

Fuente :Diario Oficial de la Federación

Fecha de Publicación: 03 de Marzo de 1995

**NOM-028-SSA1-1993**

**NORMA OFICIAL MEXICANA, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA. PESCADOS EN CONSERVA. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38, fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y

**CONSIDERANDO**

Que con fecha 18 de noviembre de 1993, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 14 de abril de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y de lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario.

Que en fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

**NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-028-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA. PESCADOS EN CONSERVA. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.**

**PREFACIO**

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

**SECRETARIA DE SALUD**

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios  
Dirección General de Salud Ambiental  
Laboratorio Nacional de Salud Pública

**SECRETARIA DE PESCA**

Dirección General de Promoción Pesquera

**INSTITUTO NACIONAL DE LA PESCA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología

**CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA PESQUERA**

**INDICE**

0. INTRODUCCION
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION
2. REFERENCIAS
3. DEFINICIONES
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS
5. DISPOSICIONES SANITARIAS
6. ESPECIFICACIONES SANITARIAS
7. MUESTREO
8. METODOS DE PRUEBA
9. ETIQUETADO
10. ENVASE, EMPAQUE Y EMBALAJE

11. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES
12. BIBLIOGRAFIA
13. OBSERVANCIA DE LA NORMA
14. VIGENCIA
15. APENDICE NORMATIVO  
Apéndice A

## **0. Introducción**

Las enfermedades transmitidas por alimentos, en su mayoría son de tipo infeccioso y de origen químico como las intoxicaciones. La incidencia de estas enfermedades, sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo contemporáneo y permanecen como una de las causas principales de morbilidad, que ocupan el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria.

Entre los alimentos involucrados resaltan los Pescados en conserva, debido a que estos productos en su origen están sometidos a una contaminación microbiológica y química entre otras y que aunado a la forma de consumo generan enfermedades para el consumidor.

Una Norma Oficial Mexicana que regule a estos productos desde el punto de vista sanitario, permitirá promover el consumo de los mismos y a la vez proteger la salud del consumidor.

### **1. Objetivo y campo de aplicación**

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias de los pescados en conserva.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

### **2. Referencias**

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

- |                   |  |
|-------------------|--|
| NOM-051-SCFI-1994 | Especificaciones generales de etiquetado para los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.   |
| NOM-117-SSA1-1994 | Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por absorción atómica.* |
| NOM-120-SSA1-1994 | Buenas prácticas de higiene y sanidad en bienes y servicios.*  |
| NOM-128-SSA1-1994 | Que establece la aplicación de un sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la planta industrial procesadora de productos de la pesca.                    |

\*Proyecto en proceso de expedición como Norma Oficial Mexicana

### **3. Definiciones**

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Abombamiento duro, cuando ambos extremos de la lata se encuentran distendidos permanente y firmemente y no pueden comprimirse.

3.2 Abombamiento suave, cuando ambos extremos de la lata se encuentran distendidos, pero pueden comprimirse o ceden ligeramente a la presión.

3.3 Aditivo para alimentos, aquellas sustancias que se adicionan directamente a los alimentos y bebidas, durante su elaboración para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación.

3.4 Buenas prácticas de fabricación, conjunto de Normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.

3.5 Brincadora, lata de aspecto Normal en la cual una tapa brinca cuando la lata golpea contra un objeto sólido. La tapa regresa a su posición Normal cuando se aplica una presión muy ligera.

3.6 Envase y empaque, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria. Se considera envase secundario aquel que contiene al primero. Ocasionalmente agrupa los productos envasados con el fin de facilitar su manejo.

3.7 Esterilización comercial, tratamiento térmico que libera al producto de formas viables de microorganismos peligrosos para la salud y causantes de descomposición así como aquellos capaces de desarrollarse en condiciones Normales de almacenamiento y distribución.

3.8 Espacio libre, aquél que se deja en un envase metálico herméticamente cerrado para que su contenido pueda dilatarse durante el tratamiento térmico y pueda alcanzar un vacío adecuado.

3.9 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.

3.10 Límite máximo, concentración permitida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides en un alimento, bebida o materia prima.

3.11 Lote, cantidad de unidades de un producto elaborado en un solo proceso con el equipo y sustancias requeridas, en un mismo lapso para garantizar su homogeneidad. Por lo tanto, no puede ser mayor que la capacidad del equipo ni integrarse con partidas hechas en varios periodos.

3.12 Metal pesado, metal de peso atómico mayor que el del sodio (22,9) que forma jabones al reaccionar con ácidos grasos. Ejemplos: aluminio, plomo y cobalto.

3.13 Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la Norma.

3.14 Muestra, número total de unidades de producto provenientes de un lote que representan las características y condiciones del mismo.

3.15 Pescado en conserva, producto alimenticio elaborado de las especies comestibles con pescados frescos y limpios, libres de cabeza y branquias, eviscerados y con tratamiento térmico antes y después de colocarse en envases sanitarios herméticamente cerrados y sometidos a proceso de esterilización comercial que asegure su conservación.

3.16 Plaguicida, sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier forma de vida que sea nociva para la salud, los bienes del hombre o el ambiente, excepto la que exista sobre o dentro del ser humano y los protozoarios, virus, bacterias, hongos y otros microorganismos similares sobre o dentro de los animales.

3.17 Proceso, conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de productos.

3.18 Resorte, cuando la tapa de la lata está distendida o se puede regresar a su posición Normal pero la tapa opuesta se distiende.

3.19 Tratamiento térmico, método físico que consiste en someter a una fuente de calor suficiente por un tiempo apropiado, envases herméticamente cerrados para destruir o inactivar todos los microorganismos nocivos.

#### 4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas, se entiende por:

BPF	buenas prácticas de fabricación
°C	grados celsius
Ca (OH) <sub>2</sub>	hidróxido de calcio
CaCl <sub>2</sub>	cloruro de calcio
g	gramos
HCl	ácido clorhídrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	ácido fosfórico
K	grados kelvin
KCl	cloruro de potasio
N	Normal
NaCl	cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
nm	nanómetros
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
kg	kilogramo
pH	potencial de hidrógeno
/	por
UFC	unidades formadoras de colonias
µg	microgramos
v	volumen
±	más menos
>	mayor o igual que

Cuando en la presente Norma se mencione:

Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

CICOPLAFEST, debe entenderse que se trata de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

**5. Disposiciones sanitarias**

Los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

5.1 Los productos enlatados, no deben exhibir los siguientes defectos: brincadora, resorte, abombamiento suave y abombamiento duro; los que se pueden presentar por las siguientes causas:

<b>Tipo de defecto</b>	<b>Causas</b>
Microbiana:	Proceso térmico insuficiente Infección por comunicación a través del cierre doble Descomposición previa al proceso
Química:	Abombamiento por hidrógeno
Física:	Técnica defectuosa en la operación del autoclave Mal agitado Sobrellenado Panelado
Misceláneos:	Oxidado Daño físico

**6. Especificaciones sanitarias**

Los productos objeto de este ordenamiento, deben cumplir con las siguientes especificaciones:

6.1 Microbiológicas

<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>LIMITE MAXIMO</b>
Mesofílicos aerobios	Negativo
Mesofílicos anaerobios	Negativo
Termofílicos aerobios	Negativo
Termofílicos anaerobios	Negativo

6.2 Los productos con un pH superior a 4,6 deben recibir un tratamiento capaz de destruir todas las esporas de Clostridium botulinum, a menos que la proliferación de las esporas supervivientes quede impedida en forma permanente por otras características distintas del pH.

6.3 Contaminación biológica

<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>LIMITE MAXIMO (mg/kg)</b>
Histamina	200

6.4 Contaminación por metales pesados

<b>ESPECIFICACIONES</b>	<b>LIMITE MAXIMO (mg/kg)</b>
Cadmio (Cd)	0,5
Mercurio (Hg)	1,0
Mercurio como metil mercurio*	0,5
Plomo (Pb)	1,0
Estaño (Sn)**	100

\* Es necesario únicamente en los casos en que el mercurio total supere el nivel de referencia establecido, con la finalidad de aceptar o rechazar el lote.

\*\* Solo para enlatado.

6.5 Contaminación por plaguicidas

Los productos objeto de esta Norma no deben contener residuos de plaguicidas como Aldrín, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, Kapone u otros prohibidos en el Catálogo Oficial de plaguicidas editado por CICOPLAFEST.

6.6 Los aditivos alimentarios permitidos para el pescado en conserva son los siguientes:

6.6.1 Reguladores del pH: ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico de acuerdo a las buenas prácticas de fabricación.

6.6.2 Estabilizantes: almidones modificados o no, agar, alginato de calcio, pectina (amidada y no amidada), gomas: (guar, algarrobo, tragacanto, xanthán) en una cantidad no mayor de 20 g/kg solos o combinados. La suma de uno o más estabilizantes o mezclas de los mismos no debe rebasar el límite permitido únicamente en el medio de cobertura.

### **7. Muestreo**

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta Norma, debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

### **8. Métodos de prueba**

Para la verificación de las especificaciones químicas que se establecen en esta Norma se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Capítulo de referencias y en el apéndice Normativo A. Para la especificación microbiológica se debe aplicar el método de prueba establecido en el "Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológicos de Alimentos Enlatados" del Laboratorio Nacional de Salud Pública.

### **9. Etiquetado**

La etiqueta de los productos objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe ajustarse a lo siguiente:

Cada envase del producto debe llevar troquelada o impresa, marcada o grabada de forma indeleble en su tapa, una declaración en clave del lote que permita identificar la planta, el producto, el año, mes y día de elaboración o el número de corrida de producción.

### **10. Envase, empaque y embalaje**

#### 10.1 Envasado

Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a las distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren las características físicas, químicas y sensoriales.

#### 10.2 Empaque

Se deben usar envolturas de material resistente que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

#### 10.3 Embalaje

Se deben usar envolturas de material resistente que ofrezcan la protección adecuada a los empaques para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

### **11. Concordancia con normas internacionales**

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

### **12. Bibliografía**

12.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. México, D.F.

12.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

12.4 Secretaría de Salud. 1989. "Manual de Técnicas y Procedimientos para Análisis Microbiológico y Alimentos Enlatados". Laboratorio Nacional de Salud Pública. México, D.F.

12.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NORMA-Z-013/02 Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. México, D.F.

12.6 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NORMA-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. México, D.F.

12.7 Ministerio de Salud. 1986. Disposiciones sanitarias sobre productos de la pesca. República de Colombia.

12.8 Code of Federal Regulations. 1990. Fish and Shellfish. Revised as of April-1. Washington D.C.

12.9 Code of Federal Regulations. 1991. Regulations governing processed fishery products and U.S. standards for grades of fishery products Revised as of October 1. Washington D.C.

12.10 Comisión del Codex Alimentarius. 1992. Codex Alimentarius: "Texto abreviado" Roma, Italia.

12.11 Comisión del Codex Alimentarius. 1981. Norma del Codex para las Sardinias y Productos Análogos en Conserva. STAN 94. Roma, Italia.

12.12 Comisión del Codex Alimentarius. 1989. Norma del Codex para Pescados y Productos Pesqueros STAN.94 Roma, Italia.

12.13 Food and Agriculture Organization of the Nations. 1989. Food Safety Regulations Applied to Fish by Major Importing Countries. Roma, Italia.

12.14 Food and Drug Administration EDRO. 1984. Compliance Guidelines Branch, DFRG Chapter 8-Fish and Sea Food Guide 7108.07 U.S.A.

12.15 Hersom A.C. a Hullonded. 1969. Canned Foods 2nd Ed. J & Churchill Ltd. London.

12.16 Kietzwann/Priebe/Reichstein. 1974. "Inspección Veterinaria de Pescados". Ed. Acribia, Zaragoza, España.

12.17 Ruiz Durá Fernández. 1978. "Recursos Pesqueros de las Costas de México". Ed. Limusa México, D.F.

12.18 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Directrices Generales para emitir Aseguramiento de Calidad de Productos de la pesca. México, D.F.

13. Observancia de la Norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

14. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio a los treinta días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 29 de noviembre de 1994.- El Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

## Apéndice Normativo A

### A METODOS DE PRUEBA

1 Determinación de histamina por TLC (cromatografía de capa fina)

1.1 Solución patrón de histamina

Mezclar 16,6 ml de dihidrocloruro de histamina (conteniendo 10 mg de histamina), 20 ml de n-butanol y 7,0 g de cloruro de sodio (NaCl) con 20 ml de agua destilada, agitar durante 5 min. Posteriormente adicionar 2,5 g de hidróxido de calcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  agitar durante 2 min, aspirarla o succionarla, filtrar dejando reposar cuando se separe la capa de butanol. Tomar una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  (esta alícuota debe contener 5  $\mu\text{g}$  de histamina), y depositarla en una hoja para TLC, no tirar el sobrante.

Con el sobrante de la mezcla se preparan otras diluciones en los siguientes volúmenes de n-butanol: 2,2, 2,8, 3,6, 4,7, 6,7, 10, 18,7, 33,3 y 100 ml. Se agitan cada una de las mezclas permitiendo la separación, se toman otras alícuotas las que se colocan en la hoja para TLC. Las 10 alícuotas se analizan como se describe a continuación:

Se establecen estándares de diferentes colores para las concentraciones de 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 y 0,5  $\mu\text{g}$  de histamina.

1.2 Desarrollo de la TLC

El solvente para la placa de TLC es una solución de etanol: hidróxido de amonio: agua destilada (90:6:10). Cuando el frente ha subido 5 cm, la placa se seca al aire durante 30 min aplicándose después una solución de ninhidrina (1 mg/1 ml de acetona) por aerosol, calentándose después a 100°C aproximadamente 2 min.

1.3 Estimación del nivel de histamina

La cantidad de histamina de la muestra se estima comparando visualmente el desplazamiento de las "manchas" de la muestra con el desplazamiento de los estándares de histamina.

Para determinar la histamina en la muestra, es suficiente que una de las manchas de la muestra tenga un desplazamiento igual al de por lo menos uno de los patrones que obtenga el autodenominado valor E en  $\mu\text{g}$ .

1.4 Cálculos

Si una mancha de las muestras entre 5 y 50 mg equivale al rango de 0,5 a 5,0  $\mu\text{g}$  de los patrones, la cantidad de histamina para 50 g de muestra se calcula como sigue:

mg de histamina = 10 E

donde E = número estimado de  $\mu\text{g}$  en la muestra entre 0,5 y 5  $\mu\text{g}$ .

Si una mancha de la muestra del rango de 25 a 250 mg corresponde al rango para el patrón de 0,5 a 5  $\mu\text{g}$ , la cantidad de histamina para 50 g de muestra se calcula como sigue:

mg de histamina = 50 E

1.5 Determinación de histamina en la muestra:

1.5.1 Mezclar 50 g de muestra molida en 100 ml de ácido clorhídrico (HCl) 1 N por 5 min.

1.5.2 Succionar y filtrar a través de un embudo de cristal con papel filtro grueso.

1.5.3 Tomar una alícuota de 20 ml (4 ml) del extracto de HCl (+ 16 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ).

1.5.4 Añadir 20 ml de n-butanol.

1.5.5 Agregar 7 g de NaCl y agitar durante 5 min.

1.5.6 Agregar 2,5 g de Ca (OH)<sub>2</sub>. Agitar 2 min.

1.5.7 Succionar y filtrar.

1.5.8 Tomar una alícuota de 10 µl de la capa de butanol y colocarla en una placa de sílica gel para TLC.

1.5.9 Desarrollar un sistema de solvente con etanol: hidróxido de amonio: agua (90: 6: 10). Secar al aire durante 30 min.

1.5.10 Rociar con ninhidrina al 0.1%. Calentar a 100°C durante 2 min y comparar las muestras con los estándares de histamina en el rango de 5 a 50 mg (25 a 250 mg) de histamina.

Si el valor obtenido en las muestras analizadas resulta ser mayor de 15 mg/100 g de muestra deberá analizarse nuevamente el producto utilizando uno de los siguientes métodos descritos a continuación:

## 2 Método químico

Usar agua bidestilada para la preparación de reactivos y para las determinaciones. No lavar la cristalería con jabón; para lavarla usar una solución de ácido crómico fresco, enjuagando con agua y después enjuagando 3 veces con agua destilada y 3 veces con agua bidestilada. Puede emplearse alcohol para enjuagar la cristalería.

### 2.1 Reactivos

2.1.1 Mezcla de benceno-n-butanol (3+2) v/v.

2.1.2 Succinato ácido de algodón. Disolver 5 g de acetato de sodio anhidro, preparado justo antes de usarse, y 40 g de anhídrido succínico en 300 ml de acetato de sodio anhidro en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Sumergir 10 g de algodón absorbente en la solución, cortado en tiras; unir el tubo de secado conteniendo el agente secante y calentando 48 horas a 100°C (el matraz puede ser sumergido hasta el cuello en un baño de vapor activo) Filtrar; lavar bien con H<sub>2</sub>O:HCl (1:9), agua y finalmente con alcohol. Secar en autoclave a 100°C.

2.1.3 Reactivo de Diazonium. Disolver 5 g de acetato de sodio anhidro recristalizado a partir de agua caliente y diluir a 100 ml con ácido clorhídrico 0,1N. Almacenar en refrigerador. Disolver 4 g de nitrito de sodio en agua y diluir a 100 ml. Refrigerar. Justo antes de usarse colocar 10 ml de una solución de p-nitroanilina en un baño helado durante 5 minutos, agregar 1 ml de nitrito de sodio en solución, mezclar y ponerlo en baño 5 min antes de emplearse.

2.1.4 Buffer acoplador. Disolver 7,15 g de metaborato de sodio y 5,7 g de carbonato de sodio en agua y aforar a 100 ml, guardarlo en botellas de polietileno.

2.1.5 Buffer de barbital. Disolver 10 g de barbital sódico en 1 l de agua y ajustar con ácido acético hasta un pH de 7,7 (1:15) (aproximadamente 25-30 ml), usando un medidor de pH. Guardar en el refrigerador para prevenir el crecimiento de hongos. Disolver algún precipitado por ebullición antes del uso (puede tenerse una botella de 50-250 ml conteniendo a este buffer a temperatura del cuarto, y reemplazar el contenido si se ve crecimiento de hongos).

2.1.6 Solución estándar de histamina. Disolver 0,1656 g de clorhidrato de histamina seca en agua y aforar a 100 ml (1 ml = 1 mg histamina). Diluir 10 ml de esta solución stock a 100 ml con agua (1ml = 100µg histamina). Tomar una alícuota de 5 ml de esta solución estándar y mezclarla con 5 ml de alcohol metílico aforar a 100 ml con agua (1 ml = 5 µg de histamina). Refrigerar. Preparar estos estándares por semana.

2.1.7 4-metil-2-pentanona (metil-isobutil-cetona). Para recuperar la cetona, lavar con solución saturada de carbonato ácido de sodio y 3 veces con agua destilada, hirviendo la fracción retenida a 115-118°C y verificar A a 475 nm.

2.1.8 Benzaldehído.- Libre de cloro.

2.1.9 Acido sulfúrico diluido.- 0,40±0,02 N, estandarizar.

### 2.2 Preparación de la columna de CAS

Preparar la columna colocando firmemente un pequeño algodón de succinato ácido (CAS) en una columna preparada al cortar la base de tubos para centrífuga. Lavar el algodón con tres porciones de 15 ml de agua y 2 porciones de 3 ml de alcohol. Permitir el goteo de los solventes a través del algodón, succionando la última porción de cada uno de los lavados con una jeringa de 10 ml. Los algodones (CAS) pueden reutilizarse durante meses, lavándose poco después de su uso con agua y alcohol como se describió arriba y protegiéndolo del polvo.

### 2.3 Determinación

Transferir 10 g de la muestra preparada a un recipiente semimicro de una licuadora de alta velocidad, agregar 50 ml de alcohol metílico, y licuar 2 min. Transferir esto a un matraz de vidrio con tapón de 100 ml. Enjuagar el tapón y la licuadora con alcohol metílico y adicionar las sustancias del enjuague al matraz. Calentar en baño maría a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a 25°C, diluir a volumen con alcohol metílico y filtrar. El filtrado del alcohol puede ser refrigerado varias semanas (la presencia de polvo luminoso o brillante durante el almacenamiento puede ser ignorada). Llevar 5 ml del filtrado a 100 ml con agua (ignorar la turbidez) colocar alícuotas de 5 ml en tubos de prueba con tapón de 16 x 150 mm, y agregar una gota de benzaldehído (libre de cloro) y 0,2 ml de hidróxido de sodio al 20% (el pH después de agregar el álcali debe ser de 12,4-12,5). Agitar vigorosamente 25 veces durante 2 minutos y agregar 5 ml de una mezcla de butihidroxibenceno. Agitar nuevamente 25 veces y dejar reposar 5 minutos.

Transferir la capa superior a un tubo fino de vidrio con una bomba de vacío de hule a la columna CAS preparada anteriormente, permitiendo el paso de cualquier fase acuosa.

Reextraer la solución acuosa con 5 ml de una mezcla de butilhidroxi benceno como antes, agitando y dejando reposar 5 min y transferir el sobrenadante a la columna. Enjuagar el borde y los lados de la columna con el alcohol proveniente de la botella lavada, aspirando fuera de CAS. Lavar la columna con 3 ml de alcohol; aspirar con la jeringa; lavar 2 veces con 3 ml de agua; aspirar; eliminar solventes y productos del enjuague.

Eluir la histamina a partir de CAS en matraces Erlenmeyer de 25 ml por lavado de los lados del tubo con 2 ml de ácido sulfúrico 0,40± 0,02 N (el volumen y concentración del ácido son críticos) seguido de 3 ml de agua, aspirar después de que termine el goteo.

Eluir en baño de hielo, agregando al tubo de ensaye un anillo de plomo o grapa para evitar que se caiga y dejarlo reposar 5-10 minutos. Agregar 0,5 ml de reactivo de diazonium helado y dejarlo en baño de hielo 5 minutos. Adicionar 0,50 ml del buffer (el volumen es crítico; es conveniente una pipeta de Ostwald) con agitación continua de modo que se pueda dar una alcalinización local (el pH debe llegar a 5-6). Dejarlo 5 minutos en baño de hielo. Agregar una parte de solución saturada con 0,25 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Agitar la solución inmediatamente y continuamente durante 30 segundos para asegurar una saturación rápida y completa (pH final 8,6). Dejar 15 minutos en baño de hielo. Pipetear 5,0 ml de metil-isobutil-cetona y agitar vigorosamente 25 veces. Transferir inmediatamente ambos sobrenadantes a tubos de prueba de 16 x 150 mm (no enjuague) y mantener 10 minutos a temperatura ambiente, separar y calentar. Transferir el sobrenadante con goteros finos a un segundo tubo de muestra conteniendo 5,0 ml de buffer de barbital. Evitar la transferencia de fase sólida y acuosa si existen (no es necesario cuantificar la cantidad transferida). Agitar vigorosamente 25 veces (el pH del barbital después del lavado debe estar en 8,3 a 8,4). Dejar 10 minutos para separación.

Transferir el sobrenadante con un gotero fino a una celda de 1 cm y determinar A a 475 nm contra o frente la metil-isobutil-cetona. Repetir la determinación en las muestras con A > 25 µg del estándar por dilución de un 1 ml de filtrado de alcohol metílico a 100 ml con agua. Alternativamente, la dilución acuosa puede ser diluida 1:4 (o más) con agua.

Para los cálculos, hay que comparar el estándar y el producto a evaluar como sigue: Pipetear 5 ml de la preparación estándar de histamina (5µg/ml) en un tubo de prueba con tapón de 16 x 150 mm (A) y pipetear 5 ml de alcohol metílico al 5% en otro tubo similar como blanco (A').

Restar el tubo A' de A (estándar) de la muestra y calcular la histamina en la alícuota de la muestra.

$$\mu\text{g histamina} = A \times 25 / A'$$

### 3 Método biológico

#### 3.1 Aparatos

3.1.1 Quimógrafo. Con brazo horizontal cuyo punto de escritura se accione por gravedad o fricción.

3.1.2 Baño de músculo. Con capacidad mínima de 50 ml, con una temperatura constante de 37°C, que pueda llenarse y vaciarse por 3 vías; un tubo conectado a una solución Ringer-Locke a través de un serpentín sumergido en el baño; otro tubo conectado a un vaso de precipitado como receptor de desecho acondicionado de manera que puedan obtenerse los desechos por succión, entrada de aire cuyo extremo cercano al músculo debe estar sellado con un filtro de algodón que permita un suministro constante pero pequeño de aire al baño.

#### 3.2 Reactivos

3.2.1 Solución stock de cloruro de sodio (NaCl), 180 g/l.

3.2.2 Solución stock de cloruro de potasio (KCl), 42 g/500 ml.

3.2.3 Solución stock de bicarbonato de sodio ( $\text{NaH}_2\text{CO}_3$ ), 15 g/500 ml.

3.2.4 Solución stock de sulfato de atropina, 1.0 g/500 ml.

3.2.5 Solución stock de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 24 g de sal anhidra/500 ml.

3.2.6 Solución Ringer Locke, 0,9% NaCl; 0,042% KCl; 0,024  $\text{CaCl}_2$ ; 0,015%  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,1% de glucosa; 0,01% Sulfato de atropina.

En un vaso de precipitado poner 100 ml de la solución stock de cloruro de sodio; 10 ml de solución stock de cloruro de potasio y de bicarbonato de sodio; añadir cuanto baste para 2 l, solución stock de sulfato de atropina, agregar agua a un volumen de aproximadamente 1800 ml y después 10 ml de solución stock de cloruro de calcio, mezclar. Agregar 2 g de glucosa anhidra antes de usar la solución diluida a volumen con agua. Cuando no se use la solución de glucosa mantenerla en refrigeración, si observa crecimiento de mohos descartar.

3.2.7 Solución estándar de difosfato de histamina.

Preparar una solución de 0,1 mg/ml de difosfato de histamina en agua hervida. Si se mantiene en refrigeración la solución puede durar hasta 3 meses.

Preparar diluciones estándar de 0,01 mg/ml y 0,005 mg/ml cuando sea necesario. Si el baño tiene una capacidad menor a 50 ml prepare diluciones de la solución estándar de difosfato de histamina con solución Ringer Locke para evitar que se diluya la concentración del baño al agregarse los estándares.

#### 3.2.8 Intestino de conejillo de indias.

Se requiere de conejillos de indias de 300 a 400 g de peso aproximado. Someterlos a dieta durante 24 horas, sacrificarlos golpeando en la cabeza, obtener el intestino a partir de la zona cercana a la válvula ileocecal hasta 12 cm de la terminación del íleon. Lavar este segmento con solución Ringer Locke. Bombear para permitir el paso de aire y manténgase entre 4 y 7 °C (40 a 45°F), debido a que a menor temperatura el intestino pierde actividad. Utilice tantos fragmentos de intestino de longitud suficiente como sea necesario para observar la respuesta a la estimulación por histamina. Estas secciones adicionales de intestino no son tan sensibles como el íleon, pero ofrecen una respuesta a la estimulación con movimientos pendulares no uniformes después del almacenamiento.

#### 3.3 Ensayo

Pesar 10 g de muestra preparada en un mortero. Agregar suficiente agua para preparar una pasta lisa cuando se muele. Agregar un poco de agua en la pasta y transferir a un vaso de Kohlrausch de 100 ml, agregar 1 ml de HCl (1:1). Añadir agua hasta llegar a un volumen total de 70 ml, mezclar bien y calentar el vaso 20 min en baño maría. Sacar y dejar enfriar, diluir con agua, mezclar, filtrar en un papel whatman del No. 12 (o equivalente) se requiere únicamente 5 ml de filtrado para el análisis. Estos filtrados pueden conservarse refrigerados durante 10 días sin pérdida de actividad. Neutralizar 1 ml de filtrado con 2 ml de solución de NaHCO<sub>3</sub> al 1%. Diluir a 10 ml con solución Ringer-Locke (sin glucosa). Sujetar el intestino al quimógrafo y asegurarse que quede inmerso en la solución Ringer-Locke por lo menos media hora a 37°C antes de realizar la prueba. Cuando se usa íleon la respuesta a la estimulación con histamina puede observarse como contracciones y relajaciones que pueden presentarse en forma arrítmica y muy fuertes o apenas perceptibles durante 2 a 3 horas.

Durante este periodo pueden realizarse determinaciones, siendo necesario agregar cantidades pequeñas que aumenten progresivamente las diluciones estándar con el fin de estabilizar la respuesta del intestino para verificar las respuestas hasta que las lecturas sean reproducibles. Agregar una cantidad conocida de la solución estándar de difosfato de histamina diluida al baño, registrar las respuestas y retirar la plumilla del cilindro. Drenar el baño y agregar solución Ringer Locke fresca a 37°C para lavar la cámara y el intestino, drenar y volver a llenar con solución fresca. Dejar descansar el intestino 3 min. Calcular una cantidad y dilución de extracto de pescado neutralizado con la que se obtenga una respuesta similar del músculo y agregarla al baño. Repetir el registro de la respuesta, lavar la cámara y dejar descansar el intestino 3 min. Durante este periodo medir los registros de las contracciones (en mm) y calcular la cantidad de solución estándar para igualar las mediciones obtenidas en el ensayo. Agregar extractos y solución estándar alternadamente hasta obtener los mismos registros.

#### 4 Método fluorométrico

Enjuagar toda la cristalería y material de plástico con HCl (1:3) y agua después de su uso.

##### 4.1 Aparatos

4.1.1 Tubo para cromatografía. Tubos de 200 X 7 mm de polipropileno ajustado y un baño de teflón de 45 cm. Control del goteo a más de 3 ml/min, ajustando a la altura de la columna cercana a la salida del baño. Alternativamente pueden ser usadas válvulas de dos vías en lugar del baño.

4.1.2 Fotofluorómetro con lámpara de presión media de Hg, o instrumento con excitación a 350 nm y medición de la emisión a 444 nm.

4.1.3 Repipeteros de 1 y 5 ml.

##### 4.2 Reactivos

4.2.1 Resina de intercambio de iones. Malla 5-100. Alcalinizar agregando aproximadamente 15 ml de NaOH (2N)/g resina. Mezclar y dejar reposar durante 30 min. Decantar el líquido y repetir con la base adicional. Lavar la resina cuidadosamente con agua, filtrar en papel y volver a lavar con agua. Preparar resina fresca cada semana y almacenarla sumergida en agua.

Colocar una porción de fibra de vidrio en la base del tubo del punto 4.2.1 y agregar suficiente resina hasta formar una cama de 8 cm. Mantener el nivel del agua por arriba de la cama de resina todo el tiempo. No regenerar la resina en la columna empacada.

4.2.2 Acido fosfórico. Llevar 121,8 ml de una solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% 3,57 N a 1 litro. Para otra concentración de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, el volumen requerido para 1 litro de ácido 3,57 N = 17 493/(densidad del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> X % de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Estandarizar 5 ml por titulación con NaOH 1 N hasta el punto final de fenoftaleína y ajustar la concentración si es necesario.

4.2.3 Solución de orto-dicarboxialdehído ftálico (OPT) al 0,1%. Disolver 100 mg de OPT en 100 ml de metanol destilado en vidrio. Guardar en una botella de vidrio ámbar. Preparar la solución cada semana.

4.2.4 Solución estándar de histamina. Refrigerar. Guardar una solución de 1 mg/ml como base libre. Pesar 169,1 mg de clorhidrato de histamina en un vaso de precipitado de 100 ml disolverlo a volumen con HCl 0,1 N. Preparar la solución semanalmente.

Solución intermedia (10 µg/ml). Tomar una alícuota de 1 ml de la solución estándar de histamina y transferirla a un vaso de precipitado de 100 ml y diluirlo a volumen con HCl 0,1 N. Preparar cada semana.

Soluciones de trabajo. (0,5, 1 y 1,5 µg/5 ml). Pipetear 1, 2 y 3 ml de la solución intermedia en diferentes vasos de precipitados y diluir cada uno a volumen con HCl 0,1 N. Preparar diariamente.

#### 4.3 Preparación de la curva estándar

Con pipetas tomar alícuotas de 5 ml por duplicado de cada solución de trabajo en dos matraces Erlenmeyer de vidrio o de polipropileno. Pipetear 10 ml de HCl 0,1 N de cada vaso de precipitado y mezclar. Pipetear 3 ml de NaOH 1 N. Dentro de los 5 min siguientes tomar 1 ml de OPT y mezclar inmediatamente. Exactamente después de 4 min adicione 3 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3,57 N y mezcle inmediatamente. Es importante mezclar cuidadosamente después de la adición de cada sustancia y por lo menos una vez durante la reacción OPT. Correr simultáneamente las reacciones OPT 6-10 adicionando los reactivos a los matraces Erlenmeyer en orden. Preparar el blanco sustituyendo 5 ml de HCl 0,1 N por la solución de histamina. Llevar un registro de la intensidad de la fluorescencia durante 1,5 horas (I) de las soluciones estándar de trabajo con agua en la celda de referencia usando una longitud de onda de excitación de 350 nm una longitud de onda de emisión de 444 nm. Trazar (I) corregida para el blanco contra µg de histamina/en alícuota de 5 ml.

#### 4.4 Determinación

Extraer la mezcla preparada con metanol. Pasar de 4 a 5 ml de agua del punto 3.2.1 descartando el eluido tomar 1 ml de la columna y adicionar de 4 a 5 ml de agua. Inmediatamente iniciar el flujo de la columna en un vaso de precipitado conteniendo 5 ml de HCl 1 N. Cuando el nivel del líquido sobrepase 2 mm la resina, agregar 5 ml de agua y dejar eluir después agregar agua hasta eluir 35 ml. Detener el flujo de la columna, diluir a volumen con agua, detener y mezclar. Refrigerar el eluido. Pipetear 5 ml del eluido en un matraz Erlenmeyer y adicionar 10 ml de HCl 0,1 N proceder como en el caso de la preparación de la curva estándar, desde: "Pipetear 3 ml de NaOH 1 N ... etc.

Si la muestra contiene más de 15 mg de histamina/100 g de pescado tomar 1 ml de la mezcla OPT-muestra y revolver cuidadosamente. Leer la fluorescencia de la nueva solución. Diluir y mezclar alícuotas con la mezcla blanco-OPT, lo suficiente para obtener una lectura medible. En forma alternativa usar un control del rango de sensibilidad del fluorómetro si el aparato lo tiene, para estandarizar la dilución. Usar este procedimiento para preparar una dilución adecuada de las alícuotas con HCl 0,1 N y proceder como en el caso de la preparación de la curva estándar comenzando con: "Pipetear 3 ml de NaOH 1 N ... etc."

#### 4.5 Cálculos

El trazo, de I medida por el deflector o registrador de respuesta y corregido para el blanco, contra µg de histamina/5 ml de solución, debe ser una línea recta que parta del origen con una pendiente = m

$$m = \frac{(I_a/1.5) + I_b + 2 I_c}{3}$$

mg Histamina/100 g pescado = (10) (F) (W)

donde: I<sub>5</sub>, I<sub>a</sub>, I<sub>b</sub>, I<sub>c</sub> = fluorescencia de las muestras estándar de 1,5, 1,0 y 0,5 µg de histamina.

F = Factor de dilución = (ml eluidos + ml HCl 0,1 N)

F = 1 para eluido no diluido.

Si el caso de la calibración no es lineal, use directamente la curva de distribución estándar para la cuantificación. Cada subdivisión de las abscisas sería > 0,1 µg histamina /5 ml de solución. Leer todos los valores de la curva cercanos a 0,5 µg histamina/5 ml de solución.

mg Histamina/100 g de pescado = 10 (F) (W)

donde W = µg de histamina/5 ml de solución determinados a partir de la curva de distribución estándar.