



**UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ**

**FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
INDUSTRIAL**

**TEMA:**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE EFECTIVIDAD DE HISTAMINA POR  
EL METODO DE ENSAYO FLUOROMÉTRICO Y METODO DE BIOFISH  
300 DE BIOLAN EN LA EMPRESA MARBELIZE S.A.”**

**AUTOR:**

**ZAMBRANO CHONILLO DARWIN EFREN**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**ING. ANGELICA INDACOCHEA VASQUEZ, MPC**

**Manta - Manabí – Ecuador**

**2017 – 2018**



**UNIVERSIDAD LAICA “ELOY ALFARO” DE MANABÍ  
FACULTAD DE INGENIERÍA INDUSTRIAL  
TESIS DE GRADO**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE EFECTIVIDAD DE HISTAMINA POR  
EL METODO DE ENSAYO FLUOROMÉTRICO Y METODO DE BIOFISH  
300 DE BIOLAN EN LA EMPRESA MARBELIZE S.A.”**

Sometida a consideración del Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, como requisito para obtener el título de:

**INGENIERO INDUSTRIAL**  
**Aprobado por el tribunal examinador:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## CERTIFICACIÓN

Quien suscribe, ING. ANGELICA INDACOCHEA VASQUEZ, MPC en calidad de directora del trabajo de tesis bajo el tema: “ESTUDIO COMPARATIVO DE EFECTIVIDAD DE HISTAMINA POR EL METODO DE ENSAYO FLUOROMÉTRICO Y METODO DE BIOFISH 300 DE BIOLAN EN LA EMPRESA MARBELIZE S.A.”, elaborado por el señor ZAMBRANO CHONILLO DARWIN EFREN, de la carrera de ingeniería industrial, CERTIFICO, que esta investigación ha sido desarrollada íntegramente por el proponente del proyecto y orientado al proceso por el suscrito.

La investigación y los resultados obtenidos en ella, como los criterios vertidos son de exclusiva responsabilidad y derechos de los autores del trabajo.

---

**ING. ANGELICA INDACOCHEA VASQUEZ, MPC**

## **AUTORÍA**

Las ideas, conceptos, procedimientos y resultados en el presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad del autor.

---

**ZAMBRANO CHONILLO DARWIN EFREN**

## **CESIÓN DE DERECHOS**

ZAMBRANO CHONILLO DARWIN EFREN con cédula de identidad N°131175827-8, declaro ser el autor del presente trabajo, y eximo a la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí y a sus representantes legales posibles reclamos y acciones legales.

---

**ZAMBRANO CHONILLO DARWIN EFREN**

## **AGRADECIMIENTO**

La realización de la presente tesis no hubiese sido posible sin la ayuda de algunas personas involucradas a las cuales estoy infinitamente agradecido.

En primer lugar a Dios por brindarme la fe, voluntad y perseverancia necesaria, gracias a su bendición todo es posible.

A la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí siendo un honorable establecimiento que me abrió sus puertas y me albergó para brindarme su educación de alto nivel.

Un agradecimiento especial a mi tutor la Ing. Angélica Indacochea ya que bajo su enseñanza y asesoría logre con éxito la realización y culminación de mi tesis.

Profesores, colaboradores y compañeros de la Facultad de Ingeniería Industrial que me permitieron todos estos años compartir con ellos y directa e indirectamente me enseñaron todo lo que hoy se expone en el presente trabajo.

## DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado ante todo a Dios por bendecir cada paso que doy e iluminar mi camino para la realización de este trabajo.

A mis padres; Alejandro y Mirian, por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para estudiar y lograr ser un profesional. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mi hermano Hernán por estar siempre presente brindándome su apoyo, y dándome ánimos para no decaer y cumplir mis objetivos siempre.

Y especialmente a mi adorada hija Daniela para quien ningún sacrificio es suficiente, que con su luz ha iluminado mi vida y hace mi camino más claro y a mi esposa Marcela por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos.

## RESUMEN

Con la finalidad de poder establecer la concentración de histamina presente en los productos del mar que van a ser procesados para el consumo se establece un control de calidad en el que se realizaran dos tipos de ensayos, para establecer un estudio comparativo entre los dos métodos que son el de BIOFISH 300 DE BIOLAN y el de espectrofotometría por medio del fluorómetro.

En el capítulo uno se tratara una breve reseña histórica y se abordaría el marco teórico referencial que sustentara conceptos y criterios establecidos en el presente proyecto así como también las decisiones tomadas en el desarrollo del proyecto.

En el capítulo dos se detallara la situación actual de la empresa en base en los análisis de histamina realizados en la actualidad dentro de la empresa MARBELIZE S.A con el método fluorométrico.

En el capítulo tres se establecerá la propuesta y la comparación de ambos métodos de análisis aplicados para la estimación de concentración de histamina en los productos del mar, para finalmente en el capítulo cuatro realizar un estudio financiero con base en la inversión a realizar.

En el capítulo cinco se determinara las conclusiones y recomendaciones encontradas en el estudio realizado en el presente proyecto.

## **ABSTRACT**

In order to establish the concentration of histamine present in seafood products that are going to be processed for consumption, a quality control is established in which two types of tests were carried out, in order to establish a comparative study between the two methods they are the BIOLAN BIOFISH 300 and the spectrophotometry one through the fluorometer.

In chapter one a brief historical review will be dealt with and the theoretical frame of reference that would support concepts and criteria established in the present project will be addressed as well as the decisions taken in the development of the project.

Chapter two will detail the current situation of the company based on histamine analyzes currently conducted within the company MARBELIZE S.A with the fluorometric method.

In chapter three the proposal and the comparison of both methods of analysis applied for the estimation of histamine concentration in seafood products will be established, and finally in chapter four to carry out a financial study based on the investment to be made.

In chapter five, the conclusions and recommendations found in the study carried out in this project will be determined.

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....</b>	<b>3</b>
<b>FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....</b>	<b>6</b>
<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>7</b>
<b>DELIMITACIÓN DEL PROYECTO. ....</b>	<b>8</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>10</b>
<b>METODOLOGÍA APLICABLE .....</b>	<b>11</b>
<b>TIPO DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>11</b>
Investigación bibliográfica. ....	11
Investigación experimental. ....	11

	11
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>15</b>
<b>1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICO-REFERENCIAL DE LA INVESTIGACIÓN. ....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. ANTECEDENTES DE LA EMPRESA MARBELIZE S.A. ....</b>	<b>15</b>
1.1.1. Reseña histórica.....	15
1.1.2. Planificación estratégica .....	16
1.1.3. Calidad.....	17
1.1.4. Normativas .....	18
1.1.5. Productos.....	19
<b>1.2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>25</b>
1.2.1. Histamina .....	25
<b>1.2.2. Validación.....</b>	<b>27</b>
1.2.3. Fluorómetro.....	28
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>30</b>
<b>2. DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. LOCALIZACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>2.3. PROCESO PARA LA DETERMINACIÓN DE HISTAMINA EN MARBELIZE S.A. ....</b>	<b>32</b>
2.3.1. Análisis de histamina durante el proceso.....	40

	12
<b>2.4. DIAGNOSTICO DE LOS PROBLEMAS PRESENTADOS EN EL MEDOTO ACTUAL.....</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>47</b>
<b>3. PROPUESTA PARA LA ESTIMACION DE HISTAMINA EN LA MATERIA PRIMA DE MARBELIZE S.A.....</b>	<b>47</b>
<b>3.1. BIOFISH.....</b>	<b>48</b>
3.1.1. BIOFISH 300.....	48
<b>3.2. Estimación de histamina presente por el método de BIOFESH 300.....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE HISTAMINA POR EL MÉTODO FLUOROMÉTRICO Y MÉTODO BIOFISH 300 DE BIOLAN.....</b>	<b>55</b>
3.3.1. Diseño Estadístico.....	55
3.3.2.2 Diseño Estadístico en Atún Crudo.....	60
3.3.2.3 Diseño Estadístico en Atún Pre-cocido.....	65
3.3.3. Observaciones de los resultados obtenidos en la comparación de los métodos analíticos de histamina en los productos pesqueros.....	70
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>71</b>
<b>4. ANÁLISIS FINANCIERO.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. INVERSIÓN EN LA COMPRA DE BIOFISH 300 DE BIOLAN.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. INVERSIÓN DEL NUEVO MÉTODO DE ANÁLISIS DE HISTAMINA (BIOFISH 300 DE BIOLAN).....</b>	<b>72</b>
<b>4.2. INVERSIÓN ACTUAL MÉTODO DE ANÁLISIS DE HISTAMINA (FLUORÓMETRO).....</b>	<b>72</b>
<b>4.3. FLUJO DE FONDOS.....</b>	<b>73</b>

	13
<b>4.4. VALOR ACTUAL NETO (VAN) .....</b>	<b>73</b>
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. ....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>75</b>
<b>5.2. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. REFERENCIA Y DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS DE BIOFISH 300</b>	51
<b>Tabla 2. MUESTRAS DE ATÚN CRUDO A 1 mg/100 g</b>	60
<b>Tabla 3. DISTRIBUCIÓN F 1mg/100g</b>	60
<b>Tabla 4. DISTRIBUCIÓN T PARA 1mg/100g</b>	61
<b>Tabla 5. MUESTRAS DE ATÚN CRUDO PARA 5mg/100g</b>	62
<b>Tabla 6. DISTRIBUCIÓN F PARA 5mg/100g</b>	62
<b>Tabla 7. PRUEBA T PARA 5mg/100g</b>	63
<b>Tabla 8. MUESTRAS PARA 10mg/100g</b>	63
<b>Tabla 9. DISTRIBUCIÓN F PARA 10mg/100g</b>	64
<b>Tabla 10. PRUEBA T PARA 10mg/100g</b>	64
<b>Tabla 11. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS PRE-COCIDO 1mg/100g</b>	65
<b>Tabla 12. DISTRIBUCIÓN F PARA 1mg / 100g</b>	66
<b>Tabla 13. PRUEBA T PARA 1 mg/100g</b>	66
<b>Tabla 14. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS 5mg/100g</b>	67
<b>Tabla 15. PRUEBA F PARA 5mg / 100g</b>	67
<b>Tabla 16. PRUEBA T PARA 5mg/100g</b>	68
<b>Tabla 17. MUESTRAS PARA ANÁLISIS 10mg/100g</b>	68
<b>Tabla 18. DISTRIBUCIÓN F 10mg/100g</b>	69
<b>Tabla 19. PRUEBA T PARA 10mg/100g</b>	69
<b>Tabla 20. FLUJO DE FONDOS PARA EL PROYECTO</b>	73

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1. DEPARTAMENTO DE CALIDAD .....</b>	18
<b>Ilustración 2. PRODUCTOS PARA EL CONSUMO PERSONAL. ....</b>	20
<b>Ilustración 3. PRODUCTOS DE GOURMET.....</b>	22
<b>Ilustración 4. PRODUCTOS DE FOOD SERVICE.....</b>	23
<b>Ilustración 5. PRODUCTOS DE FROZEN. ....</b>	24
<b>Ilustración 6. PREPARANDO LAS MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS. ....</b>	41
<b>Ilustración 7. FLUORÓMETRO. ....</b>	42
<b>Ilustración 8. PREPARANDO LAS MUESTRAS EN LA COLUMNAS DE DESTILACIÓN.....</b>	43
<b>Ilustración 9. FLUORÓMETRO JUNTO A LAS MUESTRAS.....</b>	44
<b>Ilustración 10. LECTURA DEL FLOURÓMETRO.....</b>	45
<b>Ilustración 11. LECTURA DEL FLUORÓMETRO.....</b>	45
<b>Ilustración 12. BIOFISH 300.....</b>	49
<b>Ilustración 13. REACTIVOS PARA EL ANÁLISIS DE HISTAMINA CON BIOFISH 300 .....</b>	53
<b>Ilustración 14. INSTRUMENTO PARA REALIZAR ANÁLISIS DE HISTAMINA CON BIOFISH 300. ....</b>	54
<b>Ilustración 15. KITS DE BIOFISH 300.....</b>	54
<b>Ilustración 16, DISEÑO ESTADÍSTICO PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS IGUAL .....</b>	56

<b>Ilustración 17. DISEÑO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>57</b>
<b>Ilustración 18. FORTIFICACIÓN DE MUESTRAS 1.....</b>	<b>58</b>
<b>Ilustración 19. FORTIFICACIÓN DE MUESTRAS 2.....</b>	<b>59</b>

## INTRODUCCIÓN

Desde el año 1970 el atún ecuatoriano se comenzó a considerar como un producto de potencial exportación para el país, teniendo un mayor éxito las especies Big eye, Skipjack y Yellowfin que lograron posesionarse dentro de los mercados internacionales y de manera muy especial dentro de los Estados Unidos y Europa.

En la ciudad de Manta se cuenta con las mejores plantas industriales para el procesado de atún del país, además de tener un fácil acceso al producto por la situación geográfica de su puerto lo convierte en el motor fundamental dentro de la industria pesquera (artesanal e industrial) para su procesamiento y distribución dentro y fuera del país.

MARBELIZE S.A. ubicada en el kilómetro 5 ½ vía Manta Rocafuerte, cuenta la más moderna planta procesadora de atún dentro de la región estando siempre a la vanguardia en el uso de la tecnología y desarrollo de nuevos productos desde el año 1998. Dentro de la planta en la actualidad se procesan aproximadamente 150 Toneladas de materia prima diaria donde se produce el atún Gourmet “Yeli”, marca que se encuentra al frente en la innovación dentro del sector, permitiendo lograr un prestigioso posicionamiento como empresa, presentando productos con un valor agregado de alta calidad a sus clientes.

La innovación que presenta la empresa radica en las fórmulas y recetas que acompañan a la materia prima seleccionada, en las que se emplean ingredientes de alta calidad y una constante asesoría de los más calificados chefs de nuestro país.

Actualmente en la empresa MARBELIZE S.A se cuenta con una flota de 7 barcos atuneros que cumplen los requisitos solicitados por la CIAT y la EARTH ISLAND INSTITUTE, que por su capacidad de producción en toneladas métricas se ven en necesidad de realizar análisis físicos químicos a la materia prima que se vaya a procesar dentro de la planta industrial.

El músculo que presenta el pescado es bastante susceptible a ser contaminado durante su proceso de almacenamiento principalmente debido a la actividad y crecimiento de microorganismos dentro de este. De manera general se evalúa sensorialmente la frescura del pescado siendo esto una desventaja por presentarse como métodos muy subjetivos.

Los microorganismos que se presentan en el músculo ayudan a la formación de histamina, cuando estos se empiezan alterar y las proteínas se fraccionan comienzan a liberar aminoácidos “histidina”. Este aminoácido es aprovechado por los microorganismos presentes en el pescado y dan lugar a la proliferación de la histamina en el mismo y si esta concentración rebasa las 50 ppm se presentan síntomas de intoxicación en las personas más sensibles y si sobrepasa las 100 ppm la intoxicación es eminente a cualquier tipo de personas.

Por esta razón la normativa presente en el Ecuador por medio del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) ha dispuesto un límite máximo de 50 ppm, suficientemente seguro para evitar la intoxicación de los consumidores.

Motivo por el cual se ve en la necesidad de la utilización de métodos químicos para la evaluación de la frescura del pescado por medio de parámetros como la histamina presente en el mismo.

En el presente estudio se utilizara dos técnicas analíticas para establecer los parámetros de histamina presente en las muestras tomadas de la materia prima como lo son BIOFISH 300 DE BIOLAN presentándose como alternativa y el método actual basado por fluorometría.

El estudio comparativo de ambos métodos se debe a la adquisición del nuevo equipo que presenta tecnología avanzada como lo es el BIOFISH 300 DE BIOLAN y sirve para realizar análisis de histamina para ser comparado con el fluorómetro que se presenta como actual método midiendo su efectividad a la hora del cumplimiento con todas las especificaciones y parámetros establecidos en los resultados analíticos de las muestras bajo estudio.

En el afán de mejorar los procesos y optimación de tiempo se genera la importancia del presente estudio debido a la gran cantidad de análisis de muestras que la empresa realiza diariamente y el equipo BIOFISH 300 DE BIOLAN aporta de manera rápida y eficaz a la obtención de resultados en comparación del fluorómetro.

Para esto se debe realizar una validación parcial por cada uno de los métodos analíticos y establecer la precisión y exactitud al momento de analizar las muestras y obtener resultados de Histamina.

## **EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Algunas bacterias dan origen a la enzima histidina descarboxiliada en el proceso de su crecimiento que a su vez reacciona con la histidina libre que es un amoniaco natural que se encuentra presente en ciertas familias de peces, especialmente en los de la familia Scombridae que comprende

caballas, atunes y bonitos y dan paso a la proliferación de histamina en los tejidos musculares de los peces.

Cuando ya está formada la enzima histidina descarboxiliada en los peces, el proceso de producción de histamina puede seguir a partir de la histidina presente en los peces e inclusive si las bacterias ya no están activas. Estas enzimas pueden estar activas a temperaturas de mantención en refrigeración o cercanas y probablemente pueden permanecer estables mientras están en el estado de congelación con el riesgo de reactivarse muy rápidamente después de su descongelación.

La proliferación de histamina es más alta en peces crudos o que no se encuentran congelados. Una vez formada la histamina, esta no puede ser eliminada por calor mediante el uso de autoclave y mucho menos por congelación. Al congelar los peces contaminados de histamina se inactivan las bacterias que forman las enzimas y estas continúan su multiplicación una vez siendo descongeladas.

Las bacterias asociadas al desarrollo de histamina comúnmente se encuentran en el agua salada existiendo naturalmente en las branquias e intestinos de peces vivos presentes en el agua salada. Tras la muerte de estos, sus mecanismos de defensas ya no inhabilitan la proliferación bacteriana y las bacterias desarrolladoras de histamina comienzan a reproducirlas.

Los procesos de evisceración y eliminación de las branquias de manera sanitaria reducen en cierto grado la reproducción de histamina pero no llegan al punto de eliminarla, de lo contrario si estos procesos no cumplen estándares de calidad puede llegar a acelerar el proceso de reproducción de las mismas.

Los peces forman parte de la dieta diaria de los seres humanos y el riesgo de intoxicación por histamina está presente. La intoxicación por histamina es química ocurriendo a minutos u horas de haber ingerido alimentos que contiene niveles fuera de los parámetros permitidos de histamina, presentándose como un trastorno leve de varios síntomas principalmente cutáneos gastrointestinales,

neurológicos y en complicaciones de mayor grado como lo son palpitaciones cardiacas en muy raras veces.

Los parámetros antes mencionados convierten a la histamina en un peligro latente para el consumidor y es por ello que las empresas productores tanto para el mercado nacional e internacional se preocupan de cumplir a cabalidad con los controles establecidos para evitar la proliferación de histamina en el producto que ofertan, pero ello a veces no es suficiente por lo que incurren en métodos de análisis para cuantificar la cantidad de histamina presente en el producto y si esos parámetros son permitidos o no.

MARBELIZE S .A., no es ajena a los controles establecidos para evitar la proliferación de histamina y su monitoreo mediante análisis, por lo que desde el año 2007 ha venido efectuando sus análisis mediante el método fluorométrico, con el cual ha cuantificado la histamina de manera muy eficaz. Sin embargo es un método que conlleva a tener problemas de contaminación por medio de la resina entre las muestras tomadas al momento de ser cuantificado sus niveles de histamina, además de ello su calibración se convierte tediosa por no tener los parámetros requeridos en la curva de calibración y tener que estar verificando cual reactivo es el que crea el conflicto.

Esto conlleva a tener pérdida de tiempo, desperdicio de reactivos y tener que correr el riesgo de que exista una contaminación por la resina en la lectura de las muestras, MARBELIZE S.A. siendo una empresa que cumple con todos los estándares de calidad y que esta de la mano en avances tecnológicos brindando un producto inocuo y de calidad se ve en la necesidad de buscar nuevas alternativas que le posibiliten cumplir con las políticas de la empresa en vía de desarrollo.

## **FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿El método de BIOFISH 300 DE BIOLAN mostrara la misma eficacia que el método actual de fluorómetro aplicado en la empresa de MARBELIZE S.A., además de mejorar los tiempos y disminuir las actividades analíticas en el laboratorio?

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

- a) ¿Es factible la obtención e instalación del equipo Biosensor BIOFISH 300 DE BIOLAN?
- b) ¿Cuál es la capacidad y eficiencia de resultados de histamina por medio de este método?
- c) ¿Existirá una diferencia significativa entre los métodos de ensayo FLUOROMETRICO (actual) y BIOFISH 300 (alternativa)?
- d) ¿Se justificara el costo de obtención e instalación del equipo Biosensor BIOFISH 300 DE BIOLAN con los requerimientos y expectativas requeridas por la empresa MARBELIZE S.A.?
- e) ¿Cuáles son los beneficios de implementar el nuevo método con el Biosensor BIOFISH 300 DE BIOLAN en MARBELIZE S.A.?
- f) ¿Mejoraran los tiempos en la obtención de resultados de niveles de histamina en las muestras con el nuevo método BIOFISH 300 DE BIOLAN?

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Elaborar un estudio comparativo de los métodos Biofish 300 de Biolan y fluorométrico en los análisis de histamina de la materia prima en la empresa MARBELIZE S.A., para determinar que en el nuevo método se obtendrán resultados válidos y confiables.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- a) Plantear alternativas que cumplan con los parámetros y desviaciones detectadas durante la ejecución del método que es actualmente utilizado en la empresa.
- b) Establecer los problemas hallados en el método actual para la determinación de histamina en la empresa MARBELIZE S.A.
- c) Aplicar el método Biofish 300 de Biolan para ser comparado con el método actual aplicado en la empresa.
- d) Plantear y analizar los resultados obtenidos en el estudio comparativo que se realizó entre los métodos fluorométrico y Biofish 300 de Biolan.
- e) Establecer si es factible la implementación del método Biofish 300 de Biolan en la empresa MARBELIZE S.A., para la cuantificación de histamina presente en la fibra muscular de la materia prima.

## **DELIMITACIÓN DEL PROYECTO.**

El presente proyecto tiene como campo de acción las instalaciones de la empresa MARBELIZE S.A., por lo que implicara al personal productivo en general de la planta.

## **JUSTIFICACIÓN.**

La intoxicación por medio de histamina es un problema presente en todo el mundo y de manera más común al ingerir peces que se encuentran presentes en nuestra dieta. Sin embargo la presencia de histamina no es extraña en el cuerpo humano ya que se la involucra con la generación de funciones críticas como la liberación de ácido dentro del estómago por medio de su presencia almacenada en células especializadas. Sin embargo su presencia en grandes dosis dentro del cuerpo humano puede volverse toxico y provocar síntomas de envenenamiento.

Debido a la gran existencia de especies afectadas y altas temperaturas que son comunes dentro de la región, la proliferación de histamina dentro de los productos de pesca es de un muy alto riesgo por lo que se recomienda muy rigurosamente el uso de metodologías que eviten la propagación de la misma y métodos de análisis que permitan y certifiquen el buen estado de los productos del mar.

Se debe de tener un monitoreo constante para llevar el control del riesgo de la histamina presente en el producto verificándolo por métodos válidos y certificados que los niveles de histamina en la materia prima están dentro de los parámetros permitidos para el consumo humano.

La evaluación sensorial es utilizada generalmente para la detección de olores que se desarrollan en los peces expuestos al abuso de tiempo y temperaturas altas, es un método muy eficaz para detectar que estos hayan sido sometidos a condiciones de abuso durante su conservación, sin embargo, estos olores son producto natural del deterioro de los peces por lo que convierte a la evaluación sensorial en un método poco eficaz y poco confiable. Por ello es que se recurre a los exámenes en laboratorios para llevar el control oficial por medio de métodos que den resultados validos de los análisis realizados de histamina.

El método fluorométrico utilizado en la empresa MARBELIZE S.A. para la estimación de histamina presente en la materia prima conlleva al análisis de una gran cantidad de muestras diarias, estas son analizadas primeramente en las embarcaciones pesqueras, descargas de la materia prima y así durante su proceso productivo.

Los análisis requieren que se realice una aplicación de técnicas de cromatografía como lo es el fluorómetro y Biosensor Biofish 300 de Biolan, equipos de alta sensibilidad, que son de tipo confirmatorio y de altos costos que además requieren de personalmente altamente calificados para su manejo e interpretación de análisis además del manejo de los mismos.

Hoy en día existen otras técnicas alternativas confiables, son rápidas y que no requieren de personal altamente calificado. Pero es necesario que estos métodos sean comparados con técnicas confirmatorias y más aún si están acreditadas.

Debido a la gran demanda de análisis dentro de la empresa se ha optado por la adquisición de otro equipo como lo es el Biosensor Biofish 300 de Biolan ya que mejora los tiempos de trabajo operativo y su calibración es mucho más rápida con resultados confiables de las muestras analizadas.

El método de fluorométrico es también considerado, pero es mucho más complejo su uso por la serie de pasos que deben realizarse a lo largo de la calibración, preparación de reactivos que se

utilizan y el procedimiento aplicado para la obtención de los resultados que se genera en mucho más tiempo que el de Biosensor Biofish 300 de Biolan.

En la implementación del método de validación de Biosensor Biofish 300 de Biolan la empresa obtendrá un gran beneficio ya que el departamento de control de calidad podrá dar los resultados de análisis de manera mucho más rápida eficaz en comparación del método actual por fluorometría.

La empresa MARBELIZE S.A. atendiendo su política de mejora continua en beneficio de sus clientes y el constante afán de estar a la par de la tecnología en todos sus ámbitos se ve en la necesidad de mejorar sus procesos disponiendo de nuevas tecnologías que se encuentran a la mano como lo es el método de análisis de histamina conocido como Biosensor Biofish 300 de Biolan.

## **HIPÓTESIS**

El nuevo método aplicado para la estimación de Histamina en la empresa MARBELIZE conocido como BIOFISH 300 DE BIOLAN será más factible que el método fluorométrico utilizado actualmente.

## **METODOLOGÍA APLICABLE**

### **TIPO DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación tiene un enfoque mixto ya que se utilizó el modelo bibliográfico para la recolección y análisis de datos, posteriormente se realiza un estudio experimental para realizar la comparación de los métodos de análisis de histamina en los procesos de MAERBELIZE S.A. Se contara con información previa para realizar estudios experimentales con el fin de analizar varios parámetros dentro del uso de ambos métodos.

#### **Investigación bibliográfica.**

Para los fines de la presente investigación, el método bibliográfico no será un fin como tal, sino que se pretenderá obtener conocimientos válidos para establecer un nuevo proceso de investigación.

El método bibliográfico nos proporcionara los parámetros sobre el actual método de ensayo practicado dentro de la empresa para determinar histamina en los productos pesqueros que posteriormente serán evaluados con la aplicación de un nuevo método de análisis.

#### **Investigación experimental.**

El método experimental es el más utilizado en un estudio de investigación ya que el investigador puede tener un control deliberado de las variables y establecer relaciones entre ellas basados en una metodología científica.

El método se utilizara para la recopilación de datos que serán posteriormente comparados con las mediciones tomadas del comportamiento de un grupo bajo control y las del grupo experimental.

## **MÉTODOS**

Para la realización del presente proyecto es necesario incurrir a ciertos métodos de investigación que permitirán analizar, descubrir, comprobar, validar y tomar decisiones sobre los problemas planteados en el estudio. Estos métodos son:

### **Método deductivo.**

Es un método de razonamiento que consiste en tomar conclusiones generales para explicaciones particulares. El método se inicia con análisis de los postulados, teoremas, leyes principios, etcétera, de aplicación universal y de comprobada validez, para aplicarlos a soluciones o hechos particulares. (Bernal Torres, 2006)

El proyecto de investigación partirá de lo general hasta lo particular, por lo que se estará investigando los procesos de análisis hasta determinar cuáles son los problemas que presentan en su aplicación en la empresa analizando cada uno de ellos.

### **Método Inductivo.**

Con este método se utiliza el razonamiento para obtener conclusiones que parten de hechos particulares aceptados como válidos, para llegar a conclusiones, cuya aplicación sea de carácter general. El método se inicia con un estudio individual de los hechos y se formulan conclusiones universales que postulan como leyes, principios o fundamentos de una teoría. (Bernal Torres, 2006)

Durante el desarrollo del presente trabajo se trabajara bajo evidencia con los datos reales obtenidos de las muestras para poder determinar criterios generales durante el proceso de la investigación del presente proyecto.

## **TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN**

La técnica principal a ser aplicada dentro del proyecto es la de la aplicación de la observación directa o de campo, ya que nos permite estar directamente donde se va a realizar la investigación bajo estudio obteniendo datos cualitativos y cuantitativos. Obteniendo un registro sistemático del proceso.

La observación directa es aquella en la cual el investigador puede observar y recoger datos mediante su propia observación. Este tipo de observación puede ser intersubjetiva cuando es basada en el principio de observaciones repetidas de las mismas respuestas por el mismo observador deben reproducir los mismos datos, y la observación intrasubjetiva, que expone que observaciones repetidas de la misma respuesta por observadores diferentes deben reproducir los mismos datos. (Rodríguez Moguel, 2005).

Dentro de las herramientas de apoyo que se pueden considerar dentro de esta técnica de investigación tenemos la observación y la experimentación que serán piezas fundamentales dentro de la aplicación de la técnica investigación de campo.

# CAPÍTULO I

## **1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICO-REFERENCIAL DE LA INVESTIGACIÓN.**

### **1.1. ANTECEDENTES DE LA EMPRESA MARBELIZE S.A.**

#### **1.1.1. Reseña histórica**

El mercado de conservas se ha incrementado en los últimos años presentando nuevos productos derivados del procesamiento del atún para satisfacer las necesidades de los consumidores, mismos que buscan incluso innovaciones en las maneras de abrir las latas de conservas hasta en temas más exigentes tales como es la inocuidad de los alimentos para poder ingresar a su mercado.

La empresa MARBELIZE S.A. desde sus inicios fue una de las más modernas plantas procesadoras de atún de la región estando en la vanguardia con la tecnología y en el desarrollo de nuevos productos, se encuentra ubicada en la ciudad de Manta, provincia Manabí, Ecuador con dirección Km, 5 <sup>1</sup>/<sub>2</sub> vía Manta-Rocafuerte en el Sector Parque del Atún.

La empresa tuvo su nacimiento de un sueño de un ciudadano croata que aprendió de su padre los beneficios que ofrecía el mar y su gran fuente de recursos alimenticios para el consumo humano. El Sr. Ivo Cuka tras establecerse en el Ecuador le ha dedicado más de 40 años de vida al trabajo en el mar con una flota conformada por 7 barcos atuneros fundo la empresa MARBELIZE S.A. creando nuevas plazas de trabajo en beneficio de la ciudadanía.

MARBELIZE S.A. cuenta con un recurso humano de más de 1000 trabajadores que contribuyen al desarrollo económico de la ciudad y la provincia con la flota de 7 barcos con una capacidad de más de 300 TM (toneladas métricas), equipadas con sofisticados equipos electrónicos.

### **1.1.2. Planificación estratégica**

La planificación estratégica en la que se basa la empresa MARBELIZE S.A. está conformada por su trabajo catalogado dentro de la Integridad, temple e iniciativa. Sus logros son una constante práctica de trabajo en equipo que gracias a la constante práctica del desarrollo de personas se obtienen resultados eficientes.

#### ***1.1.2.1. Misión.***

Somos una empresa productora y comercializadora de productos alimenticios; buscamos construir relaciones a largo plazo con los clientes y consumidores en mercados nacionales e internacionales, establecidos en calidad, servicio, innovación y en el desarrollo de nuestros colaboradores para lograr rentabilidad en cada uno de los procesos.

### ***1.1.2.2. Visión.***

Ser marca elegida de productos alimenticios en las familias ecuatorianas y así mismo ser industria referente de calidad, servicio y rentabilidad de productos innovadores en el mercado global.

### **1.1.3. Calidad.**

El departamento de calidad dentro de la empresa es uno de los puntos vitales para la satisfacción de los consumidores, por lo que genera una filosofía y visión dentro de la estrategia de mercado de darle un valor agregado a cada uno de los productos procesados con lo que se busca abrir fronteras en todo el mundo con sus productos.

El flujo de todo el proceso está controlado bajo un estricto control de calidad con la práctica de las buenas prácticas de manufactura (BPM), desde la captura del producto en el mar hasta que se sirve el consumidor el producto.



*Ilustración 1. DEPARTAMENTO DE CALIDAD*

#### **1.1.4. Normativas.**

Con el afán de proteger a los consumidores tanto nacionales como internacionales MARBELIZE S.A. dispone de la práctica de las siguientes normas, regulaciones y leyes:

- Codex Alimentarius
- Análisis de Riesgos y HACCP
- Normativas y Registro de Bioterrorismo ante FDA (Food and Drug Administration)  
Requisitos de la Unión Europea
- Dipoa en Brasil,

- Senasa en Argentina,
- Normas Canadienses,
- Normativas Chilenas,
- Instituto Nacional de Pesca en Ecuador,
- Servicio nacional Pesquera (SANIPES) en Perú e INVIMA en Colombia.

Junto a otras importantes normativas alimentarias internacionales:

BRC Global Standard Food (British Retail Consortium –UK) IFS (International Food Standard)

ISO 9001-2000 otorgado por Bureau Veritas Certificate y acreditada por:

UKAS (Reino Unido), TGA (Alemani) y ANAB (Estados Unidos) Certificado Kosher (Orthodox Unión) World Basc Organization (Business Alliance for Secure Commerce) Certificado de Normas Medio Ambientales ISO 14001

Con esto MARBELIZE S.A. se convierte en la primera empresa latinoamericana en obtener varias de estas certificaciones.

### **1.1.5. Productos.**

MARBELIZE S.A. a través de los años incremento su gama de productos en necesidad de cubrir las expectativas de los clientes más exigentes tanto nacionales como internacionales.

Los productos procesados en la empresa son:

### ***1.1.5.1. Personal.***



***Ilustración 2. PRODUCTOS PARA EL CONSUMO PERSONAL.***

***1.1.5.1.1. Lomos de Atún:*** Líquidos de cobertura: agua y aceites de soya, girasol u oliva.

Contiene los siguientes formatos: 160g, 170g, 175g, 178g, 184g, 200g.

***1.1.5.1.2. Ensalada Tradicional de Atún:*** Basada en la tradicional ensalada de atún de receta ecuatoriana. Ingredientes: Atún, papa, aceite de soya, pimiento verde, vinagre, pimienta, cebolla, sal.

***1.1.5.1.3. Ensalada de Atún a la mexicana:*** Ideal para fiestas o eventos, sola o acompañada.

Ingredientes: Atún, pasta de tomate, maíz dulce, frejol blanco, frejol rojo, cebolla, aceite de soya, agua, azúcar y sal.

**1.1.5.1.4. Ensalada de Atún “Dieta Mediterránea”:** Deliciosa y nutritiva, una receta mediterránea que aporta a la salud. Ingredientes: Atún, habichuela, vinagre, garbanzo, zanahoria, pimiento español, aceituna, aceite de soya, sal.

**1.1.5.1.5. Cazuela Manabita:** Uno de los platos típicos de la provincia de Manabí, y favorito en Ecuador y el mundo. Ingredientes: Atún, plátano, maní, guineo, cebolla perla, aceite vegetal, ajo, sal, pasta de achiote, pimienta.

**1.1.5.1.6. Albóndigas de Atún en Salsa de Tomate:** Ingredientes: Atún, agua, aceite de girasol, pasta de tomate, cebolla perla y miga de pan.

**1.1.5.1.7. Albóndigas de Atún en Salsa de BBQ:** Ingredientes: Atún, agua, salsa de BBQ y miga de pan.

### **1.1.5.2. Gourmet.**

En las presentaciones Gourmet se cuenta con un recipiente de vidrio insuperable en el mercado nacional en beneficio de la conservación del sabor del atún, la salud del cliente y además que le permite al cliente observar el producto dentro de su frasco de vidrio.

El producto gourmet procesado en la empresa es de muy alta calidad y además cuenta con atractivo empaque para su presentación por lo que le da muchas ventajas sobre otros productos en el mercado. El producto tiene la ventaja de poder ser consumido y guardado refrigerada mente en su propio envase para consumirse después sin perder su sabor y consistencia. Los productos elaborados

vienen en las siguientes presentaciones de 180g, 200g, 225g y 240g, además son elaborados según el requerimiento del cliente y el mercado.



*Ilustración 3. PRODUCTOS DE GOURMET.*

**1.1.5.2.1. Lomitos de Atún con “Rodajas de Limón” en aceite girasol:** Ingredientes: Atún, aceite girasol, rodajas de limón.

**1.1.5.2.2. Ventresca de Atún:** La Ventresca es un producto seleccionado, procesado artesanalmente. Es el vientre o panza del atún, con un delicioso sabor que se diferencia claramente por su consistencia, color y textura. Ingredientes: Ventresca de Atún, aceite de oliva. Formato de 120g.

**1.1.5.2.3. Bocatún – Atún con mayonesa y Vegetales:** Ingredientes: Atún, mayonesa, pimiento rojo, aceitunas verdes en rodajas, paprika.

**1.1.5.2.4. Filetes de Atún:** Ingredientes: Atún, aceite de oliva.

**1.1.5.2.5. Pimientos rellenos de Atún:** Ingredientes: Atún y pimiento rojo.

### **1.1.5.3. Food Service.**

Food service es ofrecido al mercado consumidor de los hoteles, restaurantes, barcos, aviones, escuelas, hospitales e instituciones.



**Ilustración 4. PRODUCTOS DE FOOD SERVICE.**

**1.1.5.3.1. Presentación Pouch:** Líquidos de cobertura: agua y aceites de soya, girasol u oliva.

Contiene los siguientes formatos: de 200g, 350g, 500g, 650gr, 1kg, 3kg y 7kg.

**1.1.5.3.2. Presentación Lata:** Líquidos de cobertura: agua y aceites de soya, girasol u oliva.

Contiene los siguientes formatos: Ro-900, Ro-1000, Ro-1705, Ro- 1730, Ro- 1800, Ro-1880g.

**1.1.5.3.3. Albóndigas de Atún en Salsa de Tomate:** Ingredientes: Atún, agua, aceite de girasol, pasta de tomate, cebolla perla y miga de pan. Contiene los siguientes formatos: 500g, 1kg, 3kg y 7kg.

**1.1.5.3.4. Albóndigas de Atún en Salsa de BBQ:** Ingredientes: Atún, agua, salsa de BBQ y miga de pan. Contiene los siguientes formatos: 500g, 1kg, 3kg y 7kg.

**1.1.5.4. Frozen.**



**Ilustración 5. PRODUCTOS DE FROZEN.**

**1.1.5.4.1. Albóndigas de Atún precocinadas apanadas y congeladas**

**1.1.5.4.2. Aceituna rellenas de Atún apanadas y congeladas**

*1.1.5.4.3. Nuggets de Atún precocinadas apanadas y congeladas.*

*1.1.5.4.4. Hamburguesas de Atún precocinadas apanadas y congeladas.*

*1.1.5.4.5. Steak de Atún congelado.*

## **1.2. MARCO TEÓRICO.**

### **1.2.1. Histamina.**

La histamina es una amina que contiene un amplio poder antigénico, se encuentra presente en los peces en altos niveles que puede producir intoxicación que también es conocida como escombrototoxicosis o escombroidosis por su relación al alto consumo de la familia de peces Scombridae, al tratarse de una sustancia altamente estable en calor, esta, puede resistir los diferentes tratamientos térmicos practicados durante el proceso de los productos del mar incluyendo el esterilizado en autoclave.

La intoxicación por histamina es un problema de alcance mundial en los países donde se ingiere pescado con altos niveles de esta amina. La histamina es común en el pescado y otros alimentos (queso, vino y embutidos), pero los niveles en estos productos son generalmente mucho más bajos. La

histamina se forma en el pescado post mortem por descarboxilación bacteriana de la histidina. Los pescados con alto contenido de histidina libre permanecen a las familias Scombridae (bonito, caballa, atún) y Clupeidae (boquerón, sardina, jurel, arenque). La histamina es resistente al calor y no se destruye por la cocción o enlatado. La normativa europea marca unos límites entre 100 y 200 ppm (mg/Kg de pescado), y el doble en productos de pesca sometidos a maduración y salado. (Gil Hernández, 2010)

Es de muy alta la posibilidad de ingerir histamina por el alto consumo de pescado en la dieta diaria del ser humano por lo que su procesamiento y tratamiento durante su conservación son una parte muy crítica en las empresas que producen productos del mar.

La actividad antigénica se sitúa en los constituyentes del sarcoplasma, que forma un 30% de la masa muscular. Esta actividad es termostable y resiste 10 minutos de ebullición a 100°C. Los pescados son la causa de la mitad de los choques anafilácticos de origen alimentario y pueden ser responsables de manifestaciones asmáticas. El pescado es muy liberador de histamina, y el atún por ejemplo, es muy rico en histamina. Por otra parte, si el pescado no es muy fresco, la histidina que contiene puede transformarse en histamina. Por último, hay que decir que los pescados secos contienen elevadas cantidades de histamina. (Cennelier, 1999)

Los niveles de histamina pueden alcanzarse antes de que los pescados presenten signos de descomposición o caracteres organolépticos desagradables (sabor metálico, picante). Las bacterias histaminoformadoras están presentes en el ambiente marino, y generalmente existen en las agallas e intestinos de los peces. Tras la pesca, en los peces muertos los mecanismos de defensa dejan de funcionar y dejan inhibir el crecimiento bacteriano, y las bacterias comienzan a producirse a niveles altos de histamina en un amplio rango de temperatura. Una vez formada y puesta en marcha la enzima histidina-decarboxilasa, esta puede seguir produciendo histamina en el pescado aunque ya no estén inactivadas las bacterias, incluso dicha enzima se mantiene funcional a temperaturas próximas a la

congelación (dicha temperatura es estable, no se degrada, pudiéndose reactivar rápidamente tras la descongelación). La histamina formada no se destruye ni por el calor ni con la congelación. (Bergillos Gasi3n, 2013)

La histamina presente en los productos derivados del mar (peces) es muy alta, por ello se debe de establecer controles en todos los puntos de conservaci3n de los mismos desde su captura en su habitad. Los controles deben de ser rigurosos por lo que se debe de contar con m3todos que permitan establecer el contenido de histamina en los peces que ser3n procesados para el consumo humano.

### **1.2.2. Validaci3n.**

Se considera la validaci3n de un m3todo anal3tico al proceso mediante el cual se establece criterios, basados por estudios estad3sticos, cient3ficos, t3cnicos que se dar3 para su uso previsto en el laboratorio si las caracter3sticas que presentan en el desempe3o un m3todo aplicado cumplen con los requisitos propuestos para su aplicaci3n anal3tica.

La validaci3n de un m3todo se puede definir como el proceso de demostraci3n experimental y documentada de que un m3todo anal3tico realiza lo que se espera de 3l. Por ejemplo, para m3todos anal3ticos aplicados a muestras farmac3uticas existen gu3as de validaci3n establecidas por diferentes organismos como la Farmacopea Americana (USP). (Sierra Alonso, G3mez Ruiz, Per3z Quintanilla, & Morante Zarcero, 2010)

Las mediciones en general, y particularmente las anal3ticas, se utilizan para tomar decisiones en diferentes campos: uno de ellos es la relaci3n compra/venta o aceptaci3n o rechazo como puede ser aceptaci3n de un producto en otro pa3s; selecci3n de un proveedor; evaluaci3n de la conformidad de un producto etc. La importancia que aquellas mediciones sean realizadas de una manera confiable,

no siempre es evidente. El objetivo de la validación de métodos de medición es el establecimiento de una evidencia objetiva, documentada que demuestre con alto grado de probabilidad, que el método es lo suficiente fiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos. (Leiva Guzmán, 2006)

En el caso en que se utilicen métodos oficiales, métodos normalizados o métodos de organismo nacionales o internacionales reconocidos, o basados en ellos, es posible que se necesite validación de los resultados (la validación es el acto de dar por buenos los resultados obtenidos). Cuando utilicemos estos métodos los laboratorios deberán antes de verificar ninguna muestra, verificar su capacidad para cumplir de forma satisfactoria todos los requisitos establecidos en dicho método. (Silva García & García Mermejo, 2006)

La validación nos permitirá establecer criterios de aceptación o rechazo frente a diferentes métodos analíticos aplicados para la estimación de histamina en los productos del mar que serán sometidos a procesos para sus diferentes presentaciones para el consumo de las personas.

La validación de un método analítico consiste en la determinación de las características de funcionamiento del mismo y en la comprobación de que estas son adecuadas a la aplicación que se le quiere dar. Por lo tanto abarca dos aspectos fundamentales, que son: la evaluación de los parámetros de calidad del método y la adecuación de estos a unos requerimientos analíticos concretos. (Polo Piñeiro, 2007)

### **1.2.3. Fluorómetro.**

El fluorómetro es otro aparato espectrométrico, no menos importante que permite la medición de la fluorescencia que puede estar presente en la muestra, o, lo que es más frecuente, puede ser

desarrollada por la muestra. La espectrometría infrarroja implica colocar la muestra en una celda atravesada por la radiación proveniente de una fuente infrarroja. La radiación transmitida al atravesar el espectrómetro es dispersada en un espectro mediante un prisma de cloruro de sodio, u otra sal, o mediante una red de difracción. La intensidad de la radiación se mide con un bolómetro, dispositivo capaz de detectar cambios extremadamente pequeños de temperatura con la ayuda de un amplificador electrónico, la intensidad de radiación así medida se registra mediante un aparato registrador gráfico u otro dispositivo que incluya una impresora. (Gennaro, 2003)

Fluorimetría, técnica analítica para la identificación de cantidades mínimas de una sustancia por detección y determinación de la longitud de onda característica de la luz que emite durante la fluorescencia. Fluorómetro, es el instrumento que se emplea en fluorimetría, constituido por una fuente de energía (p. ej. Una lámpara de arco de mercurio o lámpara de xenón) para inducir fluorescencia, filtros monocromáticos para la selección de la longitud de onda y detector. (De Alvear, 1996)

La fluorimetría es una técnica analítica para estimar los niveles de histamina presentes en los productos pesqueros muy usada dentro del mercado, ya que nos permite estimar si los parámetros que se tiene están dentro del permitido para el consumo humano. En el Ecuador el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), mediante NTE INEN 458:2012 expidió la Norma técnica ecuatoriana para la determinación de histamina en los productos del mar por el método Fluorométrico.

# CAPÍTULO II

## 2. DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL.

En el capítulo que se muestra a continuación se establecerá una breve descripción sobre el proceso que la empresa emplea actualmente para establecer los parámetros de histamina presente en el producto durante su procesado. Se realizara un estudio de la situación actual del sistema empleado para la aplicación del método fluorometrico dentro de la empresa MARBELIZE S.A.

El procesamiento de los productos de la empresa requiere exigencias de control para establecer un producto de calidad e inocuidad, el departamento de control de calidad cumple un rol fundamental y de manera directa en el resultado del producto obtenido ya que es el encargado de brindar las garantías de que se cumplan con los requerimientos establecidos y especificaciones de calidad nacionales e internacionales durante el procesamiento de los productos.

Durante el procesado del pescado se tiene que tener muy presente la formación de histamina que se puede generar por la inadecuada preservación del pescado, mala higiene en el procesado y almacenado del pescado, exposición a temperaturas inadecuadas y por tiempos prolongados que expone a una muy alta probabilidad de presencia de histamina en cantidades fuera de los rangos establecidos.

## 2.1. ANTECEDENTES

MARBELIZE S.A. es una empresa con amplia trayectoria dentro del sector industrial en el proceso de conservas y productos del mar ubicada en la ciudad de Manta, el constante cambio tecnológico y económico que se vive en el mundo actual globalizado obliga a la empresa presentar nuevas alternativas y estrategias que los mantengan vigentes dentro del mercado.

La empresa está sujeta a los constantes cambios que generan las demandas de los clientes actuales y potenciales y fiel a los objetivos trazados como la responsabilidad social y sustentabilidad se esfuerza en mejorar la calidad de sus procesos e innovar en cada uno de ellos aportando así con ese valor agregado que hace atractivo el producto para el consumidor.

La constante capacitación y promoción de los actuales trabajadores bajo normativas de calidad, medio ambiente e inocuidad le permite transparentar su trabajo para el consumidor, método que ha sido de vital importancia para el éxito obtenido hoy en la actualidad.

En el afán de innovación de sus procesos MARBELIZE S.A. se ve en la obligación de mejorar el proceso de control de calidad, específicamente en el método de análisis para el control de los parámetros de histamina por un método que le permitirá seguir fortaleciendo su concepto de empresa innovadora y estar a la par con los avances tecnológicos.

MARBELIZE S.A. como uno de los mayores productores de conservas y productos innovadores a nivel mundial, se caracteriza por su reconocida y excepcional calidad que brinda a sus clientes. Además de ello cuenta con la planta de procesamiento de atún más moderna del país. La misión fundamental de la empresa es desarrollar una estrategia de aseguramiento de calidad que brinde garantías para el consumo a todos los clientes. MARBELIZE S.A. sustenta de atún a más de 900 marcas de todo el mundo.

## **2.2. LOCALIZACIÓN.**

Las instalaciones de MARBELIZE S.A. se encuentran ubicadas en el kilómetro 5 ½ vía Manta-Rocafuerte, dentro de las instalaciones del Parque del Atún en el cantón Jaramijo, Provincia de Manabí, Republica de Ecuador. La temperatura media anual oscila entre los 25 a 29° C.

## **2.3. PROCESO PARA LA DETERMINACIÓN DE HISTAMINA EN MARBELIZE S.A.**

El siguiente procedimiento fluorométrico será usado para determinar el contenido de histamina en pescado crudo, precocinado y producto terminado (Congelado o conservas).

### **1.1 PRINCIPIO DEL METODO.**

La Histamina es extraída del pescado por homogenización con metanol al 75% (v/v). El extracto de pescado con metanol será pasado a través de una columna con resina de intercambio iónico. La histamina es derivatizada con O-Phthaldialdehyde para formar un compuesto fluorescente, el cual es medido usando un fluorometro donde la histamina es cuantificada usando estándares externos.

### **1.2 APLICACIÓN Y ALCANCE.**

Este método es aplicable para pescado y productos derivados del pescado.

### 1.3 EQUIPOS Y MATERIALES.

Enjuague todo el plástico y recipientes de vidrio con HCl (1-3) y H<sub>2</sub>O antes del uso.

- Columnas cromatográfica. Kontes (k- 422250), con capacidad para 250 ml. Controlar el flujo de líquido por la columna en 3 ml/min.
- Fluorometro Turner Quantech Modelo FM109515 SN= 1095000750562, utilizando un filtro de excitación NB 360 y un filtro de emisión SC 415 o SC 460.
- Fluorómetro Turner Quantech Modelo FM109515, SN 1095061225466 utilizando un filtro de excitación NB 360 y un filtro de emisión SC 415 o SC 460.
- Balanza analítica (Max. 120 g d= 0.1 mg.)
- Balanza semianalítica (Max 1200 g d= 0.01g.)
- Balanza semianalítica Sartorius Serie ELT602 195 (Max. 600 g.)
- Dispensadores con capacidad para 5 y 10 ml
- Dispensador con capacidad para 1 ml.
- Probetas plásticas con capacidad para 100 ml.
- Flash volumétrico con capacidad para 100 ml.
- Flash volumétrico con capacidad para 1000 ml.
- Soportes metálicos de tubos para centrífuga.
- Tubos para centrífuga plásticos con tapa de 50 ml.
- Reloj cronómetro.
- Cubetas redondas de 10 X75 mm de boro silicato.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 5 y 10 ml de capacidad
- Pipetas
- Vasos plásticos con capacidad para 250 ml.
- Agitador de vidrio

- Procesador de alimentos.
- Agitador Vortex V-1 N 970164
- Gradillas.
- Beaker de vidrio de 250 ml de capacidad.
- Espátula.
- Frasco ámbar de 500 ml.
- Frasco ámbar de 5000 ml.
- Beaker plástico de 2500 ml.

#### **1.4 REACTIVOS**

- Resina de intercambio iónico (Bio-Rad AG1-X8, 50-100 mesh)

Para convertirla a la forma OH proceder como sigue:

- a) Colocar en un beaker la cantidad 66.6 gr de resina.
- b) A la resina, añadir 2N de hidróxido de sodio en proporción de 15 ml de hidróxido de sodio por gramo de resina.
- c) Mezclar bien la resina y el hidróxido de sodio 2N
- d) Agitar la mezcla usando agitador magnético por un mínimo de 20 minutos, pero nunca que sobrepase más de 30 minutos. Decantar el líquido, evacuarlo y repetir con 2N de Hidróxido de sodio adicional.
- e) Lavar la resina vigorosamente con agua destilada para remover todas las impurezas del hidróxido de sodio.
- f) La solución de resina con agua destilada, dejar decantar y desalojar el agua, y la resina lavarla completamente con agua destilada hasta lograr un PH neutro en el filtrado.
- g) Una vez que se obtenga PH neutro en la resina, guardar esta con suficiente agua destilada en un Erlenmeyer con tapa, hasta su utilización.

Prepare resina fresca por semana y guarde con suficiente agua destilada.

- Ácido Fosfórico, 3.57N: Medir 121.8 ml de 85% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y llevar a un litro con agua destilada.

El Indicador de Fenolstaleina - disuelva 0.05 g de fenolstaleina en 100 ml de etanol.

La estandarización del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3.57 N. En un matraz Erlenmeyer de 250 pipetear 5 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3.57N, agregue 5 gotas de indicador de fenolstaleina (\*). Titule con NaOH al 1N hasta un cambio rosado débil de la solución. Mezcle durante la adición del NaOH.

El volumen del titulante (1N NaOH), debe ser 17.85 ml para un reactivo de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3.57 N.

Si no, ajuste la concentración de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

Para conseguir el volumen del titulante.

$$N_{H_3PO_4} = \text{la Normalidad del } H_3PO_4 = 3.57 \text{ N}$$

$$V_{H_3PO_4} = \text{el Volumen del } H_3PO_4 = 5 \text{ ml}$$

$$N_{NaOH} = \text{la Normalidad del Hidróxido de sodio} = 1.00\text{N}$$

$V_{NaOH}$  = el Volumen del titulante (1N Hidroxido de sodio) requerido al titular 5.00 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3.57 N.

$$N_{H_3PO_4} V_{H_3PO_4} = N_{NaOH} V_{NaOH}$$

$$V_{NaOH} = N_{H_3PO_4} V_{H_3PO_4} / N_{NaOH}$$

$$V_{NaOH} = 17.85 \text{ ml}$$

Para ajustar la Normalidad del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> si  $V_{NaOH}$  no es igual a 17.85 ml:

$$N_{H_3PO_4} = \text{desconocido}$$

$$V_{H_3PO_4} = 5 \text{ ml}$$

$$N_{NaOH} = 1 \text{ N}$$

$$V_{NaOH} = 20 \text{ ml, por ejemplo,}$$

$$\text{Entonces, } N_{H_3PO_4} V_{H_3PO_4} = N_{NaOH} V_{NaOH}$$

$$N \text{ H}_3\text{PO}_4 = N \text{ el NaOH } V \text{ NaOH } / V \text{ H}_3\text{PO}_4$$

$$N \text{ H}_3\text{PO}_4 = (1N \times 20 \text{ ml}) / (5 \text{ ml})$$

$$N \text{ H}_3\text{PO}_4 = 4N.$$

Esto significa que las concentraciones de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> deben ser ajustadas agregando bastante agua destilada para bajar la normalidad de 4N a 3.57 N.

Agregue agua destilada entonces en pequeñas cantidades en el frasco de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, movimiento o mezclando y repita el procedimiento de estandarización hasta que se obtenga H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 3.57 N.

Si la normalidad del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> después de la estandarización es entonces menor que 3.57 N, agregue H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% en pequeñas cantidades y repita la estandarización.

- Hidróxido de sodio 2.0 N: Pesar 80 gramos de NaOH, disolver y llevar a un litro con agua destilada.
- Hidróxido de sodio 1.0 N: Pesar 40 gramos de NaOH, disolver y llevar a un litro con agua destilada.
- O-Phthaldialdehyde (OPT) solución - 0,1% (w / v): Disolver 100 mg de OPT en 100 ml con metanol puro. Cuando no se usa de debe guardar en una botella obscura (ámbar) en el refrigerador. Preparar soluciones frescas semanalmente.
- Solución estándar de histamina. Guardar en refrigeración.
  - a) Solución Stock (A). Pesar 0,1691 gramos de histamina pura en un flask volumétrico de 100 ml. Y enrasar con HCL 0,1N (Solución A: 1 mg. /ml). Preparar fresca semanalmente.
  - b) Solución intermedia (B). Pipetear 1.0 ml de solución Stock A en un flask volumétrico de 100 ml, y enrasar a 100 ml con HCL 0.1N (Solución B: 10 ug. /ml). Preparar fresca semanalmente.

- c) Solución Control (A1). Pipetear 1.0 ml. de solución A, y enrasar a 100 ml con metanol. (Solución control A1: 10 ug. /ml). Prepare solución diaria.
- d) Soluciones de trabajo (C, D, E). Pipetear 1.0 ml, 2.0 ml y 3.0 ml de la solución B, y enrasar cada una a 100 ml con HCL 0,1N (Soluciones, C, D, E: 0,5; 1,0; 1,5 ug/5ml.). Prepare soluciones de trabajo diarias.

Guardar en el refrigerador las soluciones cuando no estén en uso.

- Ácido Clorhídrico 1.0 N: Medir 83 ml de HCL y llevar a un litro con agua destilada.
- Ácido Clorhídrico 0.1 N: Medir 100 ml de HCL al 1N y llevar a un litro con agua destilada.
- Metanol al 75% (v / v). Transferir 750 ml de metanol a un flask volumétrico y diluirlo hasta la marca con agua destilada.

Precaución: Los ácidos y el hidróxido de sodio son sumamente peligrosos, hay que tener extremo cuidado al manejarlos.

### **1.5 PREPARACIÓN DE LA COLUMNA.**

- a) Añadir la masa de resina preparada dentro de cada columna cromatográfica hasta que llegue a una altura de 8 cm.
- b) Mantener el nivel de líquido (agua) por encima de la resina todo el tiempo.
- c) Lave la columna con 10 ml H<sub>2</sub>O antes de aplicar cada extracto.

Nota: Para un analista cinco columnas son suficientes para poder manejarlas correctamente.

En cada columna con resina se deberá pasar máximo 10 extractos de pescado, siempre y cuando las muestras pasadas no presenten porcentajes altos de histamina (mayor a 1,7 mg%); caso contrario se deberá cambiar la resina.

No regenere la resina en la columna.

## 1.6 DETERMINACION

- a) Preparar 10 gramos de pescado previamente homogenizado con 90 ml de metanol al 75% en un Beaker plástico de 250 ml.
- b) Usando una varilla de vidrio agitar la mezcla.
- c) Dejar decantar la muestra por un tiempo aproximado de 2 min.

Nota: La evaporación de metanol de lo filtrado es una causa de resultados erróneos.

- d) Pasar 10 ml. de agua destilada desde arriba atravesando la resina en la columna y descartar esta agua. ( Para desalojar algún residuo de análisis anterior)
- e) A la salida de la columna colocar un tubo plástico para centrífuga de 50 ml. conteniendo 5ml. de 1N HCL.
- f) Pipetear 1 ml. del extracto (Extracto de pescado con metanol) y poner sobre la resina con 5 ml. de agua destilada.
- g) Inmediatamente abrir la válvula de la columna para que comience a fluir. h. Cuando el nivel del líquido esté 2 mm por encima de la resina agregar 5 ml, 10 ml y 20 ml de agua destilada separadamente.
- h) Descontinuar el fluido cerrando la válvula en la salida de la columna.
- i) Sacar el tubo plástico para centrífuga y diluir el contenido con agua destilada hasta completar 50 ml.
- j) Si por alguna razón se va a posponer los análisis, se debe guardar lo fluido en el refrigerador bien tapado. Al inicio de la jornada previo a la determinación de histamina, encender el fluorómetro para su respectivo calentamiento.
- k) En tubos plásticos para centrífuga de 25 x 150 mm pipetear por separado 5 ml de 0,1N HCL (blanco), soluciones C, D, E; y las soluciones de muestra pasadas a través de las columnas.
- l) Añadir 10 ml de 0,1N HCL a cada tubo y colocar en el agitador.

- m) Añadir 3 ml de 1N NaOH y agitarlo.
- n) Después de 5 minutos de haber agregado el hidróxido de sodio, añadir 1 ml de solución de OPT y agitar inmediatamente.
- o) Exactamente después de 4 minutos de haber agregado el OPT, añadir 3 ml de 3.57 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y agitar inmediatamente.
- p) Dejar las soluciones reposar por espacio de 15 min, transferir estas a las cubetas y entonces determinar la intensidad de la fluorescencia en el fluorómetro Quantech usando filtro de emisión de 415 nm y filtro de excitación de 360nm.
- q) Si la lectura de alguna muestra es > 15 mg de histamina / 100 g de pescado, diluir 25 ml de esta solución de muestra a 100 ml con 0,1N HCL y proseguir desde la etapa 1 Precaución: Pescado con alto contenido de sal puede causar problemas con la resina, necesariamente cuando esto suceda debe cambiarse la resina, lavando bien las columnas.

### 1.7 CONTROLES Y BLANCOS

- a) Al comienzo de un análisis y también al final, pasar 1ml. de la solución A1 a través de una de las columnas haciendo el proceso como si fuera el extracto de pescado. Las lecturas de la fluorescencia tienen que ser similares a la lectura de la solución D. Si la lectura tiene una desviación en un porcentaje de +/-20% con la solución D, en todos los análisis realizados en ese momento hay la sospecha de estar malos y se los debe repetir.
- b) Después de cada 10 muestras, se debe de cambiar la resina para evitar contaminaciones.

### 1.8 CÁLCULOS

Habiéndose calibrado el fluorómetro Quantech con el valor real de los estándares, no será necesario el uso de cálculos o fórmulas ya que el resultado que se obtenga será la lectura real de histamina, expresada en mg %. (Aunque en la pantalla aparezca la unidad en PPM)

### 1.9 REGISTRO DE DATOS

Los resultados de los análisis de histamina serán guardados en los formatos:

- FOR-CC-64
- FOR-CC-65
- FOR-CC-106

## REFERENCIAS

- a) Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 17th Edition, 2000, Chapter 35, p. 17, Method 977.13.

### 2.3.1. Análisis de histamina durante el proceso.

#### *2.3.1.1. Preparación de soluciones estándares de histamina.*

Las soluciones estándares que se preparan semanal y diariamente para realizar los análisis de histamina en la materia prima durante su procesado se describen a continuación.

##### *2.3.1.1.1. Solución Stock (A):*

- Pesar 0,1691 gramos de histamina 2HCL (99%) pura en un flask volumétrico de 100ml. Y luego diluir con HCL 0.1 N (Solución A: 1mg./ml). Preparar fresca semanalmente.

- **Solución Intermedia (B):** Pipetear 1,0 ml de solución Stock A en un flask volumétrico de 100 ml, y enrasar a 100 ml con HCL 0,1 N (Solución B: 10 ug./ml). Preparar fresca semanalmente.
- **Solución Control (A1):** Pipetear 1,0 ml. De solución A, y enrasar a 100 ml con metanol. (Solución control A1: 10 ug. /ml). Prepare solución diaria.
- **Soluciones de trabajo (C, D, E):** Pipetear 1,0 ml, 2,0 ml de la solución B, y diluir cada una a 100 ml con HCL 0,1 N (Soluciones C, D, E: 0,5; 1,0; 1,5 ug/5ml.). Prepare soluciones de trabajo diarias.



*Ilustración 6. PREPARANDO LAS MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS.*

### *2.3.1.2. Preparación del fluorómetro para los análisis.*

Durante el encendido del fluorómetro se tiene que seguir algunos pasos para poder proceder al análisis diario de la presencia de histamina durante el proceso.

1. Se direcciona en el menú principal del fluorometro.
2. Se selecciona el método de histamina presente dentro del menú.
3. Pide cambiar nombre y se selecciona la opción de NO.
4. Filt corrent instl?, se selecciona la opción de SI.
5. Curva estand d / MENOR SI
6. Datos guardados 1 día.
7. Coef d / determinic 1,00.
8. Inserte muestra desconocida.



*Ilustración 7. FLUORÓMETRO.*

### 2.3.1.3. Análisis de histamina.

El análisis de histamina se procede a realizar una vez se ha tomado la muestra y esta a su vez homogenizada para poder colocarlas en las columnas y tener las muestras resultante para la toma de lectura.



*Ilustración 8. PREPARANDO LAS MUESTRAS EN LA COLUMNAS DE DESTILACIÓN.*

Después se procede mediante el fluorómetro a la toma de lectura siguiendo los pasos que se muestran a continuación:

1. Se procede primeramente con el menú principal.
2. Se selecciona el método aplicado para la muestra (HISTAMINA).
3. Pide cambiar nombre se da la opción de NO.
4. En la opción de (Filt corrent instl?, se responde que SI.
5. Curva ESTAND d / Menor NO.
6. Entrar N° ptos 3.
7. Entrar la concentración 000.000 ppm
8. Entrar la concentración 0050,000 ppm.

9. Entrar la concentración 0100,000 ppm.
10. Entrar la concentración 0150,000 ppm.
11. Ingresar BLANCO.
12. COEF D/ DETERMINAC 1,00 lo cual significa que el equipo se calibro correctamente.



*Ilustración 9. FLUORÓMETRO JUNTO A LAS MUESTRAS.*

A continuación se muestran algunas lecturas tomadas durante el proceso:



*Ilustración 10. LECTURA DEL FLOURÓMETRO*



*Ilustración 11. LECTURA DEL FLUORÓMETRO.*

## **2.4. DIAGNOSTICO DE LOS PROBLEMAS PRESENTADOS EN EL MEDOTO ACTUAL**

Tiempo de respuesta del análisis, ya que debe esperar alrededor de 30 minutos para poder obtener un resultado y muchas veces el proceso productivo no puede esperar, más que todo cuando la muestra pudiese estar con niveles al límite de lo permisible y el estar expuesta más tiempo hace que se degrade más.

El método contempla un sinnúmero de soluciones preparadas tanto para reaccionar la muestra como para preparar la curva de calibración del equipo. Algunos de estos reactivos incluso son controlados por el SETED lo cual le representa a la empresa gastos por temas de permisos para su utilización. Así mismo se realizan varias actividades analíticas para obtener el resultado de la muestra lo que deje ver lo tedioso que pudiese resultar el método

Existe la posibilidad de interferencia analítica más que todo en la columna de intercambio iónica por contaminación de la resina con muestras que tengan concentraciones altas de histamina que hayan sido analizadas anteriormente.

# CAPÍTULO III

## **3. PROPUESTA PARA LA ESTIMACION DE HISTAMINA EN LA MATERIA PRIMA DE MARBELIZE S.A.**

En la actualidad la empresa MARBELIZE S.A. estima los niveles de histamina por medio del método de fluorometría como se lo reviso en el capítulo anterior. El objetivo del presente estudio trata de establecer que tan factible es el nuevo método de análisis de histamina presente en los productos pesqueros de la empresa en comparación con el utilizado en la actualidad (fluorométrico), ya que se pretende cambiar el sistema de análisis que se estaba llevando hasta el momento si brinda las garantías necesarias para su aplicación en beneficio de los consumidores.

La presencia de histamina se ha convertido en un parámetro esencial para la estimación de frescura y calidad del pescado por sus contenidos dentro de la materia prima, esta amina es causante de intoxicaciones que se asemejan mucho con las producidas por alérgenos de los alimentos.

### **3.1. BIOFISH.**

BIOFISH es un dispositivo compacto analítico que aprovecha las interacciones biológicas para poder establecer resultados cuantitativos para diferentes parámetros. Se caracteriza por su alta sensibilidad, velocidad y monitorización continua que lo convierten en un método de solución avanzada y competitiva para satisfacer las exigencias de los demandantes.

La empresa BIOLAN es el fabricante de BIOFISH. La compañía cuenta con una base de biotecnología que lo aposesionado como referencia tecnológica analítica aplicada dentro de varios sectores del mercado basándose en el desarrollo de Biosensores para el control de calidad y la seguridad alimentaria.

Su producto BIOFISH 300 ha recibido la certificación AOAC® Performance TestedSM, por parte del AOAC Research Institute, licencia 051604, en la detección de histamina presente en cualquier tipo de pescado tanto crudo o procesado y en muestras de pescado en salazón como se puede observar en el ANEXO 1

#### **3.1.1. BIOFISH 300.**

BIOFISH 300 HIS estima la cuantificación de histamina presente en los productos del mar por medio de un bio-sensor de manera precisa, sencilla y rápida en una gama de diferentes matices en que se encuentre la materia prima (pescado crudo, pescado cocido, pescado en conserva o pescado en salazón).

Los Bio-sensores establecidos por BIOLAN combinan la alta selectividad y especificidad que se tiene de las enzimas, traducidas en manera de señal amperométrica que son fácilmente detectables y cuantificables.



*Ilustración 12. BIOFISH 300.*

#### ***3.1.1.1. Características técnicas de funcionamiento.***

- Matrices: atún crudo, caballa cruda, sardina cruda, anchoa cruda, atún cocido, conserva de atún en aceite, conserva de atún al natural, conservas de caballa en salsa de tomate, conserva de sardinas en escabeche y anchoas en salazón.
- Rangos lineales de análisis:

- 5-50 mg/kg: LC 5 mg/kg, para todo tipo de pescado, tanto crudo, cocido como en conserva.
  - 10-200 mg/kg: LC 10 mg/kg, para todo tipo de pescado, tanto crudo, cocido como en conserva (certificado por AOAC PTM).
  - 30-150 mg/kg: LC 30 mg/kg, para muestras en salazón (certificado por AOAC PTM).
  - 100-3000 mg/kg: LC 100 mg/kg, para harina de pescado.
- Incertidumbre máxima del 10% (salazón: máximo 15%).
  - Preparación de muestra, extracción en agua destilada a temperatura ambiente (2 minutos para muestras de pescado y 15 minutos para harinas).
  - Tiempo de análisis, 4 minutos.

### **3.1.1.2. Productos.**

- **BIOFISH 300:** Equipo de detección.
- **Dimensiones:** 26cm x 22cm x 26cm. 4,6 kg.
- **Biotest:** Consumible del análisis.
- **Kit Calibración:** Reactivos para la calibración.
- **Kit Medida:** Reactivos para la realización del análisis.
- **Kit Extracción:** Material recomendado para la extracción de la muestra.

*Tabla 1. REFERENCIA Y DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS DE BIOFISH 300*

<b>Referencia</b>	<b>Descripción</b>
BF 300-001 BIOFISH 300	Histamina en harina de pescado
BF 300-002 BIOFISH 300	Histamina AOAC PTM
BF 300-003 BIOFISH 300	Histamina AOAC PTM + sulfito
BT FHIS10 Biotest	10 análisis
BT FHIS20 Biotest	20 análisis
BT FHIS50 Biotest	50 análisis
BT FHIS100 Biotest	100 análisis
KIT CFHIS Reactivo	Reactivo calibración para 1 mes
KIT MFHIS1	Reactivo medida para 160 análisis
KIT MFHIS2	Reactivo medida para 640 análisis
KIT EFHIS10	Reactivo de extracción (10)
KIT EFHIS50	Reactivo de extracción (50)
ELEREFN	Electrodo referencia
BIOLAB-BF	Pipetas, botellas, dosificador

### ***3.1.1.3. Material adicional requerido***

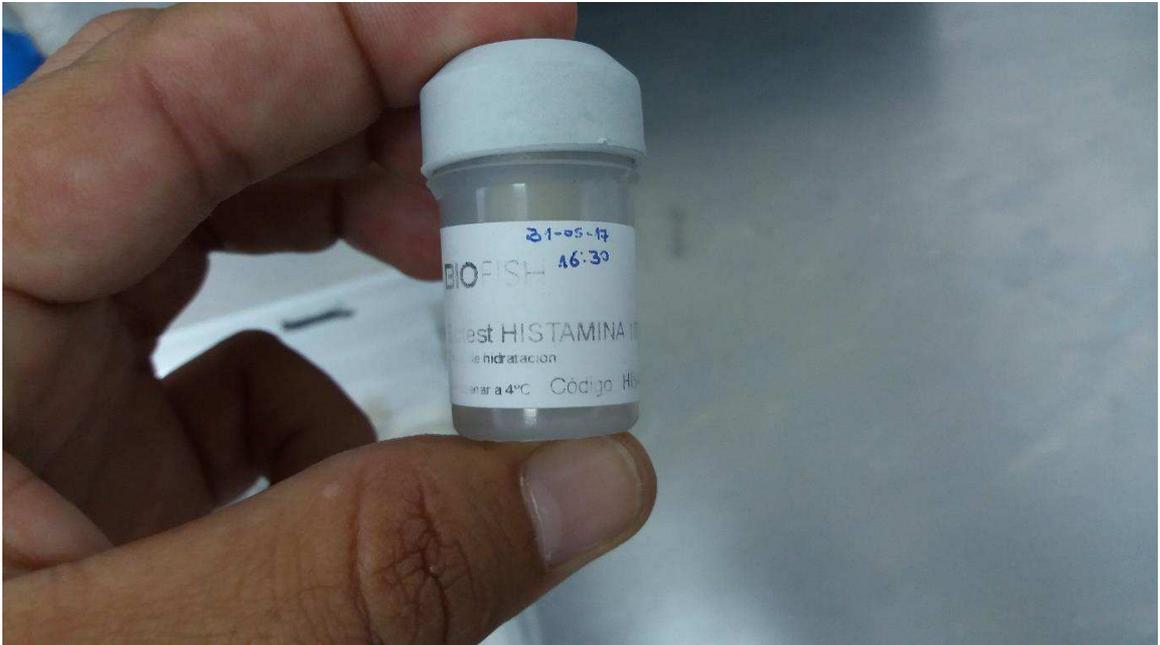
Micro pipetas, dosificador y agua destilada.

### ***3.1.1.4. Certificaciones.***

AOAC INTERNATIONAL, EEUU. Performance TestedSM 051604, AOAC® Performance TestedSM, por parte del AOAC Research Institute, licencia 051604.

### **3.2. Estimación de histamina presente por el método de BIOFESH 300.**

1. Hidratar el Biotest 12 horas previas a su uso con la Solución de medida HIS y almacenar a 4°C.
2. Preparar los Reactivos y Patrones de Calibración, así como la Solución de medida HIS siguiendo las instrucciones marcadas en los botes correspondientes.
3. Atemperar el Biotest y la Solución de Medida antes de comenzar a usar el equipo.
4. Conectar el Biotest y el electrodo de referencia y rellenar la cubeta con 10 ml de Solución de medida HIS. Asegurarse que todos los componentes queden sumergidos, ayudándose de la junta teórica.
5. Activar el equipo: añadir 2 ml de Patrón de Calibración cuando se indique. Cambiar la cubeta al finalizar.
6. Calibrar el equipo: añadir, por dos veces, el Patrón de calibración pulsando OK antes de cada adición. Cambiar la cubeta al finalizar.
7. Realizar la extracción de la muestra: pesar 10 g de la misma y añadir 90 ml de agua destilada. Agitar y filtrar.
8. Analizar muestra: añadir 2 ml del extracto cuando así lo indique el equipo. Cambiar la cubeta al finalizar.
9. Guardar los resultados de la medida para que queden almacenados en el menú HISTORICOS
10. Desconectar el Biotest y almacenarlo a 4°C. Desconectar el electrodo de referencia y guardarlo en su solución de almacenaje. Vaciar la cubeta y apagar el equipo.



*Ilustración 13. REACTIVOS PARA EL ANÁLISIS DE HISTAMINA CON BIOFISH 300*



### **3.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE HISTAMINA POR EL MÉTODO FLUOROMÉTRICO Y MÉTODO BIOFISH 300 DE BIOLAN.**

A continuación se realizará un estudio comparativo entre dos métodos de análisis para el control de calidad de productos pesqueros específicamente en el análisis de histamina, donde cuyo objetivo será determinar y cuantificar los niveles de histamina presentes en los productos del mar que serán procesados.

La histamina es el resultado de la acción de microorganismos que se encuentran presentes en el musculo del pescado cuando este se empieza a alterar y liberar un aminoácido (histidina). El aminoácido formado es utilizado por los microorganismos presentes en el musculo del pescado que da como resultado la presencia de histamina en el mismo.

Los parámetros establecidos por el INEN (Instituto Ecuatoriano de Normalización) son de 50 ppm, debido a que si la concentración presente alcanza niveles superiores de 50 ppm se produce intoxicación a personas sensibles, pero si, la concentración alcanza niveles superiores de 100 ppm la intoxicación es prácticamente segura.

#### **3.3.1. Diseño Estadístico.**

Para realizar el presente estudio comparativo en el que intervienen dos métodos para el análisis de histamina en productos pesqueros se calcularan mediante diseños estadísticos de distribución T student y F de FISHER.

La verificación estará relacionada si existe alguna diferencia significativa entre los dos métodos bajo estudio. Las muestras deben estar sometidas a los métodos bajo diferentes concentraciones.

Diseño estadístico para varianzas de dos muestras:

Hipótesis	Estadístico de prueba	Criterios de rechazo
$H_0: \mu = \mu_0$ $H_1: \mu \neq \mu_0$	$t_0 = \frac{\bar{y} - \mu_0}{S / \sqrt{n}}$	$ t_0  > t_{\alpha/2, n-1}$
$H_0: \mu = \mu_0$ $H_1: \mu < \mu_0$		$t_0 < -t_{\alpha, n-1}$
$H_0: \mu = \mu_0$ $H_1: \mu > \mu_0$		$t_0 > t_{\alpha, n-1}$
si $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$	$t_0 = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ $v = n_1 + n_2 - 2$	$ t_0  > t_{\alpha/2, v}$
si $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$		
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \mu_1 < \mu_2$	$t_0 = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$	$t_0 < -t_{\alpha, v}$
$H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \mu_1 > \mu_2$	$t_0 = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{(S_1^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(S_2^2/n_2)^2}{n_2 - 1}}$	$t_0 > t_{\alpha, v}$

Ilustración 16, DISEÑO ESTADÍSTICO PARA DOS MUESTRAS SUPONIENDO VARIANZAS IGUAL

Hipótesis	Estadístico de prueba	Criterios de rechazo
$H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$		$\chi_0^2 > \chi_{\alpha/2, n-1}^2$ O
$H_1: \sigma^2 \neq \sigma_0^2$		$\chi_0^2 < \chi_{1-\alpha/2, n-1}^2$
$H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$	$\chi_0^2 = \frac{(n-1)S^2}{\sigma_0^2}$	$\chi_0^2 < \chi_{1-\alpha, n-1}^2$
$H_1: \sigma^2 < \sigma_0^2$		
$H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$		$\chi_0^2 > \chi_{\alpha, n-1}^2$
$H_1: \sigma^2 > \sigma_0^2$		
$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$	$F_0 = \frac{S_1^2}{S_2^2}$	$F_0 > F_{\alpha/2, n_1-1, n_2-1}$ O
$H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$		$F_0 < F_{1-\alpha/2, n_1-1, n_2-1}$
$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$	$F_0 = \frac{S_2^2}{S_1^2}$	$F_0 > F_{\alpha, n_2-1, n_1-1}$
$H_1: \sigma_1^2 < \sigma_2^2$		
$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$	$F_0 = \frac{S_1^2}{S_2^2}$	$F_0 > F_{\alpha, n_1-1, n_2-1}$
$H_1: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$		

Ilustración 17. DISEÑO ESTADÍSTICO.

### 3.3.2.1. Fortificación de Muestras.

Datos de la solución Patrón:				Diclorhidrato de Histamina (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> 2HCl)			
	Valor	Unidades		Elemento	Pesos atómicos	Numero de atomos	Peso del compuesto
C2=	Concentración del estandar patrón			C	12,0107	5	60,05350
P <sub>cert</sub> =	Pureza de la solución patrón original de la que se parte para preparar el estandar			H	1,00794	9	9,07146
m =	Masa de la solución patrón original de la que se parte para preparar el estandar			N	14,0067	3	42,02010
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>2HCl</sub>	Masa molar del compuesto de diclorhidrato de histamina			Cl	35,453	2	70,90600
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub></sub>	Masa molar de la Histamina			H	1,00794	2	2,01588
V <sub>af</sub> =	Volumen al que se ha aforado la dilución			Total			184,06694
				Histamina (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> )			
				Elemento	Pesos atómicos	Numero de atomos	Peso del compuesto
				C	12,0107	5	60,05350
				H	1,00794	9	9,07146
				N	14,0067	3	42,02010
				Total			111,14506

P <sub>cert</sub> =	99	%	$C2 = \frac{P_{cert} * m * M_{C5H9N3}}{M_{C5H9N3 \cdot 2HCl} * V_{af}}$
m =	0,1691	gr	
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>2HCl</sub>	184	g/mol	
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub></sub>	111	g/mol	
V <sub>af</sub> =	100	ml	
C2=	0	mg/ml	
C2=	100	mg/100ml	

Datos Muestra:	Nº	Muestra sin Fortificar mg
Muestra: Pescado Precocido	1	0,25
Unidades: mg/100g	2	0,30
	3	0,28
	4	0,27
	5	0,32
	Promedio (C1)	0,28

Nivel: 1 mg/100g -(10 PPM)				$m2 = \frac{m1C1 - m1C_{MRI}}{C_{MRI} - C2}$	
Cálculo:	Valor	Unidades		C <sub>MRI</sub> :	
C <sub>MRI</sub> :	1	mg/100g		Concentración del MRI.	
m1:	10	g		m1:	masa (o en su defecto volumen) de la muestra que va a ser fortificada
C1:	0,28	mg/100g		C1:	Concentración promedio de la muestra que va a ser fortificada
C2:	100	mg/100ml		m2:	masa (o en su defecto volumen) del patrón o sustancia diluyente.
				C2:	Concentración del patrón o sustancia diluyente.
m2:	0,07	ml			

Nivel: 5 mg/100g -(50 PPM)				$m2 = \frac{m1C1 - m1C_{MRI}}{C_{MRI} - C2}$	
Cálculo:	Valor	Unidades		C <sub>MRI</sub> :	
C <sub>MRI</sub> :	5	mg/100g		Concentración del MRI.	
m1:	10	g		m1:	masa (o en su defecto volumen) de la muestra que va a ser fortificada
C1:	0,28	mg/100g		C1:	Concentración promedio de la muestra que va a ser fortificada
C2:	100	mg/100ml		m2:	masa (o en su defecto volumen) del patrón o sustancia diluyente.
				C2:	Concentración del patrón o sustancia diluyente.
m2:	0,50	ml			

Nivel: 10 mg/100g -(100 PPM)				$m2 = \frac{m1C1 - m1C_{MRI}}{C_{MRI} - C2}$	
Cálculo:	Valor	Unidades		C <sub>MRI</sub> :	
C <sub>MRI</sub> :	10	mg/100g		Concentración del MRI.	
m1:	10	g		m1:	masa (o en su defecto volumen) de la muestra que va a ser fortificada
C1:	0,28	mg/100g		C1:	Concentración promedio de la muestra que va a ser fortificada
C2:	100	mg/100ml		m2:	masa (o en su defecto volumen) del patrón o sustancia diluyente.
				C2:	Concentración del patrón o sustancia diluyente.
m2:	1,1	ml			

Ilustración 18. FORTIFICACIÓN DE MUESTRAS 1.

Datos de la solución Patrón:			Diclorhidrato de Histamina (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> ·2HCl)			
	Valor	Unidades	Elemento	Pesos atómicos	Numero de atomos	Peso del compuesto
C2=	Concentración del estandar patrón		C	12,0107	5	60,05350
P <sub>cert</sub> =	Pureza de la solución patrón original de la que se parte para preparar el estandar		H	1,00794	9	9,07146
m =	Masa de la solución patrón original de la que se parte para preparar el estandar		N	14,0067	3	42,02010
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>·2HCl</sub>	Masa molar del compuesto de diclorhidrato de histamina		Cl	35,453	2	70,90600
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub></sub>	Masa molar de la Histamina		H	1,00794	2	2,01588
V <sub>af</sub> =	Volumen al que se ha aforado la dilución		Total		184,06694	
			Histamina (C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> )			
			Elemento	Pesos atómicos	Numero de atomos	Peso del compuesto
			C	12,0107	5	60,05350
			H	1,00794	9	9,07146
			N	14,0067	3	42,02010
			Total		111,14506	

	Valor	Unidades
P <sub>cert</sub> =	98	%
m =	0,1691	gr
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>·2HCl</sub>	184	g/mol
M <sub>C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub></sub>	111	g/mol
V <sub>af</sub> =	100	ml
C2=	0	mg/ml
C2=	100	mg/100ml

$$C2 = \frac{P_{cert} * m * M_{C_5H_9N_3}}{M_{C_5H_9N_3 \cdot 2HCl} * V_{af}}$$
  

Datos Muestra:		Nº	Muestra sin Fortificar
Muestra:	Atun Crudo	1	0,11
Unidades:	mg/100g	2	0,10
		3	0,12
		4	0,10
		5	0,12
		Promedio (C1)	0,11

Nivel: 1 mg/100g (-10 PPM)		Valor	Unidades
C <sub>MRI</sub> :		1	mg/100g
m1:		10	g
C1:		0,11	mg/100g
C2:		100	mg/100ml
m2:		0,09	ml

$$m2 = \frac{m1C1 - m1C_{MRI}}{C_{MRI} - C2}$$

C<sub>MRI</sub>: Concentración del MRI.  
m1: masa (o en su defecto volumen) de la muestra que va a ser fortificada  
C1: Concentración promedio de la muestra que va a ser fortificada  
m2: masa (o en su defecto volumen) del patrón o sustancia diluyente.  
C2: Concentración del patrón o sustancia diluyente.

Nivel: 5 mg/100g (-50 PPM)		Valor	Unidades
C <sub>MRI</sub> :		5	mg/100g
m1:		10	g
C1:		0,11	mg/100g
C2:		100	mg/100ml
m2:		0,51	ml

$$m2 = \frac{m1C1 - m1C_{MRI}}{C_{MRI} - C2}$$

C<sub>MRI</sub>: Concentración del MRI.  
m1: masa (o en su defecto volumen) de la muestra que va a ser fortificada  
C1: Concentración promedio de la muestra que va a ser fortificada  
m2: masa (o en su defecto volumen) del patrón o sustancia diluyente.  
C2: Concentración del patrón o sustancia diluyente.

Nivel: 10 mg/100g (-100 PPM)		Valor	Unidades
C <sub>MRI</sub> :		10	mg/100g
m1:		10	g
C1:		0,11	mg/100g
C2:		100	mg/100ml
m2:		1,1	ml

$$m2 = \frac{m1C1 - m1C_{MRI}}{C_{MRI} - C2}$$

C<sub>MRI</sub>: Concentración del MRI.  
m1: masa (o en su defecto volumen) de la muestra que va a ser fortificada  
C1: Concentración promedio de la muestra que va a ser fortificada  
m2: masa (o en su defecto volumen) del patrón o sustancia diluyente.  
C2: Concentración del patrón o sustancia diluyente.

Ilustración 19. FORTIFICACIÓN DE MUESTRAS 2.

### 3.3.2.2 Diseño Estadístico en Atún Crudo.

#### 3.3.2.2.1. Diseños estadísticos a Nivel de 1mg/100g.

Tabla 2. MUESTRAS DE ATÚN CRUDO A 1 mg/100 g

Nivel:	1 mg/100 g	
Muestra:	Atún Crudo	
Nº	FLUORÓMETRO	BIOFISH 300
1	1,04	0,98
2	1	0,92
3	1,1	1,04
4	0,87	0,79
5	0,89	0,93
6	0,83	0,89
7	0,92	0,88
8	0,78	0,83
9	0,95	0,9
10	0,79	0,81
11	0,87	0,83
12	0,9	0,84

Tabla 3 DISTRIBUCIÓN F 1mg/100g

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	FLUORÓMETRO	BIOFISH 300
Media	0,91	0,89
Varianza	0,01	0,01
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1,76	
P(F<=f) una cola	0,18	
Valor crítico para F (una cola)	2,82	

No existe evidencia significativa de que la varianza de los dos métodos sea diferentes aplicando la prueba F para el análisis de varianza de las muestras por los dos métodos.

*Tabla 4. DISTRIBUCIÓN T PARA 1mg/100g*

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	0,91	0,89
Varianza	0,01	0,01
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	0,01	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,71048785	
P(T<=t) una cola	0,242432999	
Valor crítico de t (una cola)	1,717144374	
P(T<=t) dos colas	0,484865998	
Valor crítico de t (dos colas)	2,073873068	

No existe evidencia significativa de que los resultados de los dos métodos sean diferentes en la estimación de histamina utilizando la prueba t para las dos muestras estimando que las varianzas son iguales.

### 3.3.2.2.1 Diseños estadísticos a Nivel de 5mg/100g.

Tabla 5. MUESTRAS DE ATÚN CRUDO PARA 5mg/100g

Nivel:	5 mg/100 g	
Muestra:	Atún Crudo	
	FLUORÓMETRO	BIOFISH 300
1	4,12	4,25
2	4,85	4,23
3	4,36	4,38
4	4,44	4,45
5	4,78	4,69
6	4,95	4,89
7	4,19	4,1
8	4,38	4,36
9	4,78	4,81
10	5,06	4,95
11	4,85	4,79
12	4,75	4,83

Tabla 6. DISTRIBUCIÓN F PARA 5mg/100g

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	FLUORÓMETRO	BIOFISH 300
Media	4,63	4,56
Varianza	0,10	0,09
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1,10	
P(F<=f) una cola	0,44	
Valor crítico para F (una cola)	2,82	

No existe evidencia significativa de que la varianza de los dos métodos sea diferentes utilizando la prueba F para varianza de dos muestras.

Tabla 7. PRUEBA T PARA 5mg/100g

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	4,63	4,56
Varianza	0,10	0,09
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	0,1	
Diferencia hipotética de las medias	0,0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,523400996	
P(T<=t) una cola	0,302963898	
Valor crítico de t (una cola)	1,717144374	
P(T<=t) dos colas	0,605927797	
Valor crítico de t (dos colas)	2,073873068	

No existe evidencia significativa de que los resultados de los dos métodos aplicados sean diferentes.

### 3.3.2.2.1 Diseños estadísticos a Nivel de 10mg/100g.

Tabla 8. MUESTRAS PARA 10mg/100g

<b>Nivel:</b>	<b>10 mg/100 g</b>	
<b>Muestra:</b>	<b>Atún Crudo</b>	
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
1	10,07	10,13
2	9,73	9,82
3	10,12	10
4	9,85	9,78
5	10,02	9,92
6	9,89	9,82
7	9,71	9,58
8	9,92	9,96
9	9,83	9,91
10	9,76	9,78
11	9,95	10,02
12	9,85	9,89

Tabla 9. DISTRIBUCIÓN F PARA 10mg/100g

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	FLUORÓMETRO	BIOFISH300
Media	9,89	9,88
Varianza	0,02	0,02
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	0,85	
P(F<=f) una cola	0,39	
Valor crítico para F (una cola)	0,35	

No existe evidencia significativa de que la varianza de los dos métodos sea diferentes en el análisis de histamina por los dos métodos.

Tabla 10. PRUEBA T PARA 10mg/100g

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	FLUORÓMETRO	BIOFISH300
Media	9,89	9,88
Varianza	0,02	0,02
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	0,02	
Diferencia hipotética de las medias	0,0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,134431851	
P(T<=t) una cola	0,447141689	
Valor crítico de t (una cola)	1,717144374	
P(T<=t) dos colas	0,894283377	
Valor crítico de t (dos colas)	2,073873068	

No existe evidencia significativa de que los resultados de los dos métodos sean diferentes.

### 3.3.2.3 Diseño Estadístico en Atún Pre-cocido.

#### 3.3.2.3.1. Diseños estadísticos a Nivel de 1mg/100g de Atún Pre-cocido.

Tabla 11. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS PRE-COCIDO 1mg/100g

<b>Nivel:</b>	<b>1 mg/100 g</b>	
<b>Muestra:</b>	<b>Lomo Pre-cocido</b>	
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH 300</b>
1	0,92	1,02
2	0,89	0,94
3	0,93	1,04
4	1,02	0,97
5	1,09	0,98
6	0,89	0,92
7	1,12	1,05
8	1,06	1,14
9	0,87	0,95
10	1,03	0,99
11	0,95	0,9
12	0,92	0,97

Tabla 12. DISTRIBUCIÓN F PARA 1mg / 100g

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH 300</b>
Media	0,97	0,99
Varianza	0,01	0,004
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1,70	
P(F<=f) una cola	0,20	
Valor crítico para F (una cola)	2,82	

No existe evidencia significativa de que la varianza de los dos métodos sea diferentes en el análisis de histamina.

Tabla 13. PRUEBA T PARA 1 mg/100g.

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	0,97	0,99
Varianza	0,01	0,004
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	0,01	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,481351627	
P(T<=t) una cola	0,317509892	
Valor crítico de t (una cola)	1,717144374	
P(T<=t) dos colas	0,635019784	
Valor crítico de t (dos colas)	2,073873068	

No existe evidencia significativa de que los resultados de los dos métodos sean diferentes para la estimación de histamina.

### 3.3.2.3.1. Diseños estadísticos a Nivel de 5 mg/100g de Atún Pre-cocido.

Tabla 14. MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS 5mg/100g

Nivel:	5 mg/100 g	
Muestra:	Atún Pre-cocido	
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH 300</b>
1	4,93	4,91
2	4,90	4,85
3	4,96	5,06
4	4,99	4,91
5	5,13	5,09
6	4,96	4,89
7	5,05	4,95
8	5,02	5,10
9	4,78	4,85
10	5,12	5,02
11	4,89	4,96
12	4,96	5,06

Tabla 15. PRUEBA F PARA 5mg / 100g

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	4,97	4,97
Varianza	0,01	0,01
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1,15	
P(F<=f) una cola	0,41	
Valor crítico para F (una cola)	2,82	

No existe evidencia significativa de que la varianza de los dos métodos sea diferentes.

Tabla 16. PRUEBA T PARA 5mg/100g

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	4,97	4,97
Varianza	0,01	0,01
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	0,01	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,08576721	
P(T<=t) una cola	0,46621363	
Valor crítico de t (una cola)	1,71714437	
P(T<=t) dos colas	0,93242725	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07387307	

No existe evidencia significativa de que los resultados de los dos métodos sean diferentes.

### 3.3.2.3.1 Diseños estadísticos a Nivel de 10 mg/100g de Atún Pre-cocido.

Tabla 17. MUESTRAS PARA ANÁLISIS 10mg/100g

Nivel:	10 mg/100 g	
Muestra:	Atún Crudo	
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH 300</b>
1	9,92	9,95
2	10,08	9,97
3	9,95	10,02
4	9,82	9,88
5	9,96	9,92
6	9,92	9,95
7	10,19	10,12
8	9,88	9,93
9	10,05	10,11
10	9,96	9,92
11	10,17	10,12
12	9,84	9,91

Tabla 18. DISTRIBUCIÓN F 10mg/100g

<b>Prueba F para varianzas de dos muestras</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	9,98	9,98
Varianza	0,01	0,01
Observaciones	12	12
Grados de libertad	11	11
F	1,89	
P(F<=f) una cola	0,15	
Valor crítico para F (una cola)	2,82	

No existe evidencia significativa de que la varianza de los dos métodos sea diferentes.

Tabla 19. PRUEBA T PARA 10mg/100g

<b>Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales</b>		
	<b>FLUORÓMETRO</b>	<b>BIOFISH300</b>
Media	9,98	9,98
Varianza	0,01	0,01
Observaciones	12	12
Varianza agrupada	0,01	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	22	
Estadístico t	0,11647841	
P(T<=t) una cola	0,45416508	
Valor crítico de t (una cola)	1,71714437	
P(T<=t) dos colas	0,90833015	
Valor crítico de t (dos colas)	2,07387307	

No existe evidencia significativa de que los resultados de los dos métodos sean diferentes.

### **3.3.3. Observaciones de los resultados obtenidos en la comparación de los métodos analíticos de histamina en los productos pesqueros.**

Se realizó ensayos en tres diferentes tipos de niveles 1mg, 5mg y 10 mg, tanto para producto crudos como cocidos, en los cuales se utilizaron las herramientas estadísticas de T student y F de Fisher en las que no se evidencio diferencias significativas entre ambos métodos.

Se tomaron muestras al azar que a su vez fueron validadas por ambos métodos de manera simultánea. Se obtuvieron resultados favorables para la puesta en práctica del nuevo método analítico para el control de histamina presente en los productos pesqueros.

# CAPÍTULO IV

## **4. ANÁLISIS FINANCIERO.**

### **4.1. INVERSIÓN EN LA COMPRA DE BIOFISH 300 DE BIOLAN.**

En el capítulo que se muestra a continuación se establecerá una breve reseña de los costos que intervienen en la aplicación del método de BIOFIS DE BIOLAN y los del método fluorométrico por muestra. Mismos que serán contrastados para establecer una conclusión de acuerdo a los resultados obtenidos.

Por lo que se tiene que establecer los costos estimados para la implementación del nuevo método de análisis de histamina.

#### **4.1. INVERSIÓN DEL NUEVO MÉTODO DE ANÁLISIS DE HISTAMINA (BIOFISH 300 DE BIOLAN).**

Para la realización de los análisis de histamina en la empresa MARBELIZE S.A. con el método de análisis BIOFISH 300 de BIOLAN, es necesario contar con un kits de análisis que viene cuantificado para el número de análisis máximos que dispone. El precio unitario establecido para cada una de la muestra está estimado \$2,39, el valor del equipo esta estimado en \$800.

En el día normal de proceso se estima que se realizarían unos 40 análisis de histamina mediante el proceso de BIOFISH 300. Esto da como resultado de una inversión diaria de \$ 95,60 diarios. Los cuales se tendrían una cantidad de \$1912 mensuales y \$22944 anuales en la aplicación del método.

#### **4.2. INVERSIÓN ACTUAL MÉTODO DE ANÁLISIS DE HISTAMINA (FLUORÓMETRO).**

En la actualidad la empresa tiene estimado un costo unitario por cada análisis de histamina de \$ 0,79, los cuales se los realiza con una media de 100 análisis diarios por lo que se estima un costo de \$79 diarios, \$1580 mensual y \$18960 anual en la aplicación del método fluorometrico.

### 4.3. FLUJO DE FONDOS.

En la tabla que se muestra a continuación se establecen los flujos de fondos para la puesta en práctica el método de BIOFISH 300 DE BIOLAN en sustitución del fluorómetro que se utilizaba en la actualidad.

Para estar acorde a la inflación que el país sufre por factores incontrolables se establece un porcentaje del 5% que permitirá reflejar la inflación sufrida cada año.

*Tabla 20.FLUJO DE FONDOS PARA EL PROYECTO.*

CONCEPTO	INVERSIÓN INICIAL	FLUJOS DE FONDOS				
		AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	AÑO 4	AÑO 5
<b>Inversión</b>	<b>\$-800,00</b>					
<b>Costos anuales BIOFISH</b>		\$22.944,00	\$24.091,20	\$25.295,76	\$26.560,55	\$27.888,58
<b>Costos anuales FLUOROM.</b>		\$18.960,00	\$19.908,00	\$20.903,40	\$21.948,57	\$23.046,00
<b>FLUJO DE FONDOS ANUAL</b>	<b>\$-800,00</b>	<b>\$-3.984,00</b>	<b>\$-4.183,20</b>	<b>\$-4.392,36</b>	<b>\$-4.611,98</b>	<b>\$-4.842,58</b>

### 4.4. VALOR ACTUAL NETO (VAN)

Al establecer el valor actual neto en el proyecto nos permitirá estimar que valor presente tendremos si ponemos en práctica el método propuesto, ya que en este se relacionan los benéficos y los costos en que se incurren en la aplicación del nuevo método analítico.

$$VAN (8\%) = \left[ \frac{F_1}{(1+i)^1} + \frac{F_2}{(1+i)^2} + \frac{F_3}{(1+i)^3} + \frac{F_4}{(1+i)^4} + \frac{F_5}{(1+i)^5} \right]$$

$$VAN (8\%) = \left[ \frac{\$ 22944}{(1+0.08)^1} + \frac{\$ 22944,20}{(1+0.08)^2} + \frac{\$ 24091,76}{(1+0.08)^3} + \frac{\$ 26560,55}{(1+0.08)^4} + \frac{\$ 27888,58}{(1+0.08)^5} \right]$$

$$VAN (8\%) = \$100482,65$$

$$VAN (8\%) = \left[ \frac{\$ 18960}{(1+0.08)^1} + \frac{\$ 19908}{(1+0.08)^2} + \frac{\$ 20903,40}{(1+0.08)^3} + \frac{\$ 21948,57}{(1+0.08)^4} + \frac{\$ 23046}{(1+0.08)^5} \right]$$

$$VAN (8\%) = \$ 83043,82$$

El valor Actual Neto del proyecto es:

$$VAN(8 \%) = -INVERSIÓN INICIAL + VAN Beneficios - VAN Costos$$

$$VAN(8 \%) = -\$800 + \$83043,82 - \$ 100482,65$$

$$VAN(8 \%) = \$ - 18238,83$$

Al establecer el VAN en el presente proyecto se estima que tiene una pérdida de \$18238,83, pero siguiendo su ideal de estar siempre a la par con la tecnología e innovación con el consumidor se acepta el proyecto al no ser tan significativo el déficit.

# CAPÍTULO V

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 5.1. CONCLUSIONES.

- a) Se establecieron las desventajas en la aplicación del método fluorométrico en la empresa MARBELIZE, para lo cual se presentó como una posible alternativa el método BIOFISH 300 DE BIOLAN, por dar respuesta analítica en un menor tiempo, menor uso de reactivos y disminución de las actividades analíticas en el laboratorio; además se elimina la posible interferencia por contaminación de la muestra.
- b) En base a los resultados de las pruebas estadísticas utilizando la distribución T estuden y F de FISHER se puede concluir que los resultados de los dos métodos no varían significativamente, es decir que se pueden utilizar cualquiera de los dos métodos y se obtendrán los mismos resultados analíticos siempre y cuando no existe una contaminación de la columna de intercambio iónica en el análisis por fluorometría o que esta no se haya detectado por los controles de calidad.
- c) Pese a las ventajas expuestas por el método BIOFISH 300, el análisis financiero refleja un resultado negativo ya que tanto la adquisición del equipo como la de los kit de reactivos

representan un monto económico superior a los gastos que se dan en la utilización del método fluorométrico.

## **5.2. RECOMENDACIONES.**

- a) Desde el punto de vista económico resulta factible el método fluorométrico siempre y cuando se tomen los debidos controles al momento de realizar los análisis.
- b) Desde el punto de vista técnico resulta factible utilizar el nuevo método ya que optimiza los tiempos, simplifica las actividades analíticas en el laboratorio y los resultados son más confiables. Además la implementación de nuevas tecnologías por parte de MARBELIZE la direcciona a ser una empresa de vanguardia y de reconocimiento nacional e internacional por partes de sus clientes.
- c) La similitud en los resultados obtenidos fueron certificados para la aplicación de modelos estadísticos como base comparativa entre ambos métodos, sin embargo el análisis financiero no beneficia mucho al método analítico de BIOFISH DE BIOLAN. Pero este lo cubre la innovación y la nueva tecnología aplicada en el departamento de control de calidad como valor agregado a la empresa por lo que se debe de aplicar de manera inmediata.

## BIBLIOGRAFÍA

Bergillos Gasi3n, F. (2013). *Toxinología Clínica*. Barcelona: Bubok Publishing S.L.

Bernal Torres, C. A. (2006). *Metodología de la Investigaci3n*. Naucalpan: Pearson Educaci3n.

BIOLAN . (s.f.). *BIOLAN accurate, easy, smart*. Obtenido de BIOLAN accurate, easy, smart:  
<http://www.biolanmb.com/>

Cennelier, M. (1999). *La Alergia y la Homeopatía*. Barcelona : Editorial Paidotribo.

De Alvear, M. T. (1996). *Diccionario Enciclopédico de Enfermería*. Buenos Aires: Editorial Panamericana.

Gennaro, A. R. (2003). *Remington Farmacia* . Buenos Aires: Editorial Panamericana.

Gil Hernández, A. (2010). *Tratado de Nutrición*. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.

Instituto Ecuatoriano de Normalizaci3n (INEN). (2012). *NTE INEN 458:2012 Productos del Mar. DETERMINACI3N DE CONTENIDOS DE HISTAMINA. M3TODO FLUOROM3TRICO* . Quito: S/N.

Leiva Guzmán, M. A. (2006). *Metriales de Referencia y Comparaciones Intralaboratorios*. Santiago de Chile: Aquaprint.

MARBELIZE S.A. (7 de Agosto de 2017). *Marbelize.com*. Obtenido de Marbelize.com:  
<http://marbelize.com/es/>

MARBELIZE S.A. (s.f.). *MARBELIZE S.A.* Obtenido de MARBELIZE S.A.:  
<http://marbelize.com/es/>

Polo Piñeiro, M. (2007). *Desarrollo de Nuevos Métodos de Microextracci3n en Fase S3lida para la Estimaci3n de Contaminantes Emergentes en Matrices Acu3sas*. Santiago de Compostela: USC.

Rodríguez Moguel, E. A. (2005). *Metodología de la Investigación*. Villahermosa: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Sierra Alonso, I., Gómez Ruiz, S., Pérez Quintanilla, D., & Morante Zarcero, S. (2010). *Análisis Instrumental*. La Coruña: Netbiblo S.L.

Silva García, M. D., & García Mermejo, M. (2006). *Técnico ERspecialista en Laboratorio de Atención*. Sevilla: Editorial MAD S.L.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Certificación AOAC.

