

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Evidencia de la contaminación exógena de la harina de pescado por especies pelágicas, costeras y por proteína de origen aviar o bovina en pequeños comercios de alimento balanceado en Lurín, Huacho y Chimbote”

**Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Andrea Celinda Garcia Vargas
Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ
2019

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por el financiamiento del proyecto de acuerdo al contrato 113-PNICP-PIAP-2015.

A la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (UPCH) y docentes que participaron en mi formación universitaria.

A mis asesores, Dra. Marcela Mora y Dr. Carlos Shiva, por su apoyo y valiosas enseñanzas.

Al Dr. Néstor Falcón por su asesoría y apoyo constante.

A mis padres, tía y amigos que estuvieron en todo momento dándome fuerzas para continuar con este proyecto.

ABSTRACT

Peru is considered as the main producer and exporter of fishmeal worldwide. The anchoveta (*Engraulis ringens*), is the only species allowed for its preparation according to Peruvian legislation. However, this regulation is not always respected, since during its elaboration other aquatic species destined for direct human consumption and even terrestrial that affect the quality of it are included. That is why this project aims to highlight the possible contamination of commercial fishmeal with aquatic species such as: Bonito (*Sarda sarda*), Caballa (*Scomber japonicus*), Jurel (*Trachurus picturatus*), Merluza (*Merluccius gayi*); and terrestrial species such as: bird (*Gallus gallus domesticus*) and bovine (*Bos taurus*). The samples were purchased from small companies that commercialized balanced feed located in the districts of Lurin, Huacho (Lima) and Chimbote (Ancash) and were analyzed in the molecular biology laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ). For the analysis of the samples, the qPCR protocol established by Huamacha (2017) and validated by De La Cruz (2017), making changes in the concentration of primers to improve DNA detection. All the commercial flours showed as main indicators of contamination all the aquatic species considered in this study and only the avian protein as an indicator of terrestrial contamination. Finally, the hypothesis about the presence of other species other than anchoveta as part of the composition of commercial fishmeal is confirmed, being relevant information for the competent authorities

Keywords: Fish meal, anchoveta, contamination, qPCR

RESUMEN

El Perú es considerado como el principal productor y exportador de harina de pescado a nivel mundial. La anchoveta (*Engraulis ringens*), es la única especie permitida para su elaboración según la legislación peruana. Sin embargo, esta normativa no siempre es respetada, pues durante su elaboración se incluyen otras especies acuáticas destinadas para consumo humano directo e incluso terrestres que afectan la calidad de la misma.

Es por ello, que este proyecto tiene como objetivo, evidenciar la posible contaminación de la harina de pescado comercial con especies acuáticas como: bonito (*Sarda chiliensis*), caballa (*Scomber japonicus*), jurel (*Trachurus picturatus*), merluza (*Merluccius gayi*); y especies terrestres como: ave (*Gallus gallus domesticus*) y bovino (*Bos taurus*). Las muestras fueron adquiridas de pequeñas empresas que comercializaban alimentos balanceados localizados en los distritos de Lurín, Huacho (Lima) y Chimbote (Ancash) y fueron analizadas en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ). Para el análisis de las muestras se utilizó el protocolo de qPCR establecido por Huamacha (2017) y validado por De La Cruz (2017) realizando modificaciones en la concentración de primers para mejorar la detección de ADN. Todas las harinas comerciales mostraron como principales indicadores de contaminación a todas las especies acuáticas consideradas en este estudio y sólo a la proteína aviar como indicador de contaminación terrestre.

Finalmente, se confirma la hipótesis sobre la presencia de otras especies ajenas a la anchoveta como parte de la composición de la harina de pescado comercial, siendo información relevante para autoridades competentes.

Palabras clave: Harina de pescado, anchoveta, contaminación, qPCR

INTRODUCCIÓN

La actividad pesquera y el comercio de sus productos son considerados como una actividad económica de gran importancia a nivel mundial (PROMPERU, 2016). El Perú tiene una oferta variada de productos hidrobiológicos que exporta a diferentes países, uno de los principales productos y de mayor impacto económico es la harina de pescado, siendo el principal país exportador China con 647 TMB (Diario América., 2012, Ministerio de la Producción., 2018).

La harina de pescado en el Perú, se fabrica a partir de la anchoveta (*Engraulis ringens*), siendo la única especie permitida según el DS - N° 015-2007-PRODUCE, Artículo 134, Numeral 81 (PRODUCE, 2007).

Nutricionalmente, está compuesta en promedio por entre 62% - 66% de proteína, 8% -12% de grasa y un máximo de humedad del 10% (IFFO, 2005). Esta última le otorga estabilidad y además permite que su almacenamiento y manipulación sea de manera prolongada (IFFO, 2005). Sin embargo, existen otros parámetros que definen la calidad del producto, los cuales pueden clasificarse de acuerdo a su calidad microbiológica, calidad físico-química y calidad bioquímica (Berrú, 2011).

Debido a su alto contenido proteico y su alta digestibilidad, la harina de pescado producida a partir del procesamiento de la anchoveta se considera importante como alimento balanceado para animales. Según datos estadísticos de la FAO (2014), la mayor parte de la producción de harina de pescado se asigna a la acuicultura, seguido de alimento para porcinos, aves de corral y otros (FAO 2014; Auchterlonie 2016).

En la acuicultura, una de las ventajas de integrar harina de pescado a la dieta, es que favorece la reducción de la polución de las aguas efluentes, proporcionando mayor digestibilidad de los nutrientes; en la avicultura, favorece la inmunidad de las mismas,

mejorando el desarrollo de la estructura ósea. En cerdos, favorece el crecimiento, mejora la fertilidad y mejora la resistencia a enfermedades (Talledo, 2010).

En la actualidad, existen métodos que permiten la detección e identificación de proteínas animales con los que han sido elaborados los alimentos balanceados debido a la aparición y/o diseminación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). El principal medio de transmisión para contraer esta enfermedad es el consumo de alimentos contaminados con el prión, y esto ocurre básicamente con la ingestión de harina de carne y hueso infectadas, pudiendo ser incorporadas de manera intencional o accidental en el alimento (Bachur., 2014, Yamamoto et al., 2015).

En el Perú, existen plantas de fabricación de harina de plumas y vísceras de aves, por el contrario no hay estudios suficientes sobre la fabricación nacional de harina de carne y hueso bovino (Chacón, 2016).

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). Es la entidad nacional encargada de regular la seguridad y sanidad en el sector agropecuario. Esta entidad promulga normas de acuerdo a la aprobación de insumos utilizados para la alimentación animal, sus restricciones de uso y especificaciones técnicas en cuanto a producto y proceso (SENASA, 2015).

En el 2001, SENASA publicó la Resolución Jefatural N° 056-2001-AG donde se prohíbe el uso de proteínas de origen rumiante en la alimentación de poligástricos, ganado porcino y aves; sin embargo en el 2009 emitió la Resolución Jefatural N° 064-2009-AG donde se prohíbe el uso de proteína de origen animal en la alimentación de rumiantes, con excepción de las proteínas lácteas, harina de huevos y harina de plumas en la que se garantice la ausencia de proteínas que no sean propias del producto (Valencia, 2017).

Existen diferentes métodos que permiten detectar proteínas animales presentes en alimentos balanceados. La microscopia es una técnica utilizada mundialmente; sin embargo, presenta complicaciones para identificar el origen animal específico de las partículas detectadas, además es laboriosa y requiere de personal cualificado (Bachur, 2014, Pegels et al., 2009; De Hahn, 1999). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite identificar la secuencia de ADN específica para las especies animales objetivos y además la Regulación N° 51/2013 indica que este método fue validado

como una técnica sólida para utilizarse como método oficial de control en la correcta aplicación de materia de alimentación animal (Yamamoto et al. 2015; Diario Oficial de la Unión Europea, 2013).

La técnica de qPCR para la detección de partículas proteicas de animales presenta una serie de ventajas, pues esta técnica extrae el ADN de la muestra, proporcionando estabilidad a la molécula, permitiendo la identificación de especies en productos calentados y procesados (FSSAI, 2016).

Existen otras técnicas como la enzimoimmunoanálisis (ELISA), que permite detectar la presencia de una proteína reactiva en un anticuerpo específico para la especie animal objetivo, sin embargo presenta sensibilidad relacionada con el tratamiento térmico de la harina de carne y huesos (Yamamoto et al, 2015). La espectroscopia del infrarrojo acoplado al microscopio (NIRM), es un método alternativo al primero, que tiene la propiedad de identificar partículas de harina de carne y hueso en general sin asignarla a una especie animal específica. (Bachur S, 2014).

Por lo que el objetivo general de este proyecto es evidenciar la contaminación exógena en muestras de harina de pescado por especies pelágicas, costeras y por proteína de origen aviar o bovina adquirida en pequeños establecimientos de alimento balanceado en Lurín, Huacho y Chimbote.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de Estudio.-

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (San Martín de Porres, Lima – Perú).

2. Tipo de Estudio.-

Observacional – descriptivo

3. Población objetivo y tamaño de muestra. -

Se recolectaron 30 muestras de harina de pescado de 250 gramos cada una de pequeñas agroindustrias de venta de alimento balanceado y puestos de mercado en los distritos de Lurín, Huacho (Lima) y Chimbote (Ancash)

Para Lurín se consideró 6 distribuidores de harina de pescado de manera aleatoria y 2 puestos de los mercados “Virgen de la Puerta” y “8 de octubre”. En Huacho, se consideró 4 puestos del mercado “Central” y 6 puestos del mercado “Centenario” y en Chimbote se consideró a 2 puestos del mercado “Buenos Aires” y 10 puestos del mercado “La Perla”. Se recolectaron muestras de todos los puestos que vendían harina de pescado en los mercados mencionados.

4. Criterios de inclusión y exclusión. -

Dentro de los criterios de inclusión se consideraron únicamente las muestras de harina de pescado obtenidas de pequeños negocios de venta de alimento balanceado para animales o puestos de mercado en Lurín, Huacho (Lima) y Chimbote (Ancash). Por el contrario, se excluyeron las plantas de producción de harina de pescado.

5. **Recolección de muestras. -**

Las muestras de harina de pescado se adquirieron entre los meses de marzo a abril del 2018 de centros de venta de alimento balanceado de Lurín, Huacho y Chimbote. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia - FAVEZ, donde se rotularon con códigos del H1 al H30 según su orden de compra, para facilitar su identificación (**Cuadro 1**).

6. **Procesamiento de muestras y extracción de ADN**

Se empleó el DNeasy Mericon Food kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo de extracción de pequeños fragmentos (200 mg). Se colocó 600 mg de muestra en 3 tubos (200 mg por tubo), obteniendo 700 µl de sobrenadante final. Se realizaron modificaciones del protocolo de QIAGEN: centrifugación a 2,500 x g por 6 minutos y 14,000 x g por 20 minutos. Para determinar la concentración y pureza del ADN de las muestras se empleó el espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific, EEUU). El ADN fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Se trabajó con la primera dilución (1:10) de la extracción inicial para eliminar inhibidores presentes en la primera extracción y mejorar la calidad de la pureza.

PCR en tiempo real

Se utilizó el termociclador LightCycler 96 (Roche, Suiza), el master mix Absolute QPCR Mix SYBR Green (Thermo Scientific, Estados Unidos); y primers de Anchoqueta - *Engraulis ringens* (Chairi y Rebordinos, 2014), Caballa - *Scomber scombrus* (Infante et al., 2006), Jurel - *Trachurus picturatus* (Apostolidis et al., 2008), Bonito - *Sarda sarda* (Rehbein et al., 1995), y Merluza - *Merluccius gayi* (diseñado en el Laboratorio de Biología Molecular FAVEZ-UPCH) siendo su especificidad y sensibilidad validada por Huamancha 2017), Bovino - *Bos taurus* y Ave - *Gallus gallus domesticus* (Safdar y Junejo, 2015) (**cuadro 2**)

El master mix para las especies acuáticas y terrestres fue ajustado a un volumen final de 6.5 μ l, 1.25 μ l de ADN, y una concentración de primers de 0.8 μ M.

El protocolo de PCR utilizado para las especies acuáticas fue de 94°C por 5 min; 40 ciclos de 94°C por 45s, 58°C por 45s y 72°C por 1min; 72°C por 10min; 95°C por 10s; 65°C por 1min; y 97°C por 1s. Para ave y bovino el protocolo fue: 95°C por 15min; 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s; 95°C por 95s; 60°C por 60s; y 95°C por 1s.

Los resultados se analizaron en función a los valores del ciclo umbral (Cq), temperatura de melting (Tm°C) y concentración (copias ADN/ μ l) (Huamancha, 2017). Se repitió el PCR a las muestras positivas para confirmar de los resultados.

Cuadro 1: Puntos venta de harina de pescado y ubicación geográfica

MUESTRA	NOMBRE DEL CENTRO DE VENTA	DISTRITO
H1	Comercial Pantoja (Av. Domingo Torenó 153	Huacho
H2	Av. Domingo Torenó	Huacho
H3	El comedero	Lurín
H4	Merc. Virgen de la Puerta	Lurín
H5	Centro de engorde "Villa"	Lurín
H6	El Molino	Lurín
H7	Merc. 8 de Octubre	Lurín
H8	Centro de Alimento Balanceado "Ramírez"	Lurín
H9	C. de Engorde "Villa"	Lurín
H10	El Comedero	Lurín
H11	Molino Mayo – Av. Nicolás de Pierola 498	Huacho
H12	Centro de Alimento Balanceado "MM"	Huacho
H13	Centro de Alimento Balanceado "Purina"	Huacho
H14	Pantoja	Huacho
H15	Comercial Yuliana	Huacho
H16	Comercial Olaya 3c	Huacho
H17	Comercial Don Lucho	Huacho

H18	Centro de Alimento Balanceado "Purina 2"	Huacho
H19	Mercado la Perla	Chimbote
H20	Mercado Buenos Aires - pto 342	Chimbote
H21	Mdo. La Perla	Chimbote
H22	Mdo. La Perla	Chimbote
H23	Mdo. Buenos Aires	Chimbote
H24	Mdo. La Perla	Chimbote
H25	Mdo. La Perla	Chimbote
H26	Mdo. La Perla	Chimbote
H27	Mdo. La Perla	Chimbote
H28	Mdo. La Perla	Chimbote
H29	Mdo. La Perla	Chimbote
H30	Mdo. La Perla	Chimbote

Cuadro 2: Primers, tamaño de banda y temperatura de melting (Tm) para las especies acuáticas y terrestres

Espece	Secuencia de primers	Tamaño de banda (bp)	Tm (°C)
Anchoveta	F: 5'TGAAAAAGGGAATGGGGTTT-3' R: 5'-CGGTCCTTTTAGGGTTAGGG-3'	250	84.54 ± 0.13
Ayanque	F: 5'- CCTCTGCCCGATGACTTAAT-3' R: 5'-CACTTATGTCCGCCTAGACTTAG-3'	106	79.89 ± 0.20
Bonito	F: 5'-GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGC TT-3' R: 5'-ATT GGG TTG TTT GAC CCT GTTTC-3'	148	80.98 ± 0.54
Caballa	F: 5'-GCAAAATTGGCACAGCCCAGAACGTCA-3' R: 5'-CGGTGTGTACGCACTTCAGAGCCGATT-3'	188	82.82 ± 0.53
Jurel	F: 5'-CTGAAACACCGGAGTCGTT-3' R: 5'-CCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	90	78.78 ± 0.38
Merluza	F: 5'- CCT CAC TTC CTT TCT CCA AAG A-3' R: 5'- GCA GGG ATG CCA GGA ATA A -3'	133	80.13 ± 0.13
Ave	F: 5'-GGGCTATTGAGCTCACTGTT-3' R: 5'-TGAGAACTACGAGCACAAAC-3'	183	84.98 ± 0.44
Bovino	F: 5'- CAAGAACAATAATGACTAACATTCGAAAG-3' R: 5'-AAATGTTTGATGGGGCTGGA-3'	93	78.19 ± 0.41

Huamancha, 2017

RESULTADOS

1. Extracción de ADN de las harinas comerciales

Las concentraciones de ADN (1:10) oscilaron entre 1.4 - 31.2 ng/ μ l y purezas entre 1.4 - 1.89 A260/280 (Cuadro 3).

2. PCR en tiempo real

2.1 *Anchoveta*

El 100% de las muestras fueron positivas a anchoveta con una concentración promedio de 1.73 \pm 4.34 copias ADN/ μ l. La concentración mínima fue de 2.07 $\times 10^{-5}$ copias ADN/ μ l y máxima de 18.01 copias ADN/ μ l.

El 23.3% (7/30) de las muestras tuvieron un contenido mayor al 98% de anchoveta en su composición total, las demás presentaron valores entre 0.01 - 97.5% de su composición total (cuadro 3).

2.2 *Caballa*

El 100% de muestras fueron positivas a caballa, con una concentración promedio de 0.09 \pm 0.30 copias ADN/ μ l, Siendo la concentración mínima de 1.38 $\times 10^{-6}$ copias ADN/ μ l y máxima de 1.13 copias ADN/ μ l. No se obtuvieron valores de Cq para 2 muestras, sin embargo, se comprobó la presencia de caballa mediante electroforesis (Figura 1.1 (b1 y b2)).

El 10% (3/30) de las muestras tuvo un contenido del 90% de caballa, 26.7% (8/30) tuvo valores por encima del 40% de la especie. Las demás harinas tuvieron valores entre 0.02 - 17.93 % (Cuadro 3).

Se observó curvas de amplificación para los controles negativos, debido a la formación de dímeros (Figura 1.1c).

2.3 *Merluza*

El 100% de las muestras fueron positivas a merluza, con una concentración de 0.05 ± 0.28 copias ADN/ μl . Siendo la concentración mínima de 7.14×10^{-8} copias ADN/ μl y máxima de 1.89 copias ADN/ μl .

El 3.33 % (1/30) presentó 97% de merluza como parte de su composición total, el 10% (3/30) tuvieron valores por encima del 49% de la especie y el mínimo valor fue de $<0.01\%$ (Cuadro 3).

2.4 Bonito

El 100% de las muestras fueron positivas a bonito con una concentración de 0.01 ± 0.02 copias ADN/ μl . Siendo la concentración mínima 1.28×10^{-5} copias ADN/ μl y máxima de 0.1 copias ADN/ μl .

El 100% de las muestras tuvo un contenido de bonito por debajo del 61.2% (Cuadro 3).

Se observó curvas de amplificación en los controles negativos a consecuencia de los dímeros. Se descartó contaminación mediante electroforesis (Figura 1.2 e).

2.5 Jurel

El 100% de las muestras fueron positivas a jurel, con una concentración promedio de $2.30 \times 10^{-3} \pm 0.01$ copias ADN/ μl donde la concentración mínima fue de 7.68×10^{-8} copias ADN/ μl y máxima de 0.09 copias ADN/ μl .

El 3.33 (1/30) evidenció que el 97% de su composición total era a base de jurel, el resto se encontró con valores menores al 20% (cuadro 3).

2.6 Ave

El 10% (3/30) de las muestras mostró contaminación con restos de proteína aviar. Las concentraciones oscilaron entre $1.46 \times 10^{-5} \pm 2.17 \times 10^{-5}$ copias ADN/ μl . Siendo la concentración mínima de 5.16×10^{-7} copias ADN/ μl y máxima de 3.36×10^{-5} copias ADN/ μl . De las 3 harinas, una de ellas contenía el 0.02% de proteína de ave como parte de su composición total, siendo este porcentaje el mayor en comparación con las demás, donde el mínimo se encontró en $<0.01\%$ (Cuadro 3).

Se observó curvas de amplificación en los controles negativos (figura 1.3 i).

2.7 Bovino

No se detectó la presencia de bovino en las muestras.

Cuadro 3. Resultados de concentración y pureza. Extracción de ADN de harinas comerciales puras y diluidas

1:10

Muestra		Concentración (ng/μL)	Pureza
H1	Dilución 1:10	12.3	1.81
H2	Dilución 1:10	1.7	1.4
H3	Dilución 1:10	12.4	1.82
H4	Dilución 1:10	9.2	1.82
H5	Dilución 1:10	3.8	1.83
H6	Dilución 1:10	13.8	1.74
H7	Dilución 1:10	6.9	1.81
H8	Dilución 1:10	16.3	1.9
H9	Dilución 1:10	4.9	1.86
H10	Dilución 1:10	5.5	1.7
H11	Dilución 1:10	7.1	1.81
H12	Dilución 1:10	13	1.85
H13	Dilución 1:10	8.3	1.84
H14	Dilución 1:10	21.5	1.82
H15	Dilución 1:10	31.2	1.87
H16	Dilución 1:10	30.5	1.86
H17	Dilución 1:10	7.9	1.86
H18	Dilución 1:10	10	1.98
H19	Dilución 1:10	16.4	1.88
H20	Dilución 1:10	7.2	1.89
H21	Dilución 1:10	28.1	1.88
H22	Dilución 1:10	6.4	1.84
H23	Dilución 1:10	3.5	1.27
H24	Dilución 1:10	1.4	1.79

H25	Dilución 1:10	12.5	1.8
H26	Dilución 1:10	9.3	1.8
H27	Dilución 1:10	28.5	1.87
H28	Dilución 1:10	5.7	1.81
H29	Dilución 1:10	10.2	1.7
H30	Dilución 1:10	19.1	1.86

Cuadro 4: muestra la composición en porcentajes de las especies acuáticas y terrestres presentes en cada harina comercial.

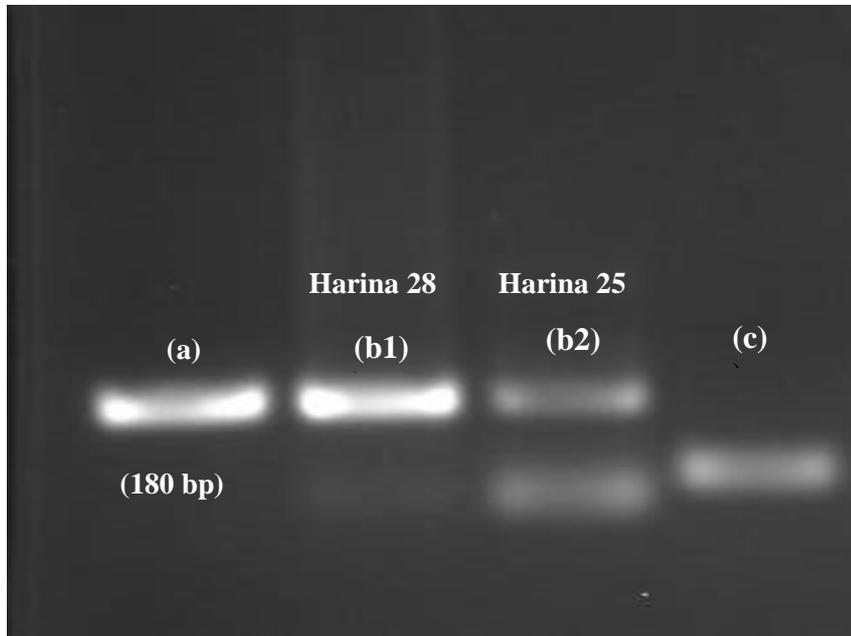
Código	Dilución	Total (copias ADN/ μ l)	Anchove ta (%)	Caballa (%)	Merluza (%)	Bonito (%)	Jurel (%)	Ave (%)	Bovino (%)
HARINA 1	(1:10)	6.67	99.96	0.04	<0.01	<0.01	<0.01	-	-
HARINA 2	(1:10)	0.27	0.82	40.55	49.30	9.32	0.01	<0.01	-
HARINA 3	(1:10)	0.37	79.33	17.93	2.62	<0.01	0.12	-	-
HARINA 4	(1:10)	<0.01	0.49	47.10	0.68	49.76	1.97	-	-
HARINA 5	(1:10)	<0.01	0.49	47.10	0.68	49.76	1.97	-	-
HARINA 6	(1:10)	1.95	0.28	0.02	97.02	2.64	0.04	-	-
HARINA 7	(1:10)	0.02	1.69	89.99	0.86	7.36	0.11	-	-

HARINA 8	(1:10)	0.93	0.01	96.50	0.04	3.43	<0.01	-	-
HARINA 9	(1:10)	<0.01	38.83	44.80	1.71	12.58	2.08	-	-
HARINA 10	(1:10)	0.02	2.47	90.33	<0.01	7.09	0.11	-	-
HARINA 11	(1:10)	0.03	97.29	0.28	2.01	0.36	0.06	-	-
HARINA 12	(1:10)	1.81	30.33	62.51	1.65	5.52	<0.01	-	-
HARINA 13	(1:10)	0.18	11.74	59.76	2.24	26.20	0.04	<0.01	-
HARINA 14	(1:10)	4.32	97.51	2.46	0.01	0.02	<0.01	-	-
HARINA 15	(1:10)	16.78	99.29	0.69	<0.01	0.01	<0.01	-	-
HARINA 16	(1:10)	12.72	99.92	0.07	<0.01	0.01	<0.01	-	-
HARINA 17	(1:10)	1.52	98.97	0.99	<0.01	0.05	<0.01	-	-
HARINA 18	(1:10)	0.50	99.89	0.03	0.03	0.03	0.02	-	-
HARINA 19	(1:10)	0.37	46.43	0.31	52.99	0.06	0.2	-	-
HARINA 20	(1:10)	0.30	97.34	0.45	0.23	1.92	0.06	-	-

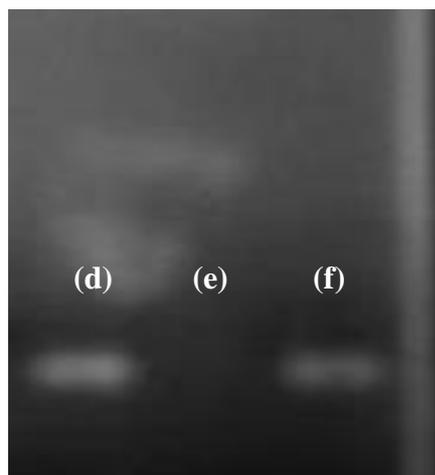
HARINA 21	(1:10)	1.43	98.61	0.86	0.02	0.50	<0.01	<0.01	-
HARINA 22	(1:10)	0.17	1.30	74.72	0.59	14.89	8.48	-	-
HARINA 23	(1:10)	<0.01	23.30	41.12	13.03	18.49	4.03	-	-
HARINA 24	(1:10)	0.09	0.07	1.15	0.63	0.79	97.35	-	-
HARINA 25	(1:10)	0.02	94.59	-	52.75	46.66	0.59	-	-
HARINA 26	(1:10)	0.04	91.30	6.14	0.29	2.22	0.05	-	-
HARINA 27	(1:10)	18.08	99.86	0.14	<0.01	<0.01	<0.01	-	-
HARINA 28	(1:10)	<0.01	4.33	-	14.58	61.19	19.89	-	-
HARINA 29	(1:10)	0.04	84.88	11.94	0.87	1.30	1.01	-	-
HARINA 30	(1:10)	0.37	97.83	1.90	0.07	0.17	0.04	-	-

Figura 1

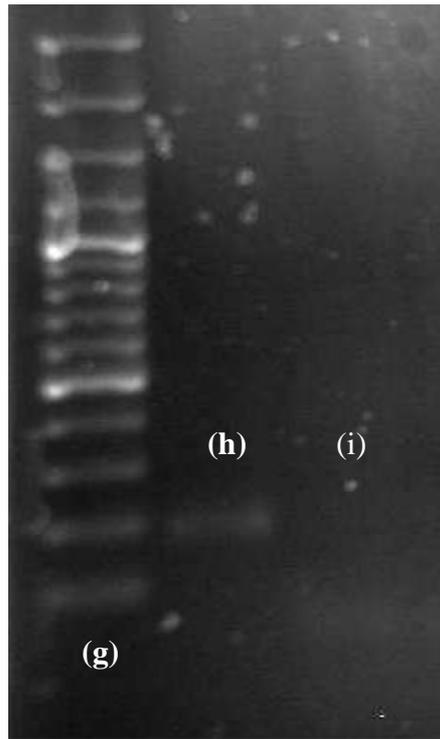
1.1 (a) Control positivo a caballa, (b) Resultado positivo a caballa en gel de agarosa al 2% para 2 muestras de harina e pescado que no obtuvieron valor de cq en el qPCR (b1) harina 28 y (b2) harina 25. (c) Control negativo caballa.



1.2 (d) control positivo de bonito, (e) control negativo a bonito y (f) muestra positiva a bonito



1.3 (g) Loading (100 bp) (h) Control positivo ave (183 bp), (i) control negativo ave



DISCUSIÓN

El presente estudio utilizó los protocolos de qPCR desarrollados anteriormente por Huamancha (2016) y De La Cruz (2017) para analizar harinas comerciales y determinar la presencia de especies no permitidas en la producción de harina de pescado. No obstante, se realizaron ajustes en la concentración de primers para mejorar la detección de ADN.

Uno de los flourocromos empleados en el PCR real time es el SYBR Green I. El aumento de ADN en cada ciclo umbral muestra un incremento proporcional de la fluorescencia emitida; sin embargo, la principal desventaja de los agentes intercalantes es la baja especificidad, puesto que, se unen de manera inespecífica a los productos generados o a dímeros de cebadores. No obstante, para mejorar la especificidad Costa (2004), menciona que se deben utilizar condiciones de reacción óptima y una cautelosa selección de cebadores con la finalidad de reducir el riesgo de formación de dímeros.

Además, la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real permiten determinar la temperatura de melting (T_m) de los fragmentos amplificados, donde cada uno de ellos presenta una T_m característica, permitiendo de esta manera comprobar la especificidad de los fragmentos hallados (Costa, 2004). No obstante, dicha condición no garantiza los resultados, por lo que una alternativa para descartar la sospecha de dímeros es el empleo de electroforesis en gel de agarosa (Rasmussen, 2012).

Esto explica por qué en los casos de caballa, ave y bonito se pudo evidenciar curvas de amplificación para los controles negativos, debiéndose a la unión del SYBR con el dímero. No obstante, la temperatura de melting (T_m) en los casos de caballa y bonito se aproximó a la temperatura del target, realizando el descarte de posible contaminación mediante electroforesis con gel de agarosa al 2% dando como resultado negativo para ambos casos. Por otro lado, la T_m para los controles negativos de ave si se encontraban por debajo del target, lo que es común de hallar en casos de dímeros. En el caso de caballa los controles negativos tuvieron una T_m de 82.6 ± 0.04 °C y el target se encontró con una T_m promedio de 84.83 ± 0.83 °C. En bonito un control negativo amplificó a una T_m de 82.07 °C y el target se mostró con una T_m de 83.21 ± 0.24 °C. Por último los controles negativos de ave amplificaron a una temperatura promedio de 75.19 ± 1.59 °C. No obstante, en otros trabajos de investigación donde también se

identificaron diferentes especies de peces no se evidenció presencia de dímeros (Prado et al., 2012; De La Cruz., 2016).

La anchoveta es la única especie permitida para la elaboración de la harina de pescado según el DS N° 015-2007-PRODUCE Artículo 134 numeral 81. No obstante, existe la sospecha de contaminación de la misma con otras especies acuáticas, incluso terrestres.

La anchoveta es la especie con mayor toneladas de desembarque al año, con 2 787 372 TM, seguido de caballa con 148 875 TM, bonito 74 524 TM, merluza 66 795 TM y jurel con 13 922 TM (INEI, 2016). Durante la captura de la anchoveta se pesca de manera accidental a otras especies pelágicas como caballa, jurel, bonito y demersales como la merluza introduciéndose accidentalmente en el proceso de producción de la harina de pescado (IMARPE, 2017).

No existen reportes en Perú sobre la contaminación de la harina de pescado con las especies en investigación; sin embargo, si se han reportado casos de adulteración de la misma con pota para incrementar su contenido proteico (Perú Pesquero, 2015).

El Ministerio de La Producción mostró que en el 2012 el Perú produjo 846.260 toneladas de harina de pescado, no obstante en el registro de aduanas figura que se exportó 1.320.051 toneladas, es decir que se exportó 473 mil toneladas más de las producidas. Este desbalance puede atribuirse al stock de producción de años anteriores, el subreporte de pesca de las grandes empresas y producto de la harina informal producida con especies para consumo humano (Jiménez, 2013)

Por otro lado, las plantas de harinas residuales y plantas harineras informales, que se basan en la pesca ilegal para obtener harina con calidad de exportación, exportan harina de pescado prime, lo que genera sospechas sobre la procedencia de la materia prima de la misma (Jiménez, 2013).

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten confirmar las sospechas de adulteración de la harina de pescado, pues es notable el uso de materia prima destinada para consumo humano como caballa, merluza jurel y bonito en la fabricación de harina de pescado comercial. Se evidenció la presencia de estas especies como ingrediente principal (un contenido > 50%) en 12 harinas.

Además, todas las harinas mostraron contaminación con todas las especies acuáticas en mención, resultado que se puede atribuir a causa de la captura accidental al momento de la pesca de anchoveta. . Por otro lado, caballa, fue la segunda especie luego de anchoveta que presentó mayor contenido en las muestras, resultado que coincide con la especie con mayor toneladas de desembarque después de anchoveta y sus residuos podrían estar siendo utilizados en la producción de harina de pescado.

El 10% (3/30) de las harinas mostraron contaminación con proteína aviar, 2 de esas muestras fueron adquiridas en Huacho, ciudad reconocida por presentar plantas avícolas importantes. La concentración en las muestras fue mínima, por lo que probablemente sea consecuencia del contacto con aves vivas o harina de plumas en el mismo almacén.

Los resultados muestran porcentajes >50% en contenido de especies acuáticas de consumo humano en las harinas de pescado comerciales, datos que muestran la falta de cumplimiento de la normativa legal que indica que la única especie considerada para su elaboración sea la anchoveta. Estos resultados se ponen a disposición de las autoridades pertinentes para que se utilice como herramienta en futuras decisiones.

CONCLUSIONES

- No se está cumpliendo el Decreto Supremo N° 015-2007-PRODUCE, Artículo 134°, Infracciones, numeral 81; que indica que la única especie permitida para la elaboración de la harina de pescado es la anchoveta.
- Existe contaminación de la harina de pescado con todas las especies acuáticas de investigación (caballa, merluza, bonito y jurel) y 1 terrestre (ave).

REFERENCIAS

- Auchterlonie N. Julio de 2016. IFFO responde al artículo sobre la sustitución completa del aceite de pescado con la microalga marina Schizochytrium. IFFO Update. Ed. 828, 5
- Bachur S. 2014. Revisión de los principales métodos de detección e identificación de proteínas animales procesadas en alimentos balanceados. SNS: 5-6: 16.
- Chacón A. (2016). Estudio de factibilidad para optimizar la producción de harina de plumas hidrolizada de pollo en La empresa PROCINSUR SRL. Recuperado el 15 de Febrero del 2018, de Universidad Católica San Pablo Obtenido de: http://repositorio.ucsp.edu.pe/bitstream/ucsp/14875/1/chacon_masco_ang_est.pdf
- Csirke J, Yumi A. (1996). Análisis bioeconómico de la pesquería pelágica peruana dedicada a la producción de harina y aceite de pescado. Instituto del mar peruano (IMARPE), 15 (2), 25-68.
- De la Cruz 2016 Validación de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de la contaminación exógena de harina de pescado con especies acuáticas y terrestres. Lima. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 32
- El Peruano. (2001). Pesquería. El Peruano, 205170. Recuperado el 02 de octubre del 2018, De Periódico El Peruano - Base de datos.
- El peruano. (2016). El Perú se afianza como primer abastecedor de harina de pescado. Recuperado el 12 de enero del 2018, de Periódico online "El Peruano". Obtenido de: <http://www.elperuano.com.pe/noticia-el-peru-se-afianza-como-primer-abastecedor-harina-pescado-38223.aspx>

Estrada. (2012). Análisis Exegético Para la Optimización Del Recurso Energético de una Planta de Harina de Pescado. - Tesis.

Farje, L. (2008). Sistema de Control de procesos para el aseguramiento de la calidad en la producción de harina de pescado. Recuperado el 18 de enero del 2018, de Repositorio académico UPC. Obtenido de: <http://repositorioacademico.upc.edu.pe/upc/bitstream/10757/274091/1/LFarje.pdf>

IMARPE. (2017). Desarrollo de la pesquería de jurel durante el 2017, situación actual y perspectivas de explotación para el 2018. Ministerio de la Producción, -, -. Obtenido de 05 de febrero del 2019, De IMARPE Base de datos.

Jiménez B. (2013). Producción de harina de pescado: El laberinto de la harina negra. Recuperado el 03 de Febrero del 2019, de Diario La República Sitio web: <https://larepublica.pe/economia/703531-produccion-de-harina-de-pescado-el-laberinto-de-la-harina-negra>

FSSAI. 2016. Manual of methods of analysis of foods: meat and meat products & fish and fish products. Ministry of health and family welfare, Government of India, New Delhi.

Fumiére O, Veys P, Boix A, von Hols C, Baeten V, Berben G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13, 59-70. Información obtenida el 11 de Marzo del 2018, De *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Base de datos.

Huamacha L. 2017 Estandarización e implementación de una prueba rápida de detección molecular en tiempo real de especies pelágicas, costeras y animales terrestres (ave y bovino) potencialmente indicadoras de contaminación en harina de pescado. Lima. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 27IFFO. (2007). La producción de harina y aceite de pescado de la anchoveta peruana. Recuperado el 2 de marzo del 2018, de International Fishmeal and Fish Oil Organisation Sitio 33

<http://www.iffonet.es/system/files/La%20produccion%20de%20harina%20y%20aceite%20de%20pescado%20de%20la%20anchoveta%20peruana.pdf>

La República. (2015). Chimbote produce 80% de la harina de pescado pero su puerto no exporta ninguna. Recuperado el 18 de enero del 2018, de Diario La República Obtenido de: <http://larepublica.pe/politica/189700-chimbote-produce-80-de-la-harina-de-pescado-pero-su-puerto-no-exporta-ninguna>

Ministerio de la Producción. (2018). Desarrollo Productivo de la Actividad Pesquera. Boletín del Sector Pesquero, pág. 17. Recuperado el 26 de septiembre del 2018, De PRODUCE Base de datos.

Pesquera Exalmar SAA. (2016) Memoria anual 2016. Lima, Perú. 65 p. Recuperado el 15 de febrero del 2018 de: <http://www.exalmar.com.pe/wp-content/uploads/2017/02/Memoria-Anual-2016-1.pdf>

Revista Pesca y Medio Ambiente. (2017). LAS PRINCIPALES EMPRESAS PESQUERAS DEL PAÍS. Recuperado el 13 de Marzo del 2018, de Revista Pesca y Medio Ambiente Sitio web: <https://pescaymedioambiente.com/2017/11/07/las-principales-empresas-pesqueras-del-pais/>

RPP. (2017). SNP: Es falso que pescados para consumo se destinen a hacer harina de pescado. Recuperado el 15 de Febrero del 2018, de RPP Sitio web: <http://rpp.pe/economia/economia/snp-es-falso-que-pescados-para-consumo-se-destinen-a-hacer-harina-de-pescado-noticia-1090183>

Pegles N, Gonzáles I, Martín R. (2009). Detection of bovine and ovine DNA in comercial feedstuffs by real-time PCR. rccv, 3, 176-183. Recuperado el 13 de marzo del 2018, De Revista Complutense de Ciencias Veterinarias (RCCV) Base de datos.

PRODUCE. (2007). Modificación del Reglamento de la Ley General de Pesca, aprobado por el Decreto Supremo N° 012-2001-PE. Recuperado el 12 de enero del 2018, de PRODUCE Obtenido de: <http://www2.produce.gob.pe/pesqueria/publicaciones/2007/agosto/ds015-2007-produce.pdf>

PRODUCE. (2017). Resolución Consejo de Apelación de Sanciones. Ministerio de la Producción, Recuperado el 15 de Septiembre del 2018, De PRODUCE Base de datos.

Talledo, S... (2010). Situación y perspectiva de la harina de pescado : Recuperado el 12 de enero del 2018, de cybertesis UNMSM Obtenido de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2313/1/Talledo_es.pdf

Yamamoto T., Kato M. Endo K, Kotoura S y Takeda Z.. (12 de Julio del 2015). Detection of ruminant meat and bone meal in feeds by sandwich ELISA with monoclonal antibodies. *Biochemistry*, 77(12), 1605–1609.