



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DISEÑO DE UN SENSOR PARA AMINAS PROVENIENTES DE LA DESCOMPOSICION DE ALIMENTOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

YESID JAIME BOLIVAR MUÑOZ



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
Vocal	Prof. Margarita Chávez Martínez
Secretario	Prof. Jesús Gracia Mora
1er. Suplente	Prof. Baldomero Gómez Reyes
2º. Suplente	Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 100, Edificio B, Posgrado, Química Inorgánica Facultad de Química, UNAM.

Asesor:
Dr. Jesús Gracia Mora

Yesid Jaime Bolívar Muñiz



Handwritten signatures of Dr. Jesús Gracia Mora and Yesid Jaime Bolívar Muñiz over horizontal lines.

Agradezco a:

Chucho, Mauro y el Tocayo por guiarme en el cumplimiento
de esta meta.

Every beginning.....

Know your enemy
But above all know yourself
You can fight a 100 battles without disaster

A mi familia Melba, Nora y Melbita por estar junto a mí durante todo este periodo. Ya que sin ustedes perdería el camino.

A mi papa y a la familia Bolívar.

A la memoria de mi abuela Melba y de Mayte.

A los integrantes de DePA: Ili, Bit, Zayra, Paola.

Jorge, Wilbert, Rosario, Daniela, Roberto y Alfonso por sus consejos y su apoyo

Jocelyn, Isadora, Ulises, Hanne, Leonardo, Eduardo, Beto, Ivan, Cike grandes concedores del concepto Warrior

Alonso, Omar, Alfonso gracias finísimos ya que sin ustedes seguiría tomando clases, esto también es su trabajo.

A todos ustedes, gracias por apoyar mis locuras

...

....has an End.

Índice:

ABREVIATURAS UTILIZADAS	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	7
HISTAMINA	7
LÍMITES RECOMENDADOS PARA EL CONTENIDO DE HISTAMINA	11
COMERCIO INTERNACIONAL DE PRODUCTOS PESQUEROS	15
CALIDAD	17
TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO	20
IDENTIFICACIÓN DE FRESCURA	20
MÉTODOS FÍSICOS	26
MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	26
IDENTIFICACIÓN DE HISTAMINA Y DIAMINAS BIOGÉNICAS	28
PORFIRINAS	35
OTROS RECEPTORES MOLECULARES.	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	46
OBJETIVO	48
OBJETIVO GENERAL	48
OBJETIVOS PARTICULARES	48
HIPÓTESIS	49
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	49
REACTIVOS	49
FIJACIÓN DE PH	51
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ELECTRÓNICA EN LA REGIÓN UV – VISIBLE	51
SOPORTES DE FIJACIÓN	51
SÍNTESIS DE PORFIRINAS METÁLICAS	52
MATRICES DE PORFIRINAS INMOVILIZADAS	56
ANÁLISIS DE RESULTADOS	58

INTERACCIÓN HISTAMINA-PORFIRINAS EN DISOLUCIÓN	61
RESULTADOS DE LA PRUEBAS DE FIJACIÓN Y DE ELUSIÓN	65
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77

Abreviaturas utilizadas

CCF	Cromatografía de Capa Fina.
CG	Cromatografía gas-líquido.
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography. (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay. (Ensayo inmunológico de enzimas enlazadas)
AOAC	Asociation of Official Analytical Chemists.
BVT	Bases volátiles totales.
TMA	Trimetilamina.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.
FAO	Food and Agriculture Organization.
FDA	Food and Drug Administration.
SS	Secretaria de Salud.
CEE	Comunidad Económica Europea.
TK	4,4',4'',4'''-(21H, 23H-Porfirina-5,10,15,20 tetraly)trakis (ácido benzoico).
TTMAPP	5,10,15,20-Tetraquiis(4-trimetilamoniofenil)porfirintetra(p-toluenesulfonato).
Mabs	Anticuerpos monoclonados.
UV	Ultra Violeta.
HD	Histidina descarboxilasa.
ATP	Adenosina trifosfato.
IMP	Inosina monofosfato.

Introducción

La histamina es una amina biogénica de gran importancia debido a que esta relacionada con la escombriosis, que es una intoxicación alimenticia cuando ésta reacciona con otras aminas biogénicas, como lo serían la cadaverina, putrecina y triamina al igual por su capacidad de reaccionar con nitrilos y dar lugar a nitrosaminas carcinogénicas, de aquí la importancia para desarrollar un método de control para mantener la calidad de los alimentos.

Kauru Ishikawua define a la calidad como "La satisfacción total del cliente" es un factor muy importante, incluyendo la rama de los alimentos, por ello se requiere una forma de emisión de criterios la cual sea rápida y precisa para lograr un producto con la calidad adecuada para que logre la satisfacción total del cliente.

Una de las industrias alimenticias que debe cumplir de manera más estricta las primicias de calidad y juicio inmediatos es la industria pesquera, esto debido a que el pescado no manifiesta cambios físicos notables, pero la formación de sustancias como la histamina la cual provoca la escombriosis, éste puede ser destinado a la venta y producir un daño a la salud del consumidor. El problema con su detección se debe a que su presencia no provoca un cambio en el olor, color, ni sabor en el producto por lo que se requiere ser sumamente estrictos en los criterios de aceptación y rechazo de estos productos.

Existen varias formas para determinar el grado de frescura de los productos pesqueros como; la evaluación sensorial que es un juicio basado en las características como: el olor, color, textura, este tipo de determinación es "engañoso", ya que es subjetiva y depende de entrenamiento previo para poder tomar decisiones.

Otra técnica que ha probado ser eficaz es la determinación de compuestos volátiles donde se aprovechan los compuestos como la dimetilamina, trimetilamina y amoníaco, pero ésto requiere de técnicas analíticas caras y complejas.

Los sensores químicos representan una posibilidad muy práctica, ya que muchos de estos métodos no dependen de equipos ni entrenamiento previo, lo que resulta en una forma veraz y rápida de determinar niveles nocivos de sustancias tales como la histamina.

Por las razones anteriores, el presente trabajo esta enfocado al reconocimiento molecular para lograr que un sustrato, en este caso porfirinas metálicas, reconozca selectivamente a una molécula, histamina y cuando ocurra esto se de un cambio en las propiedades del sistema, como el color.

En particular, se utilizaron diversas porfirinas metálicas que son compuestos altamente coloridos y dependiendo de sus características estructurales, pueden tener mayor o menor afinidad por moléculas como la histamina.

La utilidad de las porfirinas se basa en que se fija este compuesto en una matriz, y de esta forma usarlo como tira reactiva para la determinación de la cantidad de histamina o su presencia en los alimentos con solo un cambio de color. Con esto se podría evitar el uso de máquinas costosas, complejas, delicadas que requieren instalaciones especiales y personal capacitado, entre otros.

Antecedentes

Histamina

La β -aminoetilimidazol o histamina (fig. 1) es considerada como una amina biogénica debido a que su síntesis es gracias a la acción de organismos vivos a través de la descarboxilación de los aminoácidos. Para la histamina su precursor es la histidina, en caso de la putrecina es la ornitina, la cadaverina es la lisina.

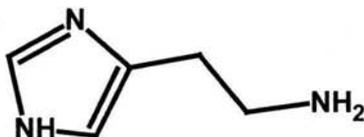


Figura 1. Estructura de la histamina.

Las acciones que causa en el cuerpo son: la dilatación de los vasos periféricos causando urticaria, hipotensión, enrojecimiento, dolor de cabeza, contracciones inducidas al músculo liso del intestino delgado lo que causa dolores abdominales, diarrea y vómito. Causando en algunos casos la muerte. [1] Se ha reportado que 100 mg de histamina en una muestra de 100 g puede inducir una respuesta de intoxicación en el humano. [2]

Muchas de las intoxicaciones por histamina pasan desapercibidas por su poca severidad, mala documentación y por mal diagnóstico. Los síntomas pueden ser confundidos con los de una "salmonelosis" [3] o por alergia al alimento. Los síntomas relacionados con la intoxicación

por histamina se pueden presentar de 30 min. a 12 hrs. después de la ingestión. [4]

El problema de la presencia de histamina en alimentos es considerado por la FAO, debido a que es un indicador del mal manejo o su conservación. La intoxicación causada por el consumo de alimentos con una alta concentración de histamina ocupa el segundo lugar en la mayoría de los países desarrollados. [5]

La producción de histamina en pescado esta relacionada al contenido de histidina. La presencia de histidina descarboxilasa (HD) y a las condiciones ambientales en las que se encuentre [6], se puede producir rápidamente por la descarboxilación ocasionada por bacterias ,en el caso de peces con un alta concentración de histidina libre en su tejido muscular cuando se encontraban vivos. [7]

La formación de histamina empieza desde el momento de la captura o muerte, cuando el adenosina trifosfato (ATP), es degradado rápidamente a inosina monofosfato (IMP), por las enzimas endógenas (autólisis).

La producción principal de histamina es por microorganismos de flora inicial y los desarrollados en el pescado, mediante la acción de enzimas endógenas. Kimata, hace referencia a un microorganismo en especial que está relacionado con envenenamiento por histamina en Japón que es el ***Proteus morganii*** perteneciente a la flora natural de muchos peces. Aunque hay otros alimentos que pueden tener también altas concentraciones de histamina, como pueden ser el queso y pescado en conserva en el cual el microorganismo causante de la histamina es el ***Lactobacillus casei***, este microorganismo es capaz de producir histamina en conservas de pescado almacenadas a pH = 5 y temperatura ambiente.

En el caso de los pescados existe el problema del vaciado intestinal al momento de ser capturados en las redes, las cuales ejercen una presión sobre ellos así como el mismo peso de los demás pescados, lo cual provoca la salida de fluidos con una carga bacteriana considerable y éste se extiende sobre la piel, causando una disminución rápida de la frescura de no ser colocado a una temperatura de -6°C para inactivar la acción bacteriana.

En la figura 2 se observa la producción de algunas aminas biogénicas a través de la descomposición de aminoácidos. [8] Siendo la histamina, la amina que se presenta con mayor rapidez debido a que sólo requiere de una descarboxilación a partir de la histidina y aprovechándonos de este hecho es un buen medio para la identificación del estado de los alimentos ya que la formación de otros compuestos como sería el caso de la cadaverina, putrecina no es tan directa y cuando estos compuestos ya se encuentran presentes se identifican por el olor que produce; éste se debe a la degradación del IMP a inosina e

hipoxantina es mucho más lenta y es catalizada principalmente por la enzima endógena IMP fosfohidrolasa y la inosina ribohidrolasa, con la contribución de enzimas bacterianas que se incrementan conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

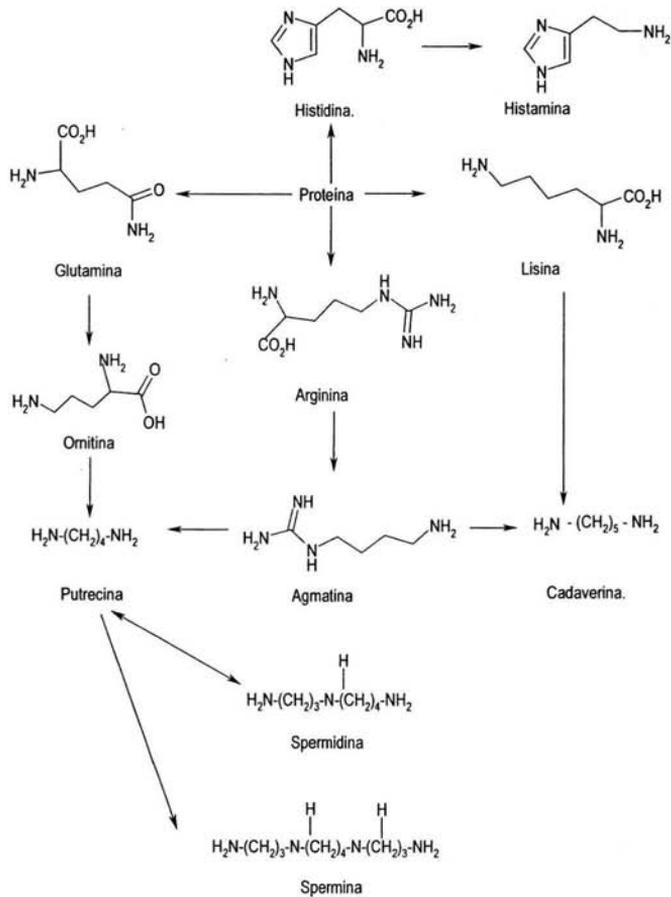


Figura 2. Esquema de formación de histamina a partir de proteínas.

En un estudio realizado por Yatsunami y colaboradores, se observa un crecimiento de bacterias formadoras de histamina halotolerantes y halófilicas de 10^1 - 10^2 a 10^4 - 10^5 después de un período de 6 meses conservados en agua de mar congelada, el contenido de putrecina, histamina y tirosina, también tuvo un incremento considerable durante este período.[9] El aislamiento de los microorganismos halotolerantes y halófilicos en la sardina cruda, fueron identificados como: Micrococcus, Vibro, Pseudomonas III / IV NH y Pseudomonas III / IV H, los microorganismos identificados 6 meses después en el proceso de fermentación fueron: Staphylococcus, Micrococcus y Vibro [8]. De aquí se puede resaltar la relación directa existente entre la cantidad de bacterias presentes en el alimento y los incrementos de aminas biogénicas como la histamina.

Límites recomendados para el contenido de histamina

Los niveles de ingestión oral de histamina que se han sugerido son: 8-40 mg causando una intoxicación leve, más de 40 mg moderada y más de 100 mg severa. [10]

En estudios realizados por Bartholomew a causa de un censo en Inglaterra en el período 1976 a 1986 donde se involucraron 250 incidentes de intoxicación se tomaron como límites en el contenido de histamina en pescado debía de ser: < 50 ppm para un consumo seguro, 5-20 ppm posible intoxicación y 20-100 ppm producto tóxico e inseguro para su consumo. Sin embargo, los casos de intoxicación durante este período fueron asociados con un consumo menor a 50 ppm. [11]

En 1982, la FDA estableció el nivel de acción de defecto por histamina en los productos de pescado escombroides como 200 ppm como indicador de un mal manejo y un nivel de acción de peligro de 500 ppm, que se reconoce como un riesgo para la salud. Aunque la relación entre el nivel de histamina y la toxicidad de la muestra de pescado no es muy clara, es considerado como un contenido de histamina > 200 ppm en el pescado puede ser considerado como toxicológicamente significativo y un contenido > 50 ppm indican que el pescado fue sometido a malas prácticas de manufactura.

Spanjer y Van Roode en 1991 sugieren una regulación para pescado y sus derivados, establecieron que deberían de contener como máximo una concentración total de 300 ppm de la suma de histamina, cadaverina, putrecina y triamina. En este mismo año la Comunidad Económica Europea (CEE) estableció la regulación para la concentración de histamina en pescado, se propuso una clasificación mediante las siguientes siglas n, c, m y M donde "n" es el número de muestras analizadas de cada lote, "m" y "M" son los límites de tolerancia de histamina y "c" es el número de unidades permitidas en contener niveles de histamina dentro de m y M, cuyo nivel máximo de concentración (n=9; c=2; m=100 ppm; M=200 ppm) para pescado fresco y (n=9; c=2; m=200 ppm; M=400 ppm) para producto de pescado sometidos a acción enzimática. [12]

La FDA en 1995 formuló una nueva guía, a partir de la revisión de políticas anteriores, en la cual se relaciona la descomposición de productos pesqueros con la concentración de histamina en los mismos. A continuación se presentan los cambios más importantes realizados:

1. Considerar la descomposición del pescado cuando la concentración de histamina sea de 50 ppm, anteriormente se consideraba 100 ppm.
2. Extender la nueva aplicación al atún y mahi-mahi crudos y congelados.
3. Eliminar la comprobación de la descomposición del pescado por métodos sensoriales cuando la concentración de histamina era menor de 200 ppm.
4. Considerar en descomposición a otras especies cuando los niveles de histamina se encuentran entre 50 ppm - 500 ppm.
5. Considerar a otros pescados diferentes al atún, implicados en un envenenamiento por histamina o que puedan causar daño a la salud, cuando los niveles de histamina se encuentren por arriba de 500 ppm. [13]

La normatividad en México no considera niveles de histamina dentro de las especificaciones para pescado entero y congelado. [14]

Hay diferencias entre las diversas organizaciones mundiales con respecto a la concentración límite aceptable de histamina presente en los alimentos, esto se podría deber a las prácticas alimenticias de cada país ya que no todos basan su alimentación en productos pesqueros, que son los más susceptibles a mostrar concentraciones altas de histamina, por lo que no le dan la importancia necesaria a establecer normas estrictas de control. Por esta razón es muy importante tomar en cuenta la naturaleza de cada alimento para saber los riesgos que esto conlleva.

Comercio internacional de productos pesqueros

En la tabla 1 muestra la importancia que tiene la industria dentro del desarrollo de los países ya que los productos pesqueros son parte fundamental de la economía de muchos de ellos. Por lo que un control estricto de la calidad de estos productos beneficiará no solo a la salud de la gente, sino que contribuirá a beneficios económicos.

México ocupa el lugar número 25 de exportaciones y el 31 de importaciones a nivel mundial de productos pesqueros, como se puede observar en la tabla 1; mientras que Japón ocupa el 1° lugar en importaciones en el período que comprende 1998 a 2000 teniendo un incremento en tres años, en varios países una de sus principales fuentes ya sea alimenticia o económica es la producción pesquera.

Tabla 1. Importación y exportaciones de pescado a nivel mundial.

IMPORTACIÓN				EXPORTACIÓN			
PAÍS O ÁREA	1998	1999	2000	PAÍS O ÁREA	1998	1999	2000
Japón	12826543	14748712	15513059	Tailandia	4031279	4109860	4367332
EUA	8578766	9407307	10453251	China	2656117	2959530	3605838
España	3545757	3286831	3351670	Noruega	3661174	3764790	3532841
Francia	3505333	3280940	2983618	EUA	2400338	2945014	3055261
Italia	2808587	2728568	2535269	Canadá	2265236	2617759	2818433
Alemania	2623741	2288523	2262018	Dinamarca	2897707	2884334	2755676
Reino Unido	2384028	2276998	2183811	Chile	1596800	1699516	1784560
China, H. Kong	1611747	1593661	1948824	China, Taiwán	1579836	1702363	1756133
Dinamarca	1704234	1771500	1806365	España	1529315	1604237	1599631
China	991463	1127412	1795953	Indonesia	1628494	1527092	1584454
Canadá	1194583	1338973	1388621	Vietnam	820588	940473	1480110
Rep. de Corea	564112	1140022	1371830	India	1049356	1179989	1405196
Holanda	1230199	1304585	1161180	Fed. Rusa	1168319	1247518	1386398
Bélgica	1061056	1063195	1027545	Rep. de Corea	1245858	1393428	1385948
Portugal	926322	1017066	860612	Holanda	1364809	1744665	1343979
Tailandia	832366	840679	781767	Reino Unido	1549305	1427853	1258585
Suiza	634802	715463	709120	Islandia	1434321	1379379	1228802
Noruega	674766	612469	596817	Perú	639071	788411	1128516
Singapur	416498	475224	555476	Alemania	1053285	966300	1104858
China, Taiwán	481645	556725	546697	Francia	1097356	1107169	1095742
Australia	490619	486933	518042	Australia	750308	899040	1003221
Suecia	386603	375700	353835	Marruecos	743196	750764	950471
Brasil	455250	289808	324249	Japón	718163	719839	801580
Polonia	322730	260653	297715	Argentina	918433	807042	747630
Malasia	226474	258747	296782	México	718479	649787	706547
Grecia	292098	308553	276043	Nueva Zelanda	663614	712256	665745
Nigeria	198874	209576	246850	Ecuador	1203392	954471	587101
Fed. Rusa	265429	199065	220770	China, H. Kong	417325	383398	545322
Egipto	147977	153061	170902	Suiza	419214	477992	498393
Austria	198765	207997	160157	Bélgica	478843	447598	468991
México	97468	125696	1414392	Singapur	394848	390062	452583

Calidad

La calidad de los alimentos es un punto de suma importancia para cualquiera de sus industrias ya que de no tener los estándares establecidos en cada país ocasionaría problemas de salud afectando su productividad y por consiguiente rezagos en lo económico, cultural y social.

El Codex Alimentarius define a:

Pez: como animal vertebrado acuático de sangre fría, comprendiendo *pisces*, *elasmobranquios* y *ciclóstomos* se excluyen los mamíferos acuáticos, los animales invertebrados y los anfibios.

Pescado Fresco: Como el recién capturado que no ha recibido tratamiento conservador y que se ha preservado solamente enfriándolo, un alimento sumamente perecedero y que deberá manipularse en todo momento con mucho cuidado y de manera que se limite la multiplicación de microorganismos. [15]

La calidad y frescura de un pescado se puede representar. Como se muestra en la figura 3, en donde se puede observar la relación entre estas dos condiciones así como los factores que afectan a cada uno de ellos.

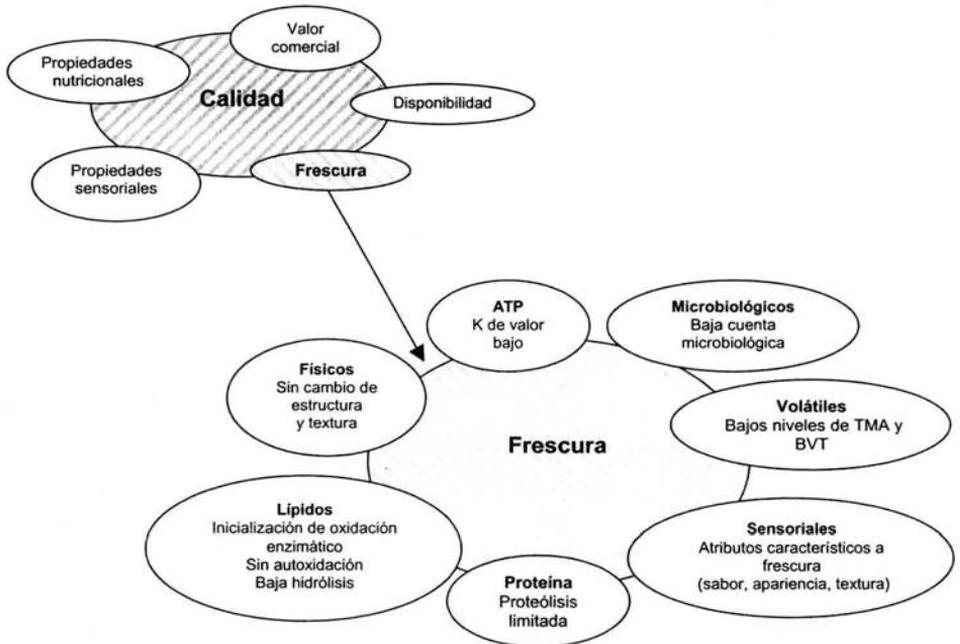


Figura 3. Esquema de calidad y frescura.

Las propiedades nutricionales y sensoriales las cuales están determinadas por la especie de que se trate. El valor comercial esta relacionado con la disponibilidad que presente ese producto en el mercado.

La única de las características cuantificables ya sea microbiológica, física o químicamente, es la frescura, donde la histamina juega un papel importante como indicador, ya que puede ser cuantificada en dos de los factores que la afectan al grado de frescura (figura 3) y a su vez a la calidad del pescado como lo son: la proteólisis y la formación de bases volátiles (BVT).

Técnicas de evaluación de la calidad del pescado

Identificación de frescura

Para garantizar la calidad se han generado diferentes métodos o técnicas las cuales deben tener una gran precisión en sus resultados, mediante este juicio se determina la aceptación o el rechazo del producto.

Es de vital importancia detectar y cuantificar la histamina, en alimentos sobre todo en peces, eso es necesario establecer estándares de calidad y métodos de detección.

Sensorial

La forma más empírica para conocer el estado de un pescado es mediante una evaluación sensorial, en donde se utilizan todos los sentidos para emitir una decisión de aceptable, si este es agradable a ellos o rechazado si no es aceptable.

Las características sensoriales como se muestran en las tablas 2 y 3:

De la comparación que aparece en la tabla 2, se pueden apreciar las diferencias que presenta un pescado fresco y uno con un grado de deterioro.

A continuación (tabla 3), se muestran los puntajes asignados a las características sensoriales. Se asignan valores a las diferentes características que presenta el pescado fijando una puntuación para determinar el estado del producto. Un valor bajo indica que el pescado está en un estado excelente mientras que un valor alto nos indica que ese producto ya esta deteriorado.

Tabla 2. Comparación de características en pescado fresco y alterado.

Pescado fresco	Pescado alterado
<i>Aspecto general:</i> limpio, brillante, suave al tacto, piel húmeda, color brillante y sin colorantes anormales.	Aspecto general: apagado o desvaído, seco o áspero al tacto, color sin brillo y a veces con tonalidades extrañas especialmente en la zona ventral.
Olor: a <mar>, puede variar ligeramente de unas especies a otras, pero nunca es desagradable.	Olor: primero acre, después pútrido y repugnante, hasta nauseabundo.
Agallas: de color rojo Burdeos brillante, separadas sus láminas, limpias, sin limosidad ni olores molestos.	Agallas: de color rojo oscuro sucio a marrón oscuro sin brillo, con láminas pegadas entre sí, recubiertas de limosidad mal oliente.
Ojos: brillantes, limpios, húmedos pero sin limo, salientes, pupila convexa azabache.	Ojos: Hundidos (tanto más cuanto mayor es la alteración), sucios, con una limosidad blanco-amarillenta y mal oliente, pupila hundida, decolorada y hasta blanco lechosa si la alteración está avanzada.
Carne: firme y elástica, fuertemente adherida a las espinas y por tanto difícil de separar de las mismas. Al presionarla no se marcan las impresiones de los dedos. Sangre rojo brillante a lo largo de la espina dorsal.	Carne: blanda y flácida, fácilmente desprendible de las espinas. Se marcan las impresiones digitales al presionar, desapareciendo tanto más lentamente cuanto mayor es la alteración. Sangre bajo la espina dorsal de color pardo a chocolate.
Pared del vientre: íntegra y firme. Internamente de color blanco o blanco azulado.	Pared del vientre: a veces lesionada, blanda y de color pardo a marrón oscuro.
Vísceras: íntegras, separadas, brillantes y húmedas. Sin olor.	Vísceras: desgarradas en parte, adheridas, con contenido intestinal extendido por el vientre, de color apagado, con mucosidad blanco-amarillenta y olor repugnante.

Tabla 3. Puntaje sensorial de frescura.

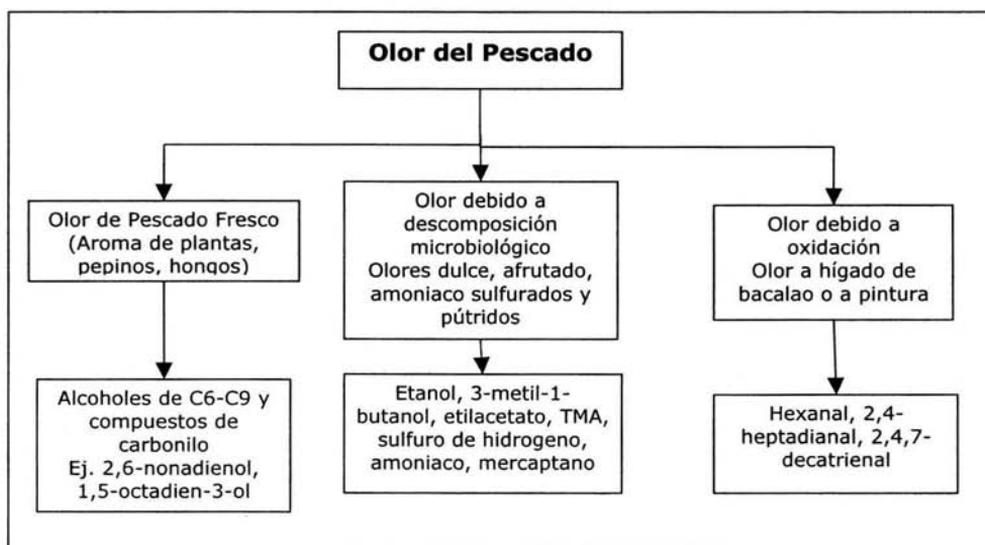
Parámetro de la calidad	Característica	Puntuación
Apariencia general	Piel	0 Brillante, resplandeciente
		1 Brillante
		2 Opaca
	Manchas de sangre (enrojecimiento) en opérculos	0 Ninguna
		1 Pequeños, 10-30%
		2 Grandes, 30-50%
		3 Muy grandes, 50-100%
	Dureza	0 Duro, en <i>rigor mortis</i>
		1 Elástico
		2 Firme
		3 Suave
	Ventre	0 Firme
		1 Suave
		2 Estallido de vientre
	Olor	0 Fresco, algas marinas/metálico
1 Neutral		
2 A humedad/Mohoso/ácido		
3 Carne pasada/rancia		
Ojos	Claridad	0 Claros
		1 Opacos
	Forma	0 Normal
		1 Planos
	2 Hundidos	
Branquias	Color	0 Rojo característico
		1 Pálidas, descoloridas
	Olor	0 Fresco, algas marinas/metálico
		1 Neutral
		2 Dulce/ligeramente rancio
	3 Hedor agrio/pasado, rancio	

La deficiencia de estos métodos es la que se debe contar con jueces entrenados para poder dictaminar el buen estado de los pescados, además que es una prueba subjetiva cuya respuesta depende de la persona que la aplica, esto por diferentes criterios de apreciación.

Determinación de bases volátiles

El olor es una de los parámetros más importantes en la evaluación del pescado, se puede dividir en tres categorías dependiendo del tipo compuestos volátiles que se generen, la primera se refiere al pescado fresco, la segunda al pescado en un estado moderado de descomposición y la tercera cuando ya se encuentra en un estado avanzado de descomposición. En la tabla 4, se observa cada fase del pescado y los componentes químicos que le proporcionan el olor característico a cada una de ellas.

Tabla 4. Componentes del olor en diversas fases.



Varios compuestos volátiles han sido sugeridos como indicadores del decremento en la frescura. Métodos clásicos de determinación de bases volátiles totales (BVT) y trimetilamina (TMA) han sido utilizados para la determinación del grado de frescura en la industria. [16]

El análisis de compuestos volátiles involucra la recolección y concentración de éstos, seguidos de una separación con cromatografía para su identificación y cuantificación de los compuestos separados.

La evaluación rápida de los compuestos volátiles en los alimentos utiliza un arreglo de sensores de gas, conocidos como narices electrónicas. [17]

Narices electrónicas

La nariz electrónica fue desarrollada en el Instituto de Tecnología de California, funciona mediante un arreglo de sensores químicos los cuales están conformados de polímeros saturados con partículas conductoras, cuando el sensor entra en contacto con el vapor, el polímero se expande cambiando la resistencia, este cambio es transmitido hacia una computadora la cual identifica el patrón de señales dando una respuesta puede determinar la calidad, cantidad y tipo de olor que se analizó.

Para el caso del pescado, lo que se busca es identificar uno o más de los compuestos de alguna de las 3 clases en las que se divide el olor y grado de frescura, en base a la concentración de estos compuestos se emite un dictamen.

El uso de estas técnicas requiere la estandarización de los métodos así como la validación de los sensores de gas utilizados en la detección de compuestos característicos que sean indicativos del estado de frescura del pescado. Lo que ocasiona que sean una determinación poco práctica y no genera un criterio uniforme en cuanto a resultados se refiere.

Métodos físicos

Conductividad eléctrica

La medición de la conductividad eléctrica en el músculo de pescado es una técnica que se encuentra en desarrollo. En este momento se cuentan con tres aparatos diseñados para esta función: el Torrimetro, el Fishtester VI y el RT-Freshness Grader, que han demostrado una buena correlación entre su lectura y el valor sensorial de la frescura del producto, además de que para su utilización no es necesaria la capacitación extensiva del personal; así como su facilidad para uso en el campo. La limitante de este método es que no puede ser utilizado cuando el pescado ha sido almacenado en agua de mar enfriado o pescados que hallan sido previamente salados, debido a que la lectura obtenida será errónea. [18-20]

Métodos microbiológicos

La actividad de microorganismos es un factor determinante en la vida de anaquel. En este método una estimación de la cuenta total se utiliza como un índice aceptable para la estandarización especificación y normatividad. No obstante puede ocurrir que un pescado el cual apenas ha sido capturado tiene una cuenta de 10^2 - 10^6 ufc/g y ésta puede aumentar dependiendo de los diferentes medios de conservación.

Recientemente la bacteria *Shewanella putrefaciens*, que produce sulfuro de hidrógeno, fue identificada como un organismo responsable de la descomposición, la cual puede ser cuantificada en un medio de agar-hierro.

Los métodos microbiólogos para la evaluación de la frescura del pescado van estrictamente relacionados con modelos matemáticos ya que gracias a ellos se puede predecir el crecimiento y por consiguiente el estado probable en que se encuentre el producto.

Identificación de histamina y diaminas biogénicas

Cromatografía de capa fina

El método de cromatografía de capa fina, (CCF), desarrollado por Spinelli y colaboradores en 1974, detecta los niveles bajos de espermina, espermidina, putrecina, cadaverina e histamina. El método usa derivados fluorescentes de amina formados con cloruro de dansilo, ((5-dimetilamino)-1-naftaleno sulfón cloro). [21] Este método es barato pero poco fiable, debido a la propia sensibilidad de la técnica, además no cuantifica y los niveles de detección son inciertos.

Cromatografía gas-líquido

Staruszkiewicz y Bond en 1981 desarrollaron un procedimiento de CG para la determinación cuantitativa de las diaminas putrecina y cadaverina usando derivados perfluoropropionil. La extracción de las aminas de alimentos fue hecha con metanol, empleado como estándar interno hexanodiamina. El residuo seco de las sales de clorhidrato de las aminas fue preparado y derivado con perfluoropropionato anhidro por calentamiento a 50° C durante 30 minutos. Utilizando una columna de alúmina para separar la mezcla de reacción y los derivados fueron eluidos con 30% de solución de acetato de etilo en tolueno. La separación de este procedimiento de CG, fue hecha en la columna a 180°C, usando este procedimiento, pudo ser cuantificado menos de 1 mg de diaminas/g de muestra; además se utilizó un detector de captura de electrones. [22]

Yamamoto y su grupo, desarrollaron un método cuantitativo para la determinación de putrecina, cadaverina, espermidina y espermina en alimentos. Lo consiguieron emulsificando la muestra a través de una columna con resinas de intercambio iónico y ésta es convertida en derivados carbonilos por medio de la reacción con etil clorofornato en medio acuoso antes de aplicar la cromatografía usando un detector de ionización de flama. Usaron 1,8 diamino octano como estándar interno y realizaron la separación y la determinación de los derivados en una columna Uniport HP (0.5m) bajo condiciones de temperatura programada. [23]

Cromatografía líquida de alta presión

La detección de la histamina separada por cromatografía líquida tiene problemas dado que la histamina absorbe pobremente la luz ultravioleta y flourece escasamente, la histamina no es una molécula conveniente para la detección electroquímica. Se han hecho variantes donde la introducción en una post-columna en que se hace reaccionar con *o*-ftaldehido para formar un derivado fluorescente que aumente la sensibilidad y especificidad. El limite de detección es de 1.5 ng con una respuesta lineal en un intervalo de 7 y 750 ng. [24]

La variante de cromatografía líquida propuesta por Veciana-Nogues, en 1995, es descrita para la determinación de aminas biogénicas en pescado y productos del mismo. La histamina, tiramina, serotonina, β -feniletilenamina, triptamina, putrecina, cadaverina, agmatina, espermina, y espermidina pueden ser determinadas en menos de 60 minutos. La preparación de la muestra implica sólo 2 extracciones con HClO₄ al 0.6N y son filtrados a través de una membrana de 0.45 μ m de tamaño de poro. La ausencia de interferencias

por aminas volátiles, aminoácidos y dipéptidos está comprobada. Los estudios de fiabilidad fueron satisfactorios, el método es lineal para cada amina en un intervalo de 0.25 y 8 mg/L y una precisión (coeficiente de variación) de entre 0.7-0.95. [25]

En el método propuesto por Gow-Chi Yen y Chi-Luan Hsieh en 1991, tiene como objetivo, la determinación simultánea de putrecina, cadaverina, triptamina, 2-feniletilamina, espermina, espermina, histamina, tiramina y agmatina. Las aminas son derivadas con cloruro de benzoilo y separadas con una columna RP-18, usando un gradiente de elusión con una mezcla de agua-metanol durante 10 minutos. El contenido de aminas en pescado enlatado fueron detectadas con este método, detectando 9 aminas en bajos niveles.

Por otro lado, Sato y colaboradores en 1995, realizaron una nueva vía para la derivación pre-columna y análisis de histamina por medio de HPLC, el método está basado en la formación del derivado diazo acoplado con la histamina. Este método de derivación es simple, eficiente, sensible y específico para la histamina y otros compuestos como imidazol. Por medio de HPLC, se permite rapidez y la separación de la fase unida con detección de luz visible de ese compuesto en 20 minutos con una sensibilidad de 10 pmoles. Este método fue utilizado para confirmar la cantidad de histamina producida en el músculo del pescado ***Scomber japonicus***.

Por su parte Hwang Deng-Fwu realizó un trabajo similar al de Gow-Chi Yen y Chi-Luan Hsieh en 1997, encontrando condiciones óptimas para la bencilación de las aminas con cloruro de benzoilo a 30°C por 40 minutos para eliminar la influencia de la interferencia de picos durante el análisis. La curva de calibración para cada amina es lineal en un intervalo de 0.002µg - 4 µg. La amina es recuperada de la carne de pescado por extracción con ácido tricloroacético al 6% con HClO₄ 1 M. Este estudio se hizo en un filete de marlín frito que contuvo 84.1 mg/100g de histamina.

Evaluación enzimática

Lerke y colaboradores, realizaron un método rápido para detectar histamina en el pescado. El procedimiento cualitativo tiene dos pasos secuenciales, en el primero, la enzima diamina oxidasa cataliza la desaparición de histamina con la producción de peróxido de hidrógeno. La detección del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo por la formación de cristal violeta a partir de bases leuco con la presencia de peroxidasa a 596 nm; este método se puede utilizar en pescado crudo o pescado procesado. [26]

Posteriormente, una modificación del método de Lerke por Rodríguez-Jerez y su grupo resultó un método rápido para determinar la histamina, consiste en la determinación de la longitud de onda óptima, esta depende del tiempo de incubación a una temperatura constante de 37 °C. Resultando que la longitud de onda óptima fue de 580 nm, con una incubación de 15 minutos, con esas condiciones la linealidad que se observa entre 1 y 25 ppm de histamina.

Entre otros métodos que utilizan para la determinación de aminas, como la diamina oxidasa se encuentran los realizados por un lado Male y por otro Tombelli, S, quién realizó un método amperométrico, desarrollando un sensor de histamina, putrecina y cadaverina. La diamina oxidasa es extraída del riñón de cerdo, purificada, homogenizada e inmovilizada dentro de una membrana porosa de nylon. La membrana enzimática fue sujeta con un electrodo amperométrico para la determinación de la concentración de las aminas acumuladas en filetes de pescado durante el almacenamiento. Para la detección del peróxido de hidrógeno liberado, el electrodo de platino debe estar listo a +400 mV vs. Ag/AgCl para impedir la contaminación y eliminar la interferencia electroactiva. El biosensor es lineal arriba de 6 mM y tiene un límite de detección límite de 25 μ M para 3 substratos y con un estado estacionario de 1.5 m, las membranas con las enzimas son estables a 5 °C y pueden ser usadas para 60 ensayos. [27]

ELISA

Este método surgió de la necesidad para desarrollar un medio simple y de alta especificidad para la histamina, qué también pueda ser utilizado en forma rutinaria y con varias muestras. Una prueba inmunológica puede ser conveniente utilizando anticuerpos monoclonados (Mabs) como los utilizados por Serrar y su equipo, los cuales tenían un gran afinidad por la histamina y fueron obtenidos de células inmunológicas de ratas a las que se le fue administrando dosis de 10-100 ng-/100 mL de histamina en conjunto con otras aminas como la cadaverina, putrecina y triamina hasta que ya no presentaron reacciones. [28]

Este método en comparación al análisis con un HPLC resultó ser igual de preciso pero el tiempo de respuesta resultó ser mayor debido al tratamiento de la muestra.

Métodos comerciales de prueba

Existen varios paquetes comerciales para detección de histamina, estos se encuentran concentrados en la Tabla 5. La ventaja de cada uno de ellos en algunos casos es el tiempo en que se emite un resultado, así como su precisión detectar bajos niveles de concentración. Pero sus desventajas son el costo de cada uno de ellos.

Estos métodos comerciales toman como base de identificación la prueba de ELISA y de inmuno-ensayos, las cuales básicamente son la misma técnica pero solo difiere en que ELISA ya es una prueba estandarizada y sigue pasos específicos. Los inmuno-ensayos enzimáticos solo se basan en tener la enzima inmovilizada y permite que reaccione la histamina proveniente del alimento y eso es por lo cual el tiempo en que se proporciona un resultado con este método es de mayor tiempo. (35 min – 1 ½ h).

Tabla 5. Pruebas comerciales existentes avaladas por la AOAC.

Prueba	Técnica Analítica	Aprox. Tiempo total de la prueba	Proveedor
ALERT® para Histamina Sensibilidad: 2.5 ppm	ELISA	35 min.	Neogen Corporation 620 Leshar Pl. US www.neogen.com
Test Kit para histamina Sensibilidad: 0.5 ppm, cuantitativa de 1-500 ppm	inmunoensayo enzimático	1 h	Immunotech 130, av. Delattre de Tassigny FRANCE www.immunotech.fr
EIA para histamina en extracto de pescado, K1-HTM Sensibilidad: 2.5 ppm, cuantitativa 1-50 ppm	inmunoensayo enzimático	90 min.	Immuno-Diagnostic Reagents P.O. Box 2659 www.tiora.net
EIA for Histamine Fishmeal and Bonemeal, K2-HTM Sensibilidad: 5 ppm, cualitativa	inmunoensayo enzimático	35 min.	Immuno-Diagnostic Reagents P.O. Box 2659 www.tiora.net
EIA for Histamine in Raw and Canned fish, K3-HTM Sensibilidad: 5 ppm, cualitativa	inmunoensayo enzimático	35 min.	Immuno-Diagnostic Reagents P.O. Box 2659 www.tiora.net
HistaMeter Sensibilidad: 0-50 ppm, cualitativa	inmunoensayo enzimático	1 h	Biomedix 1105 #F N. Golden Springs Dr. Diamond Bar
HistaQuant Sensibilidad: : 0-500 ppm, cuantitativa	inmunoensayo enzimático	1-1/2 h	Biomedix 1105 #F N. Golden Springs Dr. Diamond Bar
RIDASCREEN® Histamina R1602 Sensibilidad: 2.5 ppm; cualitativa	ELISA	2-5/6h	R-Biopharm, Inc. 7950, www.r- biopharm.com/food/o ther/hista.html
RidaQuick Histamina (R1603- 96 Wells) Sensibilidad: 20 ppm; cuantitativo	ELISA	12 min.	R-Biopharm, Inc. 7950, www.r- biopharm.com/quickhi stamin.pdf
Transia Tube <i>Histamine</i>	ELISA	1 h	Diffchamb AB FO Petersons Gata 32 Sweden www.diffchamb.se
Veratox® para Histamina Sensibilidad: < 2.5 ppm, cuantitativo de 0 a 50 ppm	ELISA	35 min.	Neogen Corporation 620 Leshar Pl. www.neogen.com

Porfirinas

En general, las porfirinas (Fig. 4) son macrociclos naturales constituidos por cuatro unidades de pirrol, se hallan unidas por puentes de metino a través de las posiciones 2 y 5. [29]

Las porfirinas son compuestos altamente coloridos y sus principales bandas de absorción tienen coeficientes de absorción muy grandes siendo la banda de Soret, ubicada alrededor de los 400-500 nm. Siendo esta banda la más característica para la identificación de los compuestos utilizados, ya que no presenta mucha variación y el coeficiente de extinción es muy grande lo que permite la cuantificación de estas sustancias por métodos espectrofotométricos, aún en concentraciones muy pequeñas.

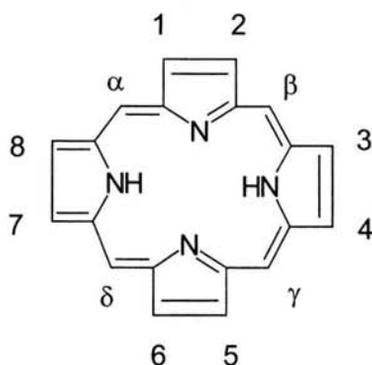


Figura 4. Estructura general de una porfirina.

Las porfirinas que se encuentran en la naturaleza, poseen normalmente cadenas laterales de ácidos carboxílicos. Para estos grupos se ha propuesto una ionización de manera simultánea con los nitrógenos pirrólicos con un aparente incremento en la basicidad de la porfirina. Las cadenas de ácidos carboxílicos comúnmente encontradas en la porfirinas naturales, son los grupos caboximetil y β -carboxietil. A pesar de que no se ha podido determinar directamente la acidez de estos grupos en las porfirinas, algunos cálculos han propuesto que el pK_a para una porfirina monocarboxilada es de 4.8, dicarboxilada \approx 5.6, tetracarboxilada \approx 6.5 y octacarboxilada \approx 7.3. [30]

La reactividad es amplia y variada, pueden formar agregados estables con ellas mismas o con otras moléculas, entre ellas también las que tienen un interés biológico mediante interacciones no covalentes y de coordinación de éstas con el metal central. La figura 5 muestra esta reactividad.

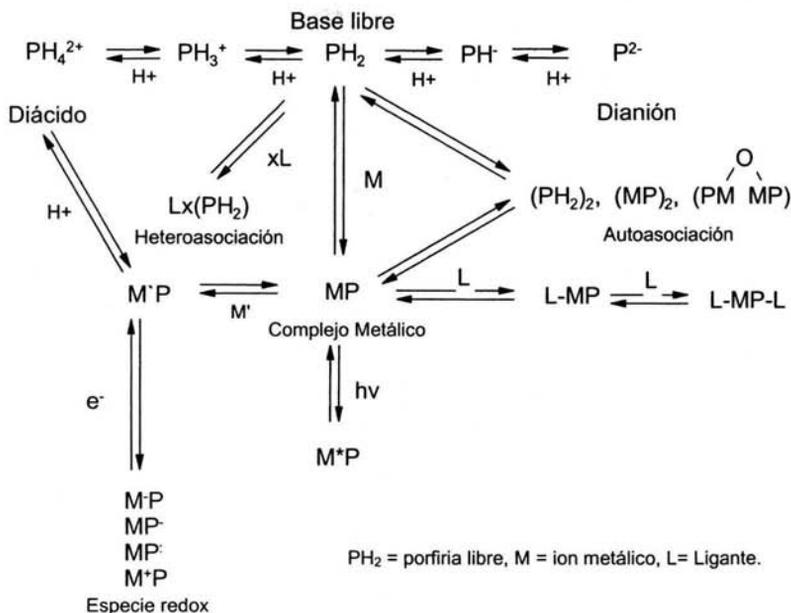


Figura 5. Reactividad de las porfirinas.

Las porfirinas pueden aceptar dos iones hidronio para formar el diácido 2^+ o donar dos protones y convertirse en el anión 2^- . Es de esta manera como las porfirinas forman complejos con iones metálicos generalmente divalentes tales como: Cu^{2+} , Fe^{2+} o Mg^{2+} los cuales son los sitios activos en las biomoléculas, mismas que se coordinan axialmente a los sustratos correspondientes como: H_2O_2 , O_2 , CO , etc.

A partir de los radios de enlace covalente, se puede calcular que un enlace existente entre un átomo de nitrógeno y un átomo de la primera serie de transición debe tener una longitud de aproximadamente 200 pm. El tamaño del "hueco" en el centro del anillo porfirínico es de 7.8 Å el cual es ideal para situar metales de la primera

serie de transición. [31] El sistema porfirínico es demasiado rígido y la distancia de enlace metal-nitrógeno no varía de manera considerable de 193-196 pm en las porfirinas de níquel a 210 pm en las porfirinas de hierro (II) de espín alto. La rigidez del anillo proviene de la deslocalización de los electrones π en los anillos pirrólicos. Sin embargo, si el átomo metálico es demasiado pequeño, como en las metaloporfirinas de níquel, el anillo se encoge para permitir un mayor acercamiento con los átomos de nitrógeno al metal. En el otro caso, si el átomo metálico es demasiado grande, no se puede ajustar dentro del "hueco" y se sitúa por encima del anillo, el cual también adquiere forma de cúpula (domo). [32]

También se ha medido la cinética de formación de estas metaloporfirinas y se ha encontrado un orden de $\text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. [32]

La mayoría de los metales son capaces de formar complejos 1:1, sin embargo, Na^+ , K^+ , y Li^+ forman complejos 2:1 en donde los átomos del metal son incorporados ligeramente por debajo y por encima del plano de la porfirina. Cuando un ion divalente (Co(II) , Ni(II) , Cu(II)) es coordinado da como resultado complejo tetracoordinado sin carga.

Mientras que el Cu(II) y Ni(II) cuando se encuentran formando complejos con la porfirina generalmente tienen una baja afinidad por otros ligandos, los quelatos formados con Mg(II) , Cd(II) y Zn(II) , se encuentran listos para combinarse con uno o más ligandos para formar complejos pentacoordinados con una estructura pirámide de base cuadrada.

Algunas metaloporfirinas (Fe(II), Co(II), Mn(II)) son capaces de formar octaedros distorsionados con dos ligantes axiales. [33]

Las características antes mencionadas de las porfirinas, como el cambio de color por la coordinación axial, la facilidad para coordinar ligantes axiales, etc. las hacen buenos candidatos para ser empleados en determinaciones analíticas visuales.

El anillo de porfirina o modificaciones del mismo son muy comunes en sistemas biológicos y son claves para muchos procesos en seres vivos, tal es el caso de los pigmentos pirrólicos (porfirinas, clorofilas, vitamina B₁₂, pigmentos biliares). Estos constituyen la materia colorida más abundante en los sistemas naturales, algunos de ellos se presentan como complejos metálicos, en los sistemas vivos, por ejemplo el grupo hemo (complejo de hierro (II) de la protoporfirina IX) que es el grupo prostético de la hemoglobina y la mioglobina, se encuentra presente en los citocromos y en las enzimas peroxidasa y catalasa. El microambiente de hierro en la mioglobina y en la hemoglobina es similar al encontrado en el citocromo C. El grupo hemo se encuentra coordinado al átomo de nitrógeno de un grupo histidina en la cadena proteínica. En un trabajo realizado por Chang y Traylor mostraron la importancia del ligante imidazol, en una serie de experimentos con una mioglobina sintética; la presencia del grupo imidazol que es un enlazante estabiliza hasta cierto punto al grupo hemo. [34]

Otros receptores moleculares.

El interés por el estudio de los sistemas huésped-anfitrión no se limita solo a las porfirinas y metaloporfirinas, si no que también se han hecho estudios de otras moléculas más que pueden funcionar como receptores solubles en agua. En base a esto cabe destacar el trabajo desarrollado por Nelen M.I y Eliseev, A.V. Sus estudios se basaron en el reconocimiento molecular de metilguanidina, tetrametilamonio y sales de amonio en disolventes próticos (D_2O , metanol y etanol) con 2 receptores dianiónicos base variando entre ellos la configuración cis (c) y trans (t) Fig 6, teniendo en total 6 derivados con las siguientes configuraciones: 1tt,1ct,1cc,2tt,2ct,2cc. Los resultados a que llegaron fue que entre más distancia había entre los grupos carboxilato en el receptor, la estabilidad se reduce, el complejo que se forma es 1:1. [35]

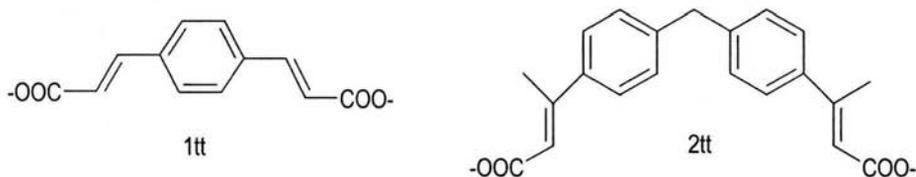


Figura 6. Estructuras rígidas de los receptores dianiónicos, configuración trans-trans.

Lehn y Vierling hicieron un estudio comparativo de los complejos $[18]-N_3O_3$ para determinar la selectividad de esta molécula receptora para cationes amonio primarios encontrando una alta selectividad y gran afinidad. Ésta se debe a la presencia de 3 sitios simétricos con nitrógeno. El grupo $R-NH_3^+$ se une dentro de la cavidad circular del

macrociclo vía 3 enlaces de hidrógeno $^+NH\dots H$ completado con 6 interacciones electrostáticas entre los sitios de oxígeno y los hidrógenos de $-NH_3^+$ representado en la figura 7. [36]

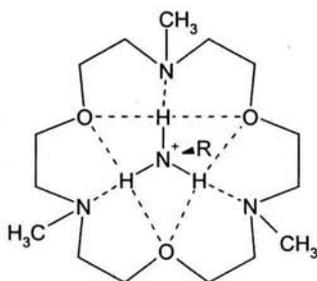


Figura 7. Éter corona [18] - N_3O_3 .

Hossain y Schneider diseñaron un receptor para reconocer selectivamente a péptidos en agua, esta molécula contiene un éter corona terminal y unidades amonio, es preparado a partir de 4-formilbenzo-18-corona-6 con 4-(dimetilamino)-anilina. Este compuesto es soluble en agua y en menor grado en una mezcla agua-metanol.

En un programa de modelaje molecular usando la mínima energía se estableció que la unión entre el anfitrión y el tripéptido (huésped) está libre de esfuerzo entre la corona y el $R\dots^+NH_3$. Mediante RMN determinaron que el modelo de ajuste más adecuado era una unión 1:1, determinando que las constantes de unión en medio acuoso eran del orden de $100 M^{-1}$, mientras que en metanol las constantes son mayores, alrededor de $10^4 M^{-1}$, demostrando que esta molécula tiene mayor selectividad en un medio menos polar. [37]

Entre otros trabajos, uno de los más importante es el desarrollado por Inoue, M.B, Machi, L y Quintus,F. donde coordinan la histamina e imidazoles con compuestos de coordinación con macrociclos con Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} que fueron estudiados por ^1H -RMN y espectroscopía electrónica, la molécula ligante estudiada fue la 2,9 dioxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7-ciclododecano diácido acético, $(12\text{edtaen})\text{H}_2$ y 2,9 dioxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7-ciclotridecano diácido acético $(13\text{edtapn})\text{H}_2$. La molécula de histamina o imidazol sustituye a la molécula de agua en $[\text{M}(12\text{edtaen})\text{H}_2(\text{H}_2\text{O})]^0$ y $[\text{M}(13\text{edtapn})\text{H}_2(\text{H}_2\text{O})]^0$. [38]

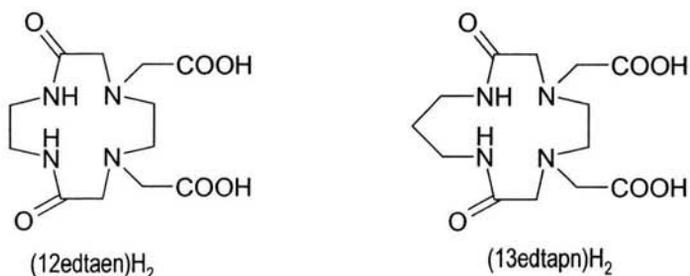


Figura 8. Moléculas receptoras del trabajo de Inoue y colaboradores.

Las constantes de formación de $[\text{ZnL}(\text{hsH}^+)]^+$ (hsH^+ : ión histaminio) son del mismo orden de magnitud como el correspondiente $[\text{CdL}(\text{hsH}^+)]^+$ sin embargo la donación de electrón de hsH^+ en el complejo de Zn^{2+} es significativamente menor que el complejo de Cd^{2+} . El quelato de Cu^{2+} con el macrociclo de 13 miembros forma $[\text{Cu}(13\text{edtapnH}_2)]^{2-}$ en el cual los átomos de nitrógeno desprotonados de la amida se coordinan. En la reacción entre quelato metálico y hsH^+ , uno de los sitios vacío de coordinación del quelato de Cu^{2+} es ocupado por la molécula de hsH^+ y se forma $[\text{Cu}(13\text{edtapnH}_2)(\text{hsH}^+)]^-$ Como la

reacción de complejación no ocurre con imidazol, la complejación de hsH^+ ocurre con dos sitios de unión de cada componente.

Inoue, M.B., Quintus F, y Navarro, R.E. realizaron un trabajo similar al anterior, donde hacen un estudio espectrofotométrico y potenciométrico de la reacción de histidina con un macrociclo de base amida quelado con Cu^{2+} . El macrociclo es el 2,9 dioxo-1,4,7,10-tetraaza-4,7-ciclotridecano ácido acético (abreviado como LH_2), forma con la histidina aductos en el cual la molécula de histidina ocupa un sitio secundario de coordinación del macrociclo- Cu^{2+} .

La formación de ese compuesto se pone de manifiesto por el cambio de la banda d-d del macrociclo en presencia de histidina a diferentes valores de pH. La composición de las especies fue determinada por titulaciones potenciométricas y la formación de constantes se obtuvo como: $\log[\text{CuL}(\text{hdH})]/[\text{CuL}][\text{hdH}] = 2.8 (0.2)$ y $\log[\text{Cu}(\text{LH}_2)(\text{hdH})]/[\text{Cu}(\text{LH}_2)][\text{hdH}] = 2.6(0.4)$ (hd =ion histidinato (-1); $\text{LH}_2 = \text{L}$ con los átomos del nitrógeno de la amida desprotonados). Estos aductos se forman por la coordinación del átomo de nitrógeno del anillo imidazol a el ion del metal central. [39]

Materazzi, et al., realizaron un estudio de varios complejos de metales de transición de la forma MeHm_x , (donde Hm = histamina; $x = 1,2$) y $\text{MeHm}_x(\text{NO}_3)_2$ ($x = 2,4$) los metales utilizados fueron los siguientes: Co^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} . Por medio de análisis de TG-FTIR acoplado, los pasos intermedios y los productos de la descomposición fueron analizados. Los resultados de análisis de ESCA para todos los compuestos de Ni^{2+} indicaba radios atómicos correctos entre nitrógenos orgánicos e inorgánicos y pudieron ser utilizados para determinar la forma de coordinación del metal. [40]

Otro receptor estudiado es el propuesto por Chen, H., Ogo, S., y Fish R.H., en el cual se aplican las interacciones no covalentes para el reconocimiento molecular de aminoácidos aromáticos y alifáticos, ácidos carboxílicos aromáticos y ácidos carboxílicos alifáticos. En medio acuoso, ocupando como receptor a el (η^5 -Pentametilciclopentadienil)rodio-Nucleobase. Encontrando que este receptor efectivamente reconoce y se une a gran número de los huéspedes estudiados por procesos no covalentes, pero esta unión está influida por otros parámetros como son el impedimento estérico, efectos conformacionales y efectos de solvatación del agua. [41]

Por otro lado el trabajo realizado por Inouye y colaboradores, desarrollaron una nueva clase de ciclofano, el pirenopano, que es soluble en agua, tiene la capacidad de acompararse y formar una cavidad neutral. Esta área hidrofóbica se construye por dos anillos aromáticos alineados en forma paralela; la cavidad tiene las siguientes medidas: profundidad, 0.95 nm; anchura, 1.31 nm y longitud de 0.46 nm. La experimentación entre este receptor y compuestos aromáticos, catiónicos y aniónicos, por medio de espectros de UV determinaron que

había cierta afinidad entre ellos, concluyendo que estas interacciones eran gobernadas por interacciones no covalentes. [42]

Otro de los sistemas utilizados en el reconocimiento molecular y que sin lugar a dudas ha sido de los más estudiados son las ciclodextrinas. Tabushi en 1977, describe la habilidad de los complejos metálicos de 6-deoxi-6-dietilentriamina- β -ciclodextrina con Zn^{2+} como receptor. El Zn^{2+} se une con algunos aniones carboxilato con altas constantes de unión y gran selectividad con respecto a la 6-deoxi-6-dietilentriamina- β -ciclodextrina sin metal. [43]

Planteamiento del problema

El consumo de alimentos en donde se encuentra presente la histamina, sin importar su concentración, es un problema de salud pública, ya que esto es un indicador del mal manejo de los alimentos, en especial del pescado.

La necesidad de desarrollar una técnica rápida y eficiente en la detección de este compuesto ha sido el objetivo en los últimos años.

Las técnicas que se encuentran actualmente requieren la utilización de equipos altamente especializados, con un costo elevado, son poco prácticos, ya que en algunos casos requieren instalaciones adecuadas. El tratamiento al cual es sometida la muestra es muy drástico ocasionando en algunos casos la aparición de falsos positivos en los resultados. El tiempo en que se obtiene el resultado no es inmediato y éste es un factor muy importante en la industria alimenticia ya que de ello depende la aplicación práctica del sistema.

La determinación de histamina a bajas concentraciones requiere de métodos analíticos muy específicos mediante la utilización de material costoso, sofisticado e inaccesible para todas las personas que se encuentran estrechamente relacionadas con la industria pesquera directa o indirectamente, además de que no proporcionan un dictamen inmediato. Generalmente es necesaria la capacitación del personal para operar o emitir un juicio correcto.

Como se ha demostrado existen moléculas que presentan una afinidad por la histamina, como es el caso de las porfirinas y esta se ve aumentada por la adición de un ion metálico dando lugar a la formación de metaloporfirinas, las cuales pueden ser una buena alternativa para la identificación para la histamina, debido a las propiedades de color que estas presentan cuando se forma el complejo histamina-metaloporfirina.

Objetivo

Objetivo general

Desarrollar un sistema de detección de aminas provenientes de la descomposición de alimentos (en particular pescado) sobre la base de una matriz de diferentes porfirinas metálicas inmovilizadas en diferentes sustratos como la sílica, celulosa, etc. Ésto con la finalidad de tener un método de detección práctico, portátil, barato y fácil de usar.

Objetivos particulares

- Sintetizar los compuestos de coordinación resultado de la reacción de las siguientes porfirinas: 5,10,15,20-Tetraquis(4-trimetilamoniofenil)porfirintetra(p-toluenesulfonato) (**TTMAPP**) y 4,4',4'',4'''-(21H, 23H-Porfirina-5,10,15,20 tetraly)trakis (ácido benzoico) (**TK**) con los siguientes iones metálicos: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ru^{2+} y Cr^{2+} .
- Inmovilizar los compuestos preparados en un sustrato sólido.
- Determinar los cambios de color de las porfirinas metálicas inmovilizadas por la interacción con la histamina.

Hipótesis

La interacción de las diferentes aminas que se generan en la descomposición de alimentos, producirá una interacción de diferente magnitud para cada porfirina metálica inmovilizada resultando en un patrón característico de cambios de color para la determinación de estos compuestos en una concentración límite conocida. Lo que resultará en la obtención de un sensor útil para determinar la frescura de algunos alimentos.

Metodología experimental

Reactivos

Las porfirinas sin centro metálico que se utilizaron son: 5,10,15,20-Tetraquiis(4-trimetilamoniofenil)porfirintetra(p-toluenesulfonato) **TTMAPP** (figura 9) y 4,4',4'',4'''-(21H,23H-Porfirina-5,10,15,20 tetraly) trakis (ácido benzoico) **TK** (figura 10) fueron obtenidas comercialmente de *Aldrich* y se utilizaron sin purificación posterior.

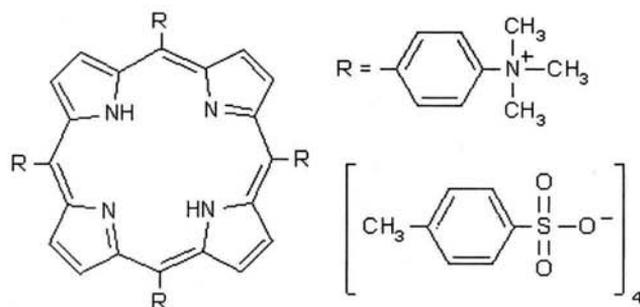


Figura 9. Estructura de TTMAPP.

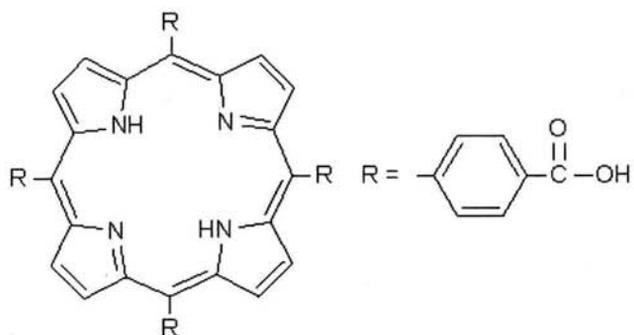


Figura 10 Estructura de TK.

La histamina (figura 11) se obtuvo comercialmente de *Aldrich* en forma de clorhidrato y se utilizó sin purificación posterior.

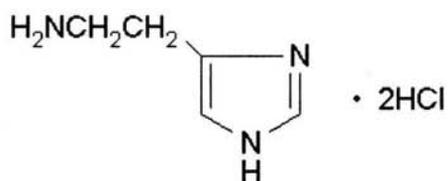


Figura 11 Estructura de histamina.

Las sales de CuCl_2 (*Baker*), ZnCl_2 (*Baker*), CoCl_2 (*Baker*), RuCl_2 (*Baker*), NiCl_2 (*Baker*), CrCl_2 (*Baker*), Tris (*Aldrich*) se obtuvieron comercialmente, cuyo grado es RA, utilizándose sin purificación posteriormente.

Todas las sustancias fueron disueltas en agua nanopura purificada con el equipo *Milli-Q Water Reagent System*.

Fijación de pH

En todas las disoluciones estudiadas se ajustaron a un valor de 9 con una disolución de NaOH 0.1M. El pH se determinó con un pH-metro Orion modelo 710-A con una precisión de ± 0.005 unidades de pH y electrodos de vidrio combinado y semimicro de la marca ROSS® .

Espectroscopía de absorción electrónica en la región UV – visible

Se utilizó un espectrofotómetro Ocean optics, modelo PC2000, con una ventana espectral de 200 nm a 850 nm y una resolución de 0.36 nm y celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Soportes de fijación

Se utilizan placas de Silica gel con base de aluminio y base de vidrio de la marca Merck, papel filtro de la marca Whatman del no. 2 con un diámetro de poro de 0.3 mm y en secciones de 1 x 5 cm y tela 100% algodón en cuadros de 1 x 3 cm.

Síntesis de porfirinas metálicas

Como primer paso se sintetizaron las porfirinas metálicas. Las reacciones se llevaron a cabo en medio acuoso a un pH adecuado para cada porfirina y cada metal. Se emplearon las siguientes porfirinas: 5,10,15,20-Tetraquis(4-trimetilamoniofenil)porfirintetra(p-toluenesulfonato) (**TTMAPP**) y 4,4',4'',4'''-(21H, 23H-Porfirina-5,10,15,20 tetralo) traquis (ácido benzoico) (**TK**) y los metales: Cu^{2+} , Co^{2+} , Ru^{2+} , Ni^{2+} y Cr^{2+} . Estas combinaciones generaron un total de 10 porfirinas metálicas.

La forma general de síntesis consistió en pesar 0.05 g de cada porfirina y la cantidad estequiométrica necesaria del cloruro del metal para tener una proporción de 1:1 molar. Como disolvente se utilizaron 50 mL de agua destilada ajustando el valor del pH hasta lograr la solubilización de la mezcla, este pH generalmente fue mayor a 9 para asegurar la desprotonación de los nitrógenos pirrólicos del macrociclo y la fácil coordinación.

La reacción se llevó a cabo durante 3 días, ya que las cinéticas de metalación de estos macrociclos son lentas, la tabla 6 especifica las cantidades que se utilizaron de cada cloruro para llevar a cabo estas reacciones.

Tabla 6. Cantidades utilizadas para cada reacción.

Porfirina	Metal	Cantidad (g)	Porfirina	Metal	Cantidad (g)
TTMAPP	CuCl ₂	0.008	TK	CuCl ₂	0.008
TTMAPP	CoCl ₂	0.009	TK	CoCl ₂	0.0142
TTMAPP	RuCl ₂	0.008	TK	RuCl ₂	0.0124
TTMAPP	NiCl ₂	0.0095	TK	NiCl ₂	0.0142
TTMAPP	CrCl ₂	0.0106	TK	CrCl ₂	0.0159

En las figuras 12 y 13 se presentan las reacciones realizadas:

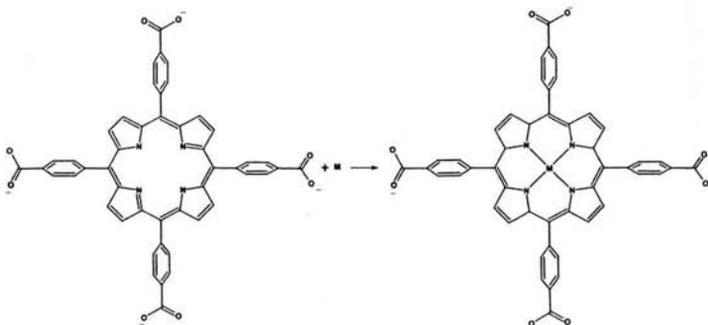


Figura 12. Esquema de reacción de TK con metal donde, M= Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Ru²⁺, Cr²⁺.

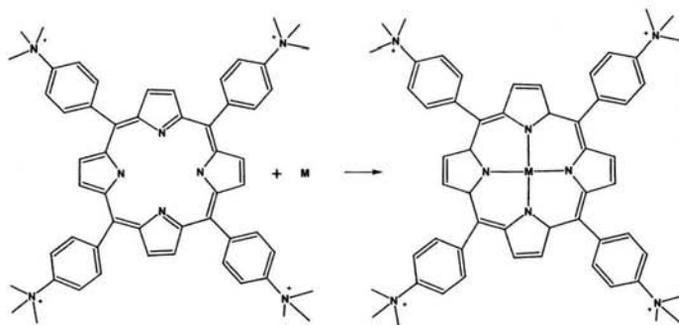


Figura 13. Esquema de reacción de TTMAPP con metal, donde M = Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Ru²⁺, Cr²⁺.

Se obtiene el espectro UV-vis para cada una de las disoluciones esto con el objetivo de garantizar la formación de la metaloporfirina observando la presencia de la banda de Soret.

Para realizar estas pruebas, a una disolución con una muy baja concentración de la metaloporfirina se le adicionó una gota de una disolución de histamina concentrada para que de esta forma no existiera un efecto importante de dilución y con esto conseguir que la concentración de porfirina al final sea prácticamente la misma con respecto al inicio.

La concentración de las metaloporfirinas se realizó mediante evaporación con agitación moderada y a temperatura de 20°C hasta obtener la mitad del volumen inicial. Se intentaron otros métodos de aislamiento como lo fue la liofilización sin presentar resultados favorables.

El pH se encuentra estrechamente ligado con la formación de las metaloporfirinas ya que a pH inferiores a 9 la porfirina no se encuentra completamente protonada por lo que el sitio de interacción no es el propicio para la unión del metal en la porfirina debido a la presencia de protones que impiden la interacción, a un valor de pH superior a 9 el sitio se encuentra libre de protones por lo que la interacción es favorecida por cualquiera de los planos de la molécula.

Matrices de porfirinas inmovilizadas

Una vez aisladas cada una de las metaloporfirinas se propusieron diversas matrices de fijación (sílica gel con soporte de aluminio, sílica gel con soporte de vidrio, papel filtro y tela de algodón) y se hicieron diversas pruebas para tratar de fijar la porfirina al soporte sólido.

La fijación se realizó aplicando gota a gota de la disolución del complejo de la metaloporfirina con un capilar estirado a la llama, para que de esta forma tener un tamaño de gota pequeño. La técnica de aplicación se basó en colocar una gota de la muestra en la matriz elegida y esperar a que ésta se seque cuidando de que no se expandiera generando una mancha de gran tamaño.

Una vez seca, las muestras en la matriz se colocaron en un horno a una temperatura de 100 °C y a una presión de 35 mmHg. durante 48 hr. Con la finalidad de evaporar toda el agua presente en la placa y así facilitar la interacción de la metaloporfirina con la matriz.

Para la fijación en papel y en tela fue utilizada la misma técnica de aplicación pero sin ser sometidas a tratamiento térmico debido a que la fijación fue inmediata.

Se preparó una disolución madre de histamina 0.1M mediante el uso de 1.15 g de histamina en 10 mL de agua destilada y una ligera agitación hasta lograr la solubilización total. A partir de esta disolución madre se tomó una alícuota de 1 mL para preparar una disolución con una concentración $1 \times 10^{-2} \text{M}$ y así sucesivamente hasta obtener una concentración de $1 \times 10^{-6} \text{M}$.

Cuando la matriz elegida se encontró seca se realizaron las pruebas de elusión, las cuales consistieron en aplicar la disolución de histamina a la placa de cada uno de los soportes, observando que no se presentara un corrimiento de la mancha original o elusión.

El cambio de color, eso simplemente consistió en agregar una gota de histamina a la placa y así los cambios físicos fueron observados (variación en color).

Análisis de resultados

Para la formación de las metaloporfirinas fue necesario tener un pH de 9 ya que a este valor se logró la solubilización de las porfirinas y el metal, este valor se aplicó para todas las disoluciones.

Al momento de ajustar el pH en las disoluciones se comprobó que no es necesario tanto tiempo de agitación y que con unas cuantas horas a una velocidad baja se formó el complejo, lo cual se puede observar en los espectros de las figuras 14 y 15 donde se aprecian la banda de Soret entre los 400 y 500 nm.

Se encontró que en todos los casos el espectro es el esperado para la formación de la metaloporfirina, como se observa en las Figuras 14 y 15.

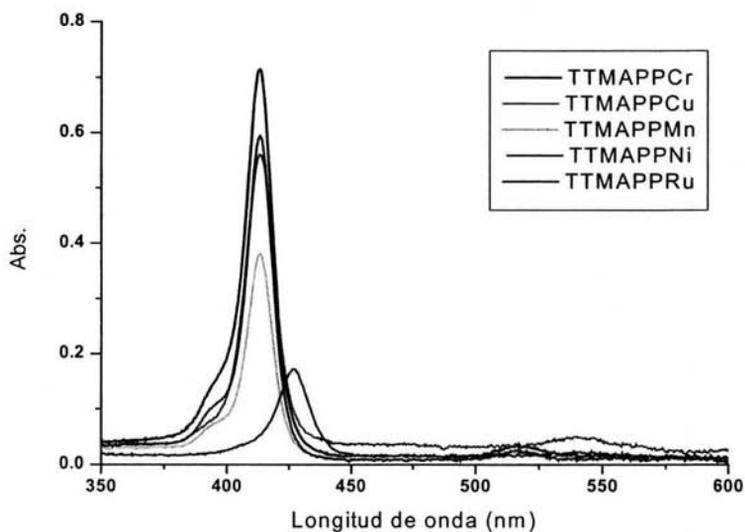


Figura 14. Espectros de comprobación de la metalación para la TTMAPP.

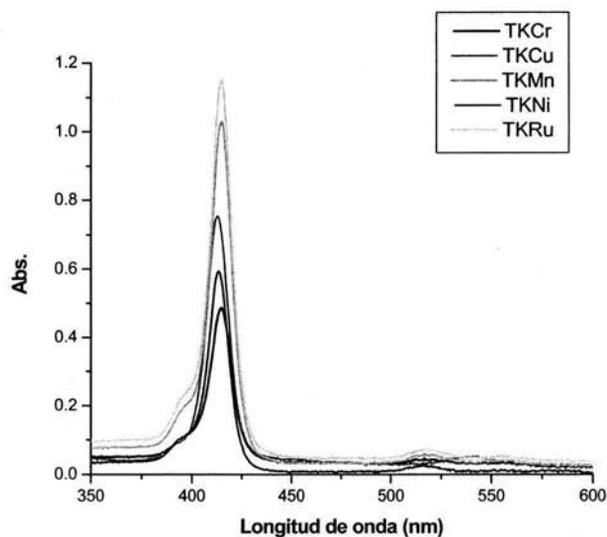


Figura 15. Espectros de comprobación de la metalación para TK.

En estas figuras se muestran el espectros típicos de las porfirinas metálicas donde la banda de Soret se ve ligeramente modificada por el diferente centro metálico, el complejo de rutenio es el que desplaza en mayor medida este máximo de absorción a una longitud de aproximada de 410 -430 nm y a una absorbancia de 0.18.

Interacción Histamina-porfirinas en disolución

Cuando se agrega histamina a una disolución de porfirina ésta se coordina axialmente de acuerdo a la siguiente estructura propuesta (figura 20) en donde la histamina se encuentra coordinada con la metaloporfirina.

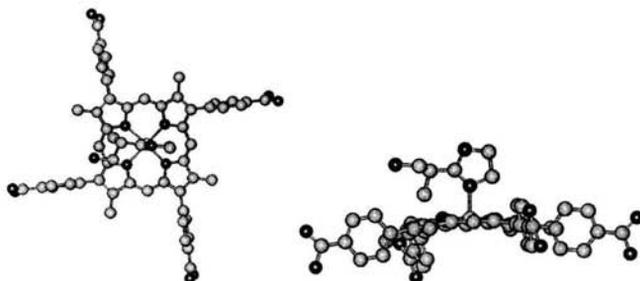


Figura 20. Posible estructura de la coordinación de la histamina.

Esta coordinación provoca un cambio de color, que se puede evidenciar por los cambios espectrales observados en las diferentes porfirinas metálicas cuando se agrega histamina en disolución. En la siguiente figura 21, con el complejo de cromo, se observa que el cambio más notorio en el espectro lo sufre la banda de Soret, donde la coordinación de la histamina provoca un pequeño corrimiento a mayor longitud de onda que va de 410-440 nm y una disminución muy notoria en la absorbancia que es de 0.7 a 0.17

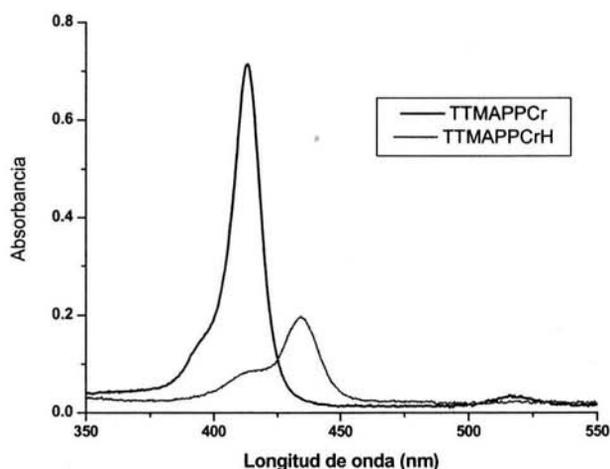


Figura 21. Espectro electrónico de TTMAPP + Cr²⁺ con y sin histamina.

En términos generales la coordinación de la histamina, induce cambios espectrales diferentes dependiendo del centro metálico. Puede cambiar la intensidad o bien el color, como se observa en la figura 21. Los espectros muestran cambios cuando la histamina se coordina. La intensidad de estos cambios y la propia forma del cambio espectral, depende de la naturaleza de la interacción de coordinación axial, es decir, cada molécula diferente que se coordine axialmente a las porfirinas metálicas inducirán patrones diferentes en cada porfirina, por lo que los cambios espectrales ilustrados en las figuras 22 y 23, hace posible la utilización de estos compuestos para el diseño de sensores ópticos.

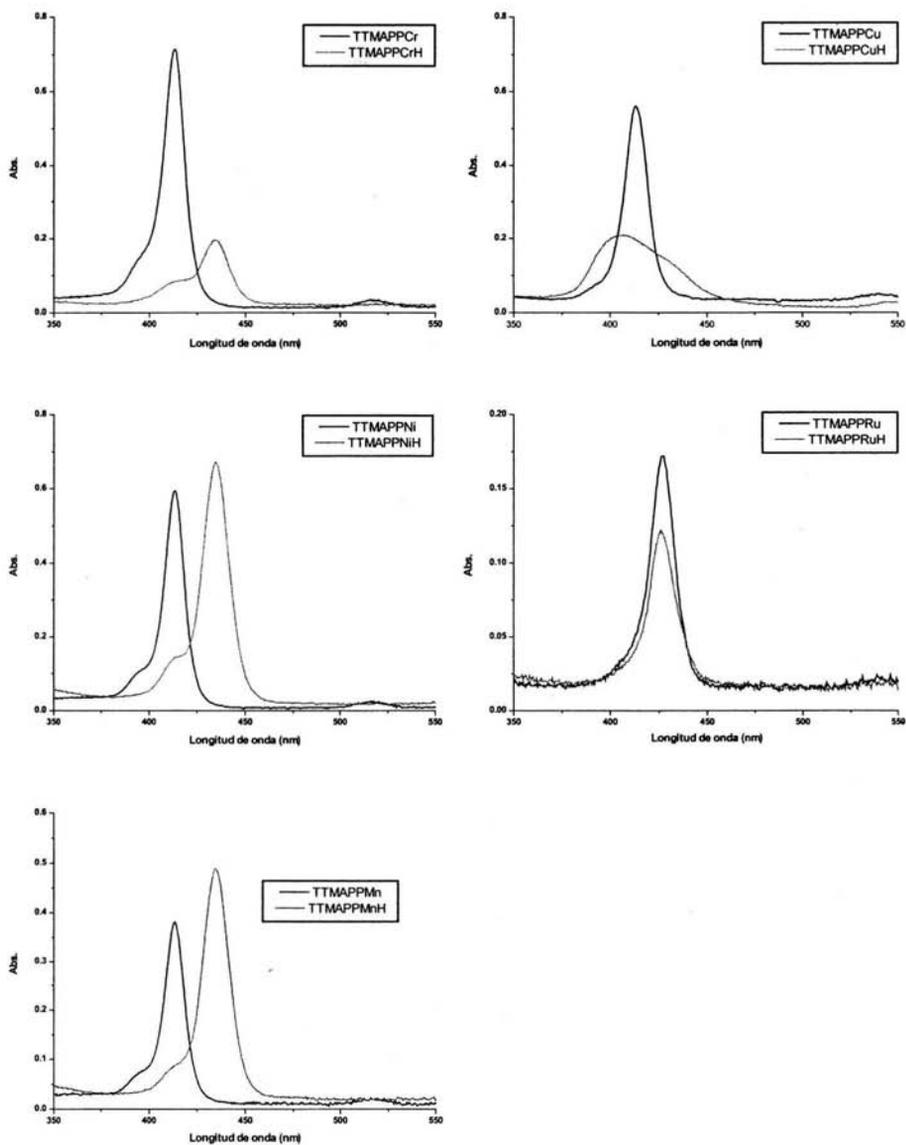


Figura 22. Espectro electrónico de TTMAPP con diferentes metales con y sin histamina.

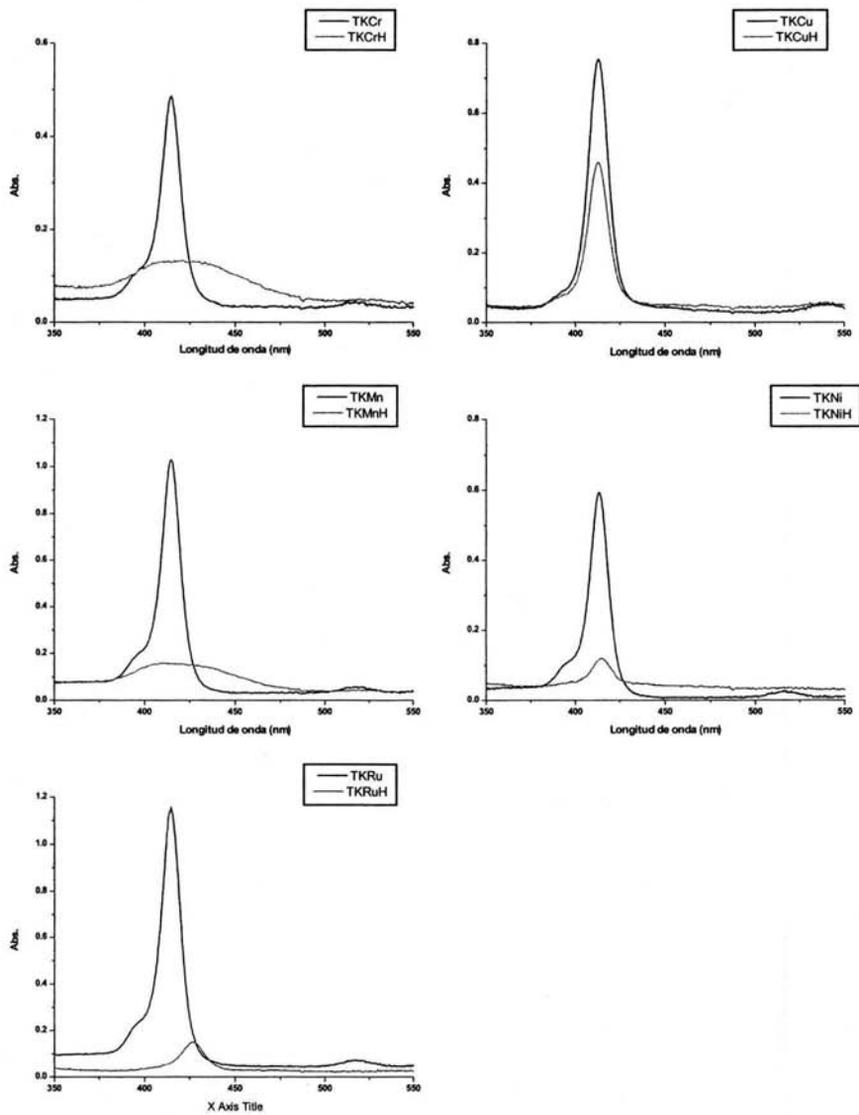


Figura 23. Espectro electrónico de TK con diferentes metales con y sin histamina.

Resultados de la pruebas de Fijación y de elusión

Una vez obtenida la metaloporfirina fue necesario encontrar una matriz de fijación por lo que se probaron diferentes tales como: sílica gel con base de vidrio, base de aluminio, papel filtro y algodón.

Las pruebas de fijación mostraron que las porfirinas se fijan bien en la tela de algodón y en papel después de calentarlas a 100 °C por 8 horas ya que las muestras no corrieron o difuminaron cuando se aplico la disolución de histamina.

En la figura 16. se presenta el acomodo el cual tienen las metaloporfirinas en los diferentes soportes seleccionados.

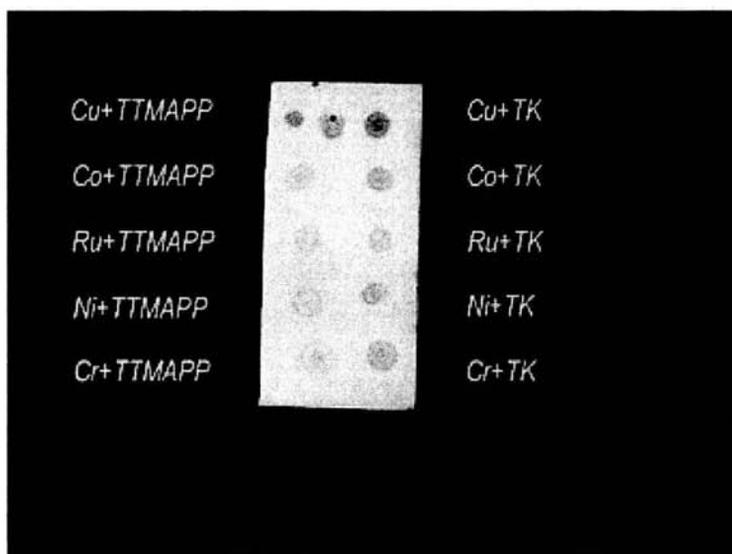


Figura 16. Diagrama del orden de las metaloporfirinas en matriz de papel.

La matriz de sílica fue rechazada debido a que no hubo una interacción fuerte entre la metaloporfirina y la sílica, ya que las manchas se eluyeron al colocar la disolución de histamina. Esto probablemente se debe a que los enlaces que se forman entre el metal y los grupos superficiales $-OH$ de la sílica no es lo suficientemente fuerte.

La utilización de una matriz en donde existen una gran cantidad de grupos de $-OH$ como lo sería en un polisacárido como es el caso del papel y la tela, en donde la presencia es 3 veces mayor por unidad que en la sílica, por que la interacción se dio con mayor facilidad, probablemente debido por encontrarse un mayor número de grupos en una posición adecuada y libres. Los resultados de la matriz de soporte se muestran en la tabla 7 y la prueba de elusión de la matriz de sílica gel con base de aluminio con y sin tratamiento térmico en las figuras 17 y 18, y la figura 20 en donde se muestra la prueba realizada en papel filtro.

Las imágenes mostradas en las figuras 17, 18 y 19, de las pruebas realizadas para observar que el soporte no es el adecuado debido a que no existió una fijación entre la matriz y la metaloporfirina, esto se pudo deber a que la interacción con los grupos $-OH$ de la matriz no se encontraban de forma libre y/o la interacción ácido-base del $-OH$ -porfirina no es lo suficientemente fuerte para generar un aducto.

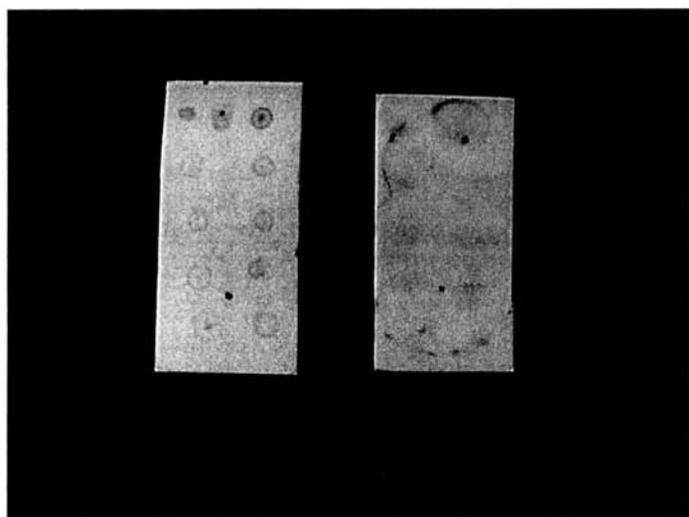


Figura 17. Prueba de elusión de la matriz de sílica gel con base de aluminio sometida a tratamiento térmico.

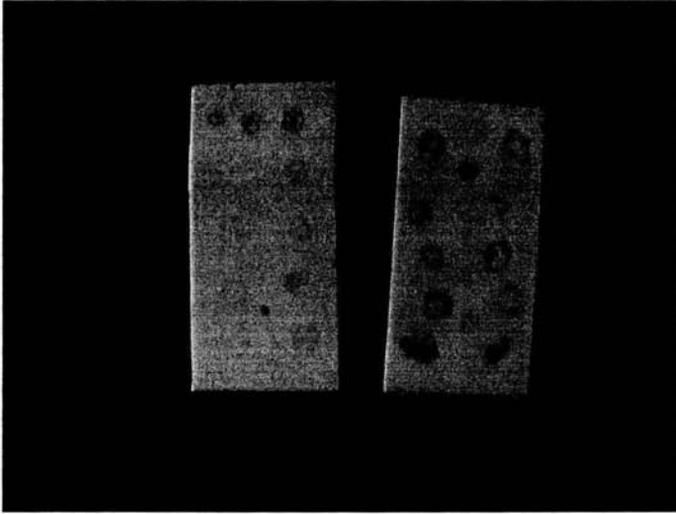


Figura 18. Prueba de elusión de matriz de sílica gel con base de aluminio sin tratamiento térmico.

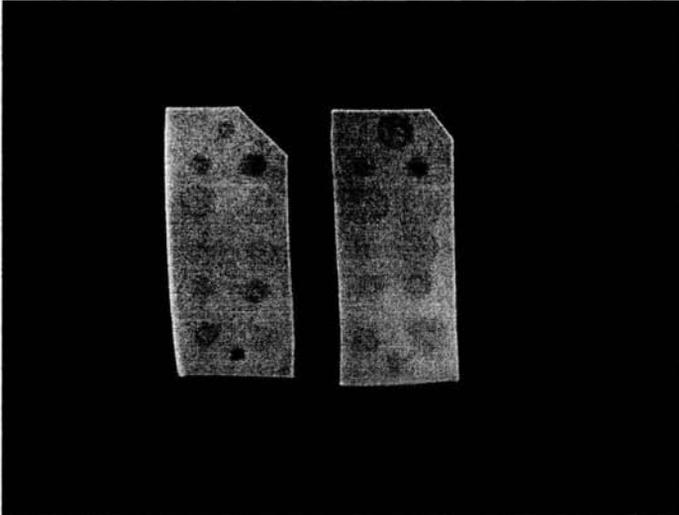


Figura 19. Prueba de elusión de matriz de papel filtro Whatman.

Tabla 7. Resultados de elusión.

Matriz de soporte	Elusión	
	Si	No
Sílica gel con soporte de aluminio con tratamiento térmico	X	
Sílica gel con soporte de aluminio sin tratamiento térmico	X	
Sílica gel con soporte de vidrio	X	
Papel filtro Whatman No.2	X	
Tela de algodón		X

Una vez fijadas las metaloporfirinas en las matrices seleccionadas dan los colores que se indica en la tabla 8 los cuales fueron determinados de forma visual.

Tabla 8. Colores iniciales de las metaloporfirinas fijadas en papel.

Métaloporfirina	Color
TTMAPP+CuCl ₂	Marrón
TK+CuCl ₂	Marrón
TTMAPP+CoCl ₂	Guinda
TK+CoCl ₂	Guinda
TTMAPP+RuCl ₂	Guinda
TK+RuCl ₂	Guinda
TTMAPP+NiCl ₂	Guinda
TK+NiCl ₂	Guinda
TTMAPP+CrCl ₂	Guinda
TK+CrCl ₂	Guinda

Los colores de las porfirinas inmovilizadas cambiaron con respecto a estas mismas especies en disolución, desafortunadamente no se pudo cuantificar esos cambios debido a que no se contaba con un espectrofotómetro con capacidad de reflectancia.

A partir de las pruebas realizadas se encuentra que la metaloporfirina que presentó un mayor cambio visual fue la de cobre

Una vez formada la porfirina metálica, el valor alto de pH favorecerá la coordinación de la histamina ya que la amina protonada provocará que esta no se coordine, preferentemente la reacción deberá ser en un valor de pH superior al valor de pKa de la propia histamina, aunque la coordinación tan fuerte de la histamina a algunas porfirinas pueden desplazar el equilibrio de protonación del ligante, haciendo que la histamina se coordine incluso a valores de pH ligeramente ácidos.

La concentración de las metaloporfirinas es un factor el cual influye en el desempeño del sensor óptico ya que a una gran saturación la función de éste no se puede apreciar mucho, partiendo que el cambio en color es la base fundamental de este trabajo.

Se presentaron diversos cambios en algunas metaloporfirinas al momento de agregar la histamina, estos cambios fueron en el color, ver tabla 9. Los cambios ópticos de las porfirinas fijadas sobre el soporte de papel no son muy pronunciados, como se esperaba, de acuerdo a los cambios en los espectros electrónicos de estos compuestos en disolución, ya que en algunos casos se modificaba el color de la muestra y en otros solo la intensidad del color, tal es el caso de las muestras color guinda que sí cambió el color sobre la muestra inmovilizada pero solo en intensidad y no en longitud de onda.

En disolución, algunas muestras mostraron un cambio en la longitud de onda en la banda de Soret, en particular los complejos de Ni^{2+} en disolución mostraron un comportamiento diferente en papel, esto muy probablemente se deba a la interacción del papel sobre el centro metálico provocando que el metal muestre menos afinidad por la histamina, o bien; la coordinación del ligante no afecte mucho el espectro de absorción electrónica.

Tabla 9. Resultados de cambio de color en soporte de papel.

(+++Intensidad alta,++ Intensidad media,+ Intensidad baja)

Métaloporfirina	Color metaloporfirina	Color metaloporfirina con histamina
TTMAPP + CuCl ₂	Marrón	Amarillo
TK + CuCl ₂	Marrón	Violeta
TTMAPP + CoCl ₂	Guinda+++	Guinda+
TK + CoCl ₂	Guinda+++	Guinda++
TTMAPP + RuCl ₂	Guinda+++	Guinda+
TK + RuCl ₂	Guinda+++	Guinda++
TTMAPP + NiCl ₂	Guinda+++	Guinda+
TK + NiCl ₂	Guinda+++	Guinda+
TTMAPP +CrCl ₂	Guinda+++	Guinda++
TK + CrCl ₂	Guinda+++	Guinda++

La Porfirina que presentó una mayor variación de color a nivel óptico fue la que contenía como centro metálico al ion Cu^{2+} , como se aprecia en la figura 24, donde hay un cambio visual al momento de poner en contacto la metaloporfirina con cobre a la histamina.

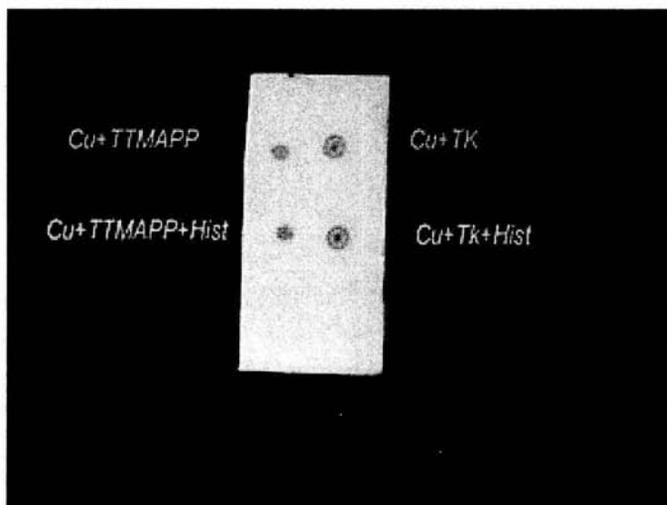


Figura 24 Cambio de color de las porfirinas con cobre en presencia de histamina

En términos generales, no todas las porfirinas metálicas son adecuadas para hacer un sensor óptico de las características descritas en el presente trabajo, ya que en la mayor parte de los casos, la interacción con la histamina no produce un cambio en el color, pero sí en la intensidad de éste. Sin embargo, algunos metales como el cobre muestran propiedades adecuadas, ya que son sensibles a la presencia de histamina y los cambios de color dependen del tipo de porfirina, así

que un sistema hecho a base de diferentes porfirinas de cobre es un buen candidato para hacer un sensor de aminas biogénicas.

Conclusiones

Se logró sintetizar una serie de porfirinas metálicas basadas en dos porfirinas de diferente naturaleza iónica.

Se determinaron los cambios espectrales de estos compuestos en disolución y las condiciones para que la coordinación de la histamina se llevara a cabo.

Se estudió la interacción de inmovilización de las porfirinas metálicas y diferentes sustratos sólidos y se encontró que estas sustancias interaccionan fuertemente con la celulosa de manera rápida y eficiente, provocando que no eluyan cuando ésta entra en contacto con una disolución, haciendo de este sustrato un material adecuado para fijar estas metaloporfirinas.

En el sistema metaloporfirina inmovilizada en celulosa, la coordinación de la histamina cambia su comportamiento con respecto a la disolución, obteniendo como resultando las metaloporfirinas de cobre son los compuestos que muestran cambios más notorios a simple vista y el resto de los compuestos, presentan cambios solo en intensidad del color.

Por lo que las metaloporfirinas de cobre diseñadas en este trabajo son una buena propuesta como sensores ópticos en la determinación de la presencia de histamina.

Bibliografía

1. Taylor, S.L., *Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects.*, in *Toxicol.* 1986. p. 91-128.
2. Arnold, S.H. and W.D. Brown, *Histamine toxicity from fish products.* *Adv. Food Res.*, 1978. **34**(113): p. 54.
3. Rusell, F.E. and Z. Maretié, *Scombriod poisoning: minireview wiyh case histories.* *Toxicon*, 1986. **24**(10): p. 967-973.
4. Whittle, K. and S. Gallacher, *Marine toxines.* *Br Med Bull*, 2000. **56**: p. 236-253.
5. Bean, N.H. and P.M. Griffin, *Foodborne disease outbreaks in the United States,1983-1987:pathogens, vehicles and trends.* *Journal of Food Protection*, 1990. **53**: p. 210-213.
6. Ienistea, C., *Bacterial production and destruction of histamine in foods, and food poisoning caused by histamine.* *Nahrung*, 1971. **15**: p. 109-113.
7. Love, R.M., *Histidine.* In:*The Chemical Biology of Fishes, Advances*, in *Academic press.* 1980. p. 427.
8. Kimata, M., *The Histamine Problem.* Academic Press. Vol. 1. 1961, New York.
9. Yatsunami, K., T. Takenaka, and T. Echigo, *Changes in the number of halotolerant histamine-forming bacteria and contents of non-volatile amines in meat during processing of fermented sardine with rice-bran.* *Nipp. Shock Kogyo Gakk*, 1994. **41**: p. 840-843.
10. Askar, A. and H. Terptow, *Biogene Amine in Lebensmitteln.* 1986, Stuttgart, Germany: Eugen Ulmer GmbH and Co.
11. Ayres, J.C., J.O. Mundt, and W.E. Sandine, *Micobiology of Foods.* 1980, W.H. Freeman and Co.: San Francisco, CA. p. 534.

-
12. Anon., *Normas sanitarias aplicables a la produccion y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros*. 1991, Off. J. Eur. Communities.
 13. FDA, *Defect action levels for histamine in tuna*. 1982, FDA.
 14. NMX-F-520-1993-SCFI, *Productos de la pesca-pescado entero congelado especificaciones*. 1993.
 15. *Codex Alimentarius*. Vol. 9. 1990. 1-56.
 16. Oehlesnshläger, J., *Evaluation of Some Well Established and Some Underrated Indices for the Determination of Freshness and/or Spoilage of Ice Stored Wet Fish' in Quality Assurance in the Fish Industry*. 1992: p. 339-350.
 17. Mielle, P., *"Electronic Noses": Towards the Objective Instrumental Characterization of Food Aroma*. Trends in Food Science and Technology, 1996. **7**: p. 432-438.
 18. Rehbein, H., Marinsdottir, E., Blomsterberg, F. Valdaimarsson, G. Oehlesnslager, J., *Shelf Life of Iced-stored Redfish*. Int. J. Food Sci. Technol., 1994. **29**: p. 303-313.
 19. Meyer, C., Oehlesnshläger, J., *Sensorische Bewertung, Mikrobiologie und Chemische Kenngrößen von Eisgelagerten Wittling*, 1996(43): p. 89-94.
 20. Damoglou, A.P., *A Comparison of Different Methods of Freshness Assessment of Herring*, in *Fishing News Books*, J.J. Connell, Editor. 1980, Blackwell Science: UK. p. 394-399.
 21. Spinelli, A.M., L. Lakritz, and A.E. Wasserman, *Effects of processing on the amine content of pork bellies*. J. Agric. Food Chem, 1974. **22**: p. 1026-1029.
 22. Staruszkiewicz, W.F. and J.F. Bond, *Gas Chromatographic determination of cadaverine, putrecine and histamine in foods*. J. Assoc. Off. Anal Chem, 1981. **64**(3): p. 584-591.

-
23. Yamamoto, S.I., H. Kataoka, H. Makita, M., *Gas-Liquid chromatographic method for analysis of di- and polyamines in foods*. J. Agric. Food Chem, 1982. **30**: p. 435-439.
 24. Walters, M.J., *Descomposition and filth in foods- Determination of histamine in fish by liquid chromatography with post-column reaction and fluorometric detection*. J. Assoc Anal Chem., 1984. **67**(6): p. 1040-1043.
 25. Veciana-Nogues, M.T.H.-J., T.Marine-Font, A. Vidal-Carou, M.C., *Liquid Chromatographic Method for Determination of Biogenic Amines in Fish and Fish Products*. Journal of AOAC International, 1995. **78**: p. 1045-1050.
 26. Lerke, P.A., M.N. Porcuna, and H.B. Chin, *Screening test for histamine in fish*. J.Food Sci, 1983. **48**(1): p. 155-157.
 27. Male, K.B.B., P. Luong, J.H.T. Gibbs, B.F., *Amperometric Biosensor for Total Histamine, Putrecine and Cadaverine using Diamine Oxidase*. Journal of Food Science, 1996. **61**(5): p. 1012-1016.
 28. Serrar, D. and R. Brebant, *The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay*. Food Chemistry, 1995. **54**: p. 85-91.
 29. Gilchrist, T.L., *Química Heterocíclica*. 1992, Addison-Wesley Iberoamerica: México, Argentina, Chile, Colombia, España. p. 202-204.
 30. Morales Rojas, H., *Estudios de la asociación de coproporfirina I en disolución acuosa*. 1996, México D.F.: UNAM. 125.
 31. Falk, J.E., *Porphyrins and Metalloporphyrins*, ed. Elsevier. 1975, New York.
 32. Huheey, J.E., *Química Inorgánica*, ed. O.U. Press. 1997, México D.F.

-
33. Biesaga, M., K. Pyrzynska, and Trojanowicz, *Porphyrins in analytical chemistry. A review*. Talanta, 1999: p. 209-224.
 34. Chang, W.T., S.L., *Imidazol Conformation*. Inorg. Chem., 1973. **10**: p. 133.
 35. Nelen, M.I. and A.V. Eliseev, *Electrostatic molecular recognition in rigid frameworks*. J. Chem. Soc., Perkin Trans, 1997. **2**: p. 1359-1364.
 36. Lehn, J.M. and P. Vierling, *The [18]-N3O3 Aza-Oxa Macrocyclic: a Selective Receptor Unit for Primary Ammonium Cations*. Tetrahedron Letters, 1980. **21**: p. 1323-1326.
 37. Hossain, A. and H.J. Schneider, *Sequence-Selective Evaluation of Peptide Side-Chain Interaction. New Artificial Receptors for Selective Recognition in Water*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**: p. 11208-11209.
 38. Inoue, M.B.M., L. Inoue, M. Quitus, F., *Coordination of histamine and imidazole with macrocyclic Zn²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ chelates of dioxotetraazacycloalkanediacetates*. Inorganica Chimica Acta, 1997. **261**: p. 59-65.
 39. Inoue, M.B.N., R.E. and M.Q. Inoue, F., *Potentiometric and spectroscopic studies of reactions of histidine with 13-membered amide -based macrocyclic Cu²⁺ chelates*. Inorganica Chimica Acta, 1999. **295**: p. 115-119.
 40. Materazzi, S.R.C., R. and A.D.A. Gentili, G., *TG-FTIR, DSC and ESCA characterization of histamine complex with transition metal ions*. Thermochemica acta, 1997. **307**: p. 45-50.

-
41. Hong Chen, S.O., and Richard H. Fish, *Bioorganometallic Chemistry.8. The Molecular Recognition of Aromatic and Aliphatic Amino Acid and Substituted Aromatic and Aliphatic Carboxylic Acid Guests with Supramolecular (n5-Pentamethylcyclopentadienyl)rhodium-Nucleobase, Nucleoside, and Nucleotide Cyclic Trimer Hosts via Non- Covalent pi-pi and Hydrophobic Interactions in Water: Steric, Electronic and Conformational Parameters*. J. Am. Chem. Soc., 1996. **118**: p. 4993-5001.
 42. Inouye, M.F., K. Furusyo, M. Nakazumi, H., *Molecular Recognition Abilities of a New Class of Water-Soluble Cyclophanes Capables of Encompassing a Neutral Cavity*. J. Am. Chem. Soc., 1999. **121**: p. 1452-1458.
 43. Rizzarelli, E. and G. Vecchio, *Metal complexes of functionalized cyclodextrins as enzyme models and chiral receptors*. Coordination Chemistry Reviews, 1999. **188**: p. 343-364.