente el tamaño de muestra a cada estrato, garantizando una representación adecuada de las unidades de muestreo según la distribución real de supermercados en la región de estudio.

Con base en esta distribución para N = 74 unidades corresponden 58 al estrato alto y 16 al estrato bajo. Se realizó un listado de los establecimientos por corregimiento y se clasificó según su estrato (bajo o alto).

Tabla 6. Listado de los establecimientos por corregimiento y estrato socioeconómico.

#	Nombre del establecimiento	Corregimiento	Área socioeconómica
1	El Rey (Casco viejo)	San Felipe	Estrato alto
2	Super 99 (Betania)	Betania	
3	Super 99 (Transístmica)		
4	Super 99 (Los ángeles)		
5	El Rey (Vía España)	Bella Vista	
6	El Rey (Bella vista)		
7	Super Xtra (Transístmica)		
8	Riba Smith (Transístmica)		
9	Riba Smith (Bella vista)		
10	Casa de la Carne (El cangrejo)		
11	El Machetazo (Vía España)	Pueblo nuevo	
12	El Rey (12 de octubre)		
13	Super 99 (Fernández de Córdoba)	San Francisco	
14	El Rey (Calle 50)		
15	Super Xtra (Vía Israel)		
16	Riba Smith (Multiplaza)		
17	Casa de la Carne (Vía porras)		
18	Super 99 (Paitilla)		
19	Super 99 (San francisco)		
20	Super 99 (Vía porras)		
21	Super Xtra (El Chorrillo)	El Chorrillo	Estrato bajo
22	El Machetazo (Santa Ana)	Santa Ana	
23	Super Xtra (Calidonia)	La exposición o Calidonia	
24	El Machetazo (Calidonia)		
25	El Rey (Parque Lefevre)	Parque Lefevre	
26	Super Xtra (Río abajo)	Rio Abajo	
27	Super 99 (Rio abajo)		

*Fuente: Elaborado por los autores (diciembre 2023).

3.2.5. Muestreo y preservación de las muestras.

Para la recolección de la muestra se realizó un solo muestreo y la selección fue de manera sistemática, la distribución de muestras corresponde 58 al estrato alto y 16 al estrato bajo.

Procedimiento para el muestreo:

- Para la toma de la muestra se consideró la compra del pescado entero, en trozos o rodajas de pescado, ya que las muestras deben ser prominentes en masa muscular.
- Al momento de la recolección de la muestra se midió y anoto la temperatura del producto con el objetivo de monitorear el cumplimiento de la cadena de frío.
- Cada muestra se registró en el formulario de recolección de muestras (ver anexo 1) donde se le asignó un código único basado en el sitio de adquisición y el número secuencial de muestra en dicho sitio (ver ejemplo en la tabla 7).

Tabla 7. Criterio para la codificación de las muestras.

Código	Muestra
1S0101	Primer supermercado, primera muestra, número de corregimiento donde está ubicado (San Felipe).
2S0302	Segundo supermercado, tercera muestra, número de corregimiento donde está ubicado (Chorrillo).

*Fuente: Elaborado por los autores (diciembre, 2023).

- Se le colocó a la muestra una etiqueta con el código asignado y se transportó en una hielera (temperatura inferior a 4 °C), hasta su llegada al laboratorio.
- Una vez la muestra llegó al laboratorio se almacenó en un congelador ($T < 0\text{ °C}$) hasta su análisis.

3.3. Materiales y equipos empleados para la determinación de histamina.

3.3.1. Reactivos.

- Histamina dihidroclorada, Número CAS: 56-92-8
- Ácido fosfórico 85% grado analítico, Número CAS: 7664-38-2
- 2-mercaptoetanol, Número CAS: 60-24-2
- Tetraborato de sodio, Número CAS: 1330-43-4
- Fosfato monohidrógeno dipotásico, Número CAS: 7758-11-4
- Hidróxido de sodio, Número CAS: 1310-73-2
- Acetato de sodio, Número CAS: 127-09-3
- Ácido Clorhídrico 37%, Número CAS: 7647-01-0
- O-ftaldialdehído, Número CAS: 643-79-8
- Ácido acético, Número CAS: 64-19-7
- Acetonitrilo grado HPLC, Número CAS: 75-05-8
- Metanol grado HPLC, Número CAS: 67-56-1
- Agua ultrapura.

3.3.2. Material de vidrio e insumos.

- Matraz volumétrico de 50 y 100 mL
- Pipeta serológica de 5 y 10 mL
- Probeta de 50 mL
- Matraz Kitasato de 1 L
- Embudo de filtración para matraz Kitasato.
- Puntas de micropipetas de 10, 300, 1000 y 5000 µL.
- Micropipetas de volumen variable 30 a 300 µl, 100 a 1000 µl y 0,5 a 5 mL
- Pipetas Pasteur desechables de 3 mL
- Tubos de centrifuga de polipropileno con faldón de 50 mL
- Filtro de membrana, tamaño de poro de 0,45 µm
- Filtro de jeringa de nylon 0,45 µm
- Jeringas de 5 mL
- Viales HPLC con septa

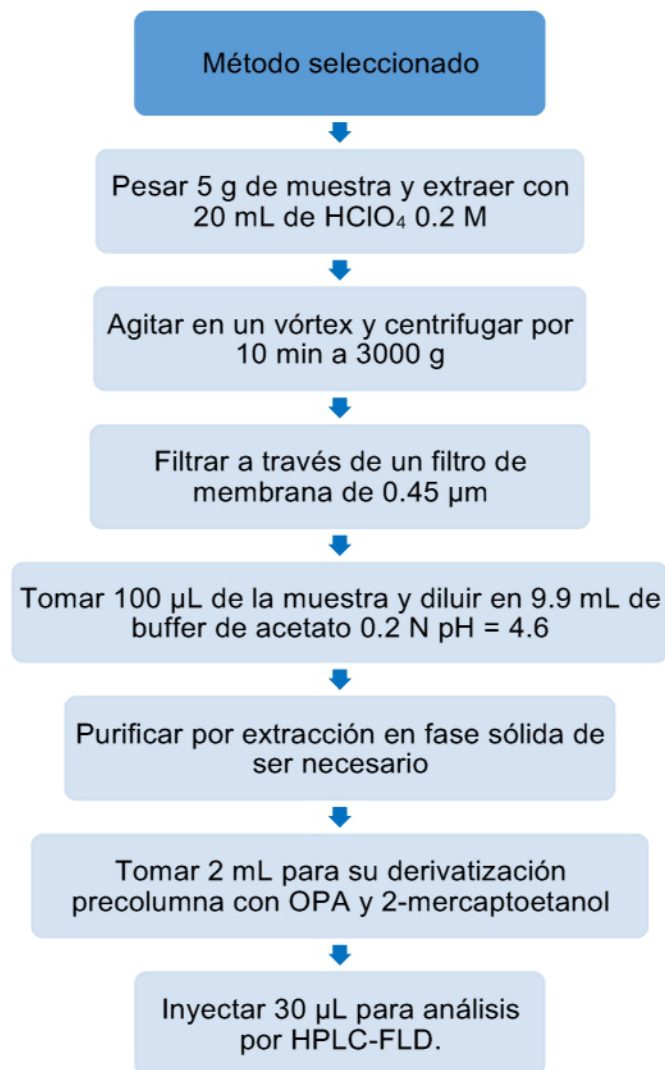
3.3.3. Equipos.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) marca VWR Hitachi Chromaster, compuesto por:
 - Módulo de bomba 5110
 - Inyector automático 5210
 - Horno de columna 5310
 - Detector de fluorescencia 5440
- Columna marca Purospher RP-18 LiChroCART (250 mm longitud, 4.6 mm diámetro y tamaño de partícula 5 μm)
- Pre Column Purospher RP-18 endcapped (4x4 mm, 5 μm).
- Balanza analítica. Marca: Metler Toledo, modelo: MtS304TS, legibilidad 0.1 mg
- Procesador de alimentos. Marca: Waring comercial, modelo: 51BL32
- Centrifuga Babcock. Marca Garver, modelo: serie 224
- Mini agitador vortex digital. Marca: Fisher Scientific, modelo: 945415
- Compresor de aire de bomba de vacío. Marca: Gast, modelo DOA-P104-AA
- Termómetro digital infrarrojo portátil sin contacto. Marca: Fisher Scientific, No. Cat: 11729785.

3.4. Selección del método.

La selección del método analítico se realizó considerando la disponibilidad de los reactivos, material volumétrico, insumos, equipos y otros recursos con los que cuenta el laboratorio de química de alimentos y aguas, se optó por un método de cromatografía líquida de alta resolución como lo sugiere los protocolos oficiales (Gaceta oficial No 26307), luego de hacer una larga revisión de la literatura científica, se seleccionó el método de HPLC-FLD que cumplía los criterios de selección el cual fue desarrollado y validado por los investigadores Ayoub Kounnoun del Laboratorio de Biología Aplicada y Patología de la Universidad Abdelmalek Essaâdi y Mohamed El Maadoudi del Laboratorio Regional de Análisis e Investigación de la Oficina Nacional de Seguridad Alimentaria en Marruecos (Kounnoun et al., 2020).

Figura 4. Método analítico seleccionado.



Fuente: Kounnoun, A., el Maadoudi, M., Cacciola, F., Mondello, L., Bougtaib, H., Alahlah, N., Amajoud, N., el Baaboua, A., & Louajri, A. (2020). Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Histamine in Fish Samples Using Fluorescence Detection with Pre-column Derivatization. *Chromatographia*, 83(7), 893–901. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03909-9>.

3.4.1. Evaluación preliminar del método analítico.

Antes de iniciar la etapa de optimización, se realizó una evaluación de la respuesta instrumental y una verificación preliminar de comportamiento del método seleccionado con el objetivo de confirmar su aplicabilidad en el laboratorio y asegurar condiciones mínimas aceptables de rendimiento. Esta verificación incluyó los siguientes parámetros fundamentales (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016):

- Parámetros cromatográficos como: tiempo de retención (T_r), Tiempo muerto (T_m), resolución (k'), número de platos (N) y selectividad del método.
- Estabilidad de la señal derivada, evaluando posibles variaciones significativas durante el tiempo de análisis.
- Linealidad de la respuesta en un rango de concentraciones relevantes.
- Límites de detección y cuantificación, estimados mediante el enfoque de relación señal/ruido.
- Precisión (repetibilidad), mediante inyecciones múltiples en niveles seleccionados.
- Sensibilidad analítica, observando la pendiente de la curva de calibración.

En esta etapa se evaluó la sensibilidad del sistema, la forma de los picos cromatográficos y la linealidad de la señal. A partir de estos resultados se definirán los parámetros que deben optimizarse.

3.5. Optimización del método.

Una vez se realiza la evaluación preliminar del método analítico se procedió a realizar la etapa de optimización del método centrada en los parámetros cromatográficos que afectan la separación, sensibilidad y precisión del análisis con la finalidad de garantizar que el método seleccionado sea adecuado para la determinación de histamina en muestras de pescado fresco.

En esta etapa se evaluó que las condiciones experimentales ofrecieran la mejor resolución del pico de histamina, tiempos de retención estables, áreas consistentes y una adecuada eficiencia de la columna. Se utilizaron criterios tales como la definición de picos, simetría, resolución y linealidad de la señal para evaluar el comportamiento inicial del método (ICH, 2005).

Los parámetros evaluados con el fin de optimizar el desempeño del sistema incluyen:

3.5.1. Reacción de derivatización.

La derivación previa a la inyección es fundamental para la detección fluorimétrica de histamina, ya que esta amina no presenta fluorescencia natural. En este método, se empleó o-ftalaldehído (OPA) como agente derivatizante, en presencia del tiol 2-mercaptoetanol, para formar un derivado fluorescente que pueda ser detectado por el sistema HPLC-FLD, esta etapa es crucial debido a la naturaleza inestable de los derivados de OPA, los cuales pueden sufrir degradación con el paso del tiempo, disminuyendo la intensidad de la señal y afectando la precisión y la exactitud del análisis (Munir & Badri, 2020).

Para garantizar que la reacción de derivatización sea eficiente y que el derivado resultante se mantenga estable durante el análisis, se optimizaron las siguientes condiciones de trabajo:

- Tiempo de reacción: El cual debe ser suficiente para completar la derivatización, pero no tan prolongado como para permitir la degradación del derivado, se recomienda un tiempo entre 1 y 3 minutos a temperatura ambiente (Munir & Badri, 2020).
- pH del medio: El pH debe favorecer la nucleofilicidad de la amina y la reactividad del derivatizante, para OPA el pH óptimo suele estar entre 9 y 10 usando un tampón borato (Munir & Badri, 2020).

Se preparó una solución estándar de histamina de concentración conocida, la cual se derivatizó bajo las condiciones controladas de pH y tiempo de reacción. Se realizaron inyecciones sucesivas del mismo derivado bajo la condición de trabajo que se quería evaluar (pH del medio o tiempo de reacción), el ensayo se realizó a temperatura ambiente como lo recomiendan otros investigadores (Munir & Badri, 2020). Se registró el área del pico correspondiente a la histamina en

cada inyección y se evaluó la respuesta en función de si hay formación de subproductos o disminución de la señal.

Esta verificación permite asegurar la estabilidad de la reacción con el agente derivatizante, asegurando la máxima respuesta sin descomposición del derivado.

3.5.2. Proporción de la fase móvil.

Se realizaron ensayos con diferentes solventes y diferentes proporciones para lograr una adecuada separación y resolución, considerando tanto la selectividad como el tiempo de análisis (ICH Q2(R1), 2005; Snyder et al., 2010).

3.5.3. Determinación del tiempo muerto (t_m).

Se utilizó un solvente no retenido para determinar el tiempo de paso del analito sin interacción con la fase estacionaria. Este valor es necesario para el cálculo del factor de retención y la eficiencia del sistema (Snyder et al., 2010).

3.5.4. Cálculo del factor de retención (k').

Se calculó a partir del tiempo de retención de la histamina y del tiempo muerto, lo que permite estimar el grado de interacción del analito con la fase estacionaria. Para el cálculo del factor de retención (k') se utilizó la siguiente fórmula (Snyder et al., 2010):

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Donde:

t_r : es el tiempo de retención del analito (histamina).

t_m : es el tiempo muerto.

3.5.5. Resolución (R_s) y número de platos teóricos (N).

Estos parámetros se utilizaron como indicadores de eficiencia del sistema ya que permiten evaluar la calidad de la separación cromatográfica y la eficiencia de la columna (Snyder et al., 2011).

Para el cálculo de la resolución se utilizó la siguiente fórmula:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2}$$

Donde:

t_{r1} : es el tiempo de retención del primer pico (tiempo muerto o interferente)

t_{r2} : es el tiempo de retención del segundo pico (histamina)

w_1 : es el ancho del primer pico a la base.

w_2 : es el ancho del segundo pico a la base.

Para este parámetro el criterio de aceptación es $R_s \geq 1.5$, para que se considere una separación adecuada (Snyder et al., 2010).

Para calcular el número de platos teóricos (N) se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

Donde:

t_r : es el tiempo de retención del analito (histamina).

w : es el ancho del pico a la base.

Para este parámetro, el criterio de aceptación es que N debe ser al menos 2000 platos teóricos para columnas nuevas y 1000 para columnas usadas, especialmente si hay un solo pico de interés (ICH Q2(R1), 2005).

3.5.6. Barrido espectral para la selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.

La selección de las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión es un paso esencial en métodos que emplean detección por fluorescencia, dado que la intensidad de la señal depende directamente del par de longitudes seleccionadas, así como de la eficiencia de la reacción de derivatización (Munir & Badri, 2020).

La determinación experimental de los valores óptimos se realizó mediante un barrido espectral de la muestra derivatizada, se preparó una solución estándar de histamina y se realizó un escaneo de excitación en el rango de 200 a 405 nm, manteniendo constante una longitud de emisión. El máximo de excitación obtenido se utilizó luego para realizar un segundo escaneo en el rango de 385 a 505 nm, pero esta vez determinando la longitud óptima de emisión. A partir de este ensayo se seleccionó las longitudes de onda óptimas de excitación y de emisión.

3.5.7. Flujo de la fase móvil.

Se ensayaron diferentes flujos para el análisis hasta identificar aquel que ofrecía una buena separación y un tiempo de análisis razonable sin comprometer la sensibilidad ni la reproducibilidad del método.

Tomando en cuenta que un flujo demasiado alto puede reducir los tiempos de retención y acortar el tiempo total de análisis, pero a costa de una disminución en la resolución y en el número de platos teóricos. Por el contrario, un flujo demasiado bajo puede mejorar la resolución, pero también prolonga innecesariamente los tiempos de análisis y puede afectar la reproducibilidad si se da la degradación de los productos de derivatización (Snyder et al., 2010).

3.5.8. Estabilidad de la señal derivada.

La estabilidad de la reacción de derivatización es un parámetro crítico en métodos de cuantificación mediante HPLC con detección por fluorescencia, en el caso de la histamina cuya derivatización es necesaria para su análisis con fluorescencia, es fundamental asegurar que el derivado formado se mantenga químicamente estable durante el tiempo de análisis para evitar pérdidas de señal o variaciones en la cuantificación (Kovacevic et al., 2006).

Para evaluar la estabilidad, se preparó una solución estándar de concentración conocida de histamina, se derivatiza y luego se inyectó en intervalos de tiempo establecidos dentro de un mismo día. Se evaluó el % de variación del área del pico del derivado de histamina donde el criterio de aceptación es una variación no mayor al 5 % respecto al valor inicial, de acuerdo con recomendaciones de guías de validación (Cantwell, 2025; ICH Q2(R1), 2005).

Esta prueba permitió confirmar la estabilidad del derivado de histamina durante el periodo de análisis, asegurando que la señal obtenida representa fielmente la concentración real del analito presente. La estabilidad del derivado es esencial no solo para garantizar la exactitud del análisis, sino también para asegurar la reproducibilidad de los resultados en condiciones rutinarias, evitando así errores sistemáticos en la cuantificación.

3.6. Validación del método.

La validación del método analítico se llevó a cabo con el objetivo de demostrar que el método implementado es apto para el propósito previsto, en este caso, la determinación de histamina en muestras de pescado fresco y no procesado. Esta validación se realizó conforme a las directrices establecidas por la guía EURACHEM (Cantwell, 2025; Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016), evaluando los parámetros de desempeño que aseguren la fiabilidad de los resultados generados.

Los parámetros verificados durante la validación del método incluyen: linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud (% recuperación), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), especificidad, robustez, sensibilidad y análisis de varianza.

A continuación, se describe la forma en que cada uno de estos parámetros fue evaluado:

3.6.1. Selectividad.

La selectividad del método cromatográfico se evaluó mediante la comparación de cromatogramas donde se pueda diferenciar la histamina de otras posibles interferencias presentes en la muestra, para evaluar la selectividad se utilizó una solución estándar compuesta por la mezcla de aminas biógenas como son: tiramina, putrescina, cadaverina e histamina ya que son las aminas mayoritarias que se encuentran en el pescado (Arulkumar et al., 2023). La evaluación se centró en verificar la ausencia de interferencias en la señal correspondiente a la histamina, único analito de interés en este estudio. Se consideró como evidencia de selectividad que ninguna otra amina se solape con el tiempo de retención ni con la señal de histamina bajo las condiciones optimizadas.

3.6.2. Linealidad.

Se evaluó la capacidad del método para proporcionar resultados proporcionales a la concentración del analito en un rango definido. Se

ensañó tanto el intervalo de trabajo del instrumento como el del método (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016). Para ello, se midió un blanco más los estándares de calibración (6 a 10) en concentraciones espaciadas en todo el rango de interés, esto permitió establecer visualmente los límites superior e inferior del intervalo de trabajo del instrumento.

Una vez establecido el intervalo de trabajo lineal del instrumento se preparó un blanco más 6 soluciones estándar de histamina a diferentes niveles de concentración, se construyeron curvas de calibración para determinar el coeficiente de correlación (r^2), cuyo criterio de aceptación fue $r^2 \geq 0.995$, esto permitió determinar el intervalo del trabajo del método. Adicionalmente la linealidad del método se evaluó revisando las estadísticas de regresión y el gráfico de residuales. También se ensayó la curva de calibración en matriz para el intervalo de trabajo del método en el rango ya seleccionado.

3.6.3. Límite de detección (LOD).

Este valor se estimó a partir de la relación señal/ruido, considerando una relación mínima de 3:1 para el LOD. Se midieron 20 repeticiones de muestras blanco o con una baja concentración del analito. Se utilizó la siguiente formula (Diego A. Ahumada et al., 2023):

$$LOD = \frac{3 \times s_{bl}}{m}$$

Donde:

s_{bl} : es la desviación estándar de la respuesta de los blancos.

m : es la pendiente de la curva de calibración.

La pendiente se obtuvo a partir de la curva de calibración construida con soluciones estándar de histamina. LOD se calculó aplicando el método propuesto por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el cual es aceptado por guías internacionales como EURACHEM.

3.6.4. Límite de cuantificación (LOQ).

Este valor se estimó a partir de la relación señal/ruido, considerando una relación mínima de 10:1 para el LOQ.

Se midieron 20 repeticiones de muestras blanco o con una baja concentración del analito. Se utilizó la siguiente formula (Diego A. Ahumada et al., 2023):

$$LOQ = \frac{10 \times s_{bl}}{m}$$

Donde:

s_{bl} : es la desviación estándar de la respuesta de los blancos.

m : es la pendiente de la curva de calibración.

La pendiente se obtuvo a partir de la curva de calibración construida con soluciones estándar de histamina. Este procedimiento permitió determinar los niveles mínimos de histamina que pueden ser cuantificados con confianza, de acuerdo con los lineamientos de la guía EURACHEM (Eurolab España & P.P. Morillas y colaboradores, 2016).

3.6.5. Precisión.

Para determinar la precisión se evaluó la repetibilidad instrumental y la repetibilidad del método por medio de múltiples inyecciones de réplicas, al menos seis para cada nivel de concentración. Para la repetibilidad instrumental se midieron unas soluciones estándares de la curva de calibración mínimo 6 repeticiones por nivel y el criterio de aceptación fue un coeficiente de variación (CV) $\leq 5\%$, el cual se considera generalmente aceptable para soluciones estándar en la mayoría de las aplicaciones.

Para la repetibilidad del método se midieron muestras blanco de matriz de pescado, enriquecidas por nivel con el analito de interés y se analizaron un mínimo de 6 repeticiones por nivel de concentración.

La precisión intermedia se evaluó considerando diferentes analistas y distintos días para los análisis (mínimo dos días entre analistas). El parámetro de aceptación para evaluar la precisión intermedia fue un coeficiente de variación (CV) $\leq 15\%$ para las muestras, conforme a las recomendaciones del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 del 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo (Unión Europea, 2021).

3.6.6. Sensibilidad analítica.

Se evaluó determinando la pendiente de la curva de calibración (respuesta por unidad de concentración), se utilizó el promedio de los valores de la pendiente de al menos 3 curvas de calibración y se calculó la desviación estándar y el % CV de la pendiente de la curva.

3.6.7. Exactitud o veracidad.

Se evaluó determinando el % de recuperación de tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), utilizando una matriz previamente analizada sin histamina y luego fortificando con cantidades conocidas del analito. Para el cálculo de % de recuperación se utilizó la siguiente ecuación (Diego A. Ahumada et al., 2023):

$$R' (\%) = \frac{C_{muestra} - C_{blanco}}{C_{agregada}} \times 100\%$$

Donde:

$C_{muestra}$: es la cantidad del analito detectada en la muestra fortificada

C_{blanco} : es la cantidad de analito que se encuentra de manera natural en la muestra

C_{agregada} : es la cantidad conocida del analito que se ha añadido a la muestra

El criterio de aceptación para el porcentaje de recuperación debe estar en el rango entre 80 y 120 %.

3.6.8. Robustez.

Se evaluó la capacidad del método para mantenerse confiable ante pequeñas variaciones deliberadas en las condiciones experimentales de análisis como son: el pH del buffer de extracción de la muestra y el tiempo de reacción y volumen de derivatizante. Se evaluó el efecto de estos cambios sobre la respuesta analítica, según el procedimiento de Youden y Steiner. Para 3 variables (A, B, C) se utilizó el diseño $2^3 = 8$ corridas, y para cada factor se marcó en mayúscula para el nivel alto (+) y en minúscula para el nivel bajo (-).

En la tabla 8, se muestra el diseño experimental de ocho corridas y cada factor que se evaluó en dos niveles (alto y bajo), el orden de ejecución fue aleatorio para evitar sesgos por deriva.

Tabla 8. Diseño de los factores seleccionados y los niveles evaluados.

Corrida	A (pH buffer de extracción)	B (Tiempo de reacción)	C (Volumen de derivatizante OPA)
1	A (+)	B (+)	C (+)
2	A (+)	B (+)	c (-)
3	A (+)	b (-)	C (+)
4	A (+)	b (-)	c (-)
5	a (-)	B (+)	C (+)
6	a (-)	B (+)	c (-)
7	a (-)	b (-)	C (+)
8	a (-)	b (-)	c (-)

*Fuente: Elaborado por los autores (mayo, 2025).

A partir de los resultados obtenidos, se calculó la diferencia de los promedios entre los experimentos en los que la variable se encontraba en el nivel alto (mayúsculas) y aquellos en los que se encontraba en el nivel bajo (minúsculas). El criterio de aceptación fue comparar la

diferencia de promedios de cada factor ($\Delta = \bar{X}_{\text{alto}} - \bar{X}_{\text{bajo}}$) con el umbral establecido, donde el umbral es dos veces la desviación estándar del estudio de precisión intermedia ($2s_T$) para el nivel de concentración ensayado. Si $|\Delta| < 2s_T$ la variable se consideraba robusta, es decir, que pequeñas variaciones en dicha condición no afectan significativamente la respuesta analítica, pero si $|\Delta| \geq 2s_T$ la variable se considera crítica o sensible a cambios.

3.6.9. Estimación de la incertidumbre de la medición

La incertidumbre de la medición es un parámetro que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser razonablemente atribuidos al mensurando (Cantwell, 2025). De acuerdo con los lineamientos de la norma ISO/IEC 17025 y las recomendaciones de la guía EURACHEM (2023), su estimación puede realizarse a partir de los datos obtenidos durante la validación del método, mediante un enfoque basado en el desempeño analítico.

En este estudio, se consideraron como posibles fuentes de incertidumbre como: la precisión del método, el sesgo asociado a la recuperación, la calibración analítica, la pureza del estándar y la preparación volumétrica de las soluciones. La estimación de la incertidumbre se realizó considerando como principales fuentes de variabilidad la precisión intermedia, el sesgo asociado a la recuperación y la calibración analítica.

Los criterios de aceptación se establecieron previamente con base en las recomendaciones de EURACHEM (2025), asegurando que el método validado sea confiable para su uso rutinario en el análisis de histamina en pescado.

3.7. Método analítico empleado para la determinación de histamina.

Para la cuantificación de histamina se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección por fluorescencia (HPLC-FLD), debido a su alta sensibilidad, selectividad y capacidad para detectar aminas biógenas después de un proceso de derivatización.

La detección de histamina se basó en su derivatización previa con ortoftalaldehído (OPA) en presencia de 2-mercaptoetanol, lo que permite la formación de productos fluorescentes que pueden ser detectados con alta sensibilidad (Kounnoun et al., 2020).

La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración construidas con soluciones estándar de histamina derivadas bajo las mismas condiciones que las muestras. Para cada corrida cromatográfica se evaluó la linealidad, sensibilidad, estabilidad de las derivatizaciones y reproducibilidad de los tiempos de retención.

3.7.1. Procesamiento y extracción de la muestra.

- Las muestras fueron descongeladas a una temperatura no mayor a 4 °C, se picaron en trozos pequeños y se homogeneizaron en un procesador de alimentos para su respectivo análisis.
- Se pesó $2.0 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ de muestra homogeneizada por duplicado en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL y se realizó la extracción con 50 mL de la solución extractora.
- El contenido del tubo se mezcló en un vórtex y luego se centrifugó durante 10 min a 3000 RPM.
- Se tomó 100 μL del sobrenadante de la muestra en un tubo de ensayo y se adicionaron 9.9 mL del buffer de acetato de sodio 0.2 M y se homogeneizó para su posterior derivación.
- Se preparó un blanco de muestra y una muestra control fortificada por duplicado.

3.7.2. Proceso de derivatización.

Para la reacción de derivatización se tomaron los valores obtenidos como óptimos para los parámetros que se optimizaron del método.

Pasos del proceso de derivatización:

- Para la derivatización se tomaron 2.0 ml de la muestra diluida en buffer de acetato de sodio y se le añadió NaOH 1M para alcalinizar la solución al pH óptimo de reacción, el tubo se mezcló en un vórtex.
- Se añadió 100 µL de solución derivatizante de OPA e inmediatamente se tomó el tiempo en el cual ocurre la reacción (tiempo determinado en la optimización), transcurrido el tiempo se agregó 2 mL de HCl 0.7 M para acidificar la solución. Esta acidificación se considera esencial para estabilizar los derivados fluorescentes de la histamina-OPA.
- Se filtró el contenido de los tubos utilizando una jeringa con filtros de nylon de 13 mm y 0.45 µm y por último se agregó el filtrado en los viales para su análisis por HPLC.

3.7.3. Condiciones cromatográficas.

La histamina se analizó por HPLC-FLD en modo de fase reversa, modo isocrático.

Tabla 9. Condiciones cromatográficas.

Parámetro	Condición
Temperatura de columna	25 °C
Volumen de Inyección	15 µL
Fase Móvil	Buffer K ₂ HPO ₄ 20 mM, pH=4 : Acetonitrilo (70:30). Modo isocrático.
Flujo	0.4 mL/min
Tiempo de corrida	20 min
Tiempo de retención	≈ 6.8 - 7 minutos
Detector de Fluorescencia	Excitación: 285 nm Emisión: 455 nm

*Fuente: Elaborado por el autor (mayo, 2025).

3.8. Control de calidad.

Se implementaron diversas estrategias de control de calidad con el propósito de garantizar la fiabilidad y trazabilidad de los resultados obtenidos mediante el método analítico para la cuantificación de histamina en muestras de pescado. Estas estrategias permitieron verificar el desempeño del método, controlar posibles fuentes de error y asegurar la calidad de los datos analíticos obtenidos.

Se incorporaron los siguientes controles a lo largo del proceso analítico:

- Blancos de reactivo y de muestra: Se emplearon blancos de reactivo para verificar la ausencia de contaminaciones en los reactivos utilizados y blancos de muestra (matriz sin fortificar) para descartar interferencias procedentes de la matriz del pescado.
- Muestras fortificadas (ensayos de recuperación): Para evaluar la exactitud del método, se utilizó matriz de pescado previamente analizada sin histamina, o con concentraciones por debajo del límite de cuantificación y se fortificaron con cantidades conocidas de histamina para calcular el % de recuperación.
- Análisis por duplicado: Cada muestra se analizó por duplicado para controlar la precisión del procedimiento analítico.
- Curvas de calibración internas: En cada corrida analítica se construyó una curva de calibración con estándares certificados de histamina, derivatizados en las mismas condiciones que las muestras, con el objetivo de verificar la linealidad del método y la estabilidad del sistema de detección.
- Controles de estabilidad: Se evaluó la estabilidad de los derivados de histamina obtenidos tras la derivatización, mediante la comparación de áreas de pico en función del tiempo transcurrido desde la preparación hasta la inyección.

Para evaluar el desempeño del método analítico se establecieron los siguientes criterios de aceptación para los resultados:

- El valor promedio del % de recuperación de cada analito en los controles internos (muestras fortificadas) debe encontrarse entre 80 a 120 % (Unión Europea, 2021).
- El coeficiente de variación en las muestras analizadas por duplicado no debe ser mayor al 15 % (Unión Europea, 2021).

- La linealidad de la curva de calibración expresada como coeficiente de determinación (r^2) no debe ser menor de 0.995.
- La pendiente obtenida en la curva de calibración debe encontrarse entre los límites superior e inferior del gráfico de control de sensibilidad. Tomar en cuenta que un cambio a nivel instrumental puede ocasionar que el valor de la pendiente se encuentre fuera de los límites de acción, por lo que se deberá realizar la justificación respectiva como una nota en el gráfico de control y la aceptación de los datos dependerá del % de recuperación y del coeficiente de determinación (r^2).
- La variación del área de la segunda inyección de cualquiera de los controles o soluciones estándar no deberá ser mayor a un 5 % con respecto al área registrada en la primera inyección de estos.

Estas prácticas de control de calidad se implementaron a lo largo del proceso analítico para respaldar la validez de los resultados generados y cumplir con los principios establecidos en las guías internacionales de validación de métodos (Unión Europea, 2021).

3.9. Aspectos éticos.

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Química de Alimentos y Aguas del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, bajo el cumplimiento de principios éticos fundamentales aplicables a la investigación científica. Dado que el trabajo se centra en la determinación de histamina en pescado fresco y no procesado y en la validación e implementación del método analítico y no se involucra la experimentación con seres humanos ni animales, se hizo la solicitud de exención de revisión al Comité de Bioética de la Universidad de Panamá (CBUP), la cual se encuentra documentada en el anexo 2.

Se garantiza la trazabilidad, confidencialidad y correcto manejo de la información asociada a las muestras analizadas. El laboratorio identificó el lugar de procedencia de las muestras, así como la marca comercial, pero estos datos se mantendrán confidenciales. Los resultados obtenidos serán reportados por especies y estrato socioeconómico para no exponer el lugar de procedencia ni la marca del producto, para asegurar que los datos se utilicen exclusivamente con fines académicos, científicos y para beneficio de los consumidores por parte de las autoridades de salud. Los sobrantes de

las muestras procesadas fueron colocados en bolsas de descarte y eliminados posteriormente mediante incineración, conforme a los procedimientos establecidos por la institución.

El Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud cuenta con un procedimiento formal de buenas prácticas de laboratorio, el cual fue cumplido estrictamente para salvaguardar la integridad de los colaboradores. Las muestras fueron manipuladas siguiendo estrictas normas de bioseguridad y los residuos generados durante el estudio fueron gestionados conforme a los protocolos internos y la normativa vigente sobre manejo de desechos químicos.

Asimismo, se respetaron los principios de integridad científica, asegurando que los resultados presentados en este trabajo reflejan con veracidad el desempeño del método analítico sin distorsión, omisión ni manipulación de los datos.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión.

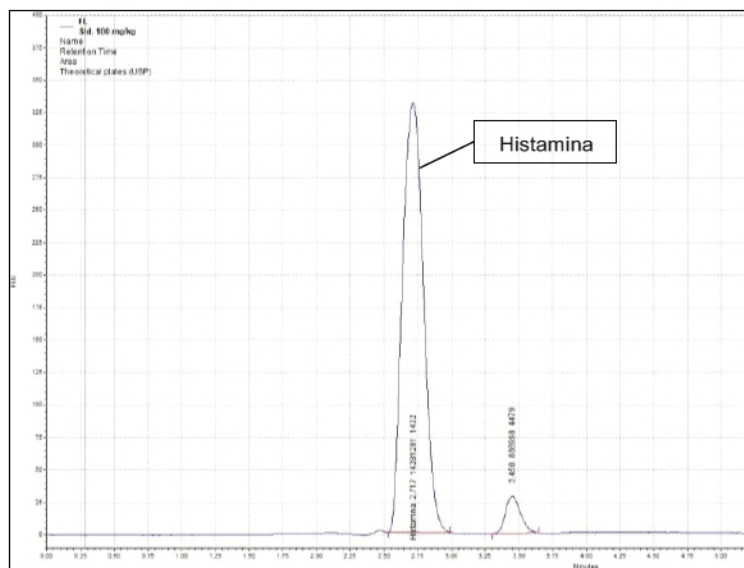
4.1. Resultados de la evaluación preliminar del método analítico.

Se realizó la verificación preliminar del comportamiento del método seleccionado para evaluar su desempeño bajo las condiciones trabajo del laboratorio, obteniendo los siguientes resultados:

4.1.1. Parámetros cromatográficos del sistema.

Con el fin de evaluar el desempeño cromatográfico del sistema bajo las condiciones iniciales, se inyectó una solución estándar de histamina de concentración de 0.250 µg/mL que es equivalente a 7.5 ng de materia inyectada en un volumen de 30 µL. El análisis se realizó utilizando una fase móvil compuesta por buffer fosfato:acetonitrilo (70:30), a un flujo constante de 0.9 mL/min.

Figura 5. Cromatograma de la solución estándar de histamina (0.250 µg/mL) bajo condiciones cromatográficas iniciales.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

El cromatograma obtenido (Figura 5) evidenció un pico bien definido para la histamina con un área de 14 281 281 unidades de fluorescencia y número de platos teóricos (N) de 1432, el tiempo de retención (Tr) para la histamina fue de 2.75 minutos, mientras que el tiempo muerto (Tm), determinado mediante la inyección de un compuesto no retenido, fue de 2.1 minutos. A partir de estos valores se calculó el factor de retención (k') utilizando la ecuación:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{2.75 - 2.1}{2.75} = 0.31$$

Donde:

t_r: es el tiempo de retención del analito (histamina).

t_m: es el tiempo muerto.

Este valor sugiere una baja retención del analito bajo las condiciones evaluadas, según las recomendaciones de la guía ICH Q2(R1) el valor de k' es considerado óptimo entre 1 y 10. A pesar de que el cromatograma muestra que el pico cromatográfico obtenido presentó una forma simétrica y bien definida, la baja retención observada sugiere que el analito eluye rápidamente en el sistema, lo cual debe ser considerado en la optimización del método.

4.1.2. Estabilidad de la señal derivada.

Para evaluar la estabilidad de la señal fluorescente generada en la derivatización de la histamina, se preparó una solución estándar de concentración 0.125 µg/mL la cual fue inyectada sucesivamente durante un período de 18 horas en intervalos de una hora, se midieron parámetros cromatográficos como el área y la altura con el fin de observar si existían variaciones significativas en la señal en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la muestra.

En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos, la primera inyección realizada inmediatamente tras la preparación de la muestra se tomó como referencia (100 % del área). Se observó que, a partir de la segunda inyección (1 hora) el área comenzó a disminuir de manera progresiva con una diferencia del 6 % respecto a la inicial, a las 2 horas la diferencia superó el 8 %. Esta tendencia decreciente continuó durante las 18 horas del ensayo, observándose una pérdida acumulada del 57 % en el área del pico al finalizar el periodo de análisis.

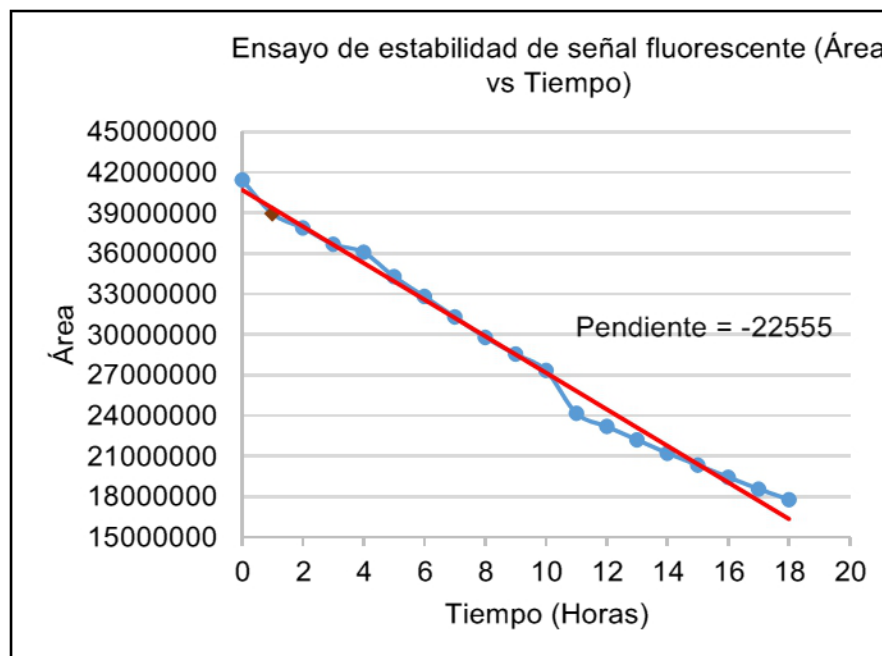
Tabla 10. Ensayo de estabilidad de señal fluorescente.

Solución estándar	# inyección	Tiempo de inyección (Horas)	Área del pico	% Diferencia de áreas
0.125 ug/mL	1	0	41446212	0
	2	1	38939062	6.0
	3	2	37888551	8.6
	4	3	36681838	11.5
	5	4	36076323	13.0
	6	5	34276844	17.3
	7	6	32815672	20.8
	8	7	31295337	24.5
	9	8	29787023	28.1
	10	9	28544025	31.1
	11	10	27339396	34.0
	12	11	24171166	41.7
	13	12	23192079	44.0
	14	13	22206192	46.4
	15	14	21213749	48.8
	16	15	20337747	50.9
	17	16	19440848	53.1
	18	17	18562815	55.2
	19	18	17780159	57.1
Pendiente = -22555				

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

La diferencia de áreas superior al 5 % ya en la primera hora indica una rápida degradación o inestabilidad del derivado fluorescente.

Grafica 1. Ensayo de estabilidad de señal fluorescente (Área vs Tiempo).



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

Este resultado sugiere que el derivado generado no presenta una estabilidad suficiente para análisis prolongados.

4.1.3. Linealidad de la respuesta.

La linealidad se evaluó a partir de una curva de calibración construida con seis niveles de concentración de histamina en el rango de 0.01562 a 0.500 µg/mL (Tabla 11), acorde a lo reportado en el método a ensayar (Kounnoun et al., 2020). Los puntos analizados mostraron un incremento proporcional del área con el aumento de la concentración, indicando una buena relación entre ambas variables.

La regresión lineal simple ($y = mx + b$) aplicada a los datos generó una curva con coeficiente de determinación $R^2 = 0.995$ (Gráfica 2), lo cual cumple con los criterios establecidos por la guía EURACHEM. La pendiente obtenida en esta curva de calibración fue utilizada

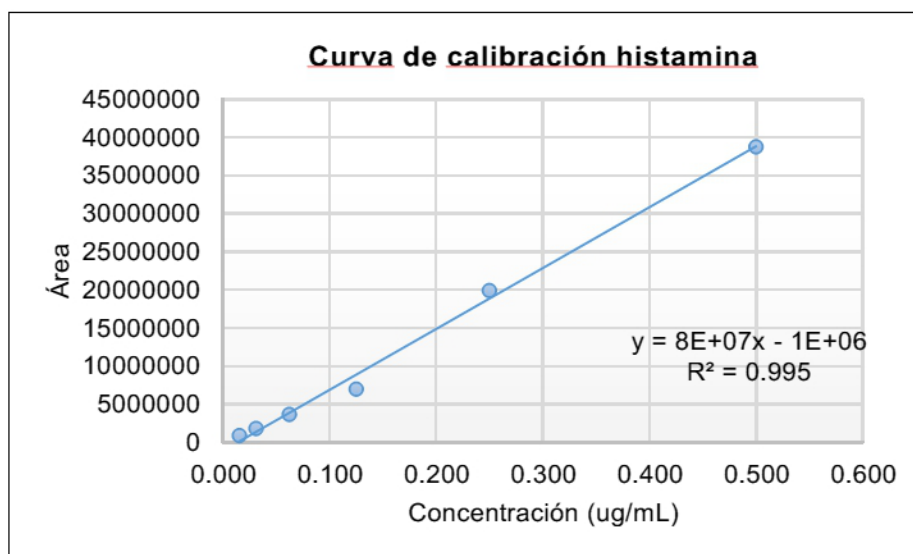
posteriormente para el cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Tabla 11. Curva de calibración histamina.

#	Concentración (µg/mL)	Área
1	0.016	883556
2	0.031	1788390
3	0.063	3624977
4	0.125	6965607
5	0.250	19887594
6	0.500	38755648
Pendiente (m) =		7.99E+07
Intercepto (b) =		-1.12E+06
R ² =		0.995
CV (m) =		3.5 %

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

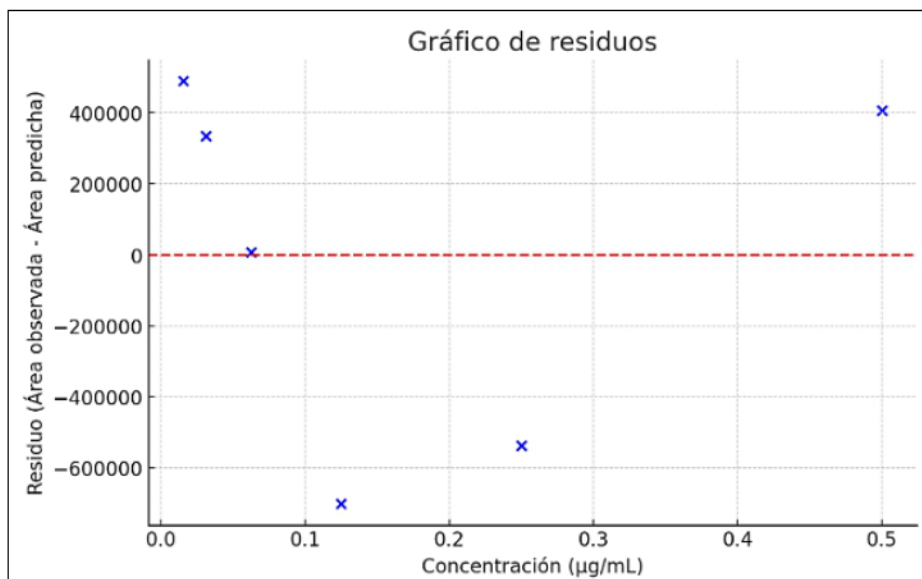
Grafica 2. Curva de calibración histamina.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

Se verificó visualmente la linealidad y a través del gráfico de residuos (Gráfica 3), los residuos no parecen distribuirse de manera homogénea.

Grafica 3. Gráfico de residuos.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

A simple vista, los residuos no parecen distribuirse de manera completamente homogénea alrededor del cero, hay cierta dispersión creciente a medida que aumenta la concentración, lo que podría sugerir una leve heterocedasticidad (varianza no constante).

4.1.4. Límites de detección y cuantificación.

La estimación de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se realizó aplicando el enfoque propuesto por la IUPAC, basado en la desviación estándar de las señales obtenidas para 20 muestras blanco ($n = 20$) y la pendiente determinada de una curva de calibración.

Tabla 12. Señal del blanco (n = 20).

#	Muestra	Área
1	Muestra blanco-1	72875
2	Muestra blanco-2	17589
3	Muestra blanco-3	35922
4	Muestra blanco-4	27624
5	Muestra blanco-5	23942
6	Muestra blanco-6	49493
7	Muestra blanco-7	5345
8	Muestra blanco-8	76312
9	Muestra blanco-9	50282
10	Muestra blanco-10	18192
11	Muestra blanco-11	36706
12	Muestra blanco-12	115308
13	Muestra blanco-13	26239
14	Muestra blanco-14	16489
15	Muestra blanco-15	79497
16	Muestra blanco-16	114588
17	Muestra blanco-17	25263
18	Muestra blanco-18	19342
19	Muestra blanco-19	36367
20	Muestra blanco-20	129515
	Promedio =	4.88×10^4
	Desv. Std =	3.69×10^4

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

A partir de los datos experimentales, se obtuvo una desviación estándar de los blancos de 3.69×10^4 unidades de área, y una pendiente de 7.19×10^7 (unidades de área por $\mu\text{g/mL}$). Los límites calculados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Límites de detección y cuantificación calculados.

Desv. Std (unidades de área)	Promedio (unidades de área)	Pendiente (m) (unidades de área por $\mu\text{g/mL}$)	LOD ($3S_{bl}/m$) ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($10S_{bl}/m$) ($\mu\text{g/mL}$)
3.69×10^4	4.88×10^4	7.19×10^7	0.0025	0.005

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

Los valores de límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) fueron calculados utilizando la desviación estándar de blancos de reactivo, por tanto, los resultados obtenidos representan una estimación del límite instrumental del sistema HPLC-FLD. En la etapa de la validación del método se utilizaron blancos de muestra (matriz de pescado libre de histamina) que fueron sometidos a todas las etapas del proceso analítico, para reflejar la sensibilidad del método bajo condiciones de análisis.

4.1.5. Precisión (repetibilidad).

La precisión se evaluó mediante la inyección múltiple de estándares de histamina en tres niveles de concentración representativos del rango de trabajo: bajo (0.016 µg/mL), medio (0.125 µg/mL) y alto (0.500 µg/mL). Cada nivel fue inyectado al menos seis veces ($n = 6$) bajo las mismas condiciones analíticas, dentro de una misma jornada de trabajo, utilizando el mismo equipo, operador y lote de reactivos.

El criterio de aceptación adoptado fue un coeficiente de variación (CV) $\leq 5\%$, el cual se considera generalmente aceptable para soluciones estándar en la mayoría de las aplicaciones. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Repetibilidad a concentración fija ($n=6$).

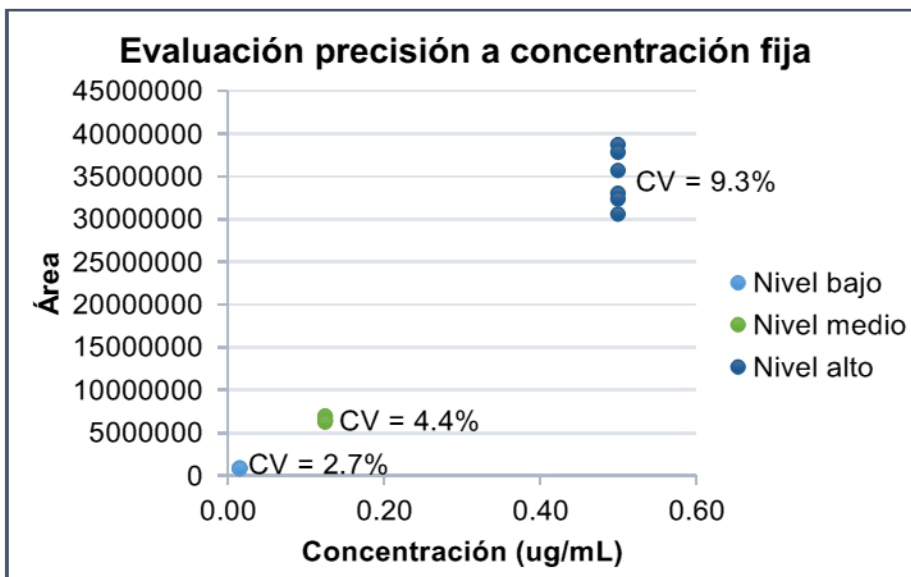
Concentración (ug/mL)	CV	Nivel
0.016	2.7 %	Bajo
0.125	4.4 %	Medio
0.500	9.3 %	Alto

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

Los resultados indican que la repetibilidad del método fue adecuada para los niveles bajo y medio, cumpliendo con el criterio de aceptación

establecido, para el nivel alto (0.500 $\mu\text{g/mL}$), se obtuvo un CV de 9.3 % el cual no cumple con el criterio de aceptación.

Grafica 4. Evaluación de la precisión a concentración fija (Repetibilidad).



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

Es importante destacar la limitada estabilidad de los derivados fluorescentes obtenidos durante la reacción de derivatización con OPA, esto podría haber influido en la variabilidad observada.

4.1.6. Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica del método se evaluó a partir de la pendiente (m) de la curva de calibración obtenida por regresión lineal entre la concentración de histamina ($\mu\text{g/mL}$) y el área de respuesta obtenida mediante HPLC-FLD. Este parámetro refleja la capacidad del método para detectar pequeñas variaciones en la concentración del analito, y es un indicador fundamental del desempeño del sistema analítico (Cantwell, 2025).

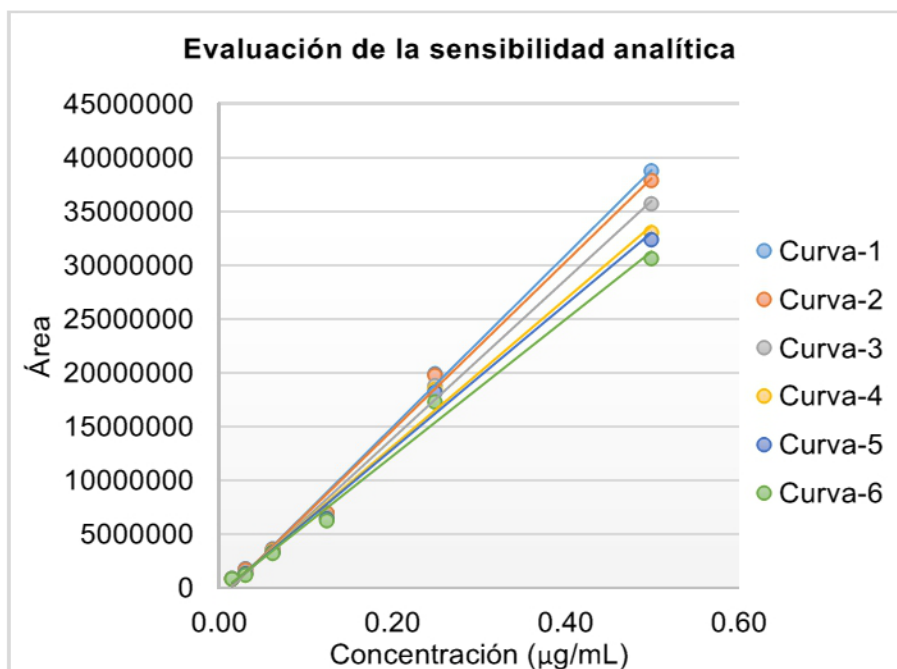
Con el fin de evaluar la consistencia y comportamiento del sistema a lo largo del tiempo, se construyeron seis curvas de calibración independientes bajo condiciones controladas. Las curvas incluyeron seis niveles de concentración de histamina entre 0.016 y 0.500 $\mu\text{g/mL}$. La pendiente de cada curva fue calculada y graficada para evaluar la estabilidad de la sensibilidad entre sesiones analíticas (Grafica 5). Los valores obtenidos (Tabla 15) fueron los siguientes:

Tabla 15. Pendiente (m) calculada para cada curva de calibración.

Curva	Pendiente (m)	R ²	CV (m)
1	7.99×10^7	0.995	3.5%
2	7.82×10^7	0.995	3.6%
3	7.39×10^7	0.995	3.7%
4	6.86×10^7	0.992	4.5%
5	6.73×10^7	0.992	4.6%
6	6.36×10^7	0.992	4.5%

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

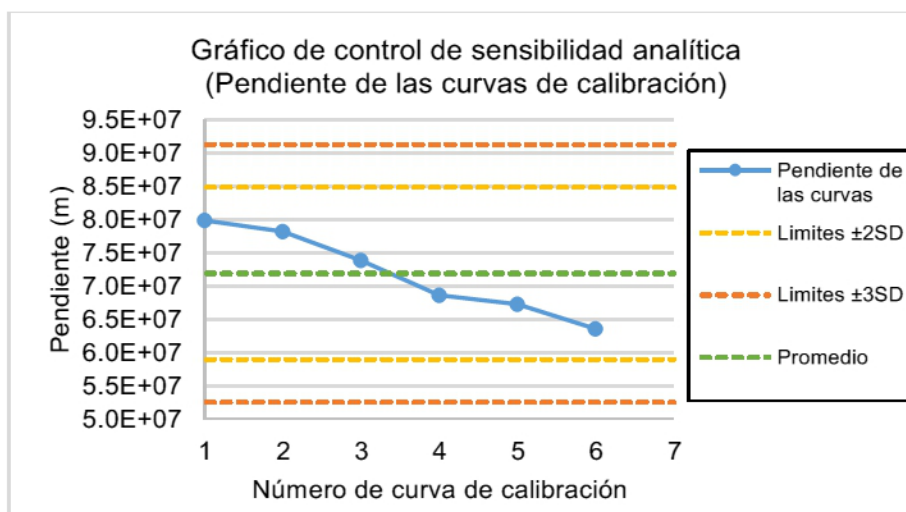
Grafica 5. Evaluación de la sensibilidad analítica.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

La tendencia muestra una disminución progresiva en la pendiente, lo que sugiere una posible reducción de la sensibilidad del sistema con el tiempo. Cabe señalar que la estabilidad de la reacción de derivatización puede influir directamente en la pendiente de la curva de calibración, ya que la limitada estabilidad de los derivados fluorescentes formados entre la histamina y el reactivo de derivatización (OPA) puede traducirse en una disminución de la señal, afectando la respuesta instrumental y reduciendo la pendiente de la curva y, por ende, la sensibilidad del método.

Grafica 6. Gráfico control de sensibilidad analítica.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

El valor promedio de las pendientes fue de 7.19×10^7 , utilizado como línea base para la generación del gráfico de control de sensibilidad. Todas las pendientes se encuentran dentro del rango de $\pm 3s$, lo que indica una variación aceptable en la sensibilidad del método. Sin embargo, se observa una tendencia descendente, lo que podría indicar una disminución progresiva en la respuesta del sistema analítico, este tipo de respuesta debe ser monitoreado para prevenir desviaciones que afecten la calidad del análisis.

4.2. Discusión.

La verificación del método analítico permitió evaluar su comportamiento inicial bajo condiciones controladas en el laboratorio, proporcionando información clave sobre su adecuación para la determinación de histamina en matrices de pescado fresco y no procesado.

- Los parámetros cromatográficos obtenidos evidenciaron una adecuada selectividad del sistema. Aunque el valor del factor de retención ($k' = 0.31$) fue inferior al rango óptimo recomendado (k' entre 1 y 10) por la guía ICH Q2(R1), la separación del pico de histamina fue suficiente y sin interferencias cercanas, lo que sugiere que el método es capaz de distinguir el analito de posibles compuestos coeluyentes presentes en la matriz. Aunque el factor de retención fue bajo, la presencia de un pico definido con buena resolución y sin señales adyacentes, sugiere que el método es selectivo y puede ser aceptado para aplicaciones donde se prioriza un análisis rápido, siempre que no se comprometa la identificación ni la cuantificación del analito.
- La estabilidad de la señal derivada mostró una marcada disminución del área del pico fluorescente a lo largo del tiempo, con una reducción mayor al 5% en menos de una hora. Este resultado sugiere que el derivado generado no presenta una estabilidad suficiente para análisis prolongados. Por lo que, se recomienda optimizar la reacción de derivatización con la finalidad de estabilizar los aductos derivados o realizar el análisis de las muestras derivatizadas en un tiempo inferior a 1 hora tras su preparación para minimizar pérdidas de señal y evitar errores sistemáticos, asegurando así la reproducibilidad y exactitud de los resultados. Una estrategia para mejorar la estabilidad de la reacción incluye evaluar diferentes concentraciones de los reactivos derivatizantes (como OPA y 2-mercaptoetanol), así como el pH y el tiempo de la reacción, ya que estos factores pueden influir directamente en la cinética de formación y estabilidad del derivado fluorescente.
- En cuanto a la linealidad, el método presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0.995 en el rango de 0.016 a 0.500 $\mu\text{g/mL}$, el análisis del gráfico de residuos demostró que los residuos no parecen distribuirse de manera completamente homogénea alrededor del cero, hay cierta dispersión creciente a medida que

aumenta la concentración, lo que podría sugerir una leve heterocedasticidad (varianza no constante).

- Los límites de detección ($LD = 0.002 \mu\text{g/mL}$) y cuantificación ($LC = 0.005 \mu\text{g/mL}$), calculados a partir de la desviación estándar de los blancos y la pendiente promedio de la curva de calibración, reflejan una buena sensibilidad del método, siendo capaz de detectar y cuantificar concentraciones de histamina en niveles considerablemente bajos, lo cual es adecuado para su aplicación en matrices alimentarias como el pescado fresco.
- La precisión (repetibilidad) fue evaluada mediante inyecciones múltiples en tres niveles de concentración. Se observó un coeficiente de variación $\leq 5 \%$ en niveles bajo y medio, cumpliendo con los valores de referencia recomendados para soluciones estándar. Sin embargo, en el nivel alto ($0.500 \mu\text{g/mL}$) el CV fue de 9.3% , lo cual puede atribuirse a la inestabilidad de la derivatización en muestras con tiempos de análisis prolongados, especialmente en concentraciones altas donde el tiempo entre inyecciones puede acentuar los efectos de degradación.
- Finalmente, la evaluación de la sensibilidad analítica mediante seis curvas de calibración mostró una tendencia decreciente en las pendientes, posiblemente asociada a variaciones en la eficiencia de derivatización. De acuerdo con las recomendaciones de EURACHEM, cualquier desviación significativa de la pendiente fuera de los límites de control debe ser investigada. En este caso, aunque la sensibilidad permanece dentro de márgenes aceptables, se recomienda el monitoreo continuo mediante gráficos de control, y la evaluación conjunta con otros parámetros como el % de recuperación y la linealidad para decidir sobre la validez de la corrida analítica.

En la tabla 16 se resumen los resultados obtenidos en la verificación del método y se comparan con los criterios de aceptación.

Tabla 16. Comparación de criterios de aceptación vs. Resultados obtenidos en la verificación del método.

Parámetro evaluado		Criterio de aceptación (EURACHEM)	Resultado obtenido	Cumple
Parámetros cromatográficos.	Tiempo de retención (Tr)	Consistencia entre corridas, picos bien definidos.	Tr: 2.75 min, pico bien definido.	Si cumple
	Tiempo muerto (Tm)	Coherente con el sistema y sin retención.	Tm: 2.1 min (basado en compuesto no retenido).	Si cumple
	Factor de retención (k')	Entre 1 y 10 (ICH Q2)	0.31 (retención corta, pero con selectividad adecuada).	No cumple
	Número de platos teóricos (N)	Depende de la columna, > 1000	1432	Si cumple
Linealidad (R²)		R ² = 0.995, los residuos no se distribuyen de manera completamente homogénea.	R ² = 0.995 CV (m) = 9%	No cumple
Límite de detección y cuantificación.	LD (µg/mL)	No definido estrictamente, pero justificado por cálculo estándar.	0.002 µg/mL	Si cumple
	LC (µg/mL)	Justificado mediante curva y blancos.	0.005 µg/mL	Si cumple
Precisión	Repetibilidad a concentración fija.	CV ≤ 2 % para estándares (EURACHEM)	2.7 %, 4.4 %, 9.3 % (según concentración)	No cumple
Estabilidad de la señal derivada		Variación ≤ 5 % durante el tiempo de análisis.	Caída > 5 % en menos de 1 hora. Tiempo de estabilidad prácticamente nulo.	No cumple
Sensibilidad (pendiente m)		Coherencia entre curvas, sin disminuciones marcadas.	Disminución progresiva de pendiente (m) observada.	No cumple

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (junio, 2025).

* Parcialmente aceptable = Se requiere ajuste u optimización.

En conjunto, los resultados de la verificación del método respaldan su aplicabilidad para el análisis de histamina en matrices de pescado, siempre que se optimicen algunos parámetros y se controlen adecuadamente los tiempos de derivatización e inyección, así como el desempeño instrumental. Específicamente, se recomienda mejorar la estabilidad de los derivados de histamina mediante ajustes en el pH o el tiempo de reacción y la concentración del agente derivatizante, con el fin de minimizar la pérdida de señal.

4.3. Resultados de la optimización del método.

4.3.1. Reacción de derivatización.

En este estudio, la eficiencia de la reacción de derivatización de histamina con ortoftalaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol fue evaluada mediante la medición del área del pico cromatográfico, utilizando una solución estándar de 0.200 µg/mL. Se evaluaron dos parámetros: el tiempo de reacción y el pH del medio, con la finalidad de identificar las condiciones que maximizan la respuesta fluorescente del derivado formado.

La optimización del pH se realizó ajustando el pH del medio de reacción a valores de pH dentro del rango de 5.0 a 14.0. Los resultados (tabla 17 y gráfica 7) mostraron un incremento lento del área del pico entre pH 6.0 y pH 12.0, alcanzando un máximo pronunciado en pH 13.0, con un área de 55 808 322 unidades. A partir de este punto, se observó una caída abrupta de la señal. Esto sugiere que el derivado fluorescente es más estable en condiciones fuertemente básicas, aunque valores de pH excesivamente altos podrían afectar la reproducibilidad o generar reacciones secundarias no deseadas.

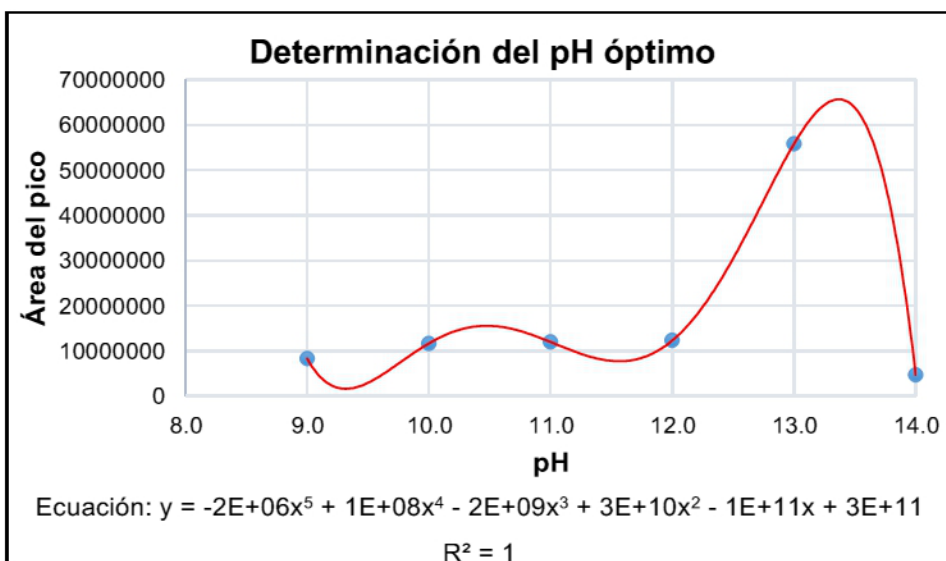
Tabla 17. Resultados de la optimización del pH.

Solución estándar	pH	Área del pico	Tr (min)
0.200 mg/mL de histamina	5.0	143140	8.98
	6.0	8140903	8.97
	7.0	9087868	8.96
	8.0	10273936	8.97
	9.0	8277325	8.96
	10.0	11657663	8.96
	11.0	11966151	8.97
	12.0	12303560	8.96
	13.0	55808322	6.56
	14.0	4664602	6.42

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Se ajustó una regresión polinómica de grado 5 a estos datos, y aunque el modelo mostró una tendencia compatible con los resultados experimentales, se identificó una variabilidad significativa en los valores extremos. Por tanto, se recomienda el uso de pH 13.0 como condición óptima, se recomienda verificar la estabilidad del derivado en condiciones rutinarias de análisis.

Grafica 7. Determinación del pH óptimo.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Posteriormente, se evaluó el tiempo de reacción, considerando el rango entre 30 y 240 segundos a temperatura ambiente.

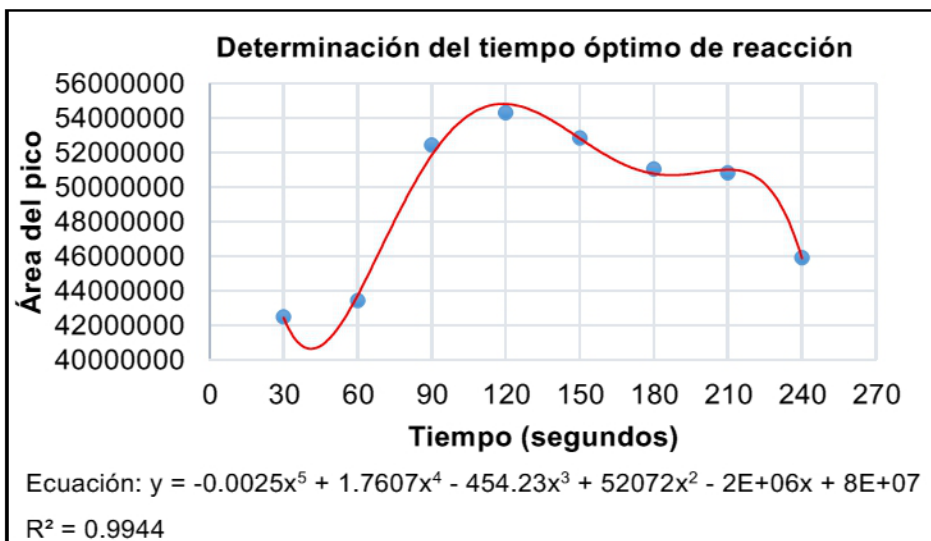
En la tabla 18 y la gráfica 8 están los resultados del ensayo, se observó un aumento progresivo del área del pico hasta los 120 segundos, momento en el cual se alcanzó el valor máximo experimental 54 308 406 unidades. A partir de ese punto, la señal comenzó a disminuir levemente, lo que sugiere una posible degradación del derivado o interferencia por productos secundarios.

Tabla 18. Resultados de la optimización del tiempo de reacción.

Solución estándar	Tiempo (segundos)	Área del pico
0.200 mg/mL de histamina	30	42488184
	60	43434692
	90	52440336
	120	54308406
	150	52843760
	180	51050207
	210	50821576
	240	45910367

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Gráfica 8. Determinación del tiempo óptimo de reacción.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Se ajustó una regresión polinómica de grado 5 a estos datos y presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0.994, indicando un excelente ajuste. El valor predicho por este modelo para 120 segundos fue de 54 817 641 unidades, confirmando la validez del tiempo óptimo determinado experimentalmente.

4.3.2. Proporción de la fase móvil.

Se evaluó el efecto de diferentes proporciones de la fase móvil, la cual estaba compuesta por buffer fosfato 20 mM a pH 4 y acetonitrilo (ACN). Las proporciones evaluadas fueron: 97:3, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30 y 60:40 (v/v, buffer:ACN), con el objetivo de optimizar la resolución, simetría del pico, intensidad de la señal fluorescente y estabilidad de la línea base.

Tabla 19. Resultados de la evaluación de las diferentes proporciones de la fase móvil.

Proporción Buffer:ACN	Unidades de fluorescencia	Área del pico	Altura del pico
97:3	No estabilizo línea base		
95:5	No estabilizo línea base		
90:10	8.24	290611	27617
80:20	136.51	20526398	544347
70:30	332.72	15951363	1326107
60:40	416.41	20350688	1651233

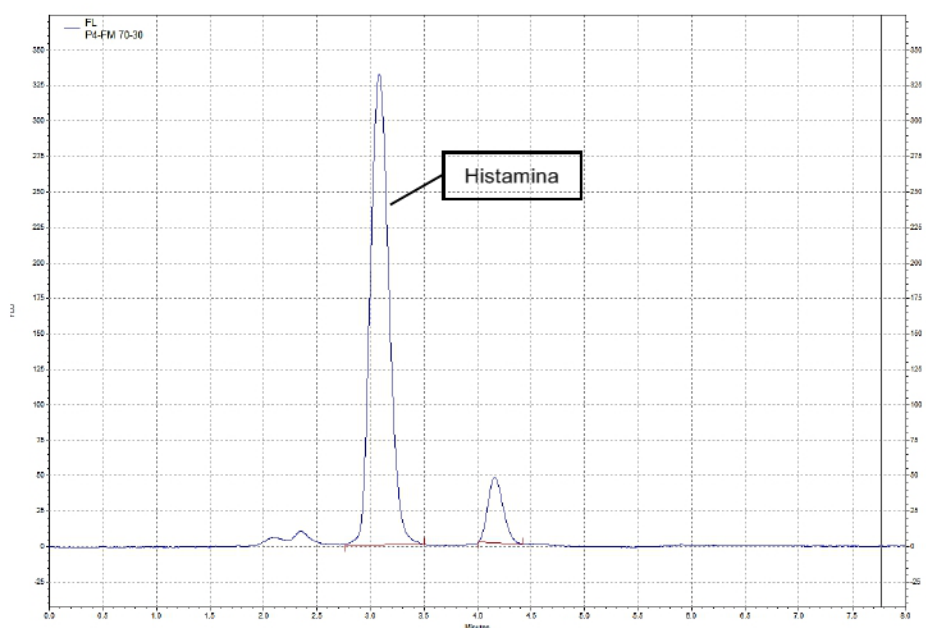
*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

En las proporciones con bajo contenido de ACN (97:3 y 95:5), no se logró estabilizar la línea base, por lo que no fue posible detectar adecuadamente la señal del analito. A partir de la proporción 90:10, se obtuvo una señal débil para la histamina (área: 290 611; altura: 27 617). La proporción 80:20 mostró un incremento de la señal (área: 20 526 398; altura: 544 347), pero el pico cromatográfico presentó mayor anchura y menor definición. En este caso, el tiempo de retención (T_r)

fue de 5.5 minutos, con un tiempo muerto (T_m) de 2.1 minutos, y un factor de retención (k') de 1.62.

La proporción 70:30 (Figura 6) mostró un área de 15 951 363 y altura de 1 326 107, con T_r de 3.08 minutos y k' de 0.47. Aunque este valor de k' se encuentra por debajo del rango recomendado (entre 1 y 10), se observó una adecuada definición del pico y buena simetría, sin interferencias adyacentes.

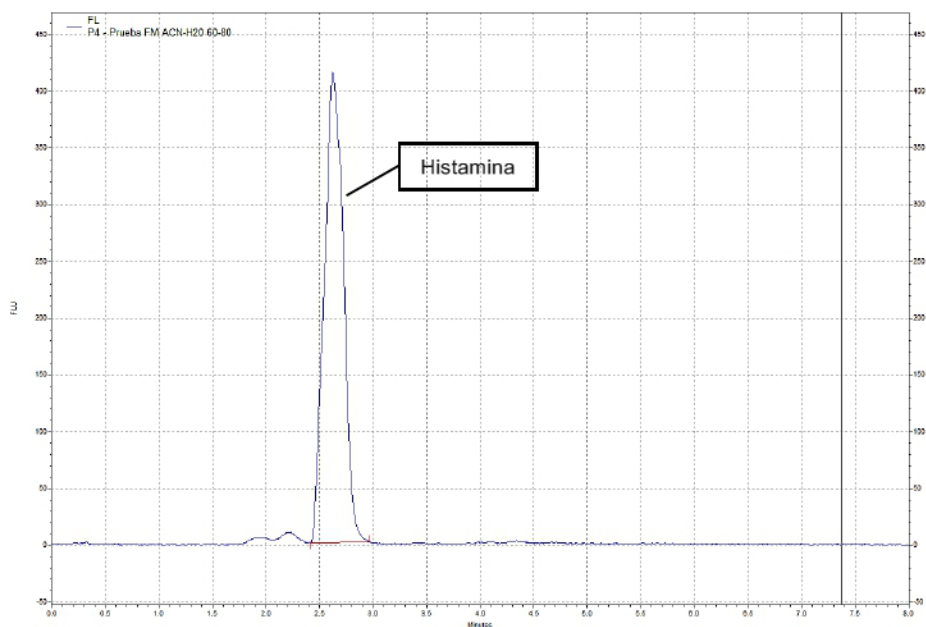
Figura 6. Cromatograma de histamina con fase móvil en proporción 70:30.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

En la proporción 60:40 (Figura 7), se obtuvo la señal más intensa (área: 20 350 688; altura: 1 651 233); sin embargo, el pico presentó asimetría en forma de cola (tailing), lo cual compromete la exactitud en la integración del área y puede afectar la separación frente a compuestos cercanos.

Figura 7. Cromatograma de histamina con fase móvil en proporción 60:40.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Luego de evaluar los resultados obtenidos se seleccionó la proporción 70:30 (Buffer:ACN) como la más adecuada para la cuantificación de histamina, por ofrecer la mejor combinación entre intensidad de señal, forma del pico y rapidez de análisis cromatográfico.

4.3.3. Barrido espectral para la selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.

Para determinar las longitudes de onda de excitación y emisión máximas del derivado fluorescente de histamina, se llevó a cabo un barrido espectral. Esta etapa fue fundamental para establecer las longitudes de onda que proporcionan la mayor sensibilidad analítica del sistema cromatográfico. Para este ensayo, se utilizó una solución estándar de histamina de concentración 0.125 µg/mL y se derivatizó bajo las condiciones previamente optimizadas de pH y tiempo de reacción. Se realizó un barrido espectral en el rango longitudes de onda

de Excitación de 200 a 405 nm y de Emisión de 385 a 505 nm en intervalos de 10 en 10. El cual se hizo en dos etapas, primero se fijó la longitud de onda de emisión y realizar un barrido espectral de excitación en el rango de 200 a 405 nm y de esta manera determinar la longitud de excitación óptima (etapa 1), luego se realizó un segundo barrido en el rango de 385 a 505 nm para determinar la longitud de onda de emisión óptima (etapa 2).

Como criterio de selección, se tomó el pico que mostró máxima intensidad de fluorescencia en cada barrido. El resultado obtenido del ensayo de barrido espectral se muestra en las tablas 20 y 21.

Tabla 20. Resumen del ensayo de barrido espectral para establecer las longitudes de onda máximas.

Excitación (nm)	Rango del barrido												
	Emisión (nm)												
	385	395	405	415	425	435	445	455	465	475	485	495	505
200	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
210	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
220	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
230	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
240	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
250	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
260	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
270	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
280	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
285	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x
295	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
305	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
315	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
325	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
335	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
345	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
355	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
365	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
375	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
385	---	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
395	x	---	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
405	x	x	---	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

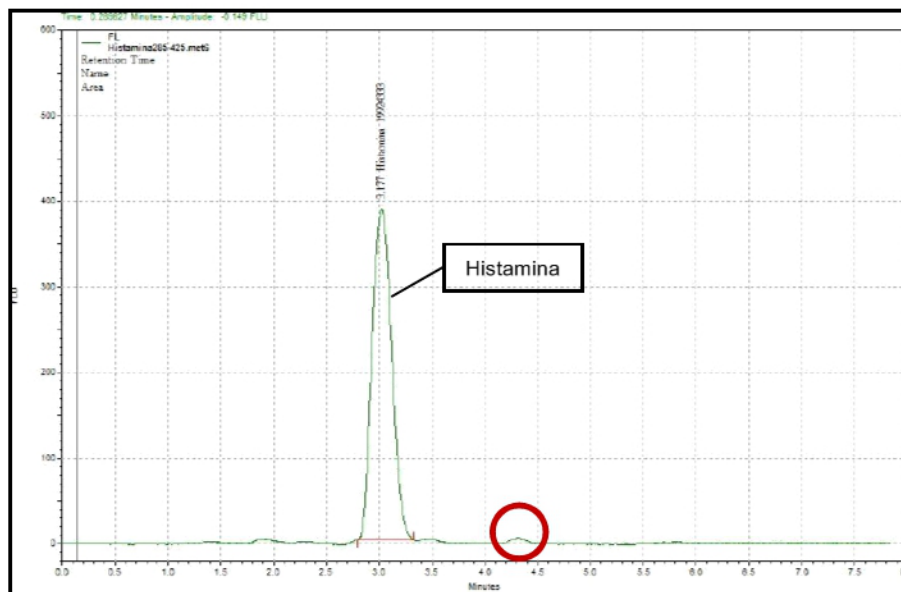
*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Tabla 21. Resumen del ensayo de barrido espectral, intensidad de fluorescencia en cada barrido.

Excitación (nm)	Barrido (FLU)				
	Emisión (nm)				
	415	425	435	445	455
280	306.247	366.046	346.21	343.958	368.346
285	326.592	390.469	365.957	359.693	388.381
290	319.07	386.301	361.069	357.388	382.807
295	297.035	303.652	308.705	300.802	356.178

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

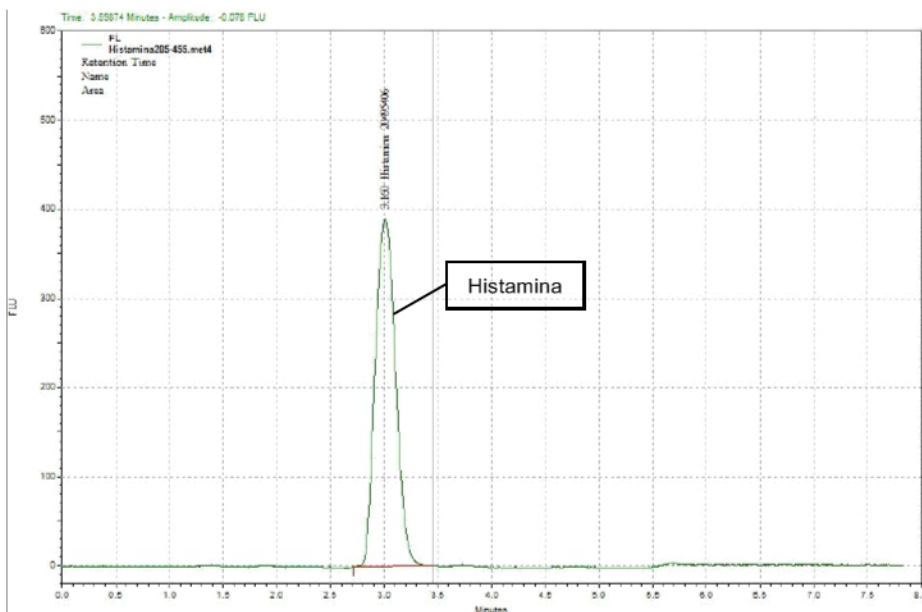
Figura 8. Cromatograma a longitud de onda de excitación de 285 y emisión de 425.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

En el cromatograma de la figura 8, el pico tiene una intensidad de señal de 390.47 unidades de fluorescencia para una $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$.

Figura 9. Cromatograma a longitud de onda de excitación de 285 y emisión de 455.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

En el cromatograma de la figura 9, el pico tiene una intensidad de señal de 388.38 unidades de fluorescencia para una $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 455 \text{ nm}$.

En el cromatograma de la figura 8 se observa la señal de un pequeño pico con $T_r = 4.4$ minutos, este pico no se observa en el cromatograma de la figura 9 lo cual podría indicar una interferencia, tomando en cuenta factor se decidió establecer como longitud de onda máxima de excitación 285 nm y 455 nm para emisión, estas longitudes de ondas son adecuadas para la detección del derivado de histamina bajo las condiciones de trabajo propuestas.

4.3.4. Flujo de la fase móvil.

Para evaluar el desempeño cromatográfico del método se ensayaron distintos flujos de fase móvil, en el rango de 0.05 a 2.0 mL/min (Tabla 23), con la finalidad de determinar el flujo óptimo que ofreciera una

mayor eficiencia sin comprometer la resolución ni la altura del pico. Para ello, se evaluaron los siguientes parámetros: tiempo de retención (T_r), anchura del pico (W), área, altura, número de platos teóricos (N) y altura de plato teórico (H), para una longitud de columna de 250 mm. Los resultados se resumen en la tabla 22.

Los resultados mostraron que, al aumentar el flujo el tiempo de retención del analito disminuyó de forma progresiva, pasando de 54.98 minutos a 1.38 minutos. Sin embargo, la eficiencia del sistema, medida como número de platos teóricos, mostró un comportamiento no lineal. El número máximo de platos teóricos (2802.5) se obtuvo a un flujo de 0.075 mL/min, mientras que el valor mínimo (249) se registró a 2.0 mL/min. Los flujos muy bajos presentaron tiempos de análisis excesivamente largos, lo cual no es práctico para un método rutinario. Para determinar el flujo óptimo se graficó la altura del plato teórico (H) frente a la velocidad lineal de flujo, identificándose un mínimo en la curva a un flujo de aproximadamente 0.056 mL/min (Figura 10), a este flujo hay una eficiencia máxima en términos de altura mínima del plato. Este comportamiento se ajusta al modelo teórico de Van Deemter, donde el punto mínimo de la curva representa el equilibrio ideal entre difusión longitudinal, resistencia a la transferencia de masa y velocidad de fase móvil.

Tabla 22. Ecuación de Van Deemter y parámetros para el cálculo del flujo óptimo.

A	B	C
0.0409	0.00159	0.5046
$H = A + \frac{B}{u} + Cu$ (Skoog et al., 2015)		
Flujo (u) óptimo = $\sqrt{\frac{B}{C}}$ =	0.056 mL/min	
H (óptimo) =	0.0976	
H (óptima) ($u = 0.4$ mL/min) =	0.247	
Perdida Eficiencia Relativa =	2.5	
Ganancia Tiempo =	9.2	

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

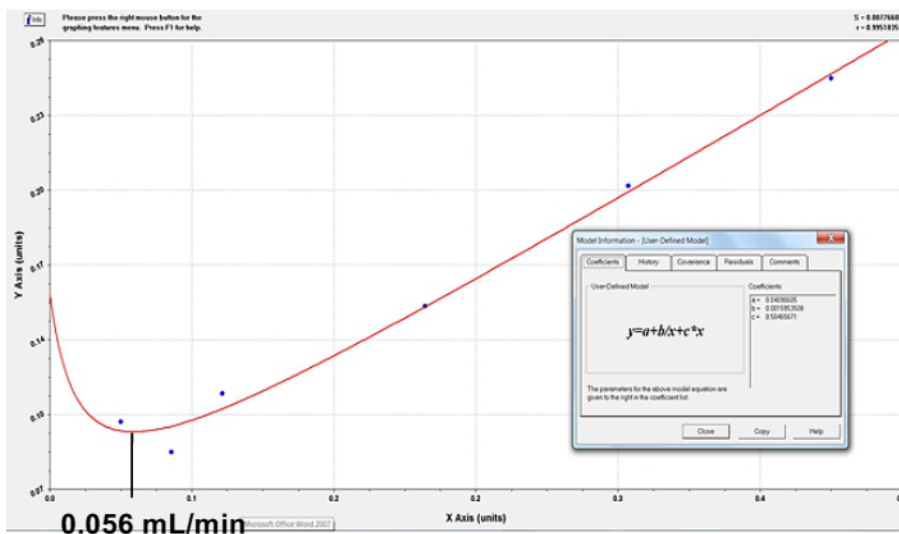
Tabla 23. Parámetros evaluados para determinar el flujo óptimo.

Flujo (mL/min)	Tr (min)	Ancho (W) del pico	Área del pico	Altura del pico	Número de platos teóricos (N)	Altura de plato teórico (mm)
0.05	54.98	4.440	162248805	1739871	2453	0.10190
0.075	36.66	2.770	121185727	1976952	2802	0.08921
0.1	27.44	2.340	118147380	2380713	2200	0.11363
0.2	13.69	1.570	77816960	2459784	1216	0.20550
0.3	9.12	1.150	53291903	2179567	1006	0.24844
0.4	6.87	0.860	40107345	1993362	1021	0.24485
0.5	5.41	0.763	33587380	2024991	804	0.31080
0.6	4.51	0.670	28538774	1955738	725	0.34484
0.7	3.87	0.647	24797699	1886659	572	0.43672
0.8	3.40	0.560	21995685	1818772	590	0.42388
0.9	3.02	0.523	19632901	1752907	533	0.46861
1.0	2.72	0.470	17750711	1689205	536	0.46653
1.1	2.48	0.473	14684819	1479946	440	0.56838
1.2	2.28	0.433	13549925	1436188	444	0.56354
1.3	2.11	0.397	12606440	1397302	452	0.55314
1.4	1.96	0.413	11835405	1360733	360	0.69376
1.5	1.83	0.400	11177025	1335693	335	0.74651
1.6	1.72	0.383	10544577	1309973	323	0.77475
1.7	1.62	0.380	9995570	1285201	291	0.85972
1.8	1.53	0.347	9419055	1255001	311	0.80370
1.9	1.45	0.320	8935071	1230409	329	0.76100
2.0	1.38	0.350	8696440	1220567	249	1.00507

*Para una columna cromatográfica de 250 mm.

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Figura 10. Altura del plato teórico (H) frente a la velocidad lineal de flujo, para determinar el flujo óptimo.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Tabla 24. Resultados obtenidos para el cálculo del flujo óptimo.

Flujo (mL/min)	Tr (min)	Número de platos teóricos (N)	Altura de plato teórico (H en mm)
0.4	6.87	1021.03	0.24485
0.3	9.12	1006.27	0.24844
0.2	13.69	1216.54	0.20550
0.1	27.44	2200.17	0.11363
0.075	36.66	2802.50	0.08921
0.05	54.98	2453.37	0.10190

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

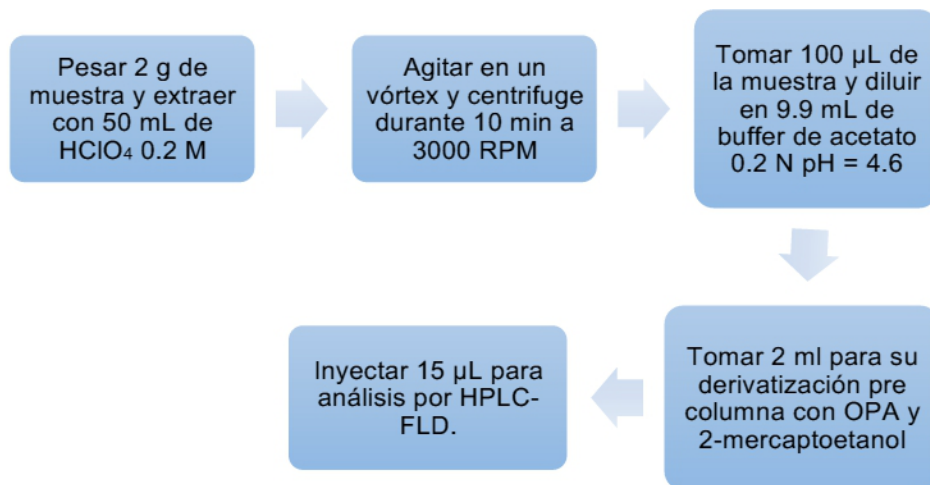
Como se muestra en la tabla 24, el mayor número de platos teóricos fue $N = 2802.5$ y la menor altura de plato fue $H = 0.0892$ mm, estos valores se obtuvieron con un flujo de 0.075 mL/min, que es donde hay mayor eficiencia cromatográfica. Sin embargo, este flujo también implicó un tiempo de retención prolongado ($T_r = 36.66$ min), lo cual no resulta conveniente para análisis de rutina.

Se evaluaron los resultados obtenidos y se seleccionó un flujo de 0.4 mL/min como flujo de trabajo ya que se considera tiene un buen equilibrio entre eficiencia y velocidad de análisis. Este flujo redujo el tiempo de retención en 81.2 % respecto al flujo de 0.075 mL/min (de 36.66 a 6.87 min), pero con una pérdida relativa de eficiencia del 63.5 % (reducción de N de 2802.5 a 1021.03). A pesar de esta pérdida parcial de eficiencia, la forma del pico fue adecuada y el número de platos teóricos todavía es aceptable (N debe ser al menos 1000 platos teóricos para columnas usadas), se continuará tratando de optimizar este parámetro para que este método pueda utilizarse como método analítico de rutina.

4.3.5. Extracción de la muestra.

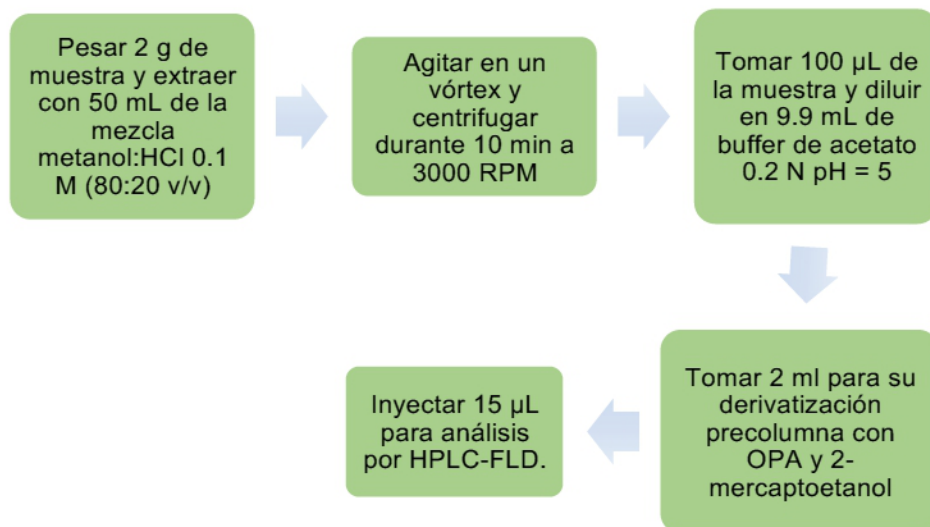
Como parte de la optimización del proceso de extracción se evaluaron dos opciones reportadas en la literatura, la primera el Método A donde se utiliza ácido perclórico 0.2 M para disolver la muestra y la segunda el Método B el cual utiliza una mezcla metanol:HCl 0.1 M (80:20 v/v). El criterio de selección se basó en la comparación de las áreas de pico obtenidas y las interferencias presentes en los cromatogramas obtenidos tras la derivatización con OPA/2-mercaptoetanol. En las Figuras 11 y 12 se resumen los pasos seguidos para el análisis de las muestras de pescado mediante los métodos A y B, ambos métodos comparten una secuencia similar, sin embargo, difieren en el tipo de solvente de extracción y el pH del buffer de dilución.

Figura 11. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el análisis de la muestra por el método A.



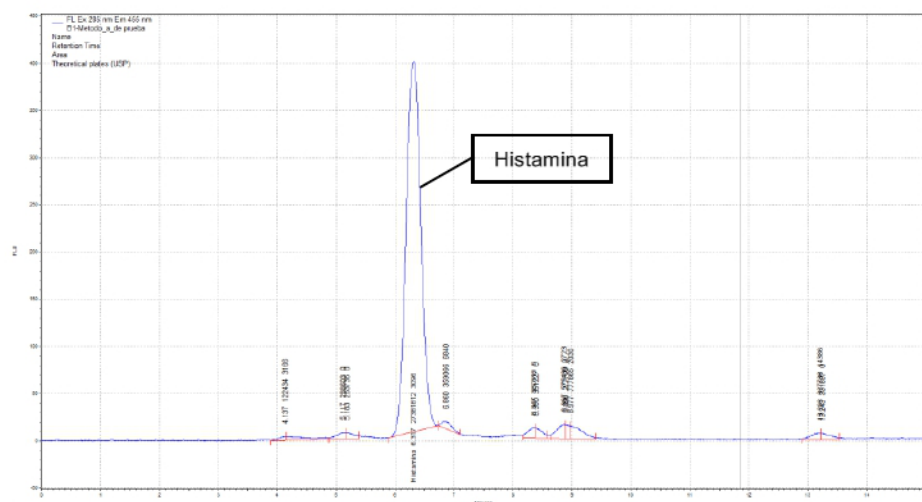
*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Figura 12. Diagrama de flujo de los pasos seguidos para el análisis de la muestra por el método B.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

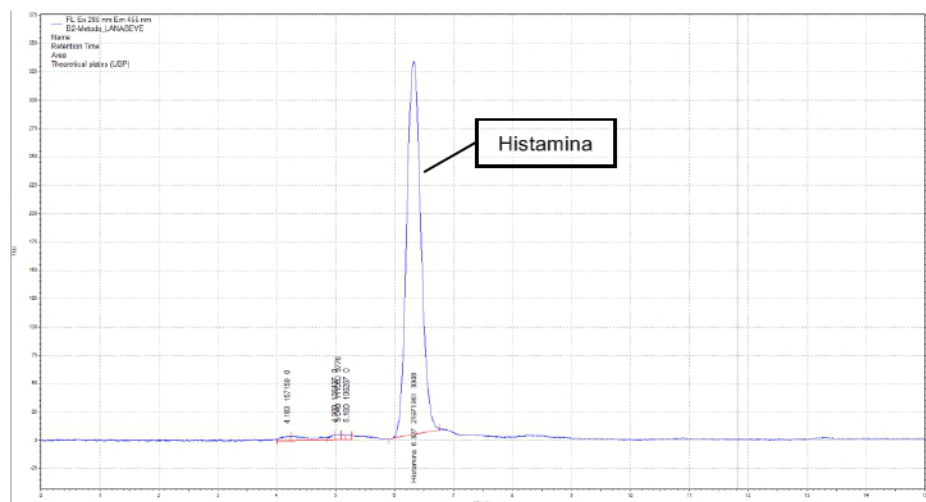
Figura 13. Cromatograma del método A donde se utiliza ácido perclórico 0.2 M.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

El Método A (Figura 13), generó una señal con área del pico 27381812 unidades de fluorescencia y N = 3096, este método presentó señales de picos interferentes en el cromatograma.

Figura 14. Cromatograma del método B donde se utiliza una mezcla metanol:HCl 0.1 M (80:20 v/v).



El Método B (Figura 14), generó una señal con área del pico 21971961 unidades de fluorescencia y $N = 3348$, además demostró mayor limpieza cromatográfica, menor interferencia y un perfil de base más estable.

Para la etapa de extracción de la muestra se seleccionó el Método B, el cual utiliza una mezcla de metanol y HCl 0.1 M (80:20 v/v), ya que mostró un cromatograma más limpio y una mejor eficiencia ($N = 3348$).

Como parte de la optimización del método de extracción, también se evaluó el efecto del pH del buffer utilizado para diluir el extracto, considerando su impacto en la simetría del pico y la intensidad de la señal fluorescente.

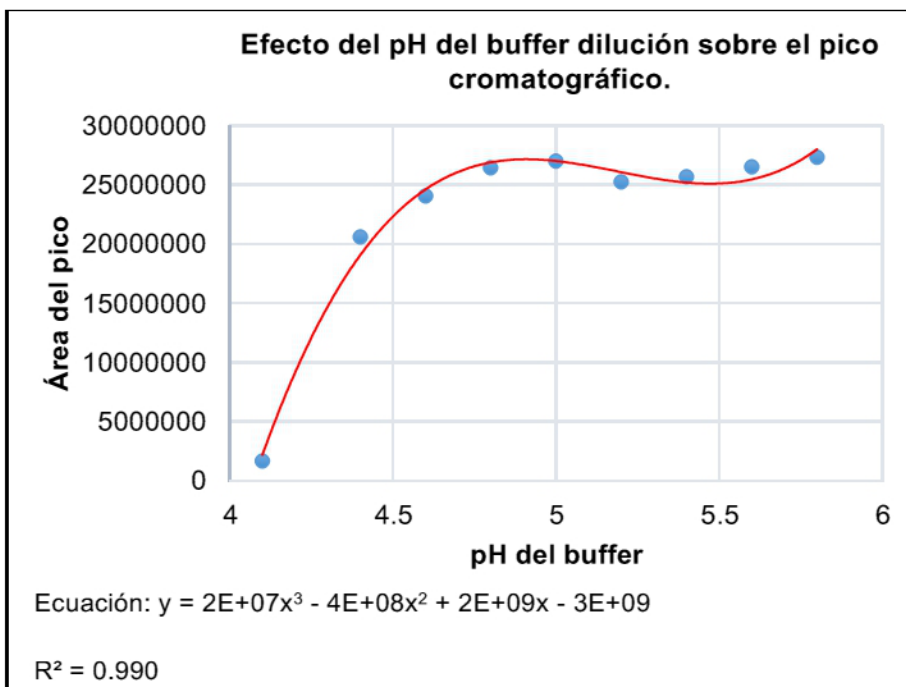
Para ello, se prepararon soluciones buffer en un rango de pH entre 4.1 y 5.8, y se analizó una solución estándar de histamina de concentración 0.100 $\mu\text{g/mL}$, con cada solución preparada. Se midió el área del pico cromatográfico, la altura del pico y se observó la simetría del pico en cada caso, los resultados se resumen en la tabla 25 y grafica 9.

Tabla 25. Resultados del efecto del pH del buffer dilución sobre el pico cromatográfico

Solución estándar	pH	Área del pico	Altura del pico
0.100 mg/mL de histamina	4.1	1686181	91302
	4.4	20581669	865078
	4.6	24047275	1187021
	4.8	26414531	1100705
	5.0	26994167	1808945
	5.2	25238633	1700381
	5.4	25659517	987206
	5.6	26500528	1020100
	5.8	27312941	1054896

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Grafica 9. Efecto del pH del buffer dilución sobre el pico cromatográfico.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

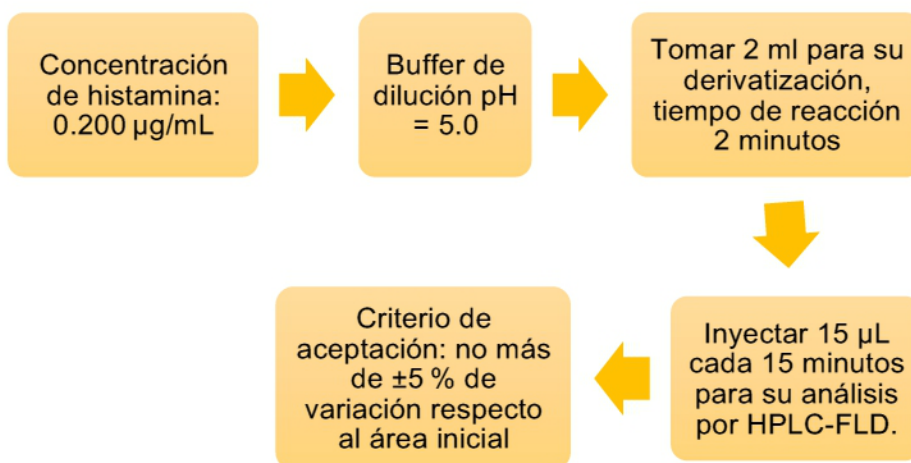
Los resultados mostraron que, a medida que el pH se incrementó desde 4.1, la intensidad de la señal (área del pico) aumentó progresivamente, alcanzando un máximo a pH 5.0. En este punto también se observó la mayor altura de pico, lo que sugiere una derivatización más eficiente y una mejor definición de la señal cromatográfica. A valores de pH superiores (5.4–5.8), aunque el área del pico se mantuvo elevada e incluso mostró ligeros incrementos, se evidenció una deformación del pico, lo que afecta negativamente la calidad cromatográfica.

Con base en estos resultados, se seleccionó el Método B con un pH de 5.0 como valor óptimo para el buffer de dilución, ya que a este pH se obtuvo un adecuado balance entre intensidad de señal y forma del pico, garantizando una respuesta analítica más confiable.

4.3.6. Estabilidad de la reacción de derivatización.

Se evaluó en el tiempo la estabilidad del derivado fluorescente de histamina mediante un ensayo de inyecciones repetidas, con la finalidad de comprobar si la señal fluorescente del derivado se mantiene estable bajo las condiciones de análisis. Para ello, para este ensayo se utilizó una solución estándar de histamina de concentración conocida, derivatizada bajo las condiciones óptimas con ortoftaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol. Para el ensayo se utilizaron las siguientes condiciones de extracción y derivatización (Figura 15):

Figura 15. Diagrama de flujo de las condiciones y los pasos seguidos para el ensayo de estabilidad.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Luego de establecer las condiciones de ensayo, se estableció como criterio de aceptación una variación máxima de $\pm 5\%$ en el área del pico cromatográfico con respecto al valor inicial, considerando que una desviación mayor puede comprometer la cuantificación y reproducibilidad del método. El resultado del ensayo se evaluó mediante un gráfico de % de variación del área vs tiempo (Gráfica 10),

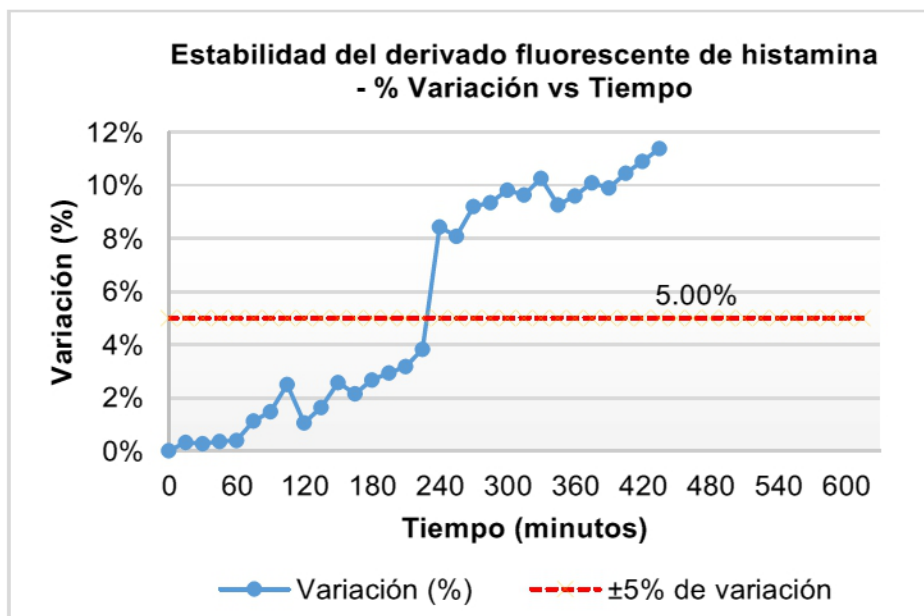
permitiendo observar la tendencia y comportamiento del derivado a lo largo del tiempo de análisis.

Tabla 26. Resultados del ensayo de estabilidad del derivado fluorescente de histamina.

# Inyecciones	Tiempo (segundos)	Tiempo (horas)	Área del pico	% Variación
1	0	0.0	97091649	0.0%
2	15	0.3	96786051	0.31%
3	30	0.5	96832385	0.27%
4	45	0.8	96751467	0.35%
5	60	1.0	96715841	0.39%
6	75	1.3	96000606	1.12%
7	90	1.5	95655676	1.48%
8	105	1.8	94665844	2.50%
9	120	2.0	96071750	1.05%
10	135	2.3	95504134	1.64%
11	150	2.5	94595171	2.57%
12	165	2.8	95000933	2.15%
13	180	3.0	94500222	2.67%
14	195	3.3	94246799	2.93%
15	210	3.5	94004003	3.18%
16	225	3.8	93372236	3.83%
17	240	4.0	88906719	8.43%
18	255	4.3	89238806	8.09%
19	270	4.5	88160263	9.20%
20	285	4.8	88018286	9.35%
21	300	5.0	87561961	9.82%
22	315	5.3	87738974	9.63%
23	330	5.5	87127035	10.26%
24	345	5.8	88099293	9.26%
25	360	6.0	87768989	9.60%
26	375	6.3	87285594	10.10%
27	390	6.5	87482450	9.90%
28	405	6.8	86933499	10.46%
29	420	7.0	86500493	10.91%

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Grafica 10. Estabilidad del derivado fluorescente de histamina - % Variación vs Tiempo.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Durante los primeros 225 minutos (3.8 horas), el % de variación en el área del pico se mantuvo dentro del 5 %, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido. A partir de los 240 minutos (4 horas), el % de variación subió a 8.43 %, y a partir de allí estuvo entre el 8 y 10 % de variación.

En general, se observa que bajo las condiciones optimizadas hay una mejor estabilidad del derivado fluorescente durante al menos 3,8 horas. Posteriormente, hay una tendencia a disminución o pérdida de la señal (área del pico), lo que sugiere que el análisis debe realizarse dentro de ese intervalo para garantizar resultados confiables.

4.4. Discusión.

La optimización del método permitió establecer las condiciones adecuadas para la determinación de histamina en pescado mediante HPLC-FLD. Cada parámetro fue evaluado de forma sistemática considerando criterios como: mayor señal y simetría del pico, menor tiempo de análisis sin pérdida crítica de eficiencia, cromatograma limpio y sin interferencias y una variación de áreas $\leq \pm 5 \%$ durante el tiempo de análisis (estabilidad).

- Los resultados obtenidos en la optimización de la reacción de derivatización con OPA y 2-mercaptoetanol permitieron determinar las condiciones ideales para maximizar la señal fluorescente del derivado de histamina. Se evaluaron diferentes tiempos de reacción, observándose que la intensidad del área del pico aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo a los 2 minutos, luego comenzó a decrecer lentamente. Esto indica que el derivado se forma rápidamente y que tiempos mayores no aportan beneficio adicional. También se evaluaron ajustes al pH del medio de reacción, alcanzando un máximo pronunciado a pH 13.0, a partir de este punto, se observó una caída abrupta de la señal. Esto sugiere que el derivado fluorescente es más estable en condiciones fuertemente básicas. Para la reacción de derivatización, se seleccionó un pH de reacción = 13 y un tiempo de reacción de 2 minutos, ya que bajo estas condiciones se obtuvo una mayor intensidad de señal.
- Se realizó variaciones en la proporción de los componentes de la fase móvil (ACN y buffer fosfato 20 mM a pH = 4), esto permitió evaluar su efecto sobre parámetros cromatográficos como son: el tiempo de retención (T_r), la resolución y forma del pico. En las proporciones con bajo contenido de ACN (97:3 y 95:5), no se logró estabilizar la línea base, por lo que no fue posible detectar adecuadamente la señal del analito. A partir de la proporción 90:10, se obtuvo una señal débil para la histamina. La proporción 80:20

mostró un incremento de la señal, pero el pico cromatográfico presentó mayor anchura y menor definición. La proporción 70:30 mostro un área de 15 951 363 y altura de 1 326 107, con Tr de 3.08 minutos y k' de 0.47. Aunque este valor de k' se encuentra por debajo del rango recomendado (entre 1 y 10), se observó una adecuada definición del pico y buena simetría, sin interferencias adyacentes. En la proporción 60:40, se obtuvo la señal más intensa (área: 20 350 688; altura: 1 651 233); sin embargo, el pico presentó asimetría en forma de cola (tailing), lo cual compromete la exactitud en la integración del área y puede afectar la separación frente a compuestos cercanos. Luego de evaluar los resultados obtenidos se seleccionó la proporción 70:30 (Buffer:ACN) como la más adecuada para la cuantificación de histamina, por ofrecer una separación adecuada en un tiempo razonable.

- El barrido espectral realizado permitió identificar las longitudes de onda óptimas para la detección del derivado de histamina. Se observaron máximos de intensidad en $\lambda_{\text{excitación}} = 285 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 455 \text{ nm}$, lo cual fue confirmado mediante cromatogramas con alta intensidad en la señal y la ausencia de interferencias. A pesar de que otras combinaciones como $\lambda_{\text{emisión}} = 425 \text{ nm}$ mostraron intensidades similares, presentaron picos secundarios no deseados. Por tanto, se seleccionaron las longitudes que ofrecieron mayor sensibilidad, especificidad y sin evidencia de interferencias al mismo tiempo de retención.
- Se evaluaron distintos flujos de fase móvil desde 0.05 hasta 2.0 mL/min, analizándose su impacto sobre la eficiencia de la columna (expresada en número de platos teóricos) y el tiempo de análisis. Se observó que flujos bajos aumentan considerablemente la eficiencia cromatográfica, como fue el flujo de 0.075 mL/min que obtuvo el mayor número de platos teóricos, sin embargo, el tiempo de retención superó los 30 minutos. El flujo seleccionado fue de 0.4 mL/min ya que permitió realizar el análisis en menos de 7 minutos, aunque con una pérdida de eficiencia del 63.6 %, pero con una

ganancia de tiempo de más del 85 %. Aunque el número de platos todavía es aceptable ($N > 1000$ platos teóricos para columnas usadas), se continuará tratando de optimizar este parámetro para que este método pueda utilizarse como método analítico de rutina.

- Para la extracción de la muestra se evaluaron diferentes solventes de extracción, se comparó el uso de ácido perclórico 0.2 M (método A) y la mezcla metanol:ácido clorhídrico 0.1 M (método B). Ambos permitieron extraer histamina. Se seleccionó el método B para la extracción de la muestra ya que permitió obtener cromatogramas limpios, buena intensidad de señal (área = 21 971 961 y $N = 3348$) y menor interferencia. El método A, aunque proporcionó cromatogramas con mayor intensidad de señal (área = 27 381 812 y $N = 3096$), mostró presencia de pequeños picos (interferencias) en el en el cromatograma.
- También se evaluó el pH del buffer de dilución, se observó que un valor de pH = 5.0 ofrecía una mayor intensidad y altura del pico cromatográfico, con buena simetría, lo cual favorece la repetibilidad y precisión de las mediciones. Esto sugiere que el medio de extracción y las condiciones de dilución juegan un papel importante en la recuperación y estabilidad del analito, y deben ser cuidadosamente ajustados para maximizar la eficiencia del método.
- Una vez optimizadas las condiciones de análisis se volvió a evaluar la eficiencia y la ganancia de tiempo, inicialmente se seleccionó el flujo de 0.4 mL/min en lugar del flujo óptimo de 0.075 mL/min ($N = 2802.5$ y $Tr = 36.66$ min) ya que ofrecía una reducción de tiempo de retención del analito del 81.2 %, pero con una pérdida relativa de eficiencia del 63.5 % (reducción de N de 2802.5 a 1021.03). Sin embargo, bajo las condiciones finalmente optimizadas, se logró una reducción del 82.4 % en el tiempo de retención del analito y además un incremento del 39.9% en el número de platos teóricos (aumento de N de 2802.5 a 3920), lo cual indica una mejora importante tanto en la eficiencia cromatográfica como en la calidad de la separación. Estos resultados reflejan una optimización exitosa del sistema, con

implicaciones positivas en términos de productividad y robustez analítica.

- Finalmente, se evaluó la estabilidad del derivado fluorescente bajo las condiciones optimizadas, obteniéndose una variación $< 5\%$ en el área del pico hasta las 3.8 horas post derivatización, cumpliendo con el criterio de aceptación y facilitando el análisis rutinario de las muestras.

En conjunto, los resultados (Tabla 27) de esta etapa permitieron definir un conjunto de condiciones robustas y eficientes, cumpliendo con todos los criterios preestablecidos para continuar con la validación formal del método.

Tabla 27. Comparación de criterios de aceptación y resultados obtenidos en la optimización del método.

Parámetro optimizado	Criterio de aceptación	Condición seleccionada	Resultado obtenido	Cumple criterio
Reacción de derivatización.	Máxima señal fluorescente y estabilidad dentro de la ventana de análisis.	pH de reacción = 13, tiempo = 2 min	Área máxima con buena estabilidad hasta 3.8 horas.	Si cumple
Proporción de fase móvil.	Resolución adecuada y tiempo de análisis razonable.	Buffer fosfato 20 mM pH = 4:ACN en proporción 70:30	Separación adecuada, buena simetría y Tr moderado.	Si cumple
Barrido espectral.	Mayor señal y sin interferencias.	$\lambda_{\text{excitación}} = 285 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 455 \text{ nm}$	Señal intensa, sin picos secundarios.	Si cumple
Flujo de fase móvil.	Menor tiempo de análisis sin pérdida crítica de eficiencia.	0.4 mL/min	Tr = 6.44 min, incremento de eficiencia 39.9 % (N=3920), ganancia de tiempo 82.4 %	Si cumple
Solvente de extracción y pH del buffer de dilución.	Señal máxima y simetría del pico, cromatograma limpio y sin interferencias, buen % de recuperación	Solvente de extracción seleccionado: MeOH:HCl 0.1 M (80:20) pH del buffer de dilución = 5	Mayor área de pico, buena simetría del pico cromatográfico, cromatografía sin interferencias.	Si cumple
Estabilidad del derivado.	Variación $\leq \pm 5\%$ durante el tiempo de análisis.	Condiciones de ensayo optimizadas.	Variación < 5 % hasta 3.8 horas de análisis.	Si cumple

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

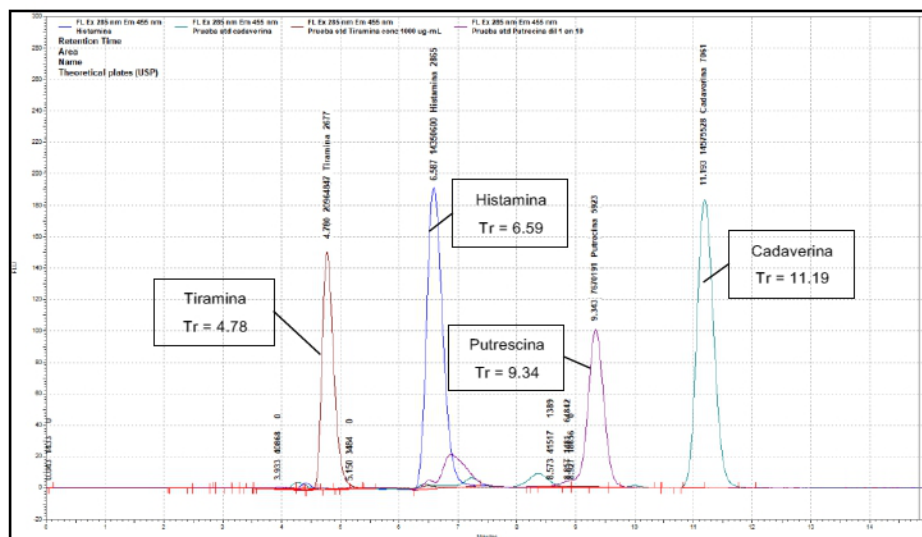
4.5. Resultados de la validación de la metodología.

4.5.1. Selectividad.

Con el fin de evaluar la selectividad del método para la determinación de histamina, se analizaron cromatográficamente soluciones estándar de aminas biógenas relevantes (tiramina, putrescina, cadaverina e histamina), tanto de manera individual como en mezcla. Todas las soluciones fueron derivatizadas bajo las condiciones previamente optimizadas.

En un primer ensayo, se evaluó la especificidad del método mediante la inyección de soluciones estándar individuales (1000 µg/mL) preparadas en HCl 0.1 M, con el objetivo de identificar los tiempos de retención característicos de cada amina.

Figura 16. Cromatograma correspondiente a soluciones estándar de tiramina (Tr = 4.78), histamina (Tr = 6.59), putrescina (Tr = 9.34) y cadaverina (Tr = 11.19).

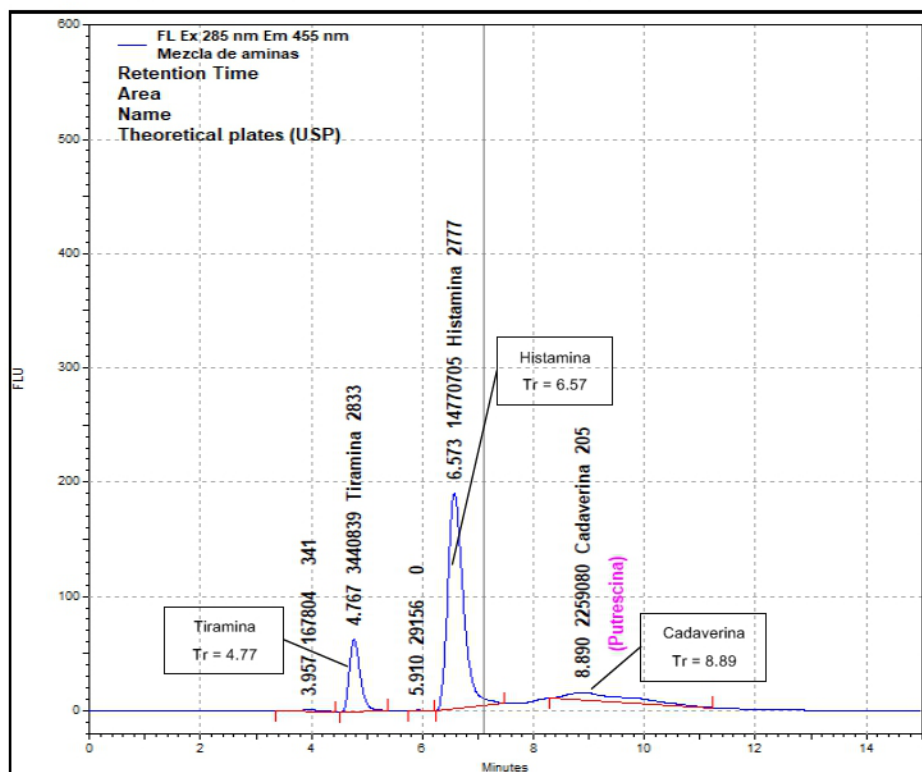


*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Se observaron picos bien definidos para cada compuesto, con los siguientes tiempos de retención (t_r): tiramina (4.78 min), histamina (6.59 min), putrescina (9.34 min) y cadaverina (11.19 min). Estos resultados permitieron establecer la separación cromatográfica de las aminos evaluadas bajo las condiciones iniciales.

Posteriormente, se realizó un segundo ensayo (Figura 17) en el que las soluciones estándar fueron mezcladas y posteriormente diluidas en buffer de acetato de sodio (pH = 5), condiciones equivalentes a las utilizadas durante la preparación de muestras y soluciones de calibración.

Figura 17. Cromatograma obtenido tras la derivatización de una solución estándar mezcla de aminos biogénicos. Tiramina ($T_r = 4.77$), histamina ($T_r = 6.57$) y cadaverina ($T_r = 8.89$).



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Bajo estas condiciones, se observaron variaciones en la respuesta cromatográfica de las aminos. La tiramina ($t_r = 4.77$ min) mostró un incremento en el área del pico, mientras que la histamina ($t_r = 6.57$ min) mantuvo una señal estable, lo que indica que su derivatización no se vio afectada por el cambio de medio. Por su parte, la cadaverina presentó una disminución en el área del pico y un ligero desplazamiento en el tiempo de retención. En el caso de la putrescina, no se observó señal detectable, lo que sugiere una posible afectación en su derivatización bajo estas condiciones.

Los resultados evidenciaron que la histamina presentó un pico bien definido y separado de las demás aminos, sin solapamientos en su tiempo de retención. A pesar de las variaciones observadas en la respuesta de otras aminos, no se identificaron interferencias que comprometieran la identificación y cuantificación de la histamina.

Estos resultados confirman que el método presenta una adecuada selectividad para la determinación de histamina en presencia de otras aminos biógenas comúnmente presentes en el pescado.

4.5.2. Linealidad.

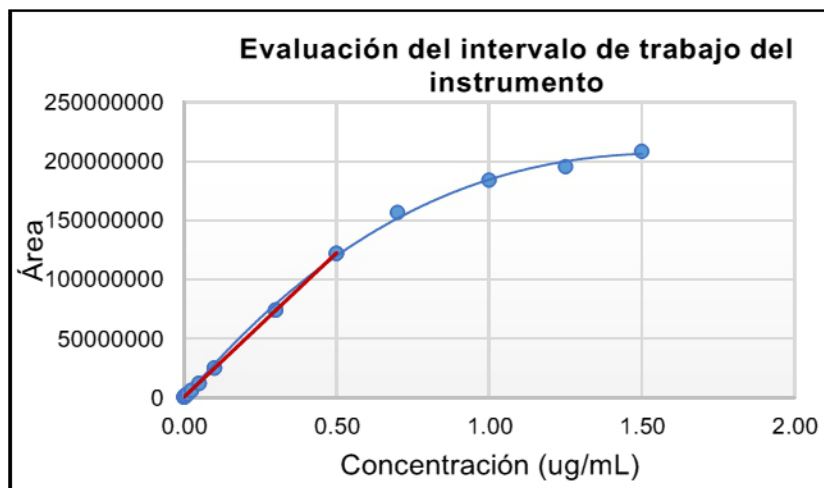
Para evaluar la linealidad de la respuesta del método, se prepararon soluciones estándar de histamina en el rango de concentración de 0.00075 a 1.5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 28) con la finalidad de evaluar el intervalo de trabajo del instrumento, se utilizó una réplica por nivel de concentración y la señal obtenida (área del analito) fue graficada frente a la concentración.

Tabla 28. Rango de concentración para evaluar el intervalo de trabajo del instrumento.

#	Concentración (ug/mL)	Área del pico	Observaciones
1	0.00075	285248	Señal con mucho ruido
2	0.0015	618298	
3	0.0030	1540248	
4	0.0060	1804590	
5	0.0125	3170716	
6	0.0250	6195947	
7	0.050	12153221	
8	0.100	24914770	
9	0.300	74100754	
10	0.500	122113195	
11	0.700	156748343	Saturación de la señal
12	1.000	184097710	
13	1.250	195537664	
14	1.500	208480071	

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Grafica 11. Evaluación del intervalo de trabajo del instrumento



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

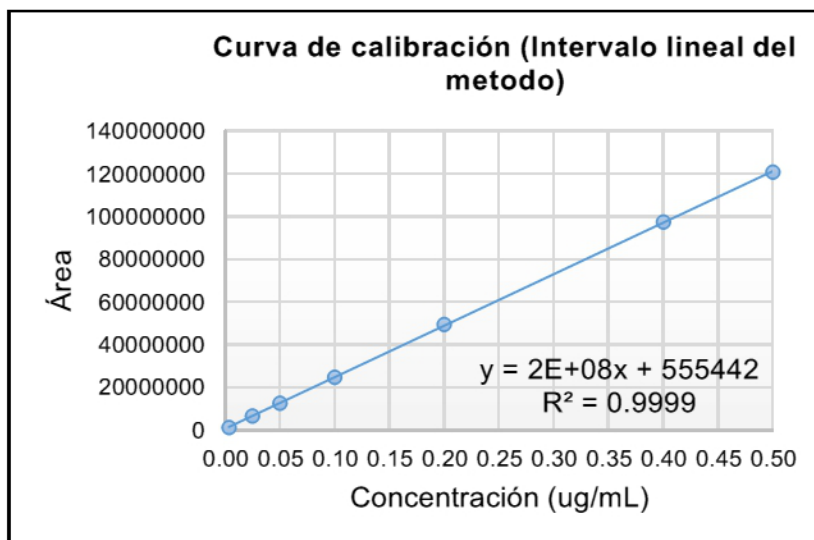
Luego de evaluar el intervalo de trabajo del instrumento mediante una inspección visual de la curva de respuesta (Gráfica 11), se realizó la selección de los puntos dentro del intervalo lineal (Tabla 29), el cual fue de 0.0035 a 0.500 $\mu\text{g/mL}$ para intervalo de trabajo del método (Grafica 12).

Tabla 29. Puntos seleccionados para el intervalo de trabajo del método.

Puntos para la curva de calibración		
#	Concentración en solución (µg/mL)	Área del pico
1	0.0035	1054216
2	0.025	6565461
3	0.050	12571046
4	0.100	24703321
5	0.200	49348262
6	0.400	97321222
7	0.500	120719660
$R^2 =$		0.9999
Pendiente =		2.41E+08
DE(m) =		7.81E+05
CV(m) =		0.3%

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Grafica 12. Puntos seleccionados como intervalo de trabajo del método.

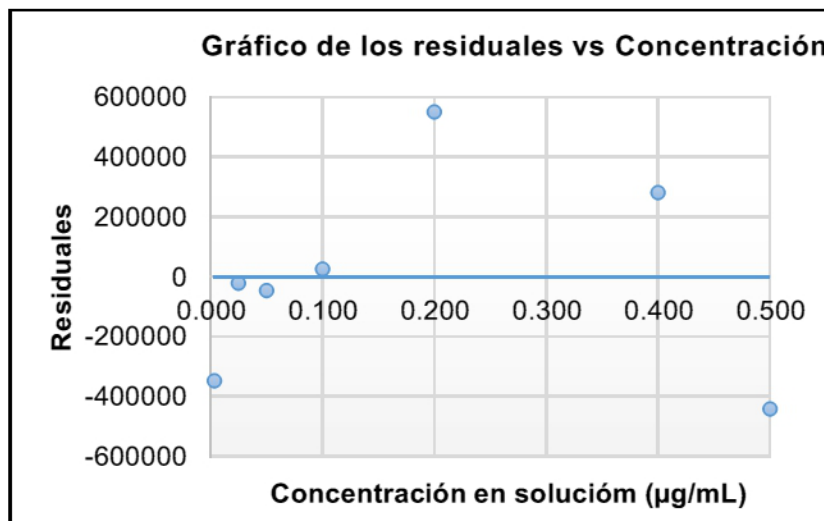


*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Se verificó gráficamente el comportamiento de los residuos de la regresión (Gráfica 13), observándose que en las concentraciones más

bajas ($0.0035 \mu\text{g/mL}$) y más altas ($0.500 \mu\text{g/mL}$), los residuos parecen dispersarse más, lo que sugiere cierta heterocedasticidad.

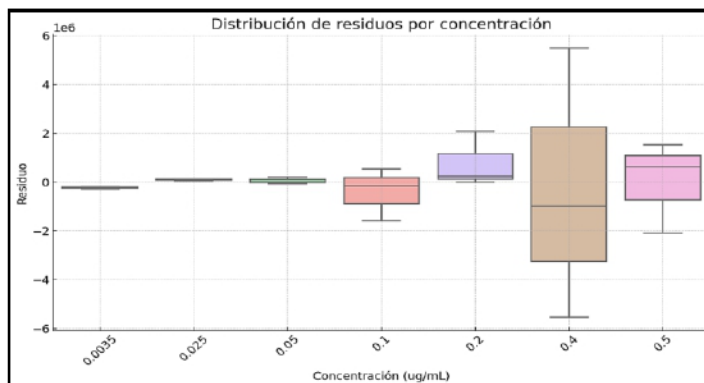
Grafica 13. Comportamiento de los residuos de la regresión.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Es probable que los residuos no estén completamente dispersos aleatoriamente, ya que se puede notar que en las concentraciones más altas los residuos crecen o decrecen, lo cual indica cierta curvatura o tendencia no lineal o variación en la varianza.

Grafica 14. Distribución de los residuos por nivel de concentración.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Para evaluar la homocedasticidad de la respuesta instrumental en el rango de trabajo del método, se aplicó la prueba de Levene a tres curvas de calibración ($n = 3$ para cada nivel, Tabla 30), la cual permite contrastar la igualdad de varianzas entre los diferentes niveles de concentración, incluso cuando los datos no cumplen estrictamente con el supuesto de normalidad. Esta prueba es apropiada en estudios de linealidad, ya que la homogeneidad de varianzas es un requisito para asumir un ajuste de regresión no ponderado (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), n.d.).

Adicionalmente, se utilizó el test de Cochran con el fin de detectar la presencia de alguna varianza individual significativamente mayor al resto, lo que podría indicar un punto con dispersión atípica y potencialmente afectar la precisión global del método. Ambas pruebas proporcionan evidencia estadística sobre la uniformidad de la variabilidad (Cochran, 1941).

Tabla 30. Curvas de calibración $n=3$ para cada nivel.

#	Concentración (ug/mL)	Curva-1	Curva-2	Curva-3
1	0.0035	1051637	1054216	966311
2	0.025	6639865	6565461	6635917
3	0.050	12645155	12571046	12833993
4	0.100	25414881	24703321	23275272
5	0.200	51434031	49348262	49595108
6	0.400	103812980	97321222	92782513
7	0.500	123419258	120719660	124319053

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Resultados estadísticos.

- Prueba de Levene (varianzas iguales entre grupos):

Tabla 31. Hipótesis para prueba de Levene.

Hipótesis	Homogeneidad de varianzas	<i>p</i>
H ₀ (hipótesis nula)	Las varianzas de los grupos son homogéneas	>0.05
H ₁ (hipótesis alterna)	Las varianzas de los grupos no son homogéneas	<0.05

Estadístico *W* (Levene, median) (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), n.d.):

$$W = \frac{N - \kappa}{\kappa - 1}$$

con $\kappa = 7$ (grupos), $N = 21$ (observaciones totales):

Resultado numérico:

$W = 2.43$

$p\text{-valor} = 0.080$

Interpretación: con $\alpha = 0.05$ y $p = 0.080 > 0.05$, no rechazamos la hipótesis nula (H_0), no hay evidencia estadística de desigualdad de varianzas al 95% de confianza.

- Prueba de Cochran (detección de varianza atípica entre grupos):

Tabla 32. Interpretación para prueba de Cochran.

Homogeneidad de varianzas	Criterio
Las varianzas de los grupos son homogéneas.	$G_{crit} > G_{exp}$
Las varianzas de los grupos no son homogéneas.	$G_{crit} < G_{exp}$

Se calculó la varianza por nivel entre réplicas de las curvas de calibración (Tabla. 33).

Tabla 33. Varianza entre réplicas en cada nivel.

Nivel	Varianza residual
0.0035	4.66E+10
0.025	1.14E+11
0.050	2.82E+11
0.100	3.20E+11
0.200	6.29E+10
0.400	1.31E+13*
0.500	8.10E+12

*Varianza más alta (*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Valor experimental (Gexp) para el estadístico de Cochran (Cochran, 1941):

$$G_{exp} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^k S_i^2} = 0.595$$

Donde:

S_{max}^2 : Es la varianza más alta entre los grupos.

$\sum S_i^2$: Es la suma de todas las varianzas de los grupos.

k: Número de grupos o tratamientos.

El valor crítico (Gcrit) para k = 7, n = 3 (grados de libertad = 2) y $\alpha = 0.05$ para el estadístico de Cochran es 0.727 (ver anexo 3). Resultado: Gcrit > Gexp por lo que se acepta la hipótesis de homogeneidad de varianzas con un 95% de confianza.

Con el fin de evaluar el efecto de la matriz en la respuesta del instrumento, se prepararon y analizaron curvas de calibración en solución y en matriz de pescado, los resultados se resumen en la tabla 34.

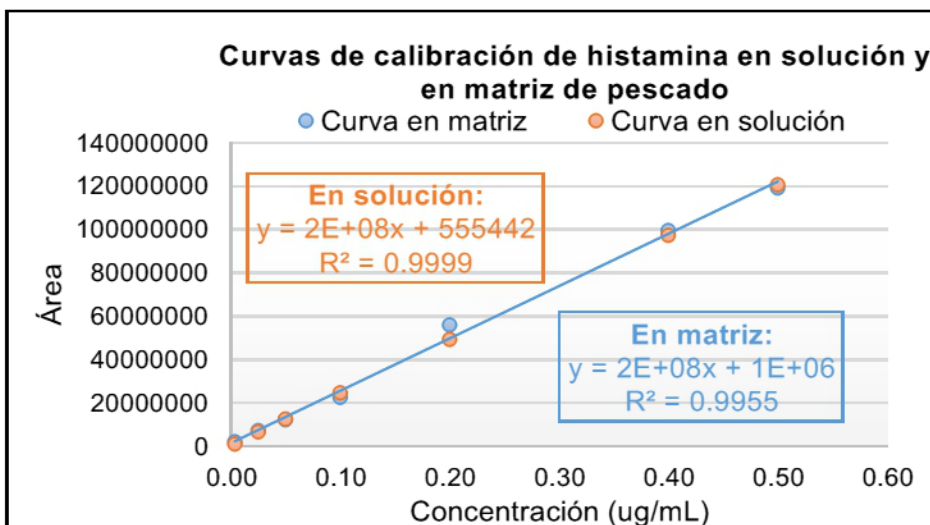
Tabla 34. Puntos de la curva de calibración de histamina solución y matriz de pescado.

Curva de calibración en solución y matriz de pescado			
#	Concentración (µg/mL)	Área de pico (Curva en matriz)	Área de pico (Curva en solución)
1	0.0035	2102597	1054216
2	0.025	7202214	6565461
3	0.050	12171468	12571046
4	0.100	22600665	24703321
5	0.200	55932568	49348262
6	0.400	99588585	97321222
7	0.500	119190568	120719660
R ² =		0.9955	0.9999
Pendiente =		2.41E+08	2.41E+08
DE(m) =		7.26E+06	7.81E+05
CV(m) =		3.0%	0.3%

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Para ambas curvas de calibración se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (R^2) para el rango lineal, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido de $R^2 \geq 0.995$ (Gráfico 15).

Grafica 15. Comparación de las curvas de calibración de histamina en solución y en matriz de pescado.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Para cuantificar el efecto matriz (EM) y determinar si es necesario corregir la curva de calibración en solución, se calculó el porcentaje de efecto matriz a partir de la siguiente ecuación (Eimear McCall, 2020), utilizando las pendientes obtenidas.

$$EM = \frac{m_{matriz}}{m_{solución}} \times 100 = \frac{241475728}{244800901} \times 100 = 98.7 \%$$

Un EM cercano al 100 % indica que la respuesta del detector no se ve alterada de forma significativa por la matriz del pescado, si el valor de EM se aleja del rango de 80-120% significa que hay interferencia y es necesario aplicar corrección por efecto matriz. La comparación de las pendientes mostró una diferencia por debajo del criterio del 5% establecido en guías de validación analítica (Patrick, 2019). Esto indica que no se evidenció un efecto matriz significativo, por lo que es posible emplear la curva de calibración preparada en solución para la cuantificación de las muestras de pescado.

4.5.3. Límite de detección (LD).

El límite de detección se estimó a partir de la relación señal/ruido, considerando una relación mínima de 3:1. Se utilizaron 20 repeticiones de una muestra de pescado que no presentaba concentración detectable de histamina, tratada como blanco de muestra.

Tabla 35. Valores de muestras blanco de matriz de pescado (n = 20).

#	Área
1	137272
2	85000
3	107024
4	10865
5	107553
6	338636
7	45095
8	58760
9	120214
10	91290
11	96691
12	109035
13	11217
14	18998
15	96690
16	93049
17	78390
18	333793
19	211083
20	129515
Promedio =	114008.5
S _{bl} =	89094.9

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (julio, 2025).

Con base en la desviación estándar de la señal de los blancos $S_{bl} = 89094.9$ y la pendiente $m = 2.44E+08$ de la curva de calibración, obtenida a partir de soluciones estándar de histamina, el valor calculado para el LD fue de $0.001 \mu\text{g/mL}$ (0.3 mg/kg), lo que indica que el método es capaz de detectar concentraciones muy bajas de histamina.

4.5.4. Límite de cuantificación (LOQ).

El límite de cuantificación se determinó a partir de la relación señal/ruido, considerando una relación mínima de 10:1. Utilizando las mismas 20 repeticiones de la muestra de pescado sin histamina detectable (Tabla 34), se calculó el LOQ a partir de la desviación estándar de la señal de los blancos y de la pendiente de la curva de calibración, el valor calculado para el LOQ fue de 0.003 µg/mL (0.9 mg/kg), lo que señala que el método puede cuantificar con fiabilidad concentraciones de histamina iguales o superiores a este nivel.

4.5.5. Precisión.

La evaluación de la precisión del método incluyó la repetibilidad instrumental, la del método y la precisión intermedia, siguiendo los lineamientos de EURACHEM.

La repetibilidad instrumental (Tabla 36) se evaluó mediante seis inyecciones consecutivas de un estándar de la curva de calibración en cuatro niveles de concentración: LOQ, nivel bajo, medio y alto. Los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel fueron de 1.5 % para el LOQ (0.0035 µg/mL), 1.0 % para el nivel bajo (0.025 µg/mL), 0.7 % para el nivel medio (0.100 µg/mL) y 0.6 % para el nivel alto (0.400 µg/mL).

Tabla 36. Resultados de la repetibilidad instrumental en solución estándar por nivel de concentración (n = 6 para cada nivel).

Concentración (µg/mL)	% CV	Nivel
0.0035	1.5	LOQ
0.025	1.0	Bajo
0.100	0.7	Medio
0.400	0.6	Alto

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

Se observó una disminución progresiva del CV a medida que aumentó la concentración, un comportamiento esperado en métodos

cromatográficos debido a que la variabilidad relativa es más significativa en niveles cercanos al límite de cuantificación. Todos los valores estuvieron por debajo del criterio de aceptación establecido para soluciones estándar ($CV \leq 5 \%$), de acuerdo con las recomendaciones de EURACHEM.

La repetibilidad del método fue evaluada mediante el análisis de seis réplicas de muestras de pescado, enriquecidas para cada nivel de concentración establecido y los resultados se expresaron como coeficiente de variación (CV).

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 37. En el nivel correspondiente al LOQ ($0.0035 \mu\text{g/mL}$) el % CV fue de 6.2 %, para el nivel bajo ($0.025 \mu\text{g/mL}$) se obtuvo un % CV de 2.0 %, mientras que en el nivel medio ($0.100 \mu\text{g/mL}$) y alto ($0.400 \mu\text{g/mL}$), los % CV fueron de 0.9 % en ambos niveles. Los resultados obtenidos evidencian que el método presenta una buena repetibilidad, ya que los valores de % CV se mantuvieron por debajo del criterio de aceptación recomendado.

Tabla 37. Resultados de la repetibilidad del método en muestras de pescado por nivel de concentración (n = 6 para cada nivel).

Concentración (mg/kg)	% CV	Nivel
0.91	6.2	LOQ
6.25	2.0	Bajo
25.0	0.9	Medio
100.0	0.9	Alto

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

De acuerdo con los criterios de aceptación de la guía EURACHEM y las recomendaciones del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 del 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos un % CV $\leq 15 \%$ se considera adecuado en el rango de concentración evaluado, por lo tanto, todos los niveles evaluados cumplen con los criterios establecidos, evidenciando que el método presenta una buena repetibilidad en el rango de trabajo considerado.

La precisión intermedia se evaluó con el objetivo de determinar la variabilidad del método bajo condiciones normales de uso en el laboratorio. Para ello, dos analistas realizaron los ensayos utilizando soluciones estándar (Tabla 38) y en muestras de pescado enriquecidas (Tabla 39), esto se realizó en días distintos, utilizando el mismo equipo e idénticas condiciones de trabajo. Se consideran ambos resultados para evaluar la precisión intermedia ya que la información que se obtiene mediante el análisis de soluciones estándar da información del desempeño instrumental bajo condiciones variables y el análisis de muestras enriquecidas refleja el comportamiento del método en la matriz, lo cual es más representativo del uso final del método.

Tabla 38. Resultados de la evaluación de la precisión intermedia en solución estándar de concentración 0.400 µg/mL.

# Réplica	Analista 1		Analista 2	
	Área	Concentración (µg/mL)	Área	Concentración (µg/mL)
1	92762804	0.382	94907618	0.391
2	92666486	0.382	95421882	0.393
3	92353122	0.381	96132624	0.396
4	92501504	0.381	94315689	0.389
5	95693257	0.394	93813428	0.387
6	93667683	0.386	94883563	0.391
7	93767132	0.386	92545027	0.381
8	93291578	0.384	93777141	0.386
9	95247907	0.393	95427706	0.393
10	93700905	0.386	95527678	0.394
11	93247757	0.384	94197778	0.388
12	94360055	0.389	93394934	0.385
13	93188743	0.384	93492814	0.385
Promedio	93572995	0.386	94449068	0.389
S.Std	1017771	0.004	1036354	0.004
%CV	1.1 %	1.1 %	1.1 %	1.1 %

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

La precisión intermedia (Tabla38) fue evaluada mediante la preparación y análisis de una solución estándar de histamina de concentración de

0.400 µg/mL, el ensayo se realizó en dos días distintos por dos analistas independientes. El Analista 1 obtuvo un valor medio de concentración de 0.386 µg/mL con un CV de 1.1 %, mientras que el Analista 2 obtuvo un valor medio de 0.389 µg/mL con un %CV de 1.1 %.

Tabla 39. Resultados de la evaluación de la precisión intermedia en muestras de pescado enriquecidas a 100 mg/kg.

# Réplica	Analista 1		Analista 2	
	Concentración (mg/kg)	% R	Concentración (mg/kg)	% R
1	84.4	84.4%	83.8	83.8%
2	82.0	82.0%	81.6	81.6%
3	84.2	84.2%	85.9	85.9%
4	83.5	83.5%	81.6	81.6%
5	82.1	82.1%	82.7	82.7%
6	85.1	85.1%	83.3	83.3%
7	84.2	84.2%	84.3	84.3%
8	83.2	83.2%	87.4	87.4%
9	80.8	80.8%	87.2	87.2%
10	80.6	80.6%	82.6	82.6%
Promedio	83.0		84.0	
S.Std	1.6		2.1	
%CV	1.9%		2.5%	

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

También se prepararon muestras de pescado enriquecidas a 100 mg/kg y se analizaron en dos días distintos por dos analistas independientes. El Analista 1 obtuvo un promedio de 83.0 con una desviación estándar de 1.6, lo que corresponde a un coeficiente de variación (% CV) de 1.9 %. Por su parte, el Analista 2 presentó un promedio de 84.0, con una desviación estándar de 2.1 y un % CV de 2.5 %.

Con el propósito de verificar la homogeneidad de las varianzas entre los resultados de ambos analistas en diferentes días, se aplicó la prueba F. El valor calculado fue $F = 1.85$, con 9 grados de libertad. Al comparar el valor calculado con el valor crítico ($F = 3.18$, para $\alpha = 0.05$), se observa

que $F_{(calc)} < F_{(crit)}$, por lo que no existe diferencia significativa entre las varianzas de los dos analistas.

Se aplicó la prueba t de Student (dos muestras independientes) la cual nos dio un $t = -1.26$ y $p = 0.224$, como $p > 0.05$, no existe diferencia significativa entre los resultados de ambos analistas. También se aplicó la prueba ANOVA de una vía donde se obtuvo valores para $F = 1.59$ y $p = 0.223$, donde el valor de $p > 0.05$, confirmando que no hay diferencia significativa entre los grupos. Esto indica que la variabilidad observada se debe al azar y no a diferencias reales en el desempeño de los analistas.

En ambos casos, los valores de % CV se mantuvieron por debajo del 15%, de acuerdo con los criterios de aceptación de la guía EURACHEM y las recomendaciones del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 del 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos, lo que indica que el método presenta una adecuada precisión entre analistas.

Los resultados obtenidos mostraron que los coeficientes de variación (% CV) se mantuvieron dentro de los límites de aceptación recomendados, lo que indica que el método presenta una buena reproducibilidad a nivel de laboratorio. Esto confirma que el procedimiento es robusto frente a variaciones menores asociadas a diferentes operadores y días de análisis, garantizando la confiabilidad de los resultados en su aplicación rutinaria.

4.5.6. Sensibilidad analítica.

La sensibilidad del método se evaluó a partir de la pendiente de la curva de calibración, obtenida en tres repeticiones independientes (Tabla 40).

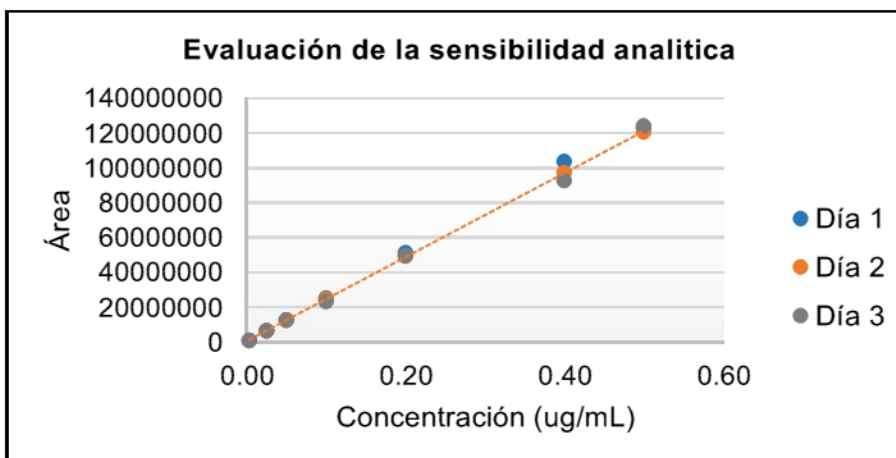
Tabla 40. Evaluación de la pendiente de la curva de calibración.

Concentración (µg/mL)	Día 1	Día 2	Día 3
0.0035	1051637	1054216	966311
0.025	6639865	6565461	6635917
0.050	12645155	12571046	12833993
0.100	25414881	24703321	23275272
0.200	51434031	49348262	49595108
0.400	103812980	97321222	92782513
0.500	123419258	120719660	124319053
Pendiente (m) =	250 898 225	241 212 567	242 291 914
Intercepto (b) =	519 916	315 217	90 444
R² =	0.9989	0.9999	0.9978
Promedio (m) =	244 800 902		
Des Std (m) =	5 307 943		
%CV (m) =	2.2%		

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

Los valores de la pendiente para cada curva de calibración se muestran en la tabla 40 y en la gráfica 16, con un promedio de 244 800 902, una desviación estándar de 5 307 943 y un coeficiente de variación de 2.2 %. Estos resultados evidencian una buena reproducibilidad de la sensibilidad, considerando que un CV inferior al 5 % se considera aceptable en métodos cromatográficos.

Gráfica 16. Evaluación de la sensibilidad analítica.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

4.5.7. Exactitud o veracidad.

La exactitud del método se evaluó mediante el análisis de muestras blanco de pescado fortificadas con concentraciones conocidas de histamina en cuatro niveles: LOQ (0.91 mg/kg), bajo (6.25 mg/kg), medio (25 mg/kg) y alto (100 mg/kg). El cálculo de la recuperación se realizó corrigiendo la concentración determinada con respecto al valor presente en la muestra blanco. Los resultados de recuperación se presentan en la Tabla 41.

En el nivel LOQ, las recuperaciones oscilaron entre 83.9 % y 99.3 %, con un promedio de 90.2 % y un % CV = 6.5 %, atribuible a la proximidad con el límite de cuantificación. Para los niveles bajo, medio y alto, los porcentajes de recuperación fueron más consistentes, con promedios de 95.2 %, 94.1 % y 98.5 %, respectivamente, y coeficientes de variación entre 1.5 % y 2.0 %. Todos los resultados se encuentran dentro del rango de aceptación recomendado (80–120 %), por EURACHEM y del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 del 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos, confirmando que el método presenta una exactitud adecuada para la cuantificación de histamina en muestras de pescado fresco.

Tabla 41. Resultados de los % de recuperación por nivel fortificado.

Muestra fortificada	Recuperación (mg/kg)	Promedio (mg/kg)	% R	Promedio (% R)	S. Std	CV
LOQ (Concentración (mg/kg) = 0.91)	0.8	0.8	90.4 %	90.2 %	0.06	7.5 %
	0.9		97.6 %			
	0.9		99.3 %			
	0.8		84.8 %			
	0.8		85.4 %			
	0.8		83.9 %			
Nivel de fortificación Bajo	Recuperación (mg/kg)	Promedio	% R	Promedio	S. Std	CV
(Concentración (mg/kg) = 6.25)	5.8	5.9	92.8 %	95.2 %	0.12	2.0 %
	6.1		97.3 %			
	6.0		96.2 %			
	5.8		92.9 %			
	6.0		96.6 %			
	5.9		95.2 %			
Nivel de fortificación Medio	Recuperación (mg/kg)	Promedio	% R	Promedio	S. Std	CV
(Concentración (mg/kg) = 25.0)	23.6	23.5	94.2 %	94.1 %	0.41	1.7 %
	22.9		91.8 %			
	24.2		96.6 %			
	23.7		94.6 %			
	23.6		94.4 %			
	23.2		93.0 %			
Nivel de fortificación Alto	Recuperación (mg/kg)	Promedio	% R	Promedio	S. Std	CV
(Concentración (mg/kg) = 100.0)	98.3	98.5	98.3 %	98.5 %	1.52	1.5 %
	96.8		96.8 %			
	101.0		101.0 %			
	99.2		99.21 %			
	97.1		97.1 %			
	98.6		98.7 %			

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

4.5.8. Robustez.

Con el fin de evaluar la robustez del método analítico se realizaron variaciones intencionales en las condiciones experimentales de: pH del buffer de extracción (± 0.2 unidades), tiempo de reacción (± 30 segundos) y volumen de derivatizante (volumen de OPA $\pm 5\%$), se evaluó el efecto de estos cambios según el procedimiento de Youden y Steiner, los resultados se resumen en la Tabla 42.

Tabla 42. Resultados de la evaluación de robustez mediante el procedimiento de Youden y Steiner.

Factor o variable	$\bar{X}$ (alto)	$\bar{X}$ (bajo)	Diferencia (Δ)	Umbral ($2s_T$)	Resultado
A (pH del buffer de extracción ± 0.2 unidades)	87.12	88.25	-1.13	3.70	Robusto
B (Tiempo de reacción ± 30 segundos)	82.82	80.30	2.52	3.70	Robusto
C (Volumen OPA $\pm 5\%$)	82.61	85.40	-2.79	3.70	Robusto

Siendo $\bar{X}$ (alto) = Promedio valores nivel superior (+)

Siendo $\bar{X}$ (bajo) = Promedio valores nivel inferior (-)

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

El criterio de aceptación establecido es: si $|\Delta| < 2s_T$ la variable se consideraba robusta, pero si $|\Delta| \geq 2s_T$ la variable se considera crítica o sensible a cambios. El valor de s_T (desviación estándar global) se obtiene de la evaluación de precisión intermedia en muestras de pescado fortificadas (analista 1, $s = 1.57$ y analista 2, $s = 2.13$), se tomó el promedio de ambas desviaciones estándar para el cálculo del valor umbral ($2s_T = 3.7$). A partir de los resultados obtenidos, la diferencia de promedios fue inferior al umbral establecido. Por lo tanto, se concluye que el método es robusto frente a pequeñas variaciones en el pH del buffer de extracción de la muestra, el tiempo de reacción y el volumen de derivatizante. Estos resultados respaldan la confiabilidad del procedimiento en condiciones rutinarias de análisis de histamina en pescado.

4.5.9. Estimación de la incertidumbre de la medición

En este estudio, la estimación de la incertidumbre se realizó mediante un enfoque basado en el desempeño analítico del método, considerando como principales fuentes de variabilidad la precisión intermedia, el sesgo asociado a la recuperación y la calibración analítica (Tabla 43).

La precisión intermedia fue identificada como la principal contribución a la incertidumbre, debido a que integra las variaciones asociadas a cambios de analista, días de análisis, preparación de muestras, derivatización e inyección cromatográfica.

La contribución del sesgo fue evaluada a partir de los ensayos de recuperación realizados en muestras de pescado fortificadas. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 90.2 % y 98.5 %, indicando ausencia de errores sistemáticos significativos y una adecuada veracidad del método.

En cuanto a la calibración analítica, la curva de calibración presentó un comportamiento lineal adecuado, con un coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.9999$ y baja variabilidad de la pendiente (%CV = 2.2 %), por lo que su contribución a la incertidumbre fue considerada baja.

Las fuentes asociadas a la preparación de soluciones, incluyendo la pureza del estándar, el material volumétrico y las micropipetas calibradas, se consideraron de menor impacto frente a la variabilidad observada en la precisión del método.

Tabla 43. Resumen de las principales fuentes de incertidumbre.

Fuente	Valor observado	Consideración	Contribución relativa
Precisión intermedia	CV = 2.2 %	Incluida	Principal
% Recuperación	Promedio 94.5 %, sesgo = 5.5 %	Incluida	Moderada
Curva de calibración	CV(m) = 2.2 %	Incluida	Moderada
Material volumétrico	Certificado de calibración	No significativa	Baja
Micropipetas	Certificado de calibración	No significativa	Baja
Pureza estándar	Certificado de análisis (≥ 97 %)	No significativa	Baja

La incertidumbre estándar combinada (u_c) se estimó mediante la combinación de las contribuciones asociadas a la precisión intermedia, recuperación y calibración analítica. Se obtuvo un valor de $u_c = 6.3\text{mg/kg}$. Posteriormente, la incertidumbre expandida (U) se calculó aplicando un factor de cobertura $k=2$, correspondiente a un nivel de confianza aproximado del 95 %, obteniéndose: $U = \pm 12.6 \text{ mg/kg}$.

Este resultado indica que el método presenta una incertidumbre adecuada para la determinación de histamina en pescado no procesado y demuestra su confiabilidad para aplicaciones de control y vigilancia sanitaria.

4.6. Discusión.

La validación de un método analítico es un paso fundamental para garantizar la confiabilidad de los resultados, por lo que en este estudio, la validación del método cromatográfico para la determinación de histamina en pescado se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por Eurachem, se evaluaron parámetros como selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, sensibilidad analítica, exactitud y robustez, con el propósito de demostrar que el procedimiento cumple con los requisitos de desempeño necesarios para la cuantificación de histamina en la matriz de pescado (resumen en tabla 44). A continuación, se presentan y discuten los principales hallazgos obtenidos en cada una de estas etapas de la validación.

- Para la evaluación de la selectividad se analizaron individualmente las aminas: tiramina, putrescina, cadaverina e histamina, así como una mezcla estándar de las mismas, con el fin de determinar la capacidad del método para discriminar la señal de histamina frente a posibles interferencias, ya que es común la presencia simultánea de diferentes aminas biogénicas en los productos pesqueros. Los resultados obtenidos para el primer ensayo (análisis individual), donde se inyectó la solución stock en HCl 0.1 M de cada amina, se evidenciaron picos bien definidos y tiempos de retención diferenciados para cada amina, lo que permitió una clara identificación cromatográfica. En el segundo ensayo (mezcla de aminas), al utilizar buffer de acetato de sodio (pH = 5) como medio de dilución previo a la derivatización, se observaron diferencias en el comportamiento para alguna de las aminas posiblemente porque la eficiencia de la derivatización depende no solo del agente derivatizante sino también del pH y la composición del medio de reacción, factores que pueden alterar la estabilidad de los derivados fluorescentes. A pesar de estas variaciones en las demás aminas, la histamina mantuvo un comportamiento consistente en ambos

ensayos, con un área de pico estable y un tiempo de retención reproducible. Estos resultados confirman que las condiciones optimizadas del método aseguran una respuesta selectiva y específica para la histamina, sin interferencias relevantes de otras aminas biogénicas comúnmente presentes en el pescado. Los resultados son coherentes con lo descrito en la literatura, las aminas biogénicas como: tiramina, putrescina y cadaverina pueden mostrar variaciones en área y tiempos de retención bajo distintos buffers (pH = 5 vs HCl 0.1 M). Esto concuerda con lo descrito en el estudio de Chen et al. (2015) que describen que la eficiencia de la derivatización y la respuesta cromatográfica dependen del pH del medio de reacción, el tiempo de reacción y la concentración de OPA (Chen et al., 2016).

- La linealidad se evaluó en el intervalo de 0.035 - 0.500 µg/mL, dentro de este intervalo la curva cumple con el criterio de aceptación de un coeficiente de determinación ($R^2 \geq 0.995$), lo que confirma la capacidad del método para cuantificar la histamina. El análisis de residuos reveló una ligera dispersión en las concentraciones más bajas y altas, lo que sugiere la presencia de heterocedasticidad. Sin embargo, la aplicación de la prueba de Levene no mostró diferencias estadísticamente significativas en las varianzas ($p = 0.080 > 0.05$), confirmando la homocedasticidad en el rango lineal evaluado. Este hallazgo fue reforzado por la prueba de Cochran, en la cual el valor experimental ($G_{exp} = 0.595$) fue menor que el valor crítico ($G_{crit} = 0.727$), evidenciando que no existió una varianza individual atípica que comprometa la regresión. Ambos análisis estadísticos respaldan la consistencia de la respuesta del método y justifican el uso de una regresión no ponderada. Adicionalmente, se evaluó el posible efecto matriz comparando curvas de calibración preparadas en solución y en matriz de pescado. El cálculo del efecto matriz ($EM = 98.7\%$) demostró que no existieron interferencias significativas derivadas de la matriz, ya que se encuentra dentro del rango aceptado (80 –

120 %) y por debajo de la diferencia máxima del 5 % en la pendiente establecida en guías de validación. Este resultado permite concluir que la curva de calibración en solución es adecuada para la cuantificación de histamina en muestras de pescado, simplificando el procedimiento analítico sin comprometer la exactitud. Los resultados de linealidad ($R^2 = 0.9999$) obtenidos en este estudio son consistentes con los valores reportados por Kounnoun et al. (2020) quienes obtuvieron una linealidad satisfactoria en el rango de 0.031 a 0.500 $\mu\text{g/mL}$, estos autores también ensayaron en matriz de pescado y concluyen que la matriz no ejerce un efecto significativo en la cuantificación de histamina (Kounnoun et al., 2020). En el estudio de Tran et al. (2020) se evaluó el efecto matriz obteniendo valores de EM en el rango de 98.23 % a 104.01 % valores dentro del rango aceptable (de 80 % a 120 %), estos valores demuestran que la influencia del efecto matriz en la medición es insignificante.

- En este estudio, el LD y el LOQ se estimó a partir de la relación señal/ruido ($S/N = 3$) y ($S/N = 10$), utilizando 20 repeticiones de un blanco de muestra. Para el LD el valor calculado fue de 0.00120 $\mu\text{g/mL}$ (0.30 mg/kg), lo que evidencia que el método es capaz de detectar concentraciones muy bajas de histamina, este resultado refleja una alta sensibilidad del método y asegura su utilidad en estudios de control de calidad donde se requiere detectar trazas de la amina. Para el LOQ el valor obtenido fue de 0.00365 $\mu\text{g/mL}$ (0.91 mg/kg), lo cual indica que el método puede cuantificar con confiabilidad concentraciones de histamina iguales o superiores a este umbral. Los resultados obtenidos para LD y LOQ demuestran que el método cromatográfico puede cuantificar concentraciones de histamina dentro de los límites regulatorios establecidos en normativas internacionales para pescado y productos pesqueros (rango de 50 - 100 mg/kg), garantizando que el método es adecuado para verificar el cumplimiento normativo. Los valores obtenidos en este estudio para LOD y LOQ se encuentran en el rango de métodos de alta sensibilidad reportados, como el descrito

por Tran et al. (2020) en pescado y salsa de pescado mediante UPLC-MS/MS quienes reportaron un LOD de 0.12 mg/kg y un LOQ de 0.40 mg/kg, valores que son comparables y confirman que el presente método ofrece un desempeño competitivo en términos de sensibilidad (Tran et al., 2020).

- En este estudio, la precisión fue evaluada a través de la repetibilidad instrumental, la repetibilidad del método y la precisión intermedia. Primero se evaluó la repetibilidad instrumental, la cual evidenció una tendencia decreciente del % CV con el aumento de la concentración, con valores que oscilaron entre 1.54 % en el LOQ y 0.58 % en el nivel alto. Este comportamiento es característico en métodos cromatográficos, donde la variabilidad relativa tiende a ser mayor en concentraciones próximas al límite de cuantificación. No obstante, todos los niveles estuvieron muy por debajo del criterio de aceptación de 5 %, lo que confirma un desempeño instrumental consistente y confiable. Lo siguiente evaluado fue la repetibilidad del método, evaluada en muestras de pescado enriquecidas, se obtuvo un % CV de 6.19 % en el nivel más bajo (LOQ) y menores al 1 % en los niveles medio y alto. Estos valores cumplen con los criterios de aceptación establecidos ($\% \text{ CV} \leq 15 \%$) y se encuentran dentro de los rangos reportados en estudios similares de validación de métodos cromatográficos, como el de Kounoun et al. (2020) los resultados de repetibilidad y precisión oscilaron entre 1.37 y 2.25 %. Por último, se evaluó la precisión intermedia, evaluada mediante la participación de dos analistas en días diferentes, demostró % CV inferiores al 5 % tanto en soluciones estándar como en muestras enriquecidas. Se aplicó la prueba t de Student para dos muestras independientes y la prueba de ANOVA de una vía y en ambos casos $p > 0.05$ confirmado que los resultados de ambos analistas son estadísticamente equivalentes. Adicionalmente, al aplicar la prueba F, se obtuvo $F_{(\text{calc})} < F_{(\text{crit})}$, indicando que la variabilidad entre los analistas es también estadísticamente equivalente. Estos resultados evidencian la reproducibilidad del método y que el

desempeño del método no se ve afectado por variaciones relacionadas con el operador o el momento de ejecución. Los valores obtenidos en este estudio son consistentes con los valores reportados en el estudio reciente de Tran et al. (2020), validación por UPLC-MS/MS, donde los CV para la precisión intermedia oscilaron en rango de 2.34 % y el 10.21 %.

- La sensibilidad del método fue evaluada a partir de la pendiente de la curva de calibración en tres repeticiones independientes. El valor promedio de la pendiente fue de 244 800 902, con una desviación estándar de 5 307 943 y un coeficiente de variación (% CV) de 2.2 %. Este nivel de variabilidad es bajo y se encuentra dentro de los criterios de aceptación generalmente establecidos para métodos cromatográficos, en los cuales un % CV inferior al 5 % se considera indicativo de una buena estabilidad de la respuesta instrumental. La pendiente de la curva se considera un parámetro crítico de desempeño debido a su relación directa con la sensibilidad del método, según las recomendaciones de la guía Eurachem (2025), una pendiente alta y constante entre corridas analíticas indica una buena sensibilidad del sistema. Los resultados de sensibilidad analítica obtenidos coinciden con lo reportado en la literatura para métodos cromatográficos de histamina con derivatización y detección fluorométrica. En el estudio de Ghazi et al., la validación incluyó pendientes robustas con CV inferiores al 5 %, lo que respalda que los valores que se obtuvieron en este trabajo muestran sensibilidad adecuada para análisis rutinarios (Ghazi et al., 2015).
- La exactitud del método fue evaluada mediante ensayos de recuperación en muestras de pescado fortificadas con histamina en varios niveles de concentración. En el nivel correspondiente al LOQ (0.91 mg/kg), los valores de recuperación oscilaron entre 83.4 % y 99.3 %, con un promedio de 90.2 % y un % CV de 6.5 %. Aunque se observó un mayor % CV en este nivel, este comportamiento es esperado en concentraciones cercanas al límite de cuantificación,

donde los efectos de la matriz y la sensibilidad instrumental suelen tener un mayor impacto. Para los niveles bajo (6.25 mg/kg), medio (25 mg/kg) y alto (100 mg/kg), los valores de recuperación fueron más consistentes, con promedios de 95.2 %, 94.1 % y 98.5 %, respectivamente, y coeficientes de variación inferiores al 5 %. Los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran dentro del rango de aceptación recomendado por la guía EURACHEM (80 - 120 %) y por el Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808, que establece criterios de desempeño para métodos analíticos aplicados al control oficial. Los resultados obtenidos en el presente estudio para la exactitud se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura para métodos validados de histamina en matrices de pescado. Estudios anteriores como el de Ghazi et al. (2015) reportaron una recuperación promedio de ~96 % con % CV < 8 % utilizando HPLC-FLD en muestras enriquecidas de pescado (Ghazi et al., 2015); Kounnoun et al. (2020) reportaron una recuperación promedio de ~98 % con % CV < 3 % utilizando HPLC-FLD en muestras enriquecidas de pescado (Kounnoun et al., 2020). Estos antecedentes respaldan que la exactitud de nuestro método es adecuada, incluso en niveles cercanos al LOQ.

- Para evaluar la robustez del método se aplicó el procedimiento propuesto por los autores Youden y Steiner, se introdujeron cambios controlados en tres factores críticos del método: pH del buffer de extracción (± 0.2 unidades), tiempo de reacción (± 30 segundos) y volumen de derivatizante OPA (± 5 %). El criterio de aceptación se estableció a partir de la desviación estándar de la precisión intermedia, considerando como umbral el doble de dicho valor ($2s_T = 3.70$). Los resultados mostraron que las diferencias observadas entre los niveles alto y bajo de cada variable (Δ) fueron inferiores al umbral, con valores de + 1.13 para el pH del buffer de extracción, - 2.52 para el tiempo de reacción y - 2.79 para el volumen de derivatizante. Estos resultados indican que ninguno de los factores evaluados introdujo un efecto significativo sobre la

respuesta del método, lo que demuestra que el procedimiento analítico es robusto frente a estas variaciones. Los resultados obtenidos concuerdan con recomendaciones metodológicas y hallazgos previos que señalan que, si la etapa de derivatización está adecuadamente optimizada, pequeñas desviaciones de pH, tiempo o volumen no comprometen la cuantificación siempre que se mantenga control de la etapa crítica (Stroka et al., 2014).

- El valor de incertidumbre de la medición obtenido en este estudio (± 13 mg/kg) fue consistente con los reportado en la literatura para métodos cromatográficos aplicados a la determinación de histamina en productos pesqueros. Cicero et al. reportaron incertidumbres expandidas entre 5 % y 16 % para métodos UHPLC aplicados a pescado (Cicero et al., 2020), mientras que Jinadasa et al. informaron una incertidumbre expandida aproximada del 11 % para un método HPLC-FL validado en productos pesqueros (Jinadasa et al., 2016). En ambos estudios, las principales contribuciones a la incertidumbre estuvieron asociadas a la precisión y recuperación del método, comportamiento similar al observado en este estudio.

Tabla 44. Resumen de los resultados obtenidos en la verificación del método.

Parámetro evaluado		Criterio de aceptación	Resultado obtenido	Cumple
Selectividad		Ausencia de interferencias en el tiempo del analito.	Señal de la histamina estable y bien definida, las otras aminos no interfieren.	Si cumple
Linealidad (R^2)		$R^2 \geq 0.995$	Intervalo de trabajo del método 0.035–0.500 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 \geq 0.9999$, CV (m) = 0.3%), para el análisis de residuos se aplicó la prueba de Levene ($p = 0.080 > 0.05$), confirmando la homocedasticidad en el rango lineal.	Si cumple
Límite de detección y cuantificación.	LD ($\mu\text{g/mL}$)	No definido estrictamente, pero justificado por cálculo estándar.	Blanco de muestra $n = 20$, el valor calculado para LD fue de 0.00120 $\mu\text{g/mL}$ (0.30 mg/kg).	Si cumple
	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Justificado mediante curvas y blancos.	Para el LOQ el valor obtenido fue de 0.00365 $\mu\text{g/mL}$ (0.91 mg/kg).	Si cumple
Precisión.	Repetibilidad instrumental.	%CV $\leq 5\%$ para estándares (Eurachem).	% CV por nivel para $n = 6$: LOQ = 1.54%, nivel bajo = 0.98%, nivel medio = 0.69% y nivel alto = 0.58%.	Si cumple
	Repetibilidad del método.	%CV $\leq 15\%$ para muestras, Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 del 2021	% CV por nivel para $n = 6$: LOQ = 6.19%, nivel bajo = 2.03%, nivel medio = 0.94% y nivel alto = 0.93%.	Si cumple
	Precisión intermedia.	%CV $\leq 15\%$ para muestras, Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 del 2021	% CV por analista para $n = 10$: Analista 1 = 1.86% y analista 2 = 2.54%.	Si cumple
Sensibilidad (pendiente m)		Coherencia entre curvas y %CV $\leq 5\%$.	%CV (m) = 2.2%	Si cumple

Parámetro evaluado	Criterio de aceptación	Resultado obtenido	Cumple
Exactitud o veracidad.	En el rango de 80–120%, recomendación Eurachem y Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808.	% R por nivel para n = 6: Valor Promedio: LOQ = 90.25% y %CV = 7.51% Nivel bajo = 95.17% y %CV = 2.02% Nivel medio = 94.11% y %CV = 1.73% Nivel alto = 98.51% y %CV = 1.54%	Si cumple
Robustez.	Si $ \Delta < 2s_T$ la variable se consideraba robusta, pero si $ \Delta \geq 2s_T$ la variable se considera crítica o sensible a cambios. Donde s_T es el valor de la desviación estándar de la precisión intermedia ($2s_T = 3.70$).	Variable #1: pH del buffer de extracción, $\Delta = +1.13$. Variable #2: tiempo de reacción, $\Delta = -2.52$. Variable #3: volumen de derivatizante, $\Delta = -2.79$. $ \Delta < 2s_T$, ninguno de los factores evaluados introdujo un efecto significativo sobre la respuesta del método.	Si cumple
Incertidumbre global del método	Estimación a partir de los datos de validación del método.	$U = \pm 13$ mg/kg. (incertidumbre global del método)	Si cumple

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

4.7. Resultados del análisis de las muestras.

4.7.1. Niveles de histamina encontrados en las muestras por especie.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los niveles de histamina en las muestras de pescado no procesado, agrupadas según la especie analizada. Los valores fueron expresados en miligramos por kilogramo (mg/kg) se incluyen los parámetros de %CV, desviación estándar (DE), error estándar (EE) y el porcentaje de muestras que superaron los niveles de intervención (50 mg/kg) y el límite máximo permitido (200 mg/kg), según el reglamento COPANIT, la FDA y la UE.

➤ Atún aleta amarilla.

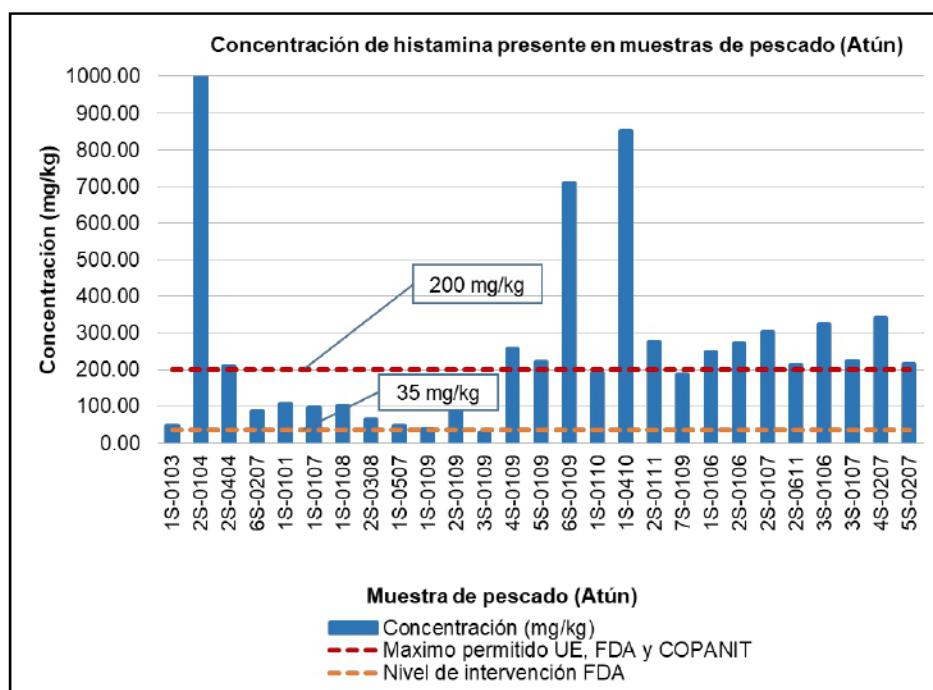
El atún aleta amarilla presentó los niveles más elevados de histamina entre las especies analizadas (Tabla 45), con valores que en algunos casos superaron los 200 mg/kg, de las 27 muestras analizadas 15 superan el límite máximo permitido lo que representa el 56% de las muestras, incluso una muestra alcanzó concentraciones extremas de 2050 mg/kg. Este comportamiento es coherente con las características propias de la especie, ya que el atún pertenece a la familia *Scombridae*, conocida por su alto contenido de histidina libre en el músculo lo que hace que sea más susceptible a al deterioro bacteriano cuando hay ruptura de la cadena de frío o exposición prolongada a temperatura ambiente.

Tabla 45. Resultados obtenidos en las muestras de Atún aleta amarilla.

#	ID Muestra	Concentración (mg/kg)	%CV (n = 2)	± Error Estándar (EE)
1	1S-0103	46.8	5.0	1.7
2	2S-0104	2050	0.9	12.3
3	2S-0404	208.5	1.4	2.1
4	6S-0207	88.3	5.9	3.7
5	1S-0101	106.6	12.7	9.6
6	1S-0107	96.4	2.0	1.4
7	1S-0108	102.5	1.9	1.4
8	2S-0308	65.4	4.2	1.9
9	1S-0507	48.5	6.1	2.1
10	1S-0109	38.6	12.7	3.5
11	2S-0109	84.7	2.1	1.2
12	3S-0109	27.1	4.8	0.9
13	4S-0109	257.2	2.7	5.0
14	5S-0109	222.1	2.6	4.0
15	6S-0109	711.6	5.4	27.0
16	1S-0110	191.8	4.2	5.7
17	1S-0410	853.7	3.2	19.1
18	2S-0111	275.6	10.2	19.8
18	7S-0109	185.9	2.1	2.7
20	1S-0106	249.5	3.4	5.9
21	2S-0106	271.0	9.3	17.9
22	2S-0107	303.9	1.1	2.3
23	2S-0611	215.0	3.8	5.8
24	3S-0106	323.2	2.1	4.8
25	3S-0107	225.1	2.2	3.5
26	4S-0207	342.4	11.3	27.2
27	5S-0207	215.6	6.6	10.0

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

Grafica 17. Niveles de histamina encontrados en muestras de atún aleta amarilla.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

➤ Dorado.

Evaluando los resultados obtenidos el dorado ocupó una posición intermedia, lo que sugiere que es un pescado menos susceptible a la formación de histamina que el atún. Los valores obtenidos (Tabla 46) se mantuvieron por debajo del límite reglamentario, 19 de las 20 muestras analizadas (95 %) superaron el nivel de intervención establecido por la FDA (35 mg/kg). De acuerdo con la FDA niveles de histamina mayores a 35 (mg/kg) son indicativos de una descomposición significativa y una manipulación inadecuada del pescado. Estos resultados evidencian que el dorado también es una especie susceptible a la formación de histamina si no se mantiene una adecuada refrigeración. Esto puede atribuirse a que, al igual que el atún, el dorado es una especie alta actividad natatoria, con predominio de músculo oscuro, lo cual favorece

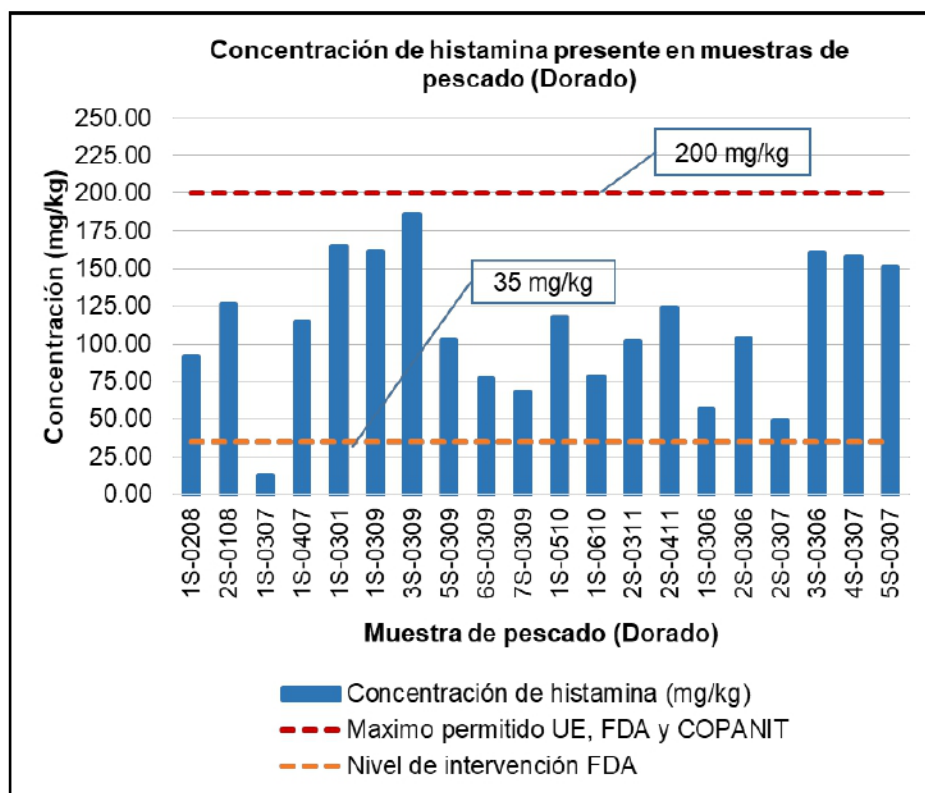
una mayor concentración de histidina libre precursor directo de la histamina.

Tabla 46. Resultados obtenidos en las muestras de Dorado.

#	ID Muestra	Concentración (mg/kg)	%CV (n =2)	± Error Estándar (EE)
1	1S-0208	91.1	13.5	8.7
2	2S-0108	126.2	7.1	6.4
3	1S-0307	12.8	6.6	0.6
4	1S-0407	114.9	9.8	7.9
5	1S-0301	164.8	2.6	3.0
6	1S-0309	161.3	0.1	0.1
7	3S-0309	186.0	4.2	5.5
8	5S-0309	102.2	7.2	5.2
9	6S-0309	76.9	7.1	5.9
10	7S-0309	68.3	10.5	5.8
11	1S-0510	117.3	2.0	1.4
12	1S-0610	78.1	3.7	2.0
13	2S-0311	101.8	8.4	4.0
14	2S-0411	124.5	9.4	8.3
15	1S-0306	56.5	8.3	3.3
16	2S-0306	104.1	11.8	8.7
17	2S-0307	49.4	8.5	3.0
18	3S-0306	160.8	3.2	3.6
18	4S-0307	157.4	3.0	3.3
20	5S-0307	151.2	2.7	2.9

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

Grafica 18. Niveles de histamina encontrados en muestras de Dorado.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

➤ Sierra.

El pescado sierra mostró los niveles más bajos de histamina, sin casos que excedieran el límite reglamentario (Tabla 47). Aunque ninguna muestra superó el límite reglamentario, el 100% de las muestras analizadas (27) superaron el nivel de intervención establecido por la FDA (35 mg/kg). Lo que sugiere la presencia de procesos de descomposición incipiente o una manipulación inadecuada durante la cadena de frío.

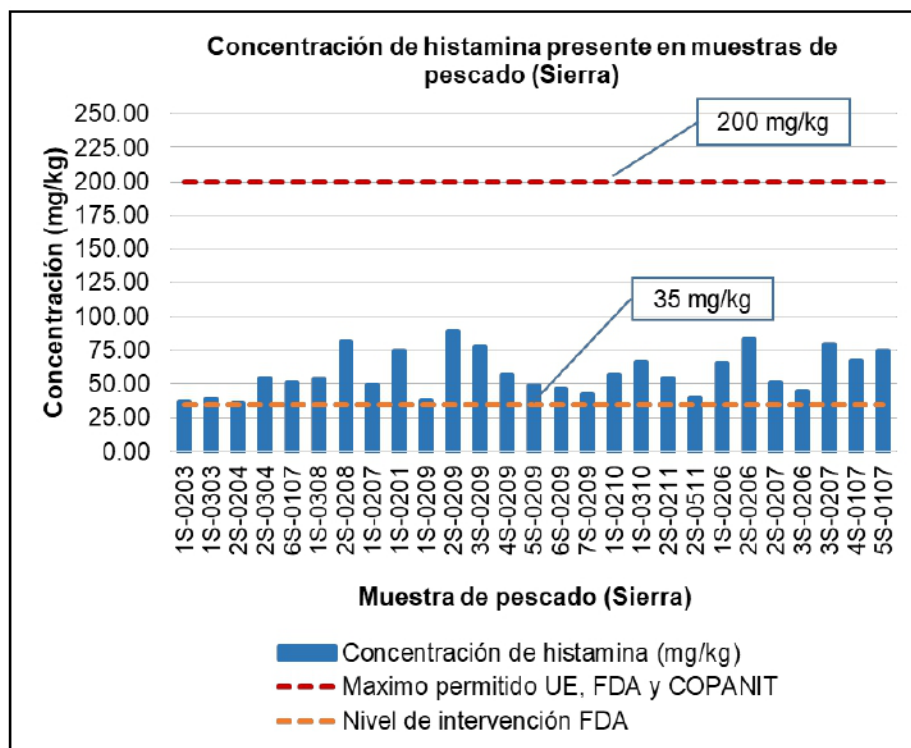
Tabla 47. Resultados obtenidos en las muestras de Sierra.

#	ID Muestra	Concentración (mg/kg)	%CV (n =2)	± Error Estándar (EE)
1	1S-0203	36.7	0.2	0.06
2	1S-0303	38.9	1.3	0.48
3	2S-0204	36.4	10.3	5.94
4	2S-0304	54.5	10.2	2.64
5	6S-0107	51.2	1.5	0.37
6	1S-0308	53.9	4.4	1.21
7	2S-0208	81.7	8.3	3.20
8	1S-0207	49.2	10.7	3.74
9	1S-0201	74.2	6.8	3.58
10	1S-0209	37.4	0.9	0.23
11	2S-0209	88.6	3.2	1.75
12	3S-0209	77.6	3.3	1.30
13	4S-0209	56.5	9.5	3.26
14	5S-0209	48.7	5.5	2.22
15	6S-0209	46.4	10.9	6.83
16	7S-0209	42.0	7.9	2.59
17	1S-0210	56.8	12.6	3.74
18	1S-0310	66.4	0.7	0.34
18	2S-0211	54.6	2.9	1.37
20	2S-0511	40.2	5.0	2.93
21	1S-0206	65.9	2.8	1.06
22	2S-0206	82.9	5.3	1.50
23	2S-0207	51.5	5.8	2.12
24	3S-0206	44.5	0.6	0.18
25	3S-0207	79.2	4.9	2.73
26	4S-0107	67.2	3.0	1.42
27	5S-0107	74.5	7.7	4.03

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

El pescado sierra presentó niveles bajos, lo que podría relacionarse tanto con su menor contenido de histidina como con un mejor manejo de la cadena de frío en las muestras recolectadas.

Grafica 19. Niveles de histamina encontrados en muestras de Sierra.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

Los resultados reflejan una marcada variabilidad entre las especies analizadas, lo que puede atribuirse a la interacción entre factores intrínsecos (propios de la especie) y factores extrínsecos (asociados al manejo post-captura y las condiciones de comercialización).

Entre los factores intrínsecos, el contenido natural de histidina libre en el músculo es determinante, ya que constituye el precursor directo de la histamina. Las especies de músculo oscuro y alta actividad natatoria, como el atún y el dorado, presentan mayor contenido de histidina, lo que incrementa el riesgo de acumulación de histamina durante el almacenamiento.

Por su parte, los factores extrínsecos tienen un impacto significativo en la formación de histamina. La ruptura de la cadena de frío, la exposición prolongada a temperatura ambiente, el tiempo transcurrido desde la

captura y las prácticas deficientes de manipulación e higiene favorecen la proliferación de bacterias con actividad histidina descarboxilasa, responsables de la conversión de histidina en histamina.

En conjunto, los hallazgos sugieren que el riesgo asociado a la presencia de histamina no depende únicamente de la especie, sino de la combinación entre su biología y las condiciones post-captura y de comercialización.

Tabla 48. Resumen de los resultados obtenidos en las muestras de pescado por especie.

Especie de pescado	n	Rango de histamina (mg/kg)	Media (mg/kg)	> 35 mg/kg	> 200 mg/kg
Atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)	27	27.1 - 2050	289	26 (96%)	15 (56%)
Dorado (<i>Coryphaena hippurus</i>)	20	12.8 - 186	110	19 (95%)	0
Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>)	27	36.4 - 88.6	57.7	27 (100%)	0

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

4.7.2. Niveles de histamina encontradas en pescado no procesado por corregimiento y estrato socioeconómico.

En este estudio se compararon los valores de histamina obtenidos en las muestras recolectadas en corregimientos clasificados dentro de los estratos socioeconómicos alto y bajo, con el propósito de identificar posibles diferencias asociadas al entorno socioeconómico. Factores como la disponibilidad de infraestructura de refrigeración, las condiciones de almacenamiento, el manejo post-captura, la frecuencia de venta y las prácticas higiénicas pueden variar significativamente

entre zonas de distinto nivel socioeconómico, influyendo de manera directa en la formación de histamina en el pescado.

La población total de supermercados fue dividida en estratos de acuerdo con el nivel socioeconómico dentro del área de estudio, asignando proporcionalmente el tamaño de muestra a cada estrato. Para un total de 74 unidades, 58 muestras corresponden al estrato alto y 16 al estrato bajo. La Tabla 49 presenta la distribución de las muestras por corregimiento, cantidad por especie y el estrato socioeconómico.

Tabla 49. Distribución de las muestras por corregimiento, especie y estrato socioeconómico.

Corregimiento	Estrato	Atún	Dorado	Sierra	Total
San Felipe	Alto	1	1	1	3
Betania	Alto	3	3	3	9
Bella Vista	Alto	7	5	6	18
Pueblo Nuevo	Alto	2	2	2	6
San Francisco	Alto	7	5	7	19
Total =	—	20	16	19	55
Corregimiento	Estrato	Atún	Dorado	Sierra	Total
Santa Ana	Bajo	1	0	2	3
Calidonia (La Exposición)	Bajo	2	0	2	4
Parque Lefevre	Bajo	2	2	2	6
Río Abajo	Bajo	2	2	2	6
Total =	—	7	4	8	19
N (total) =					74

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

El contenido de histamina en las muestras analizadas varió de forma significativa entre especies y estratos socioeconómicos, lo que sugiere que tanto los factores biológicos (contenido de histidina libre y tipo de músculo) como los factores extrínsecos asociados al manejo post-captura y las condiciones de comercialización desempeñan un papel determinante.

Se elaboraron tablas y mapas de calor con la finalidad de visualizar de manera más sencilla la distribución de los niveles promedio de histamina por especie y corregimiento. La escala cromática se estableció con base en criterios normativos nacionales e internacionales, considerando < 35 mg/kg (bajo nivel - verde), 35 - 200 mg/kg (nivel de alerta - amarillo) y > 200 mg/kg (no conforme - rojo). Los corregimientos en color blanco no contaban con supermercados para la realización del muestreo.

Tabla 50. Mapa de calor de la distribución de los niveles de histamina por especie y corregimientos del estrato bajo.

Corregimiento	Niveles de histamina		
	Atún aleta amarilla	Sierra	Dorado
Parque Lefevre	192	56.8	117
	854	66.4	78.1
Rio Abajo	276	54.6	102
	215	40.2	124
La Exposición o Calidonia	2050	36.4	
	208	54.5	
Santa Ana		36.7	
	46.8	38.9	

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (enero, 2026).

Para los corregimientos pertenecientes al estrato bajo (Tabla 50) el Atún fue la especie que mostro una mayor variabilidad en los niveles de histamina, destacando Calidonia (La Exposición) con valores máximos de hasta 2050 mg/kg, muy por encima de los límites establecidos por normativas nacionales e internacionales (200 mg/kg). En contraste, el corregimiento de Santa Ana presentó niveles bajos y relativamente homogéneos (46.8 mg/kg). Los niveles de histamina encontrados en las especies Dorado y Sierra se mantuvieron por debajo de los límites establecidos por las normativas. Sin embargo, el 100% de las muestras para ambas especies estuvo por arriba del nivel de intervención (>35 mg/kg).

En el estrato alto (Tabla 51), los niveles promedio de histamina encontrados en el Atún fueron más moderados; sin embargo, se detectaron muestras que excedieron los límites reglamentarios. Tal fue el caso de San Francisco, con un valor máximo de 712 mg/kg, así como Betania y Bella Vista, con máximos de 323 mg/kg y 342 mg/kg, respectivamente. Para las especies Dorado y Sierra los niveles de histamina se mantuvieron por debajo de los límites establecidos, pero el 100% de las muestras para ambas especies estuvo por arriba del nivel de intervención (>35 mg/kg).

Tabla 51. Mapa de calor de la distribución de los niveles de histamina por especie y corregimientos del estrato alto.

Corregimiento	Niveles de histamina		
	Atún aleta amarilla	Sierra	Dorado
San Felipe	107	74.2	165
Betania	249	65.9	56.5
	271	82.9	104
	323	44.5	161
Pueblo nuevo	102	53.9	91.1
	65.4	81.6	126
San Francisco	38.6	37.4	161
	84.7	88.6	186
	27.1	77.6	102
	257	56.5	
	222	48.7	76.9
	712	46.4	68.3
	186	42.0	
Bella Vista	96.4	49.2	12.8
	48.5	51.5	115
	304	79.2	49.4
	225	67.2	
	342	74.5	157
	216	51.2	151
	88.3		

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (enero, 2026).

Los mapas de calor (Figura 18, 19 y 20) permitieron visualizar la distribución espacial relativa de los niveles de histamina en las especies de pescado analizadas en el área de Panamá Centro. La intensidad del color representa la suma de las concentraciones de histamina (mg/kg) detectadas en los puntos de muestreo, lo que permite identificar zonas con mayor acumulación relativa de resultados analíticos. Esta representación tiene un carácter exploratorio y descriptivo, orientado a identificar patrones espaciales, y no constituye una evaluación directa del cumplimiento normativo.

Figura 18. Distribución espacial relativa de los niveles de histamina en Atún aleta amarilla en Panamá Centro.

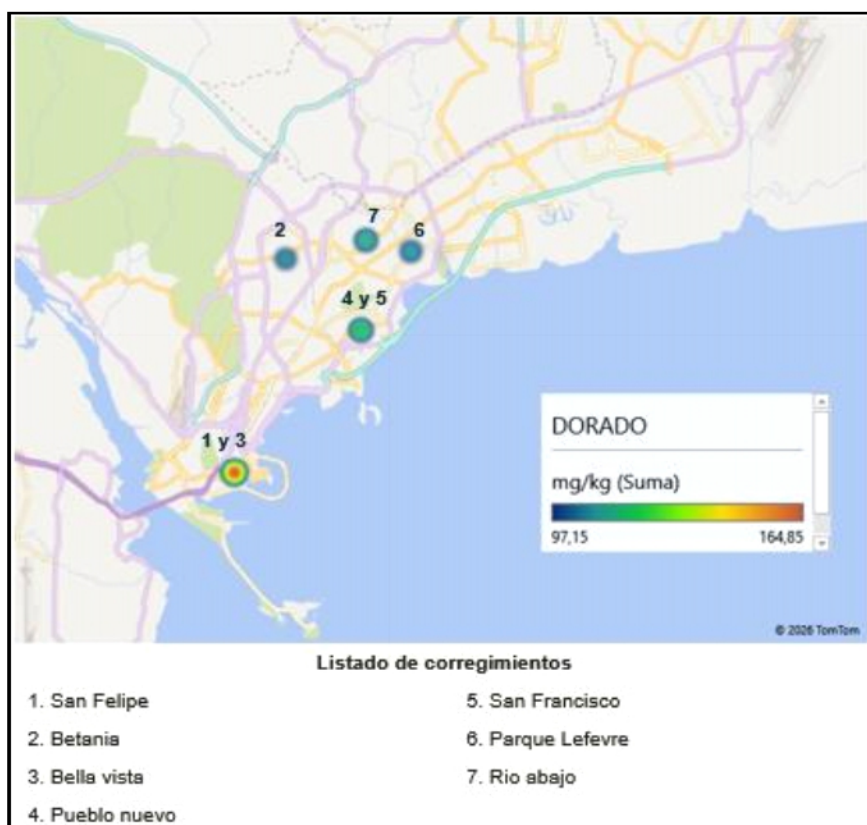


*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (enero, 2026).

En el caso del atún aleta amarilla, el mapa de calor evidenció una mayor intensidad de los valores de histamina en determinados puntos del área

de estudio como son los corregimientos de Calidonia y Parque Lefevre con concentraciones de 2050 mg/kg y 854 mg/kg, se observa una distribución heterogénea de esta amina. La presencia de zonas con mayor acumulación relativa de resultados es consistente con la susceptibilidad de esta especie a la formación de histamina y a posibles deficiencias en la cadena de frío.

Figura 19. Distribución espacial relativa de los niveles de histamina en Dorado en Panamá Centro.

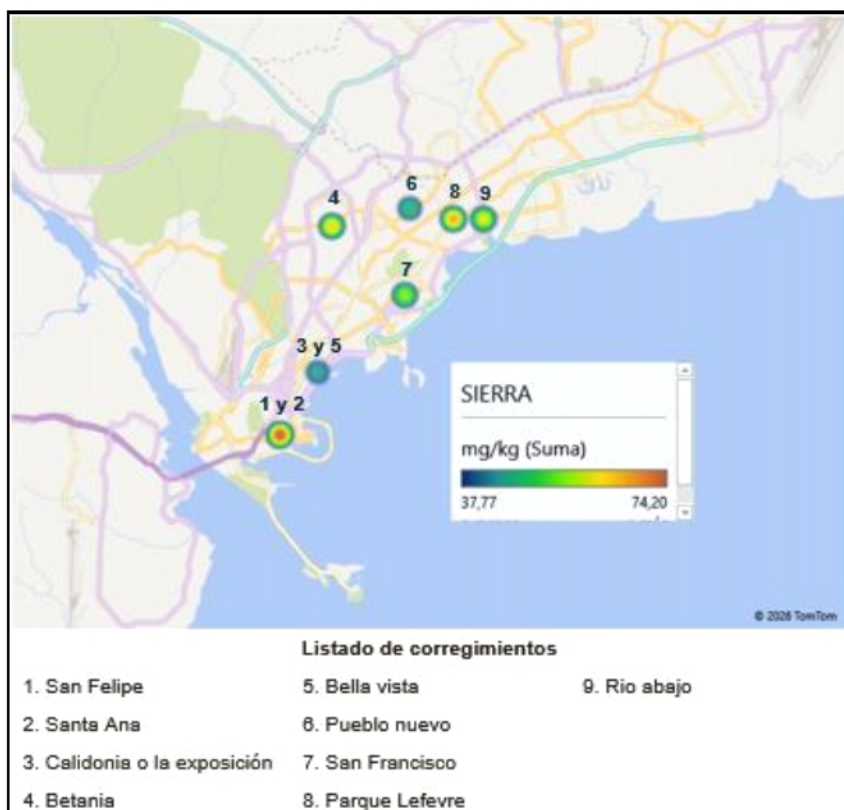


*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (enero, 2026).

Para la especie dorada, el mapa de calor mostró una distribución espacial más homogénea de los valores de histamina, con intensidades moderadas en la mayoría de los puntos de muestreo. Este

comportamiento concuerda con los niveles generalmente más bajos de histamina observados para esta especie en comparación con el atún.

Figura 20. Distribución espacial relativa de los niveles de histamina en Sierra en Panamá Centro.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (enero, 2026).

En el caso de la sierra, el mapa de calor reflejó una distribución relativamente uniforme de los niveles de histamina, sin concentraciones elevadas en zonas específicas del área de estudio. Los valores observados se mantuvieron dentro de rangos bajos a moderados, lo cual es coherente con los resultados cuantitativos obtenidos para esta especie.

En la tabla 52 se resumen los niveles de histamina encontrados en las tres especies de pescado analizadas, clasificadas según el estrato socioeconómico del punto de venta.

Tabla 52. Niveles de histamina encontrados en las especies de pescado analizadas por estrato socioeconómico.

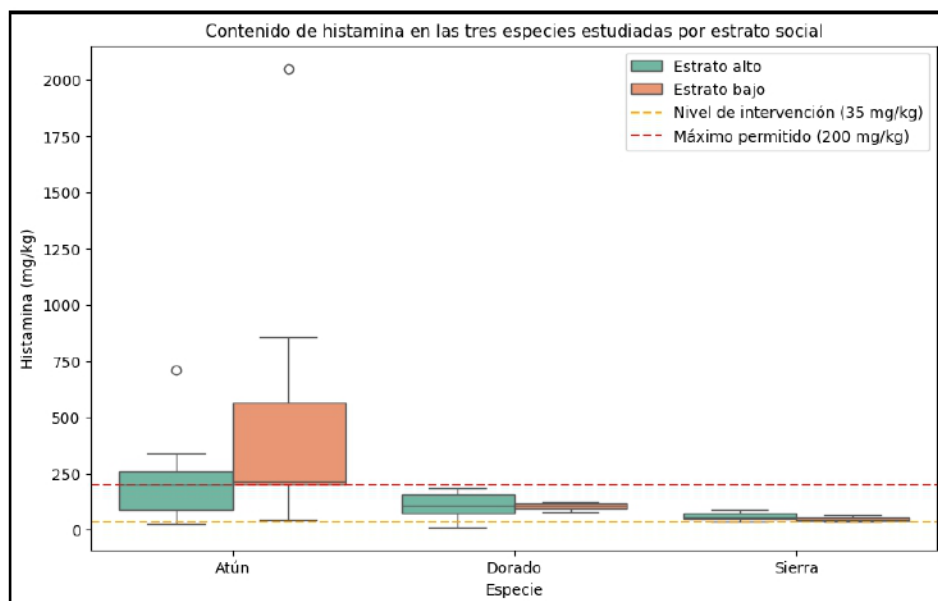
Especie de pescado	Estrato	n (muestras)	Rango de histamina (mg/kg)	Media (mg/kg)	Muestras > 35 (mg/kg)	Muestras > 200 (mg/kg)
Atún aleta amarilla (<i>Thunnus albacares</i>)	Alto	20	27.1 - 712	198	19 (95%)	10 (50%)
	Bajo	7	46.8 - 2050	549	7 (100%)	5 (71%)
Dorado o Mahi-Mahi (<i>Coryphaena hippurus</i>)	Alto	16	12.8 - 186	111	15 (94%)	0
	Bajo	4	78.1 - 124	105	4 (100%)	0
Sierra (<i>Scomberomorus sierra</i>)	Alto	19	37.4 - 88.6	61.8	19 (100%)	0
	Bajo	8	36.4 - 66.4	48.1	8 (100%)	0

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

Los resultados presentados en la Tabla 52 muestran una marcada variabilidad en las concentraciones de histamina, particularmente en el atún aleta amarilla. En el estrato alto, esta especie presentó una media de 198 mg/kg, mientras que en el estrato bajo la media fue considerablemente mayor 549 mg/kg, evidenciando una alta dispersión de los valores y la presencia de concentraciones extremadamente elevadas. En ambos estratos casi la totalidad de las muestras superaron el nivel de intervención de 35 mg/kg (95% en estrato alto y 100% en estrato bajo), y una proporción significativa excedió el límite máximo permitido de 200 mg/kg (50% y 71%, respectivamente), lo que representa un potencial riesgo toxicológico para el consumidor.

Se realizaron gráficos de caja y bigotes (boxplots) por especie y por estrato socioeconómico.

Grafica 20. Distribución del contenido de histamina en las especies Atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), Dorado (*Coryphaena hippurus*) y Sierra (*Scomberomorus sierra*) según el estrato socioeconómico del área de procedencia.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (agosto, 2025).

El Atún de aleta amarilla fue la especie con mayor concentración promedio de histamina, especialmente en los establecimientos de estrato bajo (549 mg/kg), donde el 71 % de las muestras superó el límite máximo permitido de 200 mg/kg. Estos valores sugieren posibles deficiencias en la refrigeración y tiempos prolongados de exposición a temperatura ambiente, condiciones que favorecen la descarboxilación bacteriana de la histidina y la formación de histamina. En los establecimientos del estrato alto, aunque la media fue menor (198 mg/kg), el 50 % de las muestras también sobrepasó el límite, evidenciando que incluso en puntos de venta con mejores condiciones sanitarias puede haber fallos en la cadena de frío.

Para la especie Dorado, se observó una mayor variabilidad en el estrato alto con varios valores cercanos al límite máximo permitido (200 mg/kg), mientras que en el estrato bajo las concentraciones fueron más homogéneas y menores. Las concentraciones promedio encontradas fueron para el estrato alto (111 mg/kg) y para el estrato bajo (105 mg/kg) y aunque ninguna superó el límite máximo, el 95 % de las muestras mostraron concentraciones superiores al nivel de intervención sugerido por la FDA (35 mg/kg), lo cual indica un posible riesgo de deterioro incipiente. Este comportamiento sugiere que el Dorado, aunque menos propenso a acumular histamina que el Atún, no está exento de condiciones post-captura inadecuadas.

En el caso de la Sierra, fue la especie con menores niveles promedio de histamina, con concentraciones entre 36 y 88 mg/kg, ninguna muestra superó los 200 mg/kg. El 100 % de las muestras del estrato alto y del estrato bajo presentaron valores superiores al nivel de intervención. En general, los tres gráficos (boxplots) evidencian que la variabilidad del contenido de histamina depende tanto de la especie como del estrato socioeconómico, siendo el Atún la especie con mayor riesgo de acumulación, seguida del Dorado y finalmente la Sierra.

4.7.3. Análisis estadístico de las concentraciones de histamina entre estratos socioeconómicos.

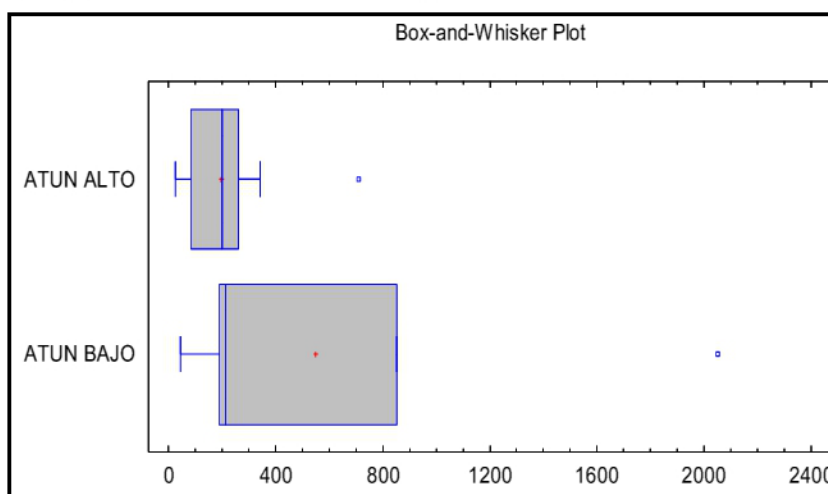
Con el objetivo de evaluar posibles diferencias en la concentración media de histamina entre los estratos socioeconómicos alto y bajo, se utilizó el software Statgraphics Centurion XV versión 15.1.02 para aplicar la prueba t de Student para muestras independientes con corrección de Welch (varianzas desiguales), debido a la desigualdad de tamaños muestrales y varianzas observadas entre los grupos. Se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Previo a la comparación de medias, se evaluó si la dispersión de las concentraciones de histamina difería significativamente entre grupos, para la evaluar la variación en la dispersión se utilizó la prueba F que compara las

varianzas (desviaciones estándar al cuadrado) de los dos estratos socioeconómicos y determinar si su dispersión es significativamente distinta.

➤ Atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*)

La concentración media de histamina en el estrato alto fue de 198.28 mg/kg, mientras que en el estrato bajo fue de 548.85 mg/kg. Aunque se observó una diferencia nominal considerable entre ambas medias, el análisis estadístico t de student no evidenció diferencias significativas entre estratos ($p = 0.24$). En cuanto a la prueba F evidenció diferencias significativas entre las varianzas de los estratos ($p < 0.05$), confirmando heterogeneidad en la dispersión de los datos. Cabe destacar que el estrato bajo presentó una alta variabilidad (DE = 710.53 mg/kg), atribuida a la presencia de valores extremos elevados, lo que influyó en la amplitud de la dispersión y en la reducción de la potencia estadística de la prueba.

Grafica 21. Distribución de las concentraciones de histamina (mg/kg) en Atún aleta amarilla según estrato socioeconómico.



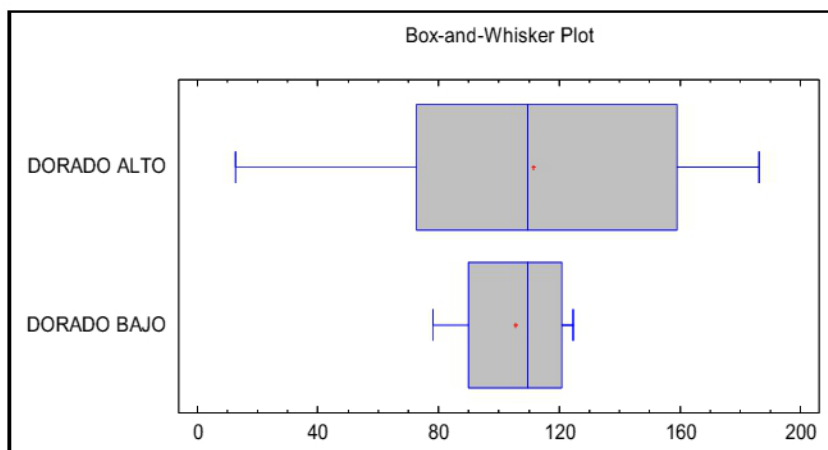
*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (febrero, 2026).

El diagrama de caja y bigotes correspondiente al atún evidenció una marcada asimetría positiva en el estrato bajo, con presencia de valores atípicos extremos y una amplitud considerable del rango intercuartílico en comparación con el estrato alto. Esta dispersión visual respalda la elevada desviación estándar (Prueba F) observada en dicho estrato (710 mg/kg) y explica la amplia variabilidad interna del grupo. Asimismo, el solapamiento entre los rangos intercuartílicos de ambos estratos es consistente con la ausencia de diferencias estadísticamente significativas detectadas mediante la prueba t con corrección de Welch ($p = 0.24$).

➤ Dorado (*Coryphaena hippurus*)

La concentración media de histamina en el estrato alto fue de 110.8 mg/kg, mientras que en el estrato bajo fue de 105.4 mg/kg. El análisis mediante la prueba t de Welch no mostró diferencias estadísticamente significativas entre estratos ($p = 0.78$). Las medias obtenidas fueron similares entre ambos grupos, lo que indica ausencia de efecto del estrato socioeconómico en esta especie. Es importante señalar que el tamaño muestral reducido en el estrato bajo ($n = 4$) constituye una limitación del análisis inferencial. En cuanto a la prueba F No se evidenciaron diferencias significativas en las varianzas entre estratos ($p > 0.05$), indicando dispersión comparable entre grupos.

Grafica 22. Distribución de las concentraciones de histamina (mg/kg) en Dorado según estrato socioeconómico.



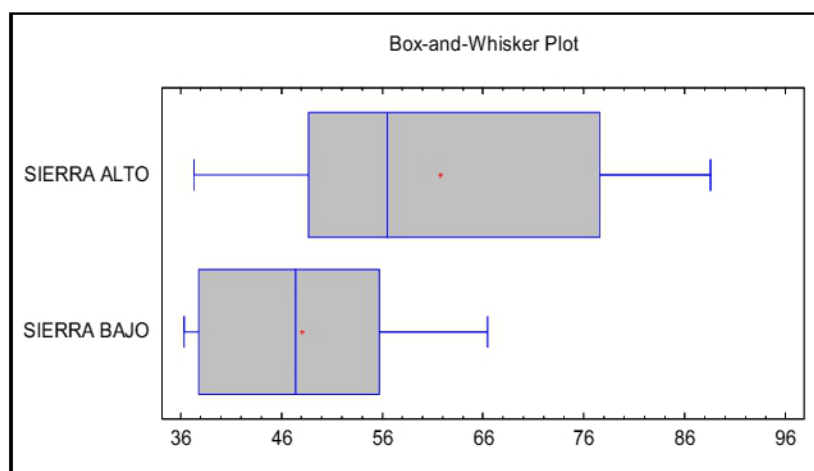
*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (febrero, 2026).

El diagrama de caja y bigotes correspondiente al dorado se observa mayor amplitud del rango intercuartílico en el estrato alto, mientras que el estrato bajo presenta menor dispersión. No se evidencian valores extremos marcados.

➤ Sierra (*Scomberomorus sierra*)

La concentración media de histamina en el estrato alto fue de 61.8 mg/kg (DE), mientras que en el estrato bajo fue de 48.1 mg/kg. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre estratos ($p = 0.026$), siendo mayor la concentración media en el estrato alto. A pesar de la diferencia estadística observada, las concentraciones registradas en ambos estratos se mantuvieron por debajo del límite máximo permitido. En cuanto a la prueba F No se evidenciaron diferencias significativas en las varianzas entre estratos ($p > 0.05$), indicando dispersión comparable entre grupos.

Grafica 23. Distribución de las concentraciones de histamina (mg/kg) en Sierra según estrato socioeconómico.



*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (febrero, 2026).

El diagrama de caja y bigotes correspondiente a la Sierra se observó una distribución relativamente homogénea en ambos estratos, sin presencia de valores atípicos extremos. No obstante, se observó un desplazamiento de la mediana y del rango intercuartílico hacia valores superiores en el estrato alto, lo que respalda visualmente la diferencia estadísticamente significativa detectada mediante la prueba t con corrección de Welch ($p = 0.026$).

Tabla 53. Comparación de concentraciones de histamina entre estratos socioeconómicos mediante prueba t con corrección de Welch.

Especie	Estrato	n	Media $\pm$ DE (mg/kg)	t calculada	p-value	Interpretación ($\alpha=0.05$)
Atún aleta amarilla	Alto	20	198.3 $\pm$ 158	-1.28	0.24	No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estratos ($p > 0.05$)
	Bajo	7	548.9 $\pm$ 710			
Dorado	Alto	16	110.8 $\pm$ 50	0.28	0.78	No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estratos ($p > 0.05$)
	Bajo	4	105.4 $\pm$ 20.5			
Sierra	Alto	19	61.8 $\pm$ 16.1	2.39	0.026	Si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estratos ($p < 0.05$)
	Bajo	8	48.1 $\pm$ 11.4			
t calculada mediante prueba t para muestras independientes con corrección de Welch.						

*Fuente: Elaborado por el autor con los resultados del estudio (febrero, 2026).

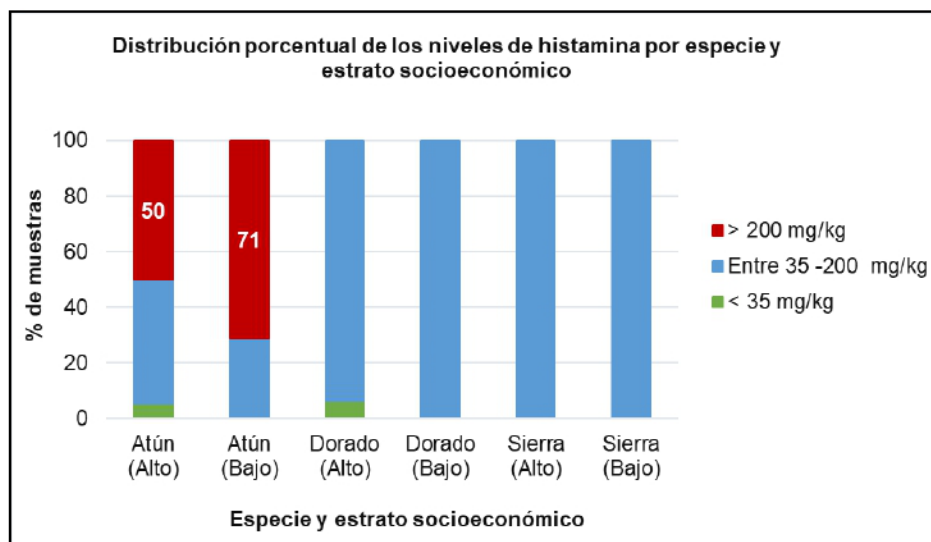
Se aplicó la prueba t de Student para muestras independientes con corrección de Welch, debido a la desigualdad de tamaños muestrales y varianzas entre los grupos. Se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

4.7.4. Comparación con normativas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron comparados con los límites establecidos por distintas normativas nacionales e internacionales para la concentración de histamina en pescado. En Panamá, el Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT (Gaceta digital No 26307) establece un límite máximo permitido de 200 mg/kg de histamina para especies pertenecientes a las familias de los Escómbridos, Clupeidos y Mahi-mahi. De igual manera, el Codex Alimentarius (CODEX STAN 36-1981) y la Unión Europea (Reglamento (CE) N.º 2073/2005) establecen valores equivalentes, con un límite máximo de 200 mg/kg. Adicionalmente, la Food and Drug Administration (FAD) recomienda 35 mg/kg como nivel de intervención, valor a partir del cual se deben implementar acciones correctivas para prevenir la formación de aminas biógenas.

Los resultados de este estudio muestran que una proporción considerable de las muestras analizadas excedieron el límite máximo permitido (200 mg/kg), el 71 % de las muestras de atún aleta amarilla del estrato bajo y el 50 % del estrato alto incumplieron las normativas nacionales vigentes, lo que representa un potencial riesgo toxicológico para el consumidor. Además, se evidenció que, aunque las muestras de Dorado y Sierra se mantuvieron por debajo de los límites establecidos el 100 % de las muestras para ambas especies estuvo por arriba del nivel de intervención (> 35 mg/kg), lo que evidencia una tendencia hacia el inicio de degradación del producto, especialmente en los puntos de venta pertenecientes al estrato socioeconómico bajo.

Grafica 24. Distribución porcentual de las muestras según concentración de histamina y cumplimiento de los valores normativos.



La gráfica 21 muestra la distribución porcentual de las muestras de pescado no procesado analizadas, clasificadas según los niveles de histamina establecidos por las normativas nacionales e internacionales, se puede observar que el atún aleta amarilla presentó la mayor proporción de muestras con concentraciones superiores al límite máximo permitido, alcanzando un 71 % en el estrato bajo y un 50 % en el estrato alto, lo que representa un incumplimiento directo de las normativas. El gráfico permite visualizar que los establecimientos pertenecientes al estrato socioeconómico bajo presentan una mayor frecuencia de muestras por encima de los niveles de intervención y reglamentarios, reflejando posibles deficiencias en la cadena de frío durante el transporte hacia el punto de distribución, los puntos de transferencia y su almacenamiento hasta su comercialización. En conjunto, los resultados confirman que, aunque la mayoría de las especies cumplen con el límite máximo permitido, existe un riesgo latente de formación de histamina, que requiere acciones preventivas y una supervisión sanitaria rigurosa.

4.8. Discusión.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian diferencias notables en las concentraciones de histamina entre especies y entre estratos socioeconómicos, lo que permitió evaluar el cumplimiento de las normativas nacionales e internacionales vigentes. De acuerdo con el reglamento técnico DGNTI-COPANIT 351-98, el límite máximo permitido de histamina en pescados pertenecientes a las familias de los Escómbridos, Clupeidos y Mahi-mahi es de 200 mg/kg, criterio que permitió contrastar las hipótesis planteadas.

Los resultados indican que la especie atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) presentó valores que excedieron el límite normativo en el 71 % de las muestras del estrato socioeconómico bajo y en el 50 % del estrato alto. Estos resultados evidencian un incumplimiento de la normativa nacional para esta especie, por lo que se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se acepta la hipótesis alterna (H_1) para el atún de aleta amarilla comercializado en la región de Panamá centro. Este comportamiento sugiere deficiencias en las condiciones de manejo post-captura, transporte, almacenamiento y control de la cadena de frío, particularmente en los puntos de venta pertenecientes al estrato socioeconómico bajo.

Por el contrario, en las especies dorado (*Coryphaena hippurus*) y sierra (*Scomberomorus sierra*), las concentraciones promedio de histamina se mantuvieron significativamente por debajo del límite máximo establecido por la normativa vigente, sin evidenciar excedencias que comprometieron su cumplimiento. En este contexto, los resultados indican que los niveles de histamina en estas especies cumplen con las normativas nacionales, por lo que se acepta la hipótesis nula (H_0) y se rechaza la hipótesis alterna (H_1) para el dorado y la sierra comercializados en la región de Panamá centro.

El análisis estadístico comparativo por estratos evidenció comportamientos diferenciados entre especies, indicando que la variabilidad en las concentraciones de histamina no sigue un patrón

uniforme en el mercado evaluado. En el atún (*Thunnus albacares*), aunque no se detectaron diferencias estadísticas entre estratos, la elevada dispersión observada en el estrato bajo está asociada a valores extremos altos, lo que sugiere posibles fallas puntuales en el manejo post-captura y representa un riesgo sanitario potencial, aun en ausencia de significancia estadística. En el dorado (*Coryphaena hippurus*), no se observaron diferencias ni alta variabilidad, lo que sugiere condiciones de comercialización más homogéneas y cumplimiento normativo. Por su parte, la sierra (*Scomberomorus sierra*) mostró diferencias significativas entre estratos; sin embargo, las concentraciones se mantuvieron dentro de los límites permitidos, indicando variaciones comerciales sin implicaciones sanitarias inmediatas.

Estos hallazgos concuerdan con investigaciones previas en especies escómbridas. (Arciniega et al. 2019) reportaron concentraciones promedio de histamina de $8257.8 \pm 24,884$ mg/kg en *Thunnus alalunga*, y observaron una correlación positiva entre la temperatura ambiental y el incremento de histamina. De forma similar, Montesel et al. 2017) encontraron valores de 14.4 - 95.9 mg/kg en un total de 192 muestras, de las cuales el 18.7 % superó los límites establecidos por la FDA (2021), identificando un riesgo potencial para la salud del consumidor. Estudios más recientes como el de (Cicero et al., 2020) y (Ding & Li, 2024) coincidieron en que el atún fresco presenta las concentraciones más elevadas de histamina, debido a su mayor contenido de histidina libre y a la composición específica de su microbiota. Estos autores también enfatizan que la temperatura inadecuada durante la distribución es el principal factor asociado al incremento de histamina. (Cicero et al., 2020) encontraron diferencias entre puntos de venta, observando mayores niveles en muestras de vendedores ambulantes y mercados minoristas, lo que coincide con los resultados del presente estudio, donde las concentraciones más elevadas se registraron en el estrato socioeconómico bajo. Esta situación podría atribuirse a deficiencias en la infraestructura de refrigeración, al incumplimiento de buenas

prácticas de manipulación y a tiempos de exposición prolongados a temperatura ambiente.

En resumen, este estudio confirma que la acumulación de histamina en el pescado no procesado está estrechamente asociada con la especie, las condiciones de manejo post-captura y el nivel socioeconómico del entorno de comercialización. El incumplimiento de la normativa observado únicamente en el atún de aleta amarilla refuerza la necesidad de fortalecer las buenas prácticas de refrigeración, manipulación e inspección sanitaria en Panamá centro, a fin de minimizar el riesgo de intoxicación histamínica en la población consumidora.

4.9. Limitaciones.

Este estudio, aunque aporta información relevante sobre los niveles de histamina en pescado no procesado comercializado en la región de Panamá Centro, presenta ciertas limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. Estas limitaciones se relacionan principalmente con la representatividad de la muestra y la distribución temporal de la recolección, recursos analíticos disponibles en el laboratorio y la limitada información de referencia local sobre el tema. A continuación, se detallan las limitaciones más relevantes y su posible impacto sobre las interpretaciones.

- Representatividad y distribución temporal del muestreo: El número de muestras y su distribución temporal constituyen un aspecto relevante, aunque el diseño de muestreo fue estratificado por corregimiento y estrato socioeconómico, y el tamaño muestral fue suficiente para los objetivos del estudio, la recolección de las muestras se concentró en un período limitado del año. No se consideraron posibles variaciones en los niveles de histamina por estaciones climáticas distintas, ya que la extensión temporal del estudio habría incrementado los costos y la duración de la investigación. Estudios como el de Annunziata et al. (2022)

recomiendan realizar estudios longitudinales con muestreos estacionales, porque esto permite obtener una visión más completa del comportamiento de la histamina en el pescado no procesado disponible en el mercado panameño. De igual forma, autores como Silva et al., (2011) sugieren tamaños muestrales mayores o muestreos repetidos en tiempo para robustecer inferencias poblacionales.

- En cuanto a las limitaciones analíticas, la validación del método y el análisis de las muestras fueron realizados en un único equipo, no hubo la posibilidad de efectuar controles interlaboratorio que permitiría estimar la reproducibilidad externa. No obstante, el método HPLC-FLD implementado fue validado conforme a las directrices de EURACHEM y cumplió con todos los criterios de aceptación. Los parámetros de precisión y exactitud podrían haberse fortalecido mediante ensayos colaborativos o la comparación con métodos confirmatorios más avanzados, como la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).
- Otra limitación importante corresponde a la falta de estudios previos sobre los niveles de histamina en productos pesqueros en Panamá. Esta carencia de estudios locales impidió realizar comparaciones directas, por lo que la discusión de los resultados de las muestras se basó en investigaciones internacionales realizadas en países vecinos con condiciones climáticas similares, como Perú, Ecuador y Brasil (Arciniega et al. (2019); Montesel et al. (2017) y Silva et al. (2011)). Aunque estos estudios ofrecen un marco de referencia, no reemplazan estudios longitudinales locales que permitirían determinar tendencias propias del contexto panameño. De esta manera, las diferencias en los sistemas de control, las prácticas pesqueras y las condiciones de distribución limitan la extrapolación de los hallazgos.

Estas limitaciones no invalidan los resultados, pero sí delimitan el alcance del estudio y orientan a futuras líneas de investigación. La ampliación del muestreo a lo largo del año y la consolidación de una base de datos permitirán fortalecer la vigilancia de histamina en productos pesqueros y garantizar una mejor protección de la salud pública en Panamá.

CONCLUSIONES

Conclusiones

El presente estudio permitió evaluar los niveles de histamina en muestras de pescado no procesado comercializado en la región de Panamá centro, así como validar e implementar una metodología analítica confiable como es la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección de fluorescencia (HPLC-FLD). De esta manera, se cumplió el objetivo general del estudio, el cual era cuantificar los niveles de histamina en muestras representativas de pescado pertenecientes a las familias *Scombridae* y *Coryphaenidae*, específicamente de las especies atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), sierra (*Scomberomorus sierra*) y dorado (*Coryphaena hippurus*), obtenidas en supermercados pertenecientes a distintos estratos socioeconómicos del área de Panamá centro. Los resultados evidenciaron que la acumulación de histamina está influenciada tanto por la especie como por las condiciones de comercialización y conservación, reflejando diferencias asociadas al estrato socioeconómico de los puntos de venta.

Se validó e implementó el método HPLC-FLD, donde se obtuvo un desempeño analítico robusto y conforme con los criterios establecidos por la guía Eurachem (2023) para la validación de métodos analíticos. El método presentó una linealidad satisfactoria ($R^2 \geq 0.9999$, CV (m) = 2.2 %) en el rango de trabajo de 0.035 - 0.500 µg/mL, precisión con coeficiente de variación ≤ 2.5 % entre analistas, veracidad en el rango de 90.3 % y 98.5 %, y los límites de detección y cuantificación de 0.30 mg/kg y 0.91 mg/kg, respectivamente. Además, la evaluación de robustez evidenció que las pequeñas variaciones en el pH de extracción de la muestra, el tiempo de reacción y la cantidad de volumen del derivatizante no afectaron significativamente la respuesta analítica, confirmando la estabilidad del método y su competencia para ser utilizado como método de control rutinario para el análisis de histamina en pescado fresco.

Se logró obtener muestras representativas de pescado no procesado de los diferentes puntos de distribución comercial en supermercados de la región de Panamá centro. Aunque el muestreo se realizó mediante un diseño estratificado por corregimiento y estrato socioeconómico y la recolección de muestras se concentró en un período limitado del año, el tamaño muestral fue adecuado y suficiente para cumplir con los objetivos planteados en este estudio.

Con respecto a los resultados de las muestras, se evidenciaron diferencias en el cumplimiento de los niveles máximos de histamina establecidos en la normativa técnica DGNTI-COPANIT 351-98 y en el CODEX STAN 36-1981. De un total de 74 muestras, procedentes de 27 supermercados clasificados en estrato socioeconómico alto ($n = 21$) y bajo ($n = 6$), se observó un incumplimiento de la normativa nacional en las muestras de atún aleta amarilla. De las 27 muestras analizadas de esta especie, 15 superan el límite máximo permitido, lo que representa el 56 % de las muestras, con concentraciones promedio de 289 mg/kg, e incluso se registró una muestra con concentraciones extremas de 2050 mg/kg excediendo ampliamente el límite máximo permitido (200 mg/kg).

A diferencia de las especies dorado y sierra, donde se encontraron valores promedio significativamente inferiores al límite normativo, con valores de 110 mg/kg y 57.7 mg/kg respectivamente, ninguna de las concentraciones encontradas excedió el límite reglamentario. Sin embargo, el 95 % de las muestras analizadas de dorado y el 100 % de las muestras de sierra superaron el nivel de intervención establecido por la FDA (35 mg/kg), lo que sugiere la presencia de procesos de descomposición incipiente o una manipulación inadecuada durante la cadena de frío.

Los resultados obtenidos contribuyen a fortalecer la vigilancia sanitaria de alimentos como el pescado fresco y no procesado, proporcionando una referencia técnica que permitirá orientar programas de control y monitoreo. Este estudio deja las bases para la creación de una base de datos nacional sobre histamina en pescado no procesado, e impulsa la necesidad de implementar estrategias de capacitación y sensibilización dirigidas a comerciantes y manipuladores de alimentos, con el fin de reducir el riesgo de intoxicaciones histamínicas en la población consumidora y garantizar la inocuidad de los productos pesqueros comercializados en el país.

RECOMENDACIONES

Recomendaciones

Con base en los resultados obtenidos, se proponen las siguientes recomendaciones orientadas a fortalecer el control de calidad e inocuidad del pescado no procesado comercializado en la región de Panamá Centro.

1. Fortalecer la cadena de frío durante todas las etapas de comercialización del pescado fresco, desde la captura hasta la venta al consumidor final, asegurando un control continuo de la temperatura para prevenir la formación de histamina y preservar la inocuidad del producto.
2. Implementar programas de capacitación dirigidos a comerciantes, distribuidores y manipuladores de alimentos, enfocados en las buenas prácticas de higiene, conservación y manipulación del pescado.
3. Establecer mecanismos de monitoreo rutinario de histamina en productos pesqueros mediante métodos analíticos, que permitan detectar de manera oportuna desviaciones en la calidad del producto y prevenir posibles brotes de intoxicación histamínica.
4. Crear una base de datos nacional sobre los niveles de histamina en pescado y productos pesqueros no procesados, con el fin de facilitar las acciones de vigilancia sanitaria y generar data útil para la elaboración de normativas nacionales en inocuidad alimentaria.
5. Fomentar la investigación continua sobre la presencia de otras aminas biógenas en diferentes especies y condiciones de almacenamiento, para ampliar el conocimiento sobre los factores que influyen en su formación y evaluar nuevas estrategias para su control.
6. Promover campañas de sensibilización al consumidor sobre la importancia de adquirir pescado en establecimientos que mantengan buenas prácticas de refrigeración y manipulación, incentivando prácticas de compra informadas que contribuyan a la reducción del riesgo sanitario.

Estas sugerencias buscan mejorar las prácticas de manejo, manipulación y conservación, así como el monitoreo sanitario, promoviendo la aplicación de estrategias que reduzcan el riesgo de intoxicación histamínica en la población consumidora.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Annunziata, L., Schirone, M., Campana, G., De Massis, M. R., Scortichini, G., & Visciano, P. (2022). Histamine in fish and fish products: An 8-year survey. Follow up and official control activities in the Abruzzo region (Central Italy). *Food Control*, 133, 108651. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108651>
- Arciniega, G. A. (2019). *Determinación de Histamina por el método de ELISA en pescado fresco comercializado en el mercado municipal "EL ARENAL" de la ciudad de Cuenca*.
- Arulkumar, A., Paramithiotis, S., & Paramasivam, S. (2023). Biogenic amines in fresh fish and fishery products and emerging control. *Aquaculture and Fisheries*, 8(4), 431–450. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.02.001>
- Autoridad de protección al Consumidor y Defensa de la Competencia (ACODECO). (2022). *Costos más bajos de la canasta básica familiar de alimentos (CBFA) en los distritos de panamá y san miguelito: Enero de 2022*. www.acodeco.gob.pa,
- Balbuena Edgar Daniel. (2014). *Manual básico sobre procesamiento e inocuidad de productos de la acuicultura*.
- Cantwell, H. (2025). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. www.eurachem.org.
- Chen, R., Deng, Y., Yang, L., Wang, J., & Xu, F. (2016). Determination of Histamine by High-Performance Liquid Chromatography after Precolumn Derivatization with o-Phthalaldehyde-Sulfite. *Journal of Chromatographic Science*, 54(4), 547–553. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv185>
- Cicero, A., Cammilleri, G., Galluzzo, F. G., Calabrese, I., Pulvirenti, A., Giangrosso, G., Cicero, N., Cumbo, V., Vella, A., MacAluso, A., & Ferrantelli, V. (2020). Histamine in fish products randomly collected in Southern Italy: A 6-year study. *Journal of Food Protection*, 83(2), 241–248. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-305>
- Cicero, A., Galluzzo, F. G., Cammilleri, G., Pulvirenti, A., Giangrosso, G., Macaluso, A., Vella, A., & Ferrantelli, V. (2020). Development of a rapid and eco-friendly UHPLC analytical method for the detection of histamine in fish products. *International Journal of*

- Environmental Research and Public Health*, 17(20), 1–11.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17207453>
- Cochran, W. G. (1941). *The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1941.tb02271.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1941.tb02271.x)
- Debeer, J., Bell, J. W., Nolte, F., Arcieri, J., & Correa, G. (2021). Histamine limits by country: A survey and review. In *Journal of Food Protection* (Vol. 84, Issue 9, pp. 1610–1628). International Association for Food Protection. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-129>
- Diego A. Ahumada, Cristhian Paredes, Johanna Abella, Ivonne González. (2023). *Validación de métodos en análisis químico cuantitativo* (Instituto Nacional de Metrología de Colombia, Ed.; 1st ed.). www.inm.gov.co
- Ding, T., & Li, Y. (2024). Biogenic amines are important indices for characterizing the freshness and hygienic quality of aquatic products: A review. In *LWT* (Vol. 194). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.115793>
- Eimear McCall. (2020, August 24). *Comprender la complejidad de la muestra: Determinación de los efectos de la matriz en muestras alimentarias complejas*. Alimentación y Medio Ambiente. <https://www.waters.com/blog/es/understanding-sample-complexity-determining-matrix-effects-in-complex-food-samples/?srsltid=AfmBOoqyeG4jiwZJoerj4RJLy7ZclKjCchhlspecJwDO1461lmoUxY89>
- Ermer, J., & Nethercote, P. W. (2005). Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. In *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/3527604685.fmatter>
- EuroLab España, & P.P. Morillas y colaboradores. (2016). *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados: Vol. 1a ed.* www.eurachem.org
- Evangelista, W. P., Silva, T. M., Guidi, L. R., Tette, P. A. S., Byrro, R. M. D., Santiago-Silva, P., Fernandes, C., & Gloria, M. B. A. (2016). Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. *Food Chemistry*, 211, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.035>

- FAO. (2019). Perfiles de Pesca y Acuicultura por Países. Panamá, 2018. *Pesca y Acuicultura*, 1–23. <https://www.fao.org/fishery/es/facp/PAN>
- FAO. (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024. La transformación azul en acción. En *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683es>
- FAO y OMS. (2022). Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros. I Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros. FAO; WHO; <https://doi.org/10.4060/cb0658es>
- FAO/WHO. (2013). *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products* (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Ed.). www.fao.org/publications
- Ghazi, A. A., Mohamed, M. M., Gad Alla, S. A., Kennedy, G., & Atalla, E. R. (2015). Optimization and Validation of Analytical Method for Determination of Histamine in Fish using HPLC-FLD. In *Egy. J. Pure & Appl. Sci* (Vol. 53, Issue 2).
- Huang, H., Li, Y., Liang, J., & Finkelman, F. D. (2018). Molecular regulation of histamine synthesis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01392>
- ICH Q2(R1). (2005). *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics/biologics-guidances>
- Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST). (n.d.). *Levene Test for Equality of Variances (sección 1.3.5.10)*. En *Exploratory Data Analysis: Statistical Methods*. Retrieved August 6, 2025, from <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35a.htm>
- Jinadasa, B. K. K. K., Jayasinghe, G. D. T. M., & Ahmad, S. B. N. (2016). Validation of high-performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative analysis of histamine in fish and fishery products. *Cogent Chemistry*, 2(1), 1156806. <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1156806>

- Kounnoun, A., el Maadoudi, M., Cacciola, F., Mondello, L., Bougtaib, H., Alahlah, N., Amajoud, N., el Baaboua, A., & Louajri, A. (2020). Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Histamine in Fish Samples Using Fluorescence Detection with Pre-column Derivatization. *Chromatographia*, 83(7), 893–901. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03909-9>
- Kovacevic, I., Pokrajac, M., Miljkovic, B., Jovanovic, D., & Prostran, M. (2006). Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 830(2), 372–376. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2005.11.034>
- Llorente, G., & Rivero, C. (2017). *Contraste del valor de una cartera de inmuebles mediante muestreo*. https://www.asociacionaev.org/admin159753/uploads/uploads_doc/varios/184836_INFO_RME%20MOD.FEB%202017%20consideraciones_aev_enero_2017_a.pdf
- Madejska, A., Pawul-Gruba, M., & Osek, J. (2022). Histamine content in selected production stages of fish products. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 66(4), 599–604. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0063>
- Ministerio de Comercio e Industrias (MICI). (1998). Productos de la pesca - pescado fresco y especificaciones. *Gaceta Oficial de Panamá*.
- Ministerio de Comercio e Industrias (MICI). (2009). *Resolución No. 26307: Regulación sobre niveles máximos permitidos de histamina en productos pesqueros*.
- Montesel Christian, & Rodríguez Franklin. (2017). *Determinación de los niveles de histamina en la especie Thunnus Alalunga, expandido en el mercado municipal '10 de agosto', cuenca – Ecuador*.
- Munir, M. A., & Badri, K. H. (2020). The Importance of Derivatizing Reagent in Chromatography Applications for Biogenic Amine Detection in Food and Beverages. In Krishna K. Verma (Ed.), *Journal of Analytical Methods in Chemistry* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/5814389>
- Organización Panamericana de la Salud (PAHO). (2017, April). *Clasificación de los alimentos y sus implicaciones en la salud*.

- Patrick, A. M. N. D. C. (2019, July 1). *Strategies for the Quantification of Endogenously Present Small Molecules in Biological Samples*. LCGC Asia Pacific. <https://www.chromatographyonline.com/view/strategies-quantification-endogenously-present-small-molecules-biological-samples-0>
- Prasad Rai Krishna, Pradhan Hare, Sharma Bal, & Rijal Som. (2013). Histamine in Foods: Its Safety and Human Health Implications. *J. Food Sci. Technol. Nepal*, 8, 1–11.
- Río, B. Del, Redruello, B., Fernández, M., Ladero, V., & Álvarez, M. A. (2020). Biogenic amines in food: Molecular methods for the detection and identification of ba-producing bacteria. *Arbor*, 196(795), 1–15. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1009>
- Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M. (2019). Impact of biogenic amines on food quality and safety. In *Foods* (Vol. 8, Issue 2). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>
- Shulpekova, Y. O., Nechaev, V. M., Popova, I. R., Deeva, T. A., Kopylov, A. T., Malsagova, K. A., Kaysheva, A. L., & Ivashkin, V. T. (2021). Food intolerance: the role of histamine. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13093207>
- Silva, T. M., Sabaini, P. S., Evangelista, W. P., & Gloria, M. B. A. (2011). Occurrence of histamine in Brazilian fresh and canned tuna. *Food Control*, 22(2), 323–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.031>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica* (9th ed.). Cengage Learning Editores, S.A. de C.V.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography: Chapter 12 Method Validation*. <https://doi.org/10.1002/9780470508183>
- Stroka, J., Bouten, K., Mischke, C., Breidbach, A., & Ulberth, F. (2014). Equivalence testing of histamine methods - Final Report. *Joint Research Centre of the European Commission*. <https://doi.org/10.2787/93196>
- Tran, Q. H., Nguyen, T. T., & Pham, K. P. (2020). Development of the High Sensitivity and Selectivity Method for the Determination of Histamine in Fish and Fish Sauce from Vietnam by UPLC-MS/MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2187646>

- Traylor J, M. D. (2023, May 26). *Scombroid and Histamine Toxicity*. In: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing; 2022 Jan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499871/>
- Unión Europea. (2005). Reglamento (CE) No 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L 338/1. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32005R2073>
- Unión Europea. (2021). *Reglamento de Ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión de 22 de marzo de 2021 relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo*. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32021R0808>
- U.S. Department of Health and Human Services (FDA)). (2021). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance [Orientación de controles y peligros de los productos pesqueros y piscícolas]*. www.ifasbooks.com
- U.S. Department of Health and Human Services (FDA). (2024). *Sec. 540.525 Scombrototoxin (Histamine)-forming Fish and Fishery Products – Decomposition and Histamine (CPG 7108.24) Compliance Policy Guide: Guidance for FDA Staff*. <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/compliance->
- U.S. Department of Health and Human Services (HHS), Food and Drug Administration (FDA), & Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN). (2011). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance: CHAPTER 7: Scombrototoxin (Histamine) Formation*.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
DIRECCIÓN DE POSTGRADO



Maestría en Toxicología con énfasis en Toxicología Analítica y Forense

Título del estudio: Evaluación de los niveles de histamina producidos en pescado no procesado de la región de Panamá centro del distrito de Panamá mediante la técnica de HPLC-FLD.

Preparado por: Amarelyz Villalba

Formulario para la recolección de las muestras de pescado fresco:

Formulario para la recolección de las muestras	
Código de muestra	
Fecha del muestreo	
Hora de muestreo	
Nombre del supermercado	
Ubicación del supermercado	
Especie de pescado	
Cantidad de muestra tomada	
Temperatura de almacenamiento	
Almacenamiento de la muestra	☐ Refrigerada en neveras ☐ Muestras congeladas
Número de fotografía	
Responsable del muestreo:	

ANEXO 2



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
COMITÉ DE BIOÉTICA (CBUP)

Panamá, 12 de diciembre de 2023
Nota N° CBUP/273/2023

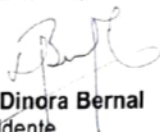
Doctora
Hildauro Acosta de Patiño
Coordinadora
Estudiante
Amarelys Villalba
Maestría en Toxicología
Centro de Investigación e Información
De Medicamentos y Tóxicos CIIMET
Universidad de Panamá

Estimada Dra. Acosta,

El Comité de Bioética de la Universidad de Panamá, luego de revisar su solicitud de exención, para evaluar su proyecto **"Evaluación de los niveles de histamina producidos en pescado no procesado de la región de Panamá Centro mediante la técnica del HPLC-FLD"** que sometieron a nuestra consideración, considera que reúne los requisitos para otorgar la exención de revisión, ya que el estudio no involucra seres humanos.

Le deseamos éxito en su proyecto y le agradeceremos considerar un resumen final de esta importante investigación.

Atentamente,


Dra. **Dinora Bernal**
Presidente
CBUP

cc Dr. Carlos Ramos
Director de Postgrado



2023: "A 100 años de la Fundación de acción Comunal"
CIUDAD UNIVERSITARIA OCTAVIO MÉNDEZ PEREIRA
Estafeta Universitaria, Panamá, República de Panamá
Tel: (507) 523-5769 Correo electrónico: comitebioetica.invup@up.ac.pa



enviada por mail 12/12/2023

ANEXO 3

Prueba de homogeneidad de varianzas de Cochran

	$\alpha = 0.05$													
	n													
k	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	1000
2	0.998	0.975	0.939	0.905	0.877	0.853	0.833	0.815	0.801	0.788	0.734	0.660	0.581	0.500
3	0.966	0.870	0.797	0.745	0.707	0.677	0.653	0.633	0.616	0.602	0.546	0.474	0.403	0.333
4	0.906	0.767	0.684	0.628	0.589	0.559	0.536	0.517	0.501	0.488	0.436	0.372	0.309	0.250
5	0.841	0.683	0.598	0.544	0.506	0.478	0.456	0.438	0.424	0.411	0.364	0.306	0.251	0.200
6	0.780	0.616	0.532	0.480	0.444	0.418	0.398	0.381	0.368	0.356	0.313	0.261	0.211	0.166
7	0.727	0.561	0.480	0.430	0.397	0.372	0.353	0.338	0.352	0.315	0.275	0.227	0.183	0.142
8	0.679	0.515	0.437	0.391	0.350	0.336	0.318	0.304	0.292	0.282	0.246	0.202	0.161	0.125
9	0.638	0.477	0.402	0.358	0.328	0.306	0.290	0.276	0.265	0.256	0.222	0.182	0.144	0.111
10	0.602	0.445	0.373	0.331	0.302	0.282	0.266	0.254	0.243	0.235	0.203	0.165	0.130	0.100

Fuente: Tabla 1. Critical values for Cochran's test, Universidad de Washington.

Disponible en:

https://faculty.washington.edu/heagerty/Books/Biostatistics/TABLES/Cochran.pdf?utm_source=

ANEXO 4

Valores críticos para la distribución t de Student

t Table

cum. prob	$t_{.50}$	$t_{.75}$	$t_{.80}$	$t_{.85}$	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$	$t_{.999}$	$t_{.9995}$
one-tail	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
two-tails	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
df											
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11	0.000	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12	0.000	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13	0.000	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14	0.000	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15	0.000	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16	0.000	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17	0.000	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18	0.000	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19	0.000	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20	0.000	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21	0.000	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22	0.000	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23	0.000	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.768
24	0.000	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25	0.000	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725
26	0.000	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27	0.000	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690
28	0.000	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29	0.000	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30	0.000	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40	0.000	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60	0.000	0.679	0.848	1.045	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
80	0.000	0.678	0.846	1.043	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416
100	0.000	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390
1000	0.000	0.675	0.842	1.037	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098	3.300
Z	0.000	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291
	0%	50%	60%	70%	80%	90%	95%	98%	99%	99.8%	99.9%
	Confidence Level										

Fuente: San José State University. (s. f.). t table. Department of Public Health, San José State University. Disponible en: <https://www.sjsu.edu/faculty/gerstman/StatPrimer/t-table.pdf>

ANEXO 5

Tabla de valores críticos para la distribución F, $\alpha = 0.05$ (para uso con ANOVA):

Critical values of F for the 0.05 significance level:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.45	199.50	215.71	224.58	230.16	233.99	236.77	238.88	240.54	241.88
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.39	19.40
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14
10	4.97	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.10	3.01	2.95	2.90	2.85
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49
17	4.45	3.59	3.20	2.97	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45
18	4.41	3.56	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35
21	4.33	3.47	3.07	2.84	2.69	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.38	2.32	2.28
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.26
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.41	2.34	2.28	2.24
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.17
31	4.16	3.31	2.91	2.68	2.52	2.41	2.32	2.26	2.20	2.15
32	4.15	3.30	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14
33	4.14	3.29	2.89	2.66	2.50	2.39	2.30	2.24	2.18	2.13
34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12
35	4.12	3.27	2.87	2.64	2.49	2.37	2.29	2.22	2.16	2.11

Fuente: University of Sussex. (2005). *Table of critical values for the F-distribution* ($p = 0.05$). Disponible en: <https://users.sussex.ac.uk/~grahamh/RM1web/F-ratio%20table%202005.pdf>

ANEXO 6

Panamá, 3 de marzo de 2026

Señores
Universidad de Panamá
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

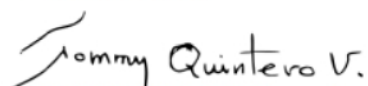
E.S.D.

Estimados señores:

La suscrita notifica haber revisado por solicitud de la estudiante **AMARELYZ VILLALBA** con cédula 8-815-2300 el trabajo de grado titulado **"EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA PRODUCIDOS EN PESCADO NO PROCESADO DE LA REGIÓN DE PANAMÁ CENTRO DEL DISTRITO DE PANAMÁ MEDIANTE LA TÉCNICA DE HPLC-FLD"** para optar por el título de Magíster en toxicología con énfasis en Toxicología Analítica y Forense.

A su vez doy fe que el documento cumple satisfactoriamente con todos los requisitos formales de ortografía y de redacción exigidos, por el idioma español.

Atentamente,



Tommy Quintero V,
Profesor de Español
Adj. Copia de Diploma

Copia de Cédula.

Prof. Tommy Alexis Quintero V.

Profesor de español

Número de cédula: 6-53-94

Registro del Diploma No: 230784

CERTIFICADO DE TRABAJO FINAL DE GRADO

Yo, Tommy Quintero V., con cédula de identidad personal 6-53-94

Certifico:

Que la estudiante Amarelyz Villalba de la Facultad de Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Panamá, citada en el documento ha terminado su trabajo final de graduación y se les hizo las correcciones pertinentes.

Que el trabajo realizado por la estudiante tiene por título: **"EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HISTAMINA PRODUCIDOS EN PESCADO NO PROCESADO DE LA REGIÓN DE PANAMÁ CENTRO DEL DISTRITO DE PANAMÁ MEDIANTE LA TÉCNICA DE HPLC-FLD"** fue con referencia a su trabajo de grado.

Como constancia expido el presente certificado en Panamá, el día **3 de marzo de 2026.**

UNIVERSIDAD DE PANAMA

LA FACULTAD DE

Humanidades

EN VIRTUD DE LA POTESTAD QUE LE CONFIEREN LA LEY Y EL ESTATUTO UNIVERSITARIO,
HACE CONSTAR QUE

Tommy Alexis Quintero U.

HA TERMINADO LOS ESTUDIOS Y CUMPLIDO CON LOS REQUISITOS
QUE LE HACEN ACREEDOR AL TITULO DE

*Licenciado en Humanidades
con Especialización en Español*

Y EN CONSECUENCIA, SE LE CONCEDE TAL GRADO CON TODOS LOS DERECHOS,
HONORES Y PRIVILEGIOS RESPECTIVOS, EN TESTIMONIO DE LO CUAL SE LE EXPIDE
ESTE DIPLOMA EN LA CIUDAD DE PANAMA A LOS *veinticin*
DIAS DEL MES DE *noviembre* DE MIL NOVECIENTOS *ochenta y cinco*.

Secretario General
Diploma 15137
Identificación Personal
6-53-94

[Signature]
Decano

[Signature]
Rector





UNIVERSIDAD DE PANAMA

LA FACULTAD DE

Educación

RECEIVED BY THE
UNIVERSITY OF PANAMA
IN THE OFFICE OF THE
RECTOR
ON FEBRUARY 27, 1994
AT 10:00 AM
BY THE SECRETARY OF THE
FACULTY OF EDUCATION
AND THE DEAN OF THE
FACULTY OF EDUCATION

EN VIRTUD DE LA POTESTAD QUE LE CONFIEREN LA LEY Y EL ESTATUTO UNIVERSITARIO,
HACE CONSTAR QUE

Tommy Alexis Quintero V.

HA TERMINADO LOS ESTUDIOS Y CUMPLIDO CON LOS REQUISITOS
QUE LE HACEN ACREEDOR AL TITULO DE

*Profesor de Segunda Enseñanza
con Especialización en Español*

Y EN CONSECUENCIA, SE LE CONCEDE TAL GRADO CON TODOS LOS DERECHOS,
HONORES Y PRIVILEGIOS RESPECTIVOS, EN TESTIMONIO DE LO CUAL SE LE EXPIDE
ESTE DIPLOMA EN LA CIUDAD DE PANAMA A LOS

veintidós
DÍAS DEL MES DE febrero DE MIL NOVECIENTOS noventa y cuatro.

[Signature]
Secretario General

Diploma 30470

Identificación Personal

G-53-94

[Signature]
Decano

[Signature]
Rector

