

## MODIFICACION DEL METODO RAPIDO ENZIMATICO COLORIMETRICO PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE HISTAMINA EN PRODUCTOS PESQUEROS

ADRIAN BARRATT\* y NELLY CAMBA\*\*

Instituto Nacional de Pesca  
Casilla 5918  
Guayaquil - Ecuador

**Resumen.-** Muestras de dorado (*Coryphaena hippurus*) fueron analizadas con modificaciones del método Lerke A. Peter, Porcuna N. Martina, and Chin B. Henry (1978). Las muestras de pescado fueron previamente expuestas a temperatura ambiente por 18 horas, con el fin de incrementar su contenido de histamina. Fueron usadas diluciones de 3, 4 y 5 mg/ml del reactivo de peroxidasa (HRP) en el análisis de las muestras de pescado con una concentración mayor a 10 mg/100 g de histamina.

El mejor desarrollo de color luego de 30 minutos se observó con la concentración del reactivo de 4 mg/ml de HRP.

La presente modificación mejora la metodología de Lerke y otros, debido a que es más fácil de aplicar en el laboratorio y en el campo, permitiendo una mejor ejecución en un corto período de tiempo.

**Abstract.-** Samples of Dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) were analysed for histamine content using the method of Lerke A. Peter, Porcuna N. Martina and Chin B. Henry (1978) with modifications. The samples were previously exposed at room temperature for 18 hours in order to increase their histamine content. Dilutions of 3, 4 and 5 mg/ml of horseradish peroxidase (HRP) reagent were used, in the analyses of fish samples known to contain more than 10 mg/100 g of histamine concentration. The best development of the colour after 30 minutes was observed with a reagent concentration of 4 mg/ml of HRP.

The present modification improves the Lerke, et. al. (op.cit.) methodology and makes it easy to use in the laboratory and in the field.

### INTRODUCCION

En la costa ecuatoriana, donde la temperatura de sus aguas fluctúa entre 20-29°C con una temperatura ambiente entre 30-35°C durante el día donde además la manipulación y el enfriamiento de la pesca son inadecuadas en algunos casos y en otros no existe, los peces como atún, (*Thunnus albacares*); dorado (*Coryphaena hippurus*) y macarela han mostrado niveles de histamina significativos que va aumentando a medida que pasa el tiempo expuestos a estas temperaturas, y como con un simple análisis organoléptico estos niveles no pueden ser detectados, es que se vió la urgente necesidad de introducir y adaptar una metodología rápida y semicuantitativa para detectar por simple desarrollo de color el contenido de histamina que sobrepasa el límite escogido como máximo de 10 mg/100 g (ref. Lerke, et. al., 1978), la observación de este color da un criterio objetivo al analista para poder reportar positiva o negativamente, sin situarse en grados intermedios, cuenta además, con la ventaja de que pueden en un momento determinado ser cuantificados los resultados en el laboratorio mediante el uso de instrumentación, y puede ser usado para detectar histamina en cantidades apreciables de pescado.

Se describe en este trabajo una metodología usando enzimas que son específicas y catalizadoras eficientes, las mismas que ya han sido probadas y usadas en análisis bioquímico (Towshead, 1981).

En el procedimiento que se describe, la histaminasa (diamino oxidasa), actúa sobre la histamina formando peróxido de hidrógeno que es luego transformado por peroxidasa, con la formación simultánea de cristales de color violeta por oxidación de su forma leuco, como lo reporta Mottola et. al., 1970.

El método de Shore/Taylor fue usado para cuantificar las concentraciones de histamina presentes en las muestras (Anexo 1) realizándose los dos análisis al mismo tiempo

### MATERIALES

- Dorado (mahi-mahi) *Coryphaena hippurus* almacenado a temperatura ambiente (30-33°C) durante 18 horas, con el fin de obtener materia prima en la que se habían desarrollado concentraciones apreciables de histamina.

Con el fin de conseguir un rango de diferentes concentraciones de histamina se procedió a tomar muestras cada 3 horas las mismas que fueron congeladas hasta el subsiguiente análisis.

\*Overseas Development Administration (ODA).

\*\*Instituto Nacional de Pesca (INP)

### Reactivos y Buffer

- Diamino oxidasa. (DAO) Sigma Chemical Company 7876 disuelta en agua y almacenada a (0-5°C).
- Hidrógeno peroxidasa-óxido-reductasa horse radish peroxidase (H R P) sigma chemical Company P-8250 se disolvió en agua y se almacenó a (0-5°C).
- Leuco cristal-violeta (LCV) Sigma Chemical L5760, disuelto en CIH al 0.5% protegido de la luz y refrigerado a la misma temperatura que los anteriores.
- Solución buffer que fue una mezcla de 2 soluciones 0.15 M de  $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$  y  $\text{PO}_4\text{-H Na}_2$ , también refrigerada.

### METODOLOGIA

Se realizaron dos pruebas:

1. Utilizando 1 ml del filtrado proveniente del homogenizado de 5 g. de muestra y 5 ml. de agua destilada.
2. Usando papel filtro de  $1 \text{ cm}^2$  de tamaño que era colocado directamente entre el músculo del pescado a fin de que se impregne en su jugo.

Las muestras así obtenidas fueron colocadas en tubos de vidrio de 20 ml de capacidad provistos de tapa rosca; + 1 ml del buffer y 0.5 ml de DAO y HRP respectivamente, se agregaron a cada uno de los tubos de prueba, con la respectiva agitación después de cada adición, paralelamente se realizaron blancos de prueba, usando agua destilada en lugar de la muestra, 0.1 ml de LCU fue añadido posteriormente, el desarrollo del color fue observado visualmente, cada 5 minutos hasta media hora después.

Se realizaron 3 determinaciones al mismo tiempo, con la única variante en lo que respecta a la concentración del HRP que fue de: 3, 4 y 5 mg/ml.

Según el trabajo de Lerke, et. al. (1978) el uso de buffer a diferentes pH y concentraciones, y del DAO no cambió la sensibilidad de este método. Pero con el uso de diferentes concentraciones de HRP como las usadas en este trabajo se logró un cambio en la sensibilidad.

Muestras que contenían desde 0.5 hasta 115 mg % (determinadas por el método de Shore/Taylor) fueron utilizadas.

También se realizaron pruebas con muestras enlatadas de atún, macarela y sardina, por los 2 métodos.

### RESULTADO Y DISCUSION

Al igual que la metodología usada por Lerke et. al., 1978 se usó como estándares pescado con diferentes concentraciones de histamina producto de diferentes etapas de descomposición, pues se comprobó que concentraciones de hidrocloreto de histamina usados no desarrollaban la coloración que se esperaba al adicionar los reactivos.

Los análisis fueron realizados inmediatamente de descongeladas las muestras, para evitar el problema de desarrollo de un nivel mayor de histamina al que poseían.

Los dos métodos usados para las pruebas (filtración del homogenizado y la impregnación de la muestra con papel filtro de  $1 \text{ cm}^2$ ) dieron resultados comparativos y reproducibles.

El tiempo necesario para obtener una visualización del desarrollo de color fue de 30', encontrándose dificultad al efectuar las lecturas en el colorímetro debido a que cuando se trabaja con 12 muestras o más el tiempo entre la lectura de la primera y la última muestra es suficiente para que se desarrolle mayor coloración en las últimas, siendo este método cualitativo ideal para observación visual contra 1 fondo blanco y no colorimétrico.

Para conseguir los papeles impregnados con la muestra objeto de estudio, es mejor colocarlos en el corte situado alrededor o cercano a la cabeza del pescado pues se presume que es el sitio donde se concentra mayor cantidad de histamina, reduciendo así el riesgo de no poder identificar pescado con alto contenido de histamina cuando el papel es colocado en otra área.

Del mismo sitio donde se realizó el corte, para la prueba cualitativa, se tomó la muestra para cuantificar los valores de histamina por el método de Shore/Taylor. (Anexo I).

Con las 3 concentraciones de HRP (3.0, 4.0 y 5.0 mg/ml) usadas el desarrollo de la coloración violeta no mostraba ninguna diferencia significativa en las muestras que contenían hasta 6 mg% de Histamina de ahí para adelante se desarrolló la coloración perfectamente diferenciable mostrando una mayor intensidad las de la concentración de 3.0 mg/ml más que la de 4 mg/ml y ésta más que la de 5 mg/ml (Tabla No. 1 y Figs. 1A, B y C).

Al cabo de 30 minutos las pruebas en las que se usó la concentración de 3 mg/ml de HRP desarrollaron una coloración violeta fuerte con un contenido de 8 mg% de histamina.

Las muestras con 4.0 mg/ml de HRP desarrollaron igual coloración que la anterior, pero a partir de aquellas que contenían 11 mg% de Histamina, y con la concentración 5.0 mg/ml de HRP, la coloración fuerte se desarrolló en las muestras con 16 mg% de Histamina.

### RECOMENDACIONES

- En base a este trabajo se aconseja el empleo de concentraciones de HRP de 4.0 mg/ml a fin de evitar que muestras

con un contenido de 10 mg<sup>o</sup>/o o menos de Histamina no desarrollen la coloración fuerte al término de 30'.

- Las dos formas usadas para obtener la muestra de ensayo son igualmente efectivas y del sitio de donde se obtenga la muestra, dependerá la metodología a emplearse (en la playa, fábrica o laboratorio).
- Es importante realizar por duplicado el análisis tomando muestras de los dos lados dorsales del pescado con el objeto de evitar el problema de diferentes concentraciones de Histamina de varios sitios provenientes del mismo pescado.
- Este método es aconsejable como una prueba preliminar para determinar si existe o no, altas concentraciones de Histamina, debiendo en caso positivo cuantificar la cantidad real existente en los pescados, por métodos fluorométricos.
- La ventaja de este método es la rapidez en su ejecución y el número de muestras que pueden analizarse al mismo tiempo.

#### BIBLIOGRAFIA

- Aiso, K., H. Iada, J. Nakayama, and K. Nakano, 1958.- Histamine poisoning caused by certain marine fish products and the specific etiologic agents. Chiba Daigaku fuhai Kenkyusho Hokoku 11: 1-6.
- Boyer, Y, et. coll., 1956.- Intoxications histaminiques collectives par le thon. (Presse médicale, 1-64, 1003.
- Connell, Y.Y., 1975.- Control of fish quality. Fishing News 1-178. London.
- Eitenmiller, R.R., Koehler, P.E., y Voigt, M.N., 1974.- Histamine content of commercial cheese, sausage and country cured ham. Proc. IV Int. Congress Food Sci. & Technical III: 278-283.
- Hibiki (S) et Simidu (W., 1959.- Studies of putrefaction of aquatic products. 1-27.
- Ienistea, C., 1973.- Significance and detection of histamine in food. In: Hobbs, B.C. & Christian J.H.B. The microbiological safety of food. London. Academic Press. 327-343.
- Jay, J.M., 1970.- Modern food microbiology. New York. Van Nostrand Reinhold. 1-328.
- Takagi (M) et. coll., 1969.- On the formation of histamine during loss of freshness and putrefaction of various marine products. Bull. Fac. Fish, 20, 227-237.
- Lerke, P.A. & E. Bell, L.D. A., 1976.- A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tuna. J. Food Sci. 41: 1282-1284.
- Lonberge, E., J. Movitz and S. Slorach, 1980.- Histamine in canned tuna. Var. Föda 32: 114-123.

Tabla 1.- Desarrollo de color después de treinta minutos

MUESTRA	CONTENIDO DE HISTAMINA (mg <sup>0</sup> /o)	3 mg/ml. HRP	4.0 mg/ml. HRP	5.0 mg/ml. HRP
1	1.6	SIN COLORACION	SIN COLORACION	SIN COLORACION
2	1.9			
3	1.9			
4	2.0			
5	2.2			
6	2.2			
7	2.3			
8	2.5	LIGERA COLORACION VIOLETA	LIGERA COLORACION VIOLETA	LIGERA COLORACION VIOLETA
9	2.7			
10	3.1			
11	3.1			
12	3.7			
13	4.6			
14	5.6			
15	6.2	MEDIANA COLORACION VIOLETA	MEDIANA COLORACION VIOLETA	MEDIANA COLORACION VIOLETA
16	6.2			
17	6.6			
18	6.9			
19	7.1			
20	7.2			
21	8.1			
22	9.0	FUERTE COLORACION VIOLETA	FUERTE COLORACION VIOLETA	FUERTE COLORACION VIOLETA
23	10.0			
24	11.2			
25	12.2			
26	16.1			
27	23.1			
28	23.1			
29	35.3	INTENSA COLORACION VIOLETA	INTENSA COLORACION VIOLETA	INTENSA COLORACION VIOLETA
30	43.5			
31	62.3			
32	91.4			

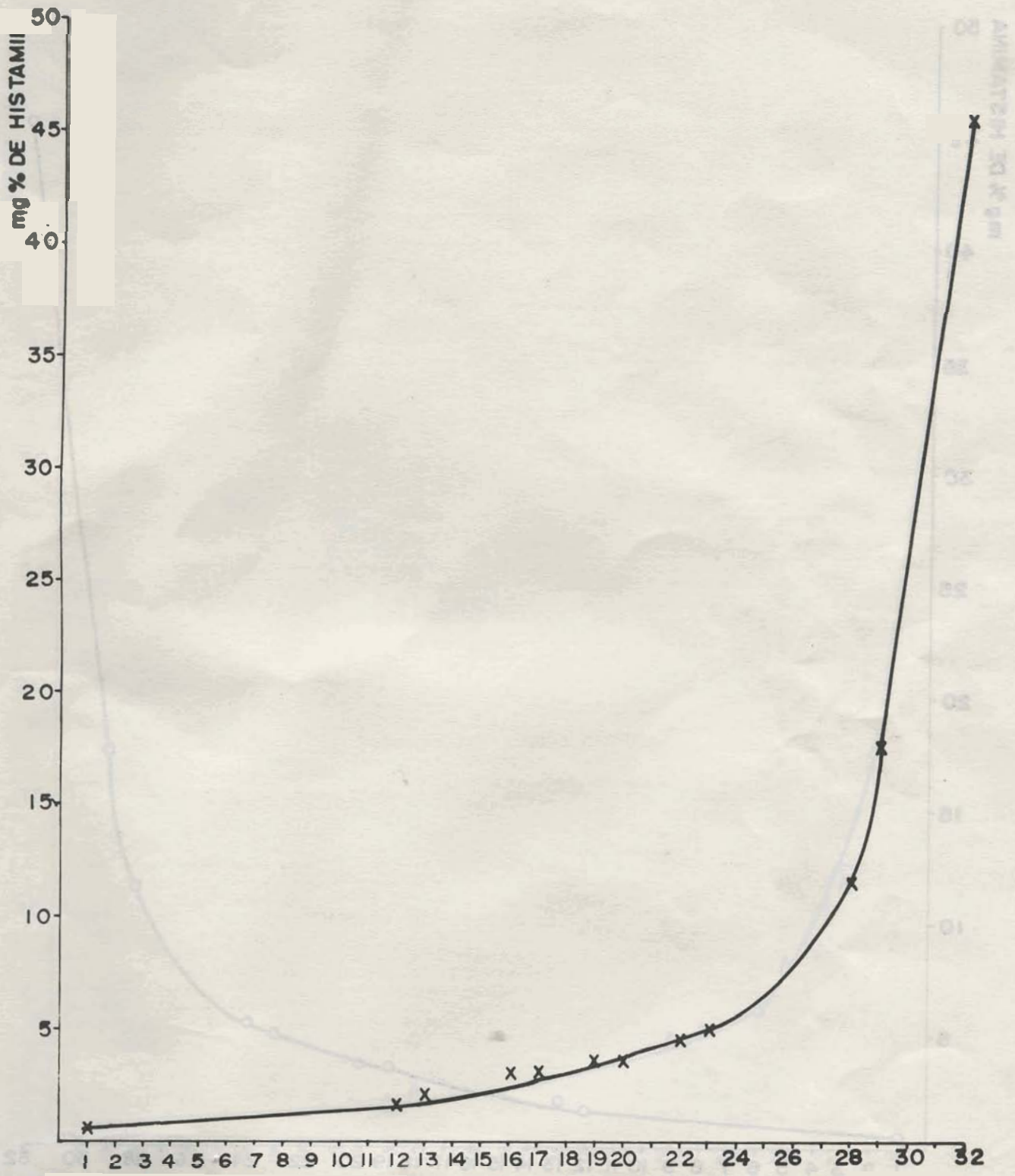


Fig. 1 A.- mgs<sup>0</sup>/o de histamina en muestras usando concentraciones de 3.0 mg/ml de HRP.

MUESTRAS

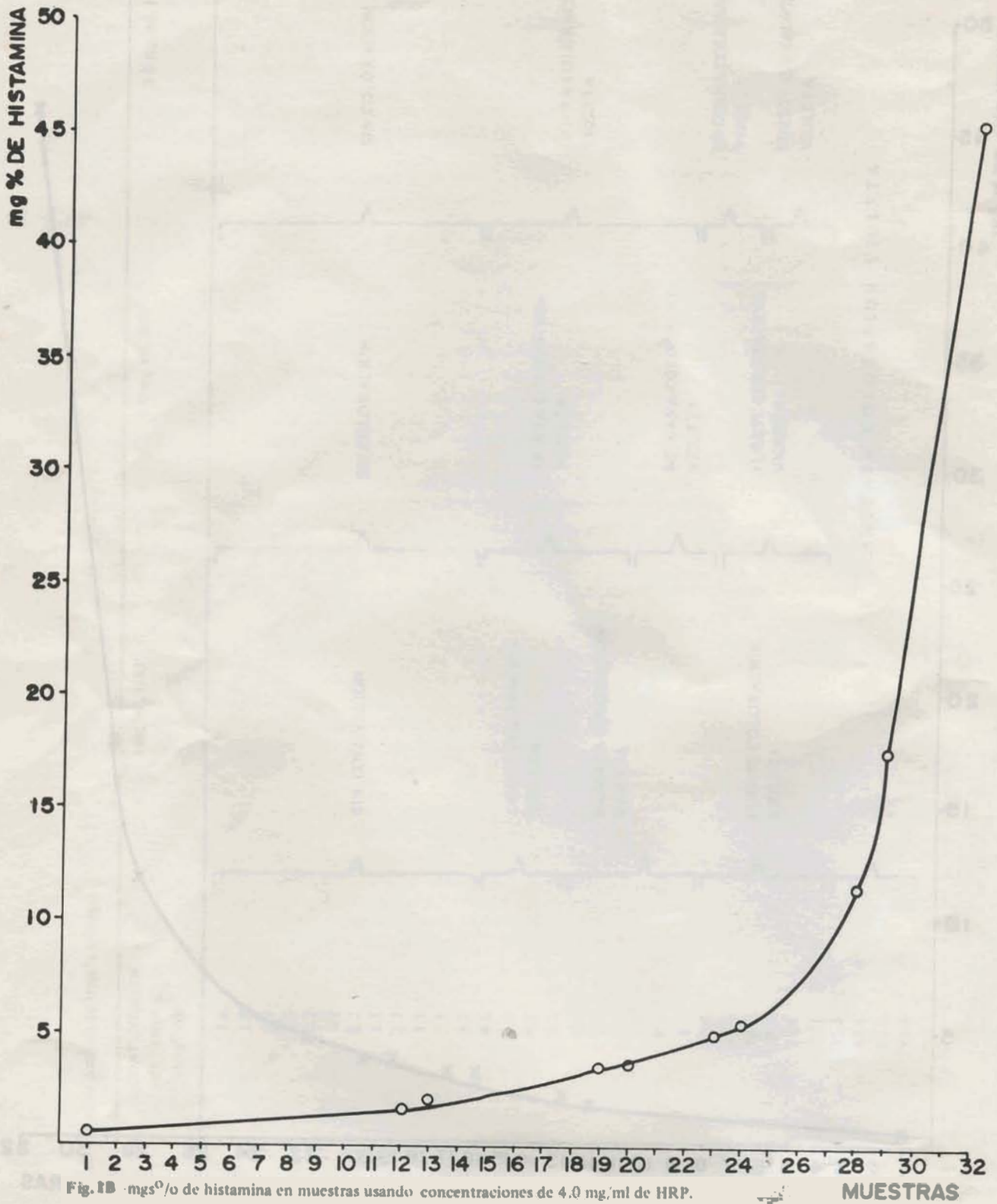


Fig. 1B - mgs<sup>0</sup>/o de histamina en muestras usando concentraciones de 4.0 mg./ml de HRP.

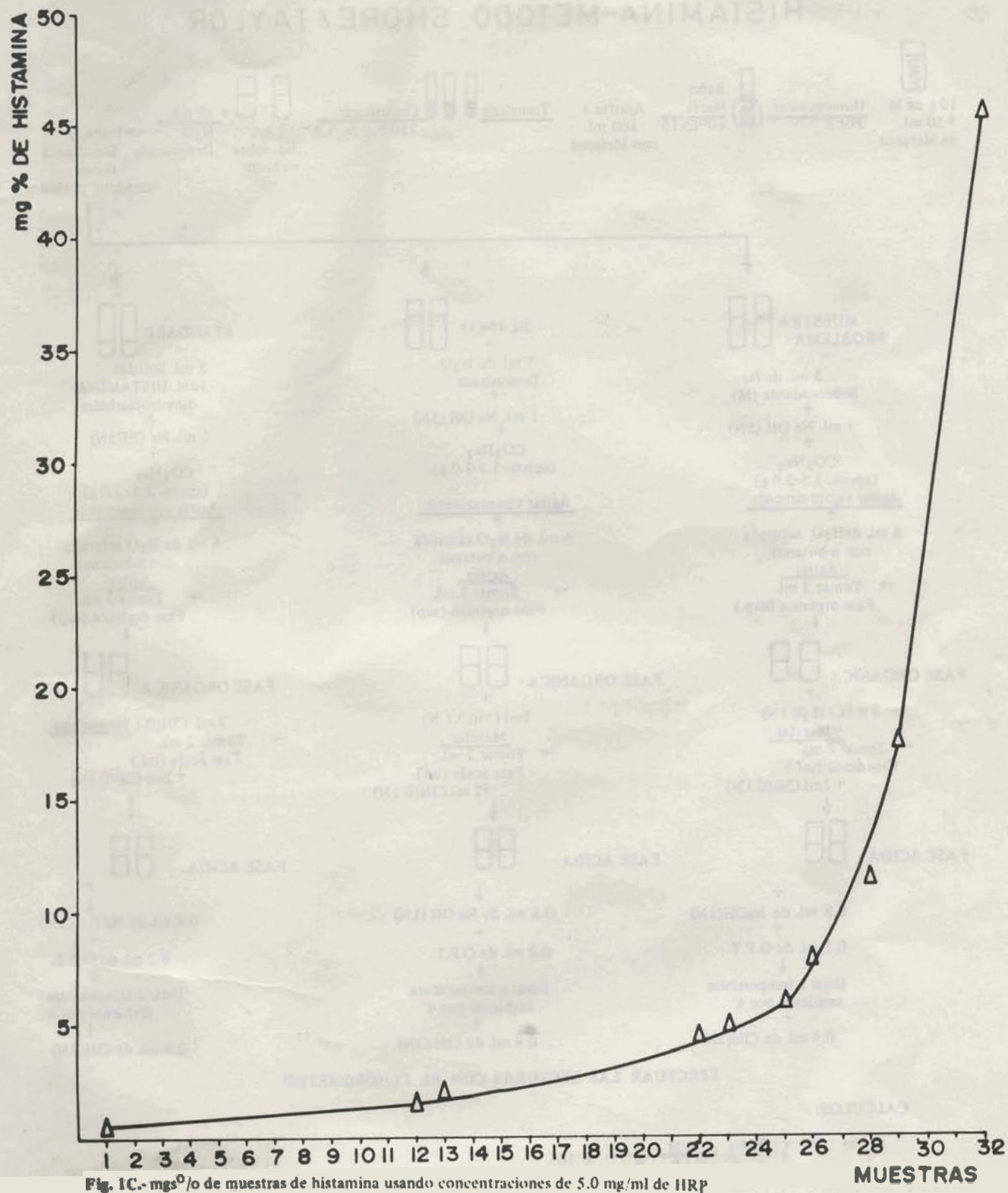
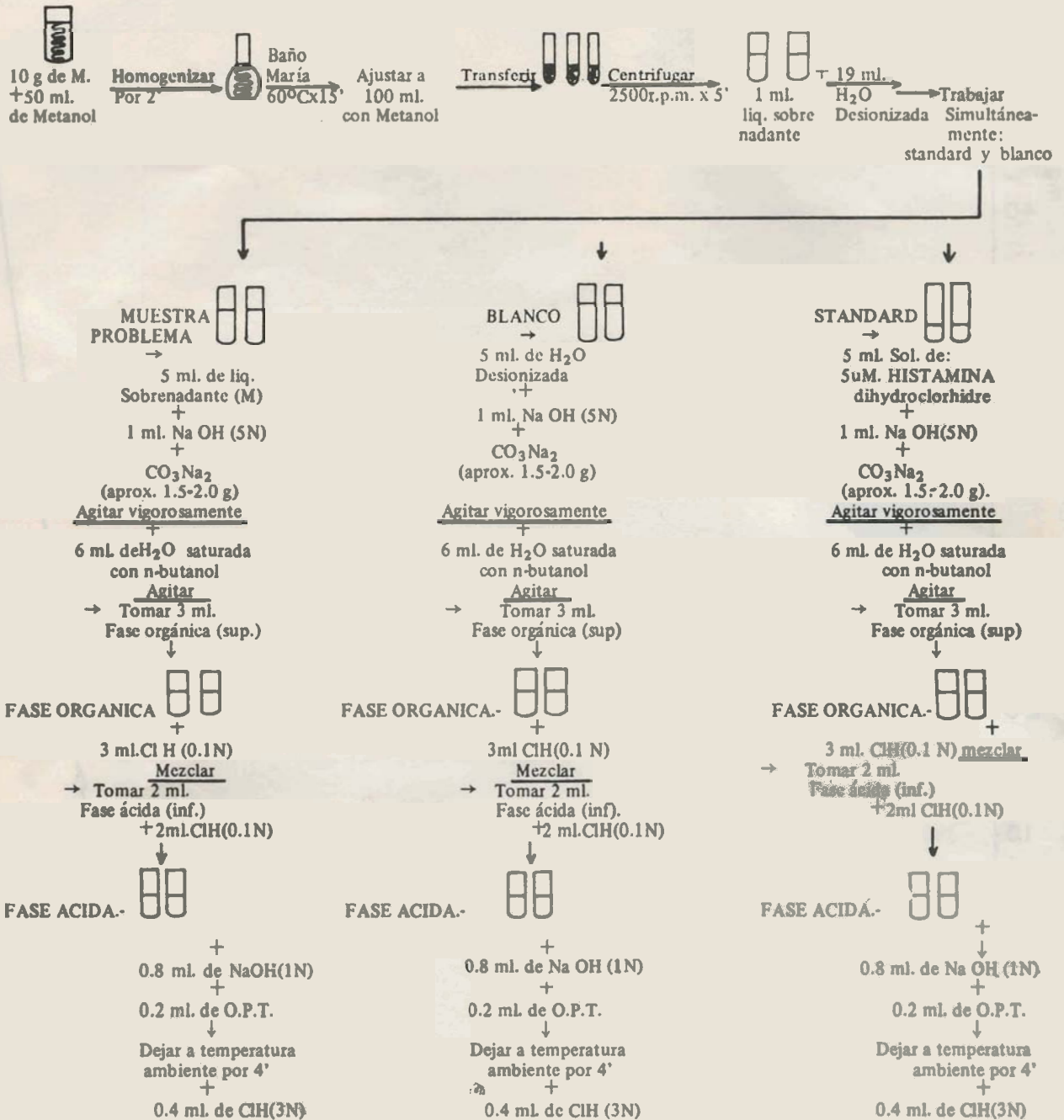


Fig. 1C.- mgs<sup>o</sup>/o de muestras de histamina usando concentraciones de 5.0 mg/ml de HRP

## HISTAMINA-METODO SHORE/TAYLOR



EFECTUAR LAS LECTURAS CON EL FLUOROMETRO

CALCULOS:

$$\%Hm = \frac{LM - B}{LS - B} \times 10$$

De donde:

Hm = HISTAMINA (mg/100 g)  
LM = Lectura de la muestra  
LS = Lectura del Standard (0.9 ug/ml)  
B = Lectura del blanco.