

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“EFECTO DEL PROCESO DE LIXIVIACIÓN SOBRE LOS
ALÉRGENOS DE *Anisakis* spp. EN LA ELABORACIÓN DE
CONCENTRADO PROTEICO DE *Dosidicus gigas*”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA PESQUERA

MARICIELO DEL CARMEN HERVAY DÍAZ

LIMA – PERÚ

2022

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

**“EFECTO DEL PROCESO DE LIXIVIACIÓN SOBRE LOS
ALÉRGENOS DE *Anisakis* spp. EN LA ELABORACIÓN DE
CONCENTRADO PROTEICO DE *Dosidicus gigas*”**

Presentada por:

MARICIELO DEL CARMEN HERVAY DÍAZ

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERA PESQUERA

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Raúl Del Carmen Porturas Olaechea
Presidente

M. Sc. David J. Roldán Acero
Miembro

Dr. Julio G. Gonzales Fernández
Miembro

Dra. Fabiola O. Olivares Ponce
Asesora

A Dios y mi Flor del Carmelo, que son mi protección y soporte espiritual siempre. Por bendecirme con una familia increíble y darme la oportunidad de vivir experiencias retadoras como esta.

A mis padres, Bernardo y Nely, por el amor y sacrificio que entregan día a día a nuestra familia, por guiarme y brindarme su apoyo incondicional desde siempre.

A mis hermanas, Lucero y Estrella, por su cariño y humor particular que me impulsaron cada día. Sepan que las quiero y admiro más de lo que se imaginan.

A mi mukita, mi cómplice y con quien comparto sueños, por motivarme y alentarme en los días más oscuros.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi patrocinadora, la Dra. Fabiola Olivares, responsable del Laboratorio de Procesos e Ingeniería Pesquera de la Facultad de Pesquería UNALM, por incentivar mi espíritu investigador con su experiencia y conocimientos sobre *Anisakis* y particularmente, por la confianza depositada, por su asesoría constante y por su paciencia para guiarme y redireccionar la realización de la tesis sobre todo cuando aparecieron dificultades propias de la pandemia.

A la Dra. Mercedes Careche, investigadora responsable del grupo QUALIFISH del ICTAN, Madrid - España, por su disposición y apertura para compartir y co-crear conocimientos y por su valioso aporte en la definición del diseño experimental.

A mis revisores, Dr. Raúl Porturas, M. Sc. David Roldán y Dr. Julio Gonzáles, por sus aportes y correcciones para la mejora de la tesis.

A la Dra. Lidia Sánchez, responsable del Departamento de Protozoología, Helmintología e Invertebrados (DPHI) de la UNMSM, por su disposición, paciencia y apoyo en la identificación de los nemátodos parásitos.

A la Bach. Francesca Duran, mi amiga inseparable durante toda la etapa universitaria, por ser mi compañera y apoyo durante la parte experimental de la tesis.

También quiero agradecer de manera muy especial al Ing. Braulio Zaga, con quien crucé caminos por un intercambio académico en Chile durante el pregrado y quien se convertiría en mi dulce compañero de aventuras, por confiar en mí y brindarme su apoyo incondicional desde el primer día en que me embarqué en esta aventura de “la tesis”.

Con el mismo sentimiento y sin lugar a duda, el agradecimiento más profundo y sincero va para mi familia. A mis padres, Bernardo y Nely, quienes se merecen mi mayor gratitud y admiración, por su apoyo, comprensión y aliento para no desistir, sin sus valiosos consejos, esfuerzo y sacrificio esto no habría sido posible. A mis hermanas, Lucero, por brindarme su apoyo en los experimentos preliminares, Estrella, por escucharme y ser mi recordatorio diario de que debía avanzar la tesis y Almendra, por recordarme que puedo con todo lo que me propongo.

Finalmente, quiero agradecer al Subproyecto N° 067-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y Grupo Banco Mundial y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Agraria la Molina, por promover y financiar la ejecución de esta tesis tras ser aprobada la propuesta en el “9° Concurso de subvención de tesis de pregrado UNALM 2019”

INDICE GENERAL

| | | |
|--------|---|----|
| I. | INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. | REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. | Los nemátodos anisákidos. | 4 |
| 2.1.1. | Taxonomía..... | 4 |
| 2.1.2. | Características morfológicas..... | 5 |
| 2.1.3. | Ciclo biológico | 8 |
| 2.1.4. | Distribución geográfica | 10 |
| 2.1.5. | Hábitat | 11 |
| 2.2. | Medidas para la reducción del riesgo asociado a <i>Anisakis</i> spp..... | 12 |
| 2.3. | Detección de larvas de anisákidos | 13 |
| 2.3.1. | Inspección visual | 13 |
| 2.3.2. | Digestión ácida | 13 |
| 2.3.3. | Compresión - UV..... | 14 |
| 2.4. | Identificación de especies de <i>Anisakis</i> spp. | 14 |
| 2.4.1. | Identificación morfológica | 14 |
| 2.4.2. | Identificación molecular | 14 |
| 2.5. | Anisakidosis y anisakiasis..... | 15 |
| 2.6. | Antígenos y alérgenos de <i>A. simplex</i> | 16 |
| 2.7. | Detección de alérgenos de <i>A. simplex</i> | 17 |
| 2.8. | <i>Dosidicus gigas</i> (D’Orbigny 1835): “pota” o “calamar gigante” | 18 |
| 2.8.1. | Taxonomía..... | 18 |
| 2.8.2. | Características morfológicas..... | 19 |
| 2.8.3. | Bioecología y desembarque..... | 19 |
| 2.8.4. | Parásitos en <i>D. gigas</i> | 21 |
| 2.8.5. | Composición química..... | 22 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.9. | Concentrado proteico de pota (CPP)..... | 23 |
| 2.9.1. | Antecedentes..... | 23 |
| 2.9.2. | Definición..... | 25 |
| III. | METODOLOGÍA..... | 28 |
| 3.1. | Lugar de ejecución y periodo de experimentación..... | 28 |
| 3.2. | Materiales y equipos..... | 28 |
| 3.2.1. | Materia prima y material biológico..... | 28 |
| 3.2.2. | Materiales de laboratorio..... | 28 |
| 3.2.3. | Equipos..... | 29 |
| 3.2.4. | Reactivos y otros..... | 29 |
| 3.3. | Métodos Analíticos..... | 30 |
| 3.3.1. | Análisis sensorial de la materia prima..... | 30 |
| 3.3.2. | Análisis sensorial del Concentrado proteico de pota..... | 30 |
| 3.3.3. | Análisis físicoquímicos y pH..... | 30 |
| 3.4. | Análisis estadístico..... | 31 |
| 3.5. | Metodología Experimental..... | 31 |
| 3.5.1. | Estudio de nemátodos anisákidos en pota <i>D. gigas</i> | 31 |
| 3.5.2.1. | Obtención de material biológico..... | 31 |
| 3.5.2.2. | Registro de datos morfométricos..... | 31 |
| 3.5.2.3. | Detección, colecta y fijación de parásitos anisákidos..... | 32 |
| 3.5.2.4. | Identificación morfológica de parásitos anisákidos..... | 32 |
| 3.5.2.5. | Identificación molecular de parásitos anisákidos..... | 33 |
| 3.5.2.6. | Análisis ecológico..... | 33 |
| 3.5.2. | Estudio comparativo del efecto del proceso de lixiviación de músculo de pota precocida durante la elaboración de concentrado proteico de pota (CPP) y de músculo crudo de merluza durante la elaboración de surimi, en la cuantificación de alérgenos de <i>A. simplex</i> | 34 |
| 3.5.2.1. | Elaboración de Concentrado Proteico de pota..... | 35 |
| 3.5.2.2. | Determinación de alérgenos de <i>A. simplex</i> en músculo lavado de merluza | |

| | | |
|----------|--|----|
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 38 |
| 4.1. | Evaluación de la materia prima..... | 38 |
| 4.1.1. | Análisis sensorial y datos morfométricos | 38 |
| 4.1.2. | Composición química proximal..... | 39 |
| 4.2. | Identificación de Anisákidos..... | 40 |
| 4.2.1. | Descripción de las especies de los nemátodos identificados | 41 |
| 4.3. | Evaluación de la nematofauna | 45 |
| 4.3.1. | Índices parasitológicos y frecuencia parasitaria | 45 |
| 4.3.2. | Localización del parásito en el hospedero | 50 |
| 4.3.3. | Factores que podrían influir en la tasa de parasitación..... | 54 |
| 4.4. | Evaluación del Concentrado proteico de pota | 55 |
| 4.4.1. | Análisis sensorial de los Concentrados proteicos de pota | 55 |
| 4.4.2. | Composición química proximal de los Concentrados proteicos de pota..... | 57 |
| 4.5. | Evaluación de las muestras de proceso obtenidas de la elaboración de CPP | 58 |
| 4.5.1. | Composición fisicoquímica y pH de las muestras de proceso..... | 58 |
| 4.5.2. | Efecto de los procesos de congelación y cocción sobre el músculo, larvas y alérgenos de <i>A. simplex</i> | 61 |
| 4.5.2.1. | Efecto del proceso de congelación | 61 |
| 4.5.2.2. | Efecto del proceso de cocción | 62 |
| 4.6. | Evaluación del efecto del proceso de lixiviación sobre los alérgenos de <i>Anisakis simplex</i> | 65 |
| 4.6.1. | Análisis comparativo del comportamiento de alérgenos de <i>A. simplex</i> en músculo infestado de merluza sometido a lavados sucesivos tipo surimi con las condiciones del proceso de lixiviación durante la elaboración de Concentrado proteico de pota (CPP) | 67 |
| V. | CONCLUSIONES | 74 |
| VI. | RECOMENDACIONES | 75 |
| VII. | BIBLIOGRAFÍA | 76 |
| VIII. | ANEXOS | 99 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Alérgenos caracterizados de <i>A. simplex</i> (IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2021) | 18 |
| Tabla 2. Composición química proximal (g/100 g) del manto de pota <i>D.gigas</i> | 23 |
| Tabla 3. Especificaciones técnicas de los concentrados proteicos de pescado y pota..... | 26 |
| Tabla 4. Composición química proximal (g/100 g) del manto de pota <i>D. gigas</i> | 40 |
| Tabla 5. Resumen de las especies de nemátodos anisákidos encontrados en pota <i>D. gigas</i> | 40 |
| Tabla 6. Prevalencia, Frecuencia parasitaria, Intensidad media de infección (IMI), Intensidad de Infección (II) y Abundancia media (AM) de anisákidos de pota <i>D. gigas</i> procedentes de La Puntilla, Atico y Matarani, Perú. | 46 |
| Tabla 7. Nemátodos colectados a partir de <i>D. gigas</i> , de acuerdo al lugar de procedencia del hospedero..... | 47 |
| Tabla 8. Evaluación sensorial de los concentrados proteicos de pota obtenidos de acuerdo al tratamiento de lixiviación y tratamientos térmicos aplicados..... | 56 |
| Tabla 9. Composición química proximal (g/100 g muestra) de los concentrados proteicos de pota (CPP) obtenidos de acuerdo con los tratamientos de lixiviación y según el tratamiento térmico aplicado. | 57 |
| Tabla 10. Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de músculo de pota y de las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de lixiviación (1:3 p:v; 10 min) aplicando dos tratamientos térmicos de cocción: TT1 (90°C + 0 min) y TT2 (90°C + 10 min) | 59 |
| Tabla 11. Porcentaje de humedad y proteína (%), cantidad de antígenos de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) y valores de pH en músculo lavado y soluciones de lavado, de merluza infestada artificialmente (50 larvas/ 100g músculo) sometida a lavados sucesivos tipo surimi..... | 69 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|--|
| Figura 1. Especies del género <i>Anisakis</i> obtenidas por 2 análisis filogenéticos (A y B). Con ambas datas se describe la existencia de cuatro clados principales: Clado 1, comprende el complejo de <i>A. simplex</i> (s.l.) que incluyen las especies: <i>A. simplex</i> (s.s.), <i>A. pegreffii</i> y <i>A. berlandi</i> .; Clado 2, comprende a las especies <i>A. ziphidarum</i> y <i>A. nascetti</i> .; Clado 3, comprende las especies <i>A. physeteris</i> , <i>A. brevispiculata</i> y <i>A. paggiae</i> y el Clado 4, comprende a la especie <i>A. típica</i> . (Mattiucci <i>et al.</i> , 2014 citado por Mattiucci <i>et al.</i> , 2018).5 | |
| Figura 2. Representación del extremo anterior, esófago y extremo posterior de larvas L3 de nemátodos anisákidos. a) <i>Anisakis</i> Tipo I; b) <i>Anisakis</i> Tipo II; c) Pseudoterranova; d) Contracaecum y e) <i>Hysterothylacium</i> . pe: poro excretor, v: ventrículo, ci: ciego intestinal, av: apéndice ventricular, m: mucrón (Debenedetti, 2013 citado por Madrid, 2015). 6 | |
| Figura 3. Morfotipos de larvas de nemátodos parásitos del género <i>Anisakis</i> . A) <i>Anisakis</i> Tipo I, barra = 0,6 mm. B) <i>Anisakis</i> Tipo II, barra = 0,7 mm. bt = diente perforador, nr = anillo nervioso, es = esófago, ve = ventrículo, in = intestino, an = ano, mu = mucrón (Pardo-Gandarillas <i>et al.</i> , 2009) 7 | |
| Figura 4. Clasificación de especies del género <i>Anisakis</i> y sus morfotipos I y II (González, 2018)..... 8 | |
| Figura 5. Ciclo biológico de <i>Anisakis simplex</i> (González, 2018)..... 10 | |
| Figura 6. Mapa con la distribución geográfica de <i>Anisakis</i> spp. identificadas genéticamente a partir de especies de importancia comercial. (Mattiucci <i>et al.</i> , 2018)..... 11 | |
| Figura 7. Distribución del calamar gigante <i>Dosidicus gigas</i> en la Costa Peruana año 2004-2011 (Alegre <i>et al.</i> , 2014)..... 20 | |
| Figura 8. Esquema del diseño experimental para los procesos de cocción de músculo y lixiviación de músculo precocido de pota <i>Dosidicus gigas</i> 37 | |
| Figura 9. Relación entre la LDM (Longitud Dorsal del Manto) y el PEM (Peso Estándar del Manto) de los 100 ejemplares muestreados de pota <i>D. gigas</i> 39 | |
| Figura 10. Larva L3 de <i>Hysterothylacium</i> sp. A) Extremo anteroventral (d: diente cuticular, pe: poro excretor) B) Región ventricular (ci: ciego intestinal, ap: apéndice ventricular) C) Extremo posterior (a: ano, mu: mucrón) 42 | |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Larva L3 de <i>Anisakis</i> Tipo II. A) Extremo anteroventral (d: diente cuticular, an: anillo nervioso, e: esófago) B) Región ventricular (ve: ventrículo) C) Extremo posterior (a: ano)..... | 44 |
| Figura 12. Prevalencia total de infección según la procedencia del hospedero <i>D. gigas</i> ... | 46 |
| Figura 13. Prevalencia de infección por <i>Hysterothylacium</i> sp. y <i>Anisakis</i> tipo II, según la procedencia del hospedero <i>D. gigas</i> | 47 |
| Figura 14. Localización de larvas anisákidas en <i>D. gigas</i> . A: Larva L3 de <i>Hysterothylacium</i> sp. localizada debajo de la piel interna del manto. B: Larva L3 de <i>Anisakis</i> Tipo II localizada en los restos de tejidos de la cavidad visceral. | 51 |
| Figura 15. Frecuencias relativas de la distribución de las larvas de <i>A. pegreffii</i> entre las vísceras y el músculo de <i>E. encrasicolus</i> , a diferentes temperaturas de almacenamiento (2 °C, 5 °C y 7 °C) y a diferentes intervalos de tiempo (Control, 24 h, 48 h y 72 h) (Cipriani <i>et al.</i> , 2015)..... | 53 |
| Figura 16. Cantidad de antígenos de <i>Anisakis</i> 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min) con dos tipos de soluciones de lavado. MP: Músculo crudo de merluza (Control); ML: Músculo obtenido después del 3° lavado; Lote 1: H ₂ O; Lote 2: NaClO 20 ppm. S1: Solución del 1° lavado; S2: Solución del 2° lavado; S3: Solución del 3° lavado..... | 71 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo 1. “Tabla de análisis sensorial para harina de pota precocida (<i>Dosidicus gigas</i>) para consumo humano”, propuesta por Lazo (2006)..... | 99 |
| Anexo 2. Flujograma de la elaboración de concentrado proteico de pota (CPP)..... | 100 |
| Anexo 3. Relación entre la LDM (Longitud Dorsal del Manto) y el PEM (Peso Estándar del Manto) de los 100 ejemplares muestreados de pota <i>D. gigas</i> de acuerdo a su procedencia de captura. | 101 |
| Anexo 4. Medidas en milímetros (mm) de <i>Hysterothylacium</i> sp. presente en <i>Dosidicus gigas</i> y comparación con otros autores. | 102 |
| Anexo 5. Medidas en milímetros (mm) de <i>Anisakis</i> Tipo II sp. presente en <i>Dosidicus gigas</i> y comparación con otros autores. | 103 |

RESUMEN

La pota o calamar gigante *Dosidicus gigas* (D'Orbigny 1835) es una especie abundante en la costa peruana, de importancia comercial y con antecedentes de infestación parasitaria; por ende, es relevante evaluar las implicancias que puedan afectar la inocuidad de los productos a base de este recurso. El objetivo general de la presente investigación fue determinar la influencia del proceso de lixiviación en la presencia o ausencia de alérgenos de *Anisakis* spp. en concentrado proteico de pota. Se realizaron dos estudios: En el primer estudio se realizó el muestreo de 100 ejemplares de pota *D. gigas*, eviscerados y refrigerados, capturados en la zona sur y desembarcados en los puertos de La Puntilla (Pisco), Atico y Matarani (Arequipa) durante el periodo setiembre-noviembre del año 2019. Se registró la LDM (cm) y PEM (Kg) de cada pota. Se encontraron dos especies de nemátodos: *Anisakis* Tipo II (Prev: 27%; IMI: 1.56) de importancia zoonótica, y se reporta por primera vez la presencia de larvas L3 de *Hysterothylacium* sp. (Prev: 30%; IMI: 1.50). En el segundo estudio se utilizaron nueve mantos de pota congelados ($<18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 4 meses) y se utilizó la metodología recomendada por Lazo (2006) con modificaciones en dos variables: Tiempo de cocción y Número de lavados, obteniendo seis concentrados proteicos. No se logró realizar los estudios de inmunodetección de las muestras de proceso para cuantificar los alérgenos por limitaciones de traslado internacional por la pandemia del COVID-19; sin embargo, se determinó que el proceso de lavado de músculo precocido de pota permitiría la remoción de los alérgenos de *Anisakis simplex* en la fracción soluble, a partir de una comparación con data no publicada del contenido de antígenos de *A. simplex* en músculo de merluza sometida a lavados sucesivos tipo surimi realizada bajo condiciones similares a la metodología mencionada. Se determinó que bajo las condiciones del presente estudio como la tasa y tipo de parasitación inicial de la pota (parasitación natural baja), los procesos previos de congelación y cocción y el proceso de lixiviación permite la eliminación progresiva de los alérgenos por lo que la cantidad de antígenos Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* residual podría estar por debajo del umbral de detección de la técnica (<1 ppm).

Palabras clave: *Anisakis*, *Hysterothylacium*, Concentrado proteico, Ani s 4, Lixiviación.

ABSTRACT

The giant squid or squid *Dosidicus gigas* (D'Orbigny 1835) is an abundant species on the Peruvian coast, of commercial importance and with parasitic infestation records; therefore, it is relevant to evaluate the implications that may affect the safety of squid -based food products. The general objective of the present investigation was to determine the influence of the leaching process on the presence or absence of *Anisakis* spp. allergens in squid protein concentrate. Two studies were carried out: In the first study, 100 specimens of squid *D. gigas* gutted and refrigerated, captured in the South Pacific Ocean and landed in the ports of La Puntilla (Pisco), Atico and Matarani (Arequipa), were sampled during the period September-November of the year 2019. The LDM (cm) and PEM (Kg) of each squid was recorded. Two species of nematodes were found: *Anisakis* Type II (Prev: 27%; IMI: 1.56) of zoonotic importance, and the presence of L3 larvae of *Hysterothylacium* sp. (Prev: 30%; IMI: 1.50). In the second study, nine frozen squid mantles were used (<18 °C ± 3 °C, 4 months) in order to use the methodology recommended by Lazo (2006) but with modifications in two variables: Cooking time and Number of washes, obtaining six protein concentrates. Immunodetection studies of the process samples to quantify allergens were not carried out due to international transport limitations because of the COVID-19 pandemic; however, it was determined that the leaching process of precooked squid muscle would allow the removal of *Anisakis simplex* allergens in the soluble fraction, as of a comparison with unpublished data of the content of *A. simplex* antigens in washed hake muscle subjected to successive surimi-type washed performed under conditions similar to the aforementioned methodology. It was determined that under the conditions of the present study, such as the rate and type of initial parasitization of squid (low natural parasitization), the freezing and cooking processes and the successive washing (leaching process) allows the progressive elimination of allergens, so that the residual amount of Ani s 4 and crude extract of *A. simplex* antigens could be below the detection threshold of the technique (1 ppm).

Key words: *Anisakis*, *Hysterothylacium*, Protein concentrate, Ani s 4, Leaching.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los principales países productores de recursos pesqueros ubicándose en el año 2018, en el tercer lugar dentro de los primeros 7 países que representaron más del 50% del total de capturas marinas a nivel mundial (FAO, 2020a). Entre las especies hidrobiológicas que destacaron por registrar una mayor cantidad de desembarque en el 2018 se encuentra la anchoveta *E. ringens* (85.9%) seguido de la pota *D. gigas* (5.0%) (PRODUCE, 2019).

En general, tanto pescados como cefalópodos son recursos con un alto valor nutricional por su contenido en proteínas de alto valor biológico, grasas poli insaturadas (Omega-3 y 6), vitaminas (B1, C) y minerales. Muchos especialistas consideran que son indispensables e insustituibles en nuestras dietas ya que resulta beneficioso para la salud y el bienestar de las personas (CECOPESCA, 2012). No obstante, también hay evidencia de que se trata de productos con mayor riesgo de transmisión de parásitos al ser humano (Chappuis y Loutan, 2006).

El parasitismo es un fenómeno generalizado y frecuente en el medio marino, es decir, todos los organismos de vida acuática son susceptibles de infestarse por diversos parásitos. Entre los helmintos de mayor importancia por su presencia en productos de la pesca se encuentran los nemátodos parásitos, los cuales han sido reportados desde el siglo XIII (Myers, 1976). Eiras *et al.* (2016) mencionan que a la fecha los parásitos de especies marinas son más abundantes, diversificados y con una distribución geográfica cada vez más amplia. Sin embargo, a pesar de la existencia de una gran cantidad y variedad de parásitos, solo pocas especies de helmintos entre digeneos, nemátodos y céstodos son zoonóticas, es decir, que pueden producir enfermedad en el hombre.

Según Chai *et al.*, (2005) citado por Madrid (2015), las larvas vivas de nemátodos de la familia Anisakidae “Anisákidos” se destacan por su alta prevalencia y ubicuidad en los ecosistemas, pero sobre todo por su alto potencial zoonótico. Estas representan un riesgo para la salud humana ya que al infestar son causantes de enfermedades con síntomas gastrointestinales y/o alérgicos.

La Anisakidosis se refiere a la infección de personas con larvas de nemátodos de las diferentes especies que pertenecen a la familia *Anisakidae*, y la Anisakiasis es la infección generada por los parásitos del género *Anisakis*, generalmente ocurre cuando las personas ingieren larvas del tercer estadio (L3) que se encuentran en las vísceras o los músculos de una amplia gama de peces y calamares marinos como la “pota” (FAO/WHO, 2014).

El primer caso de Anisakidosis ocurrió en el año 1876, en Groenlandia. Luego, en el 2010, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA reportó la existencia de aproximadamente 20,000 casos de Anisakiasis en todo el mundo, de los cuales más del 90% fueron reportados en Japón (en donde en promedio 2,000 casos son diagnosticados anualmente), asimismo informó que la ausencia de información actualizada sobre la carga real de *Anisakis* en la población humana se debe a la escasez de información epidemiológica (EFSA, 2010).

Si bien la investigación científica ha permitido desarrollar tratamientos tecnológicos aplicados a productos hidrobiológicos parasitados que logran la muerte de larvas previniendo la infección y sensibilización de los consumidores, estos no logran anular la viabilidad de los compuestos alérgenos, es decir, existe actividad alérgica residual en los alimentos (Tejada *et al.*, 2014). Siendo el *Anisakis simplex*, la especie causante de los casos de parasitosis y formas de alergia más comunes (Audicana & Kennedy, 2008).

Actualmente se conoce que la fauna parasitaria de la pota *Dosidicus gigas* está compuesta por trematodos, céstodos y larvas de nemátodos anisákidos (Dollfus, 1964; Chiella & Verano, 1997; Gonzáles & Mendo, 1998; Shukhgalter, O. & Nigmatullin, 2001; Pardo-Gandarillas *et al.*, 2009; Iannacone & Alvaríño, 2009; Céspedes RE, 2010), hecho que genera preocupación ya que demuestra que los consumidores se exponen a comprar y/o consumir pota infestada con parásitos zoonóticos.

No obstante, el acontecimiento desencadenante que ha despertado el interés por estudiar más a estos parásitos ha sido la alerta sanitaria que emitió el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera SANIPES al detectar la presencia de larvas de *Anisakis* spp. en algunos lotes de conservas de caballa y sardina importadas de China, las cuales se encontraban en los diferentes canales de distribución del país en noviembre del 2017 (SANIPES, 2018).

En concreto, existe una creciente preocupación por la presencia de parásitos y específicamente larvas de *Anisakis* spp. en los principales recursos pesqueros procedentes del litoral peruano, como la pota, ya que supone un potencial riesgo para la salud y que

además advierte a las autoridades correspondientes el énfasis en el control de calidad e inspección sanitaria del mencionado recurso en los desembarcaderos, lugares de expendio como los mercados mayoristas, etc. para garantizar su inocuidad y el debido cumplimiento de los requisitos normativos.

El presente estudio tiene como objetivo principal determinar la influencia del proceso de lixiviación en la presencia o ausencia de alérgenos de *Anisakis simplex* en concentrado proteico de pota *Dosidicus gigas*. Para ello, se han definido tres objetivos específicos a desarrollar, los cuales son:

- Identificar morfológicamente las especies de *Anisakis* spp. presentes en la pota.
- Determinar los índices parasitarios en términos de Prevalencia e Intensidad media de infección de larvas de nemátodos anisákidos en la pota *D. gigas*, procesada en la empresa Industrias Derivados de Pota S.A.
- Evaluar la influencia de la tasa y tipo de parasitación en la cuantificación de alérgenos de *Anisakis simplex* de músculo lavado y concentrado proteico de pota.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Los nemátodos anisákidos.

2.1.1. Taxonomía.

Los nemátodos de la familia Anisakidae (Nematoda: Rhabditida: Ascaridomorpha) son parásitos ascaroideos con una amplia distribución en los organismos acuáticos a nivel mundial. Suelen encontrarse en mamíferos marinos, peces, cefalópodos, aves piscívoras, reptiles marinos (Garbin, 2009) y accidentalmente en el hombre cuando este ha ingerido pescado o moluscos crudos o semicrudos infestados con larvas L3.

La familia Anisakidae se compone de al menos 24 géneros, de los cuales los más estudiados son *Pseudoterranova*, *Contracaecum* y *Anisakis* (Adelina, 2017; Chai *et al.* 2005; Osanz, 2001; Cheng, 1982).

La clasificación taxonómica para los nemátodos anisákidos más aceptada es la propuesta por Smith & Wootten (1978), la cual se basa en las claves de los taxones superiores descritas por Anderson *et al.* (1974):

Phylum: Nematelminthes
Clase: Nematoda
Subclase: Secernentea
Sub orden: Ascaridina
Orden: Ascarida
Superfamilia: Ascaridoidea
Familia: Anisakidae

Se tienen identificadas diez especies válidas dentro del género *Anisakis* Dujardin, 1845 (D'Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci *et al.*, 2009; Mattiucci & D'Amelio, 2014; Mattiucci & Nascetti, 2008) de las cuales al menos nueve han sido reconocidas genéticamente (Mattiucci & Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2014; 2017).

Estudios basados en electroforesis de enzimas multilocus ha permitido distinguir tres especies gemelas pero aisladas reproductivamente: *A. simplex sensu stricto* (s.s.), *A. pegreffii* y *A. simplex C.* las cuales son idénticas morfológicamente, pero presentan diferencias además de genéticas, a nivel ecológico y patológico (Kirstein *et al.*, 2007). Posteriormente, la especie *A. simplex C* cambió de denominación a *A. berlandi* (Mattiucci *et al.*, 2014). En la Figura 1 se muestran las diferentes especies de *Anisakis* identificadas por análisis filogenéticos concatenados.

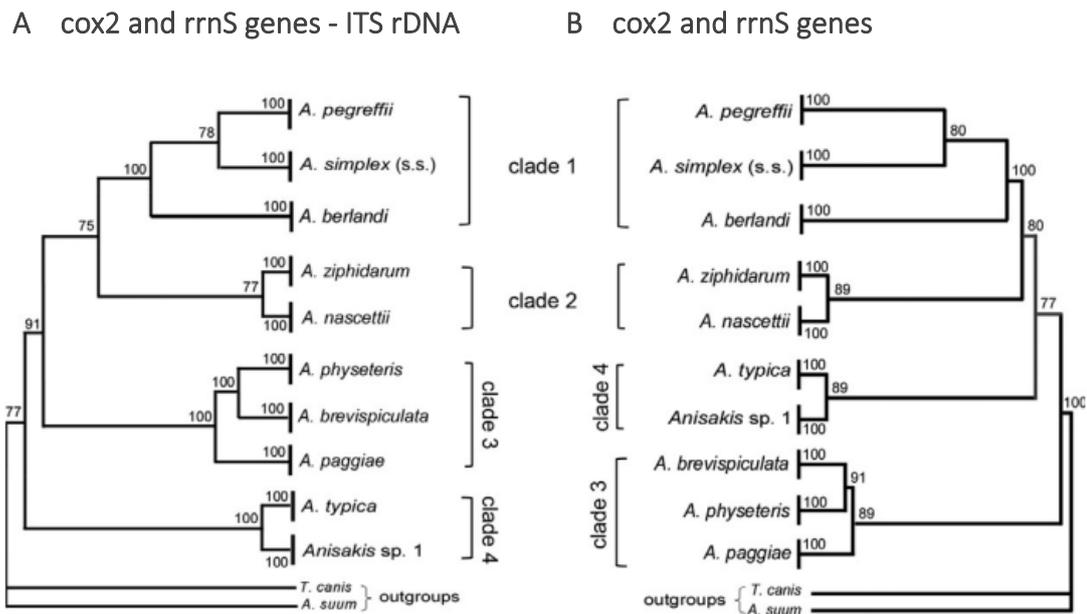


Figura 1. Especies del género *Anisakis* obtenidas por 2 análisis filogenéticos (A y B). Con ambas datas se describe la existencia de cuatro clados principales: Clado 1, comprende el complejo de *A. simplex* (s.l.) que incluyen las especies: *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* y *A. berlandi*.; Clado 2, comprende a las especies *A. ziphidarum* y *A. nascetti*.; Clado 3, comprende las especies *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggiae* y el Clado 4, comprende a la especie *A. típica*. (Mattiucci *et al.*, 2014 citado por Mattiucci *et al.*, 2018).

2.1.2. Características morfológicas

En general, los parásitos anisákidos comparten rasgos comunes de todos los nemátodos como un cuerpo cilíndrico, alargado, sin segmentación y agudo en los extremos. La epidermis segrega una cutícula caracterizada por tener estriaciones finas transversales o en capas y una composición química que protege a los parásitos de jugos digestivos (Osanz, 2001).

El sistema digestivo es completo, es decir, disponen de boca, esófago, intestino y ano (Möller y Anders, 1986). La apertura bucal consta de varios labios y un diente cuticular. El esófago posee dos porciones bien diferenciadas: una anterior muscular llamada proventrículo y otra posterior glandular denominada ventrículo, que puede tener o no apéndice, a la vez que presenta intestino con o sin ciego intestinal dependiendo del género (Osanz, 2001).

Su sistema nervioso es rudimentario, destacándose la presencia de un anillo nervioso situado en el tercio anterior del parásito que puede ser visible al ser aclarados. Respecto a su sistema excretor, está compuesto por una glándula y un conducto que finaliza en el llamado poro excretor que se sitúa inmediatamente por debajo de la apertura bucal, o bien a nivel del anillo nervioso según los géneros (Cheng, 1982). En la Figura 2 se representa las características morfológicas de cuatro géneros de anisákidos.

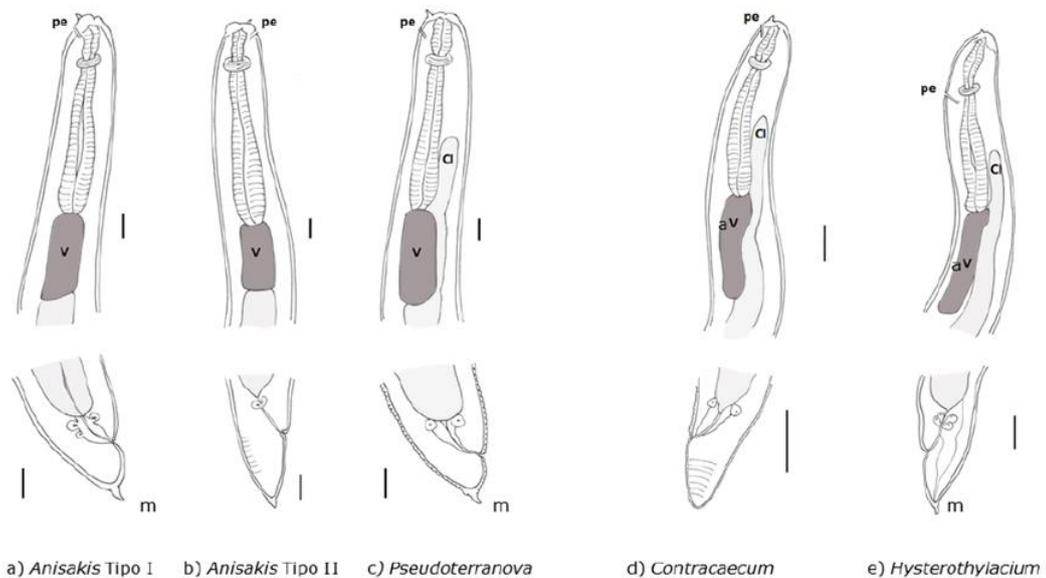


Figura 2. Representación del extremo anterior, esófago y extremo posterior de larvas L3 de nemátodos anisákidos. a) *Anisakis* Tipo I; b) *Anisakis* Tipo II; c) *Pseudoterranova*; d) *Contraeaecum* y e) *Hysterothylacium*. pe: poro excretor, v: ventrículo, ci: ciego intestinal, av: apéndice ventricular, m: mucrón (Debenedetti, 2013 citado por Madrid, 2015).

Para la diferenciación entre las larvas L3 de los géneros *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp., *Contraeaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) y *Hysterothylacium* sp. (Nematoda: Raphidascarididae) se evalúan características morfológicas como el color y tamaño de las larvas, presencia longitud y forma del ventrículo, presencia o ausencia del apéndice

ventricular, la posición del poro excretor, longitud y posición del ciego intestinal anterior (Madrid, 2015; Rello *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2007).

En un principio las especies del género *Anisakis* se clasificaron en Tipo I y Tipo II, de acuerdo a su morfología (Berland, 1961). Las larvas del Tipo I presentan ventrículo más largo que ancho y habitualmente sigmoideo con presencia de mucrón terminal, mientras que las larvas con morfología tipo II presentan ventrículo corto y nunca sigmoideo con ausencia de mucrón terminal. (Madrid, 2015; Gonzáles, 2018).

Luego, en base a lo propuesto por Berland (1961), Shiraki (1974) propuso dos grupos adicionales teniendo en cuenta criterios morfológicos como: la presencia o ausencia de la espina caudal o mucrón, encontrando larvas tipo I, II, III y IV que de acuerdo a caracterizaciones moleculares realizadas después indican que se corresponderían con las especies *A. simplex*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggiae*, respectivamente (Murata *et al.*, 2011). Posteriormente, los tipos III y IV fueron incluidos en el tipo II por inconsistencias (Mattiucci & Nascetti, 2008). En la Figura 3 se representan los morfotipos I y II de *Anisakis* y en la Figura 4, se observa la clasificación actualizada de las especies de *Anisakis* de acuerdo a sus morfotipos.

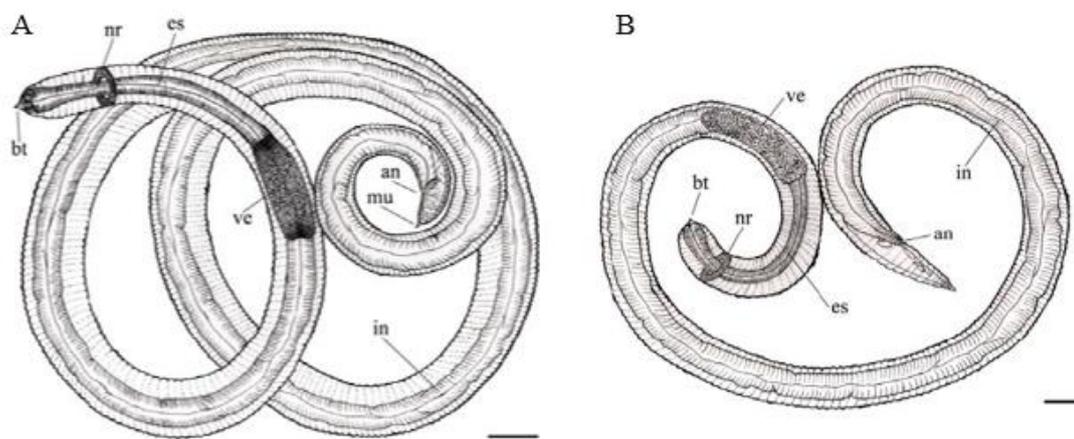


Figura 3. Morfotipos de larvas de nemátodos parásitos del género *Anisakis*. A) *Anisakis* Tipo I, barra = 0,6 mm. B) *Anisakis* Tipo II, barra = 0,7 mm. bt = diente perforador, nr = anillo nervioso, es = esófago, ve = ventrículo, in = intestino, an = ano, mu = mucrón (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2009)

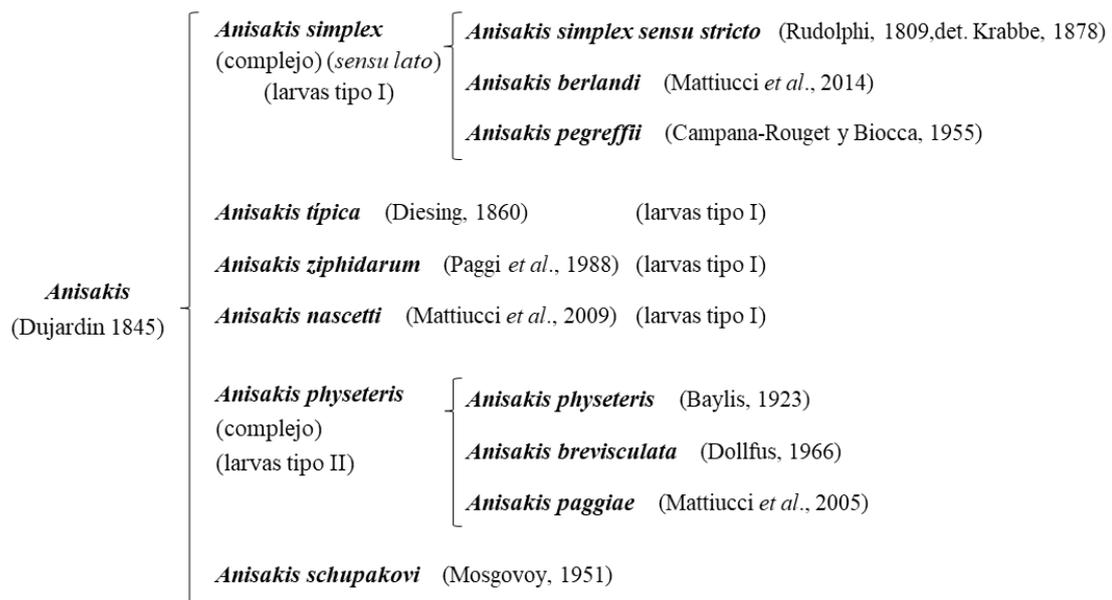


Figura 4. Clasificación de especies del género *Anisakis* y sus morfotipos I y II (González, 2018)

Particularmente, las larvas L3 de *A. simplex* son de color blanquecino o pardo cuando están encapsuladas en el músculo de los peces. Se caracterizan por tener una longitud que varía entre 15-30 mm y un diámetro entre 0,10-0,60 mm (Smith, 1983). Presentan un poro excretor situado entre las bases de los labios rudimentarios subventrales con diente cuticular (perforador); un ventrículo más o menos desarrollado y sin apéndice ventricular ni ciego intestinal (Hurst, 1984). El plano de unión ventrículo-intestino es oblicuo y el extremo posterior, que tiene forma cónica, finaliza en un mucrón (Timi *et al.*, 2001; Rello *et al.*, 2004).

2.1.3. Ciclo biológico

En general, el ciclo biológico de la familia Anisakidae está constituido por un estadio de huevo, cuatro fases larvares y adulto con sexos separados. Las fases adultas de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* se localizan en el estómago de mamíferos marinos y/o aves ictiófagas, mientras que en el género *Hysterothylacium*, el hospedero definitivo lo constituyen distintas especies de peces (Rello *et al.*, 2004).

Para el género *Anisakis*, el ciclo biológico comienza cuando los adultos copulan y se produce la ovoposición en el lumen del hospedero definitivo, los huevos del primer estadio larvario

(L1) de aproximadamente 50 μm de diámetro son liberados al agua de mar mediante las heces del hospedero definitivo, donde embrionarán tras un periodo de incubación (Smith, 1983).

En esta etapa de vida libre en el medio acuático, experimentan dos mudas, de L1 a L2 y luego de L2 a L3, ambas dentro del huevo (Køie *et al.*, 1995). En estas condiciones, se libera del huevo el tercer estadio larvario (L3) que conserva aún la cutícula de L2 la cual le proporciona la resistencia suficiente para sobrevivir libre en el medio marino hasta por cuatro semanas (13-18°C) (Smith, 1971). Las larvas L3 permanecen libres hasta que son ingeridas por crustáceos planctónicos (principalmente eufásidos), que actúan como hospederos intermediarios, en los que crecen (4,2 – 20 mm) para convertirse en infectantes para los hospedadores definitivos (Køie, 2001). En esta etapa, las larvas son consideradas muy activas e infectivas.

En la naturaleza, por medio de la cadena alimentaria, las larvas L3 tienen pocas probabilidades de infestar directamente a un hospedero definitivo, a menos que éste se alimente casi exclusivamente de pequeños crustáceos. En el ciclo epidemiológico, son capaces de parasitar diversas especies de peces teleósteos y cefalópodos (hospedero de transporte u paraténico) entre otros, los cuales forman parte de la dieta del hospedero definitivo. Las larvas liberadas pueden penetrar la pared del tracto digestivo y alcanzar la cavidad corporal, en esta etapa no experimentan ningún tipo de muda, aunque pueden aumentar de tamaño, conservando su capacidad infestante. Finalmente, se cierra el ciclo biológico cuando los hospederos definitivos ingieren los peces, zooplancton o cefalópodos infestados y se produce la cuarta y quinta muda, llegando a estadio larvario L4 y nemátodo adulto (González, 2018; Køie, 2001; Rello *et al.*, 2004). En la Figura 5 se representa gráficamente el ciclo biológico de *Anisakis* spp.

Sin embargo, el ciclo biológico puede verse interrumpido cuando el hombre aparece como huésped accidental al ingerir a los hospederos intermediarios como: pescado o cefalópodos crudos (sushi, carpaccio, ceviche, etc.), así como ahumados, semiconservas, salazón, pescado seco o en vinagre que albergan larvas vivas L3 de *Anisakis*. En esta situación, las larvas no evolucionan ni se reproducen, pero causan patologías gastro intestinales y alérgicas. (Nagasawa, 1990, Smith & Wootten, 1978).

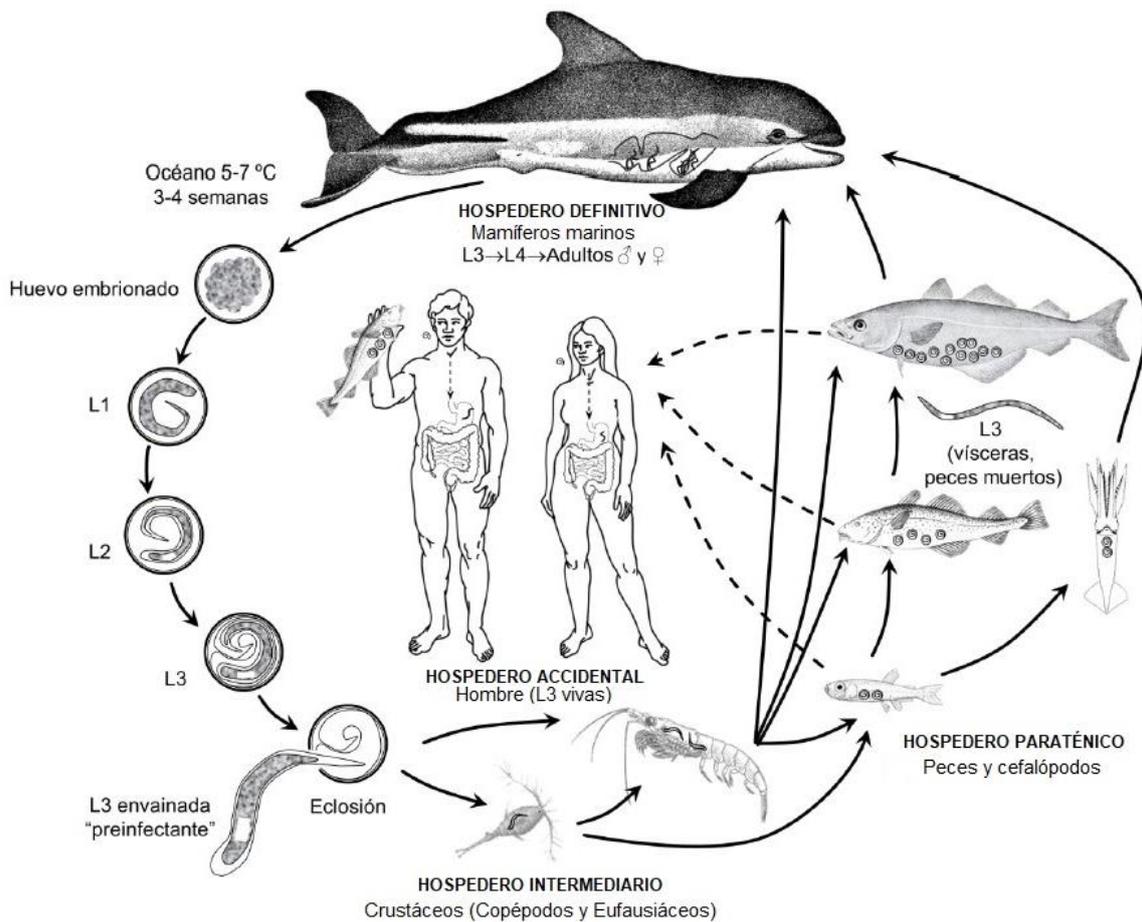


Figura 5. Ciclo biológico de *Anisakis simplex* (González, 2018).

2.1.4. Distribución geográfica

Según Abollo *et al.*, (2001), citados por Lymbery & Cheah (2007), se han encontrado larvas de *Anisakis* en más de 200 especies de peces y 25 especies de cefalópodos en todo el mundo, mientras que las larvas de *Pseudoterranova* han sido reportadas en más de 75 especies de peces en el Atlántico norte (Desportes & McClelland, 2001).

Mattiucci & Nascetti (2008) señalan que *A. pegreffii* está principalmente distribuido en el mar mediterráneo y en el hemisferio sur, *A. simplex s.s.* en el Atlántico norte y en el Océano Pacífico, mientras que *A. simplex C* se encuentra en las costas del Pacífico y en el hemisferio sur. En la Figura 6 se observa la magnitud de la distribución de *Anisakis* a nivel mundial.

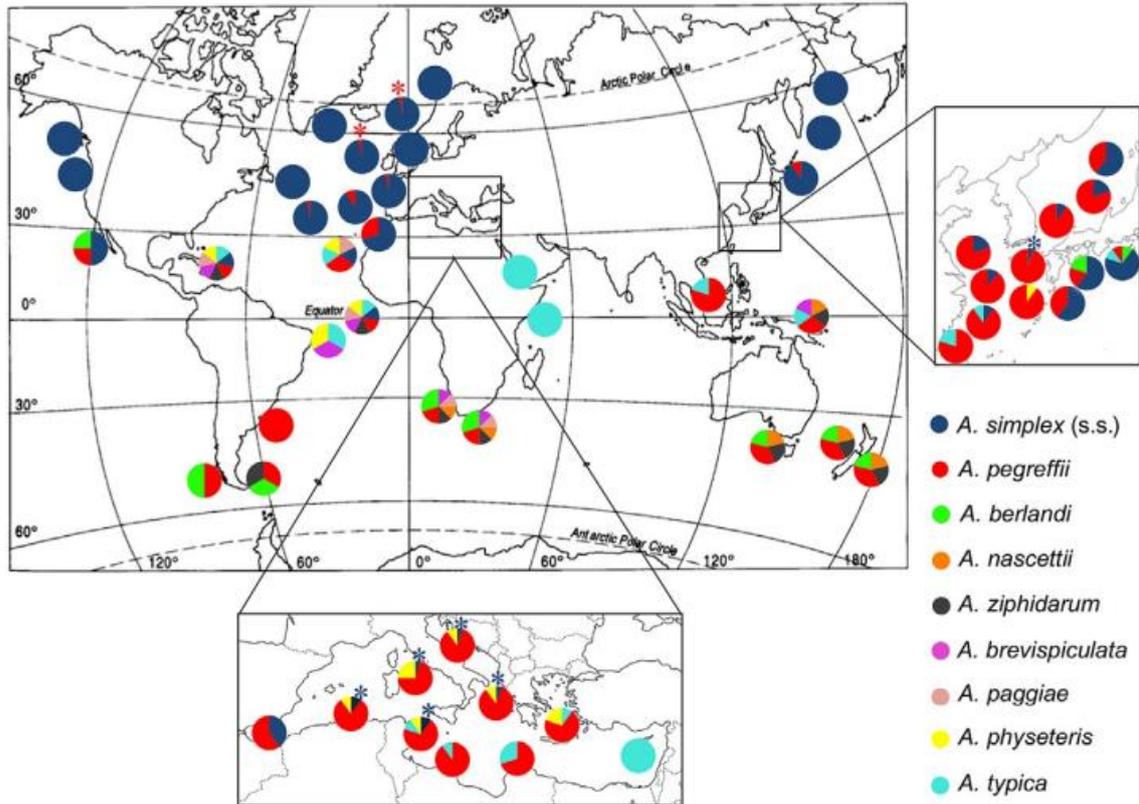


Figura 6. Mapa con la distribución geográfica de *Anisakis* spp. identificadas genéticamente a partir de especies de importancia comercial. Los asteriscos (*) indican que el hallazgo está relacionado con la migración del hospedero (Mattiucci *et al.*, 2018).

2.1.5. Hábitat

Respecto a la localización en el hospedero, según Osanz (2001) y Smith & Wootten (1978), en general, las larvas vivas del género *Anisakis* se presentan enrolladas en forma de espiral bajo el tejido conectivo, y pueden ubicarse en la submucosa del tubo digestivo, en la cavidad abdominal, en la superficie hepática, en las gónadas, entre los mesenterios y en el músculo de los peces. En cefalópodos, pueden localizarse dentro del tracto digestivo o en las vísceras de forma libre. También pueden encontrarse rodeadas por una cápsula (González & Mendo, 1998; Petersen *et al.*, 1993; Sarmiento *et al.*, 1999; Céspedes, 2010)

2.2. Medidas para la reducción del riesgo asociado a *Anisakis* spp.

De acuerdo con la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2011), se pueden tomar medidas para reducir el riesgo de infestación accidental del consumidor con larvas de *Anisakis* spp. de aplicación en toda la cadena alimentaria:

Previo a la captura, se debe evitar faenar en zonas de pesca que presentan altas prevalencias de parásitos. Durante la captura puede realizarse la evisceración para evitar la migración de las larvas de las vísceras al músculo, sin embargo, se debe evitar arrojar las vísceras al mar ya que se estaría reincorporando los parásitos al medio, ampliando su distribución e incrementando la parasitosis en las diferentes especies del ecosistema. Asimismo, luego del desembarque, se recomienda la inspección visual, el lavado de la cavidad abdominal y si es posible, en el caso de filetes de pescado, la eliminación de la musculatura hipoaxial.

Si bien la eliminación física de las larvas ya sea en la manipulación a bordo o después del desembarque en tierra, pueden reducir el peligro asociado a *Anisakis* spp., no lo eliminan y en muchos casos tampoco lo reducen a un nivel aceptable. Al respecto la EFSA (2010) detalla en un informe los tratamientos tecnológicos necesarios para la inactivación de las larvas de *Anisakis* spp. en productos hidrobiológicos, que se detallan a continuación:

Entre los tratamientos físicos el más recomendado para la inactivación del parásito es la congelación y almacenamiento en congelación. De acuerdo al Reglamento (CE) N°853/2004 de la legislación de la Unión Europea los productos que se van a consumir crudos o poco procesados (ahumado en frío, escabechado o marinado) deben congelarse a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ en todas las partes del producto por al menos 24 horas; por otro lado, según la FDA la congelación deberá ser a temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante 7 días o $\leq -35^{\circ}\text{C}$ durante 15 horas.

El tratamiento térmico por adición de calor también inactiva las larvas, algunos autores recomiendan la aplicación de temperaturas de 60° en el centro térmico por un minuto (Bier, 1976), sin embargo, hay estudios que han observado movilidad de larvas sometidas a tales condiciones por lo que proponen para esta temperatura una duración mayor a los 10 minutos (Vidaček *et al.*, 2010). Otros tratamientos físicos que podrían coadyuvar a tal fin incluyen las altas presiones, electrocución, irradiación y ahumado, mientras que entre los tratamientos químicos estudiados se señala la salazón, acidificación (marinado) y la adición de extractos vegetales, aunque debe evaluarse también la efectividad de su utilidad en la industria (EFSA, 2010)

2.3. Detección de larvas de anisákidos

En general, existen métodos que permiten determinar la presencia de larvas de *Anisakis* spp. tanto en el músculo como en las vísceras de pescado, sin embargo, tienen como principal desventaja la destrucción de la pieza a examinar (Olivares, 2012). Los métodos más utilizados según el informe de EFSA (2010) se describen a continuación:

2.3.1. Inspección visual

Según Huang (1990), consiste en la examinación directa de larvas en diferentes partes del pescado, tales como el paquete visceral, cavidad corporal y musculatura perivisceral. Este es un método de cuantificación no destructivo, siendo el más utilizado por su facilidad de aplicación, por ello se sigue empleando en la industria procesadora de productos pesqueros.

La inspección o examen visual resulta efectiva cuando se realiza en peces o filetes pequeños ya que las larvas se hallan cerca de la superficie, por tal razón su empleo en especies de pescado grandes o que albergan numerosas larvas musculares no es suficiente ya que es necesario una fragmentación de los tejidos para detectar la mayoría de las larvas no visibles.

Adicionalmente, Huang (1990), citado por Olivares (2012), menciona que este método permite determinar entre 45-83% de larvas localizadas en el músculo de algunas especies de peces como arenque, jurel o caballa.

2.3.2. Digestión ácida

Este es un método destructivo por lo que no se recomienda su uso en la industria. Consiste en someter los filetes de pescado a una solución de pepsina y ácido clorhídrico a 37°C para separar las larvas de la musculatura u otros tejidos (vísceras) en la que se encuentran contenidas (EFSA, 2010).

Según Rodríguez-Mahillo *et al.* (2008) se debe tener en consideración que la eficacia de este método se verá disminuida en caso la cutícula de las larvas se encuentre alterada por algún otro proceso previo, de ser así las larvas también serán digeridas y la recuperación de estas será menor a la esperada.

2.3.3. Compresión - UV

Este método resulta de la combinación del método de prensado y la transiluminación con luz ultravioleta, dando lugar a una técnica rápida para la cuantificación de nemátodos en filetes de pescado congelado y otros productos pesqueros. Consiste en colocar la muestra en una bolsa de plástico, someterla a una compresión significativa hasta obtener una capa delgada de 2 a 3 mm, se congela por unas horas y se analiza directamente bajo luz UV a 366 nm. Los nemátodos pueden ser contados fácilmente ya que muestran una brillante fluorescencia blanco-azulada (Karl & Leinemann, 1993).

A diferencia del método de digestión artificial, el cual emplea una solución acuosa (Pepsina/HCl), este tiene la ventaja de poder determinar el sitio de infección larval aproximado tanto en las vísceras como en el músculo (Levsen & Karl, 2014).

2.4. Identificación de especies de *Anisakis* spp.

2.4.1. Identificación morfológica

Diferentes autores realizan la identificación de estos parásitos nemátodos, presentes tanto en cefalópodos como en peces, mediante microscopía óptica y electrónica en base a sus características morfológicas y con el uso de claves taxonómicas de acuerdo con Timi *et al.* (2001), Smith & Wootten (1978), Berland (1961), Shiraki (1974), Koyama *et al.* (1969), Matsuura *et al.* (1992), Moravec (1998), Smith (1983), (Felizardo, *et al.*, 2009, Céspedes, 2010; Quiroz, 2014).

La identificación y clasificación específica es difícil en especímenes adultos y más complicada si se trata de estadios larvales, llegando únicamente a identificarse a nivel de género (Mattiucci *et al.*, 2017).

2.4.2. Identificación molecular

De acuerdo a Mattiucci *et al.*, (2018), dado que la especiación no siempre va acompañada de cambios morfológicos, es muy probable que el número real de especies biológicas sea mayor al recuento actual de especies nominal ya que estas últimas se ajustan al concepto de especie morfológica o tipológica, por lo que la identificación específica de los parásitos del género *Anisakis* es fundamental para la comprensión de su biodiversidad tanto a nivel de especies como genético.

Se han desarrollado metodologías de biología molecular que no precisan al parásito entero para identificarlo, sino que tiene por objetivo detectar el ADN de anisákidos en muestras homogenizadas de productos pesqueros (Mattiucci *et al.*, 2018; Villalobos, 2019)

Mullis *et al.* (1986) citado por Madrid (2015), describe a la PCR (Polimerase Chain Reaction) como una técnica molecular que permite la amplificación de fragmentos específicos de ácidos nucleicos de los cuales se conocen las secuencias inicial y final. Si una especie o genotipo tiene este fragmento de ADN, se puede utilizar una pareja de oligonucleótidos para amplificarlo.

Se trata entonces de un método rápido y específico para la detección e identificación taxonómica de los parásitos del pescado ya que realiza una caracterización diferencial dentro de las larvas del mismo género con el fin de conocer a detalle las especies presentes en los ejemplares evaluados (D'Amelio *et al.*, 2000).

2.5. Anisakidosis y anisakiasis

La anisakidosis se refiere a la infección de personas con larvas de nemátodos que pertenecen a la familia Anisakidae, y la anisakiasis es la infección generada por parásitos del género *Anisakis*, ambas constituyen enfermedades zoonóticas graves (FAO/WHO, 2014). Las manifestaciones clínicas de la anisakidosis en general, y de la anisakiasis en particular, son variadas y no patognomónicas, fundamentalmente de tipo alérgico y/o digestivo (Madrid, 2015).

Según la EFSA (2010), *Anisakis simplex* es el principal parásito asociado a los productos hidrobiológicos de origen marino que causa respuestas alérgicas clínicas. Los fenotipos clínicos a causa de *A. simplex* descritos a la actualidad son (González, 2018):

- **Anisakiosis gástrica:** Ocasionada por la ingesta de productos pesqueros crudos o poco cocidos que contienen larvas vivas. Se da la penetración gástrica o intestinal del nemátodo provocando una dolor epigástrico o intestinal grave, náuseas y vómitos en las primeras 12 horas desde el consumo. Se describe como una reacción inflamatoria aguda, de tipo alérgico y local.
- **Anisakiosis gastroalérgica:** Se producen síntomas digestivos, pero estos se ven superados por los síntomas alérgicos agudos como urticaria, angioedema y

anafilaxia, los cuales podrían estar relacionados con un mecanismo natural de defensa mediado por IgE que busca la expulsión de la larva durante las primeras horas de ocurrida la infección (Daschner *et al.*, 2010; Daschner & Cuéllar, 2010; Audicana *et al.*, 1995; 2002). Mattiuci *et al.* (2013) ha reportado reacciones gastroalérgicas por *A. pegreffii*.

- **Urticaria crónica asociada a sensibilización por *A. simplex*:** La urticaria crónica puede ocurrir en individuos genéticamente predispuestos que hayan presentado parasitación previa. No tiene una causa definida; sin embargo, su mecanismo de acción consiste en la degranulación de los mastocitos, caracterizada por la aparición espontánea de habones en una frecuencia de dos veces a la semana y por un periodo que puede ser mayor a los 2 meses. Adicionalmente, de acuerdo a Daschner *et al.* (2010), los pacientes diagnosticados con urticaria crónica cuentan historia de alergia inducida por el consumo de pescado o síntomas abdominales y pruebas cutáneas positivas e IgE específica frente a *A. simplex*.

2.6. Antígenos y alérgenos de *A. simplex*

Un antígeno es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune; un alérgeno es un antígeno capaz de producir anticuerpos IgE pudiendo, aunque no siempre, inducir una reacción de hipersensibilidad en personas susceptibles (González, 2018; Rodríguez-Mahillo *et al.* 2010).

De acuerdo con Valls *et al.* (2003), se conocen tres grupos de moléculas antigénicas:

- **Antígenos somáticos.** Son los más abundantes en los nemátodos, se obtienen por homogenización de las larvas enteras y contienen todas las proteínas solubles del parásito. Su peso molecular varía entre 13 y 150 kDa (Iglesias *et al.*, 1993)
- **Antígenos de excreción/secreción (E/S).** Se ha especificado que estas moléculas son sintetizadas en la glándula esofágica dorsal o células secretoras del tracto digestivo y sirven para que el parásito penetre en la mucosa gástrica (Kobayashi *et al.*, 1972). Se ha demostrado que los anticuerpos producidos frente a estos antígenos son los primeros en aparecer (Iglesias *et al.*, 1993). Además, las proteínas de este antígeno son varias, pero las de bajo peso molecular (14, 17 y 18 kDa) sólo son

reconocidas por los sueros de los ratones infectados con la larva viva de *A. simplex*. Valls *et al.* (2003)

- **Antígenos de superficie.** Son moléculas que se encuentran en la cutícula de este y otros nemátodos. Se expresan cuando ocurre la transición del tercer al cuarto estadio larvario (L3 a L4). Se ha sugerido que son menos antigénicas y específicas que los antígenos de tipo E/S y somáticos; sin embargo, puede ocurrir que estas moléculas cobren mayor relevancia en el desarrollo de un estímulo crónico (Baeza *et al.*, 2001)

De acuerdo con Daschner *et al.*, (2012), para que *A. simplex* produzca una reacción alérgica en el individuo, es necesaria la infestación del tracto gastrointestinal con la larva viva, en ese sentido, los alérgenos de *A. simplex* presentarían un comportamiento distinto a los alérgenos alimentarios. Sin embargo, para su estudio y clasificación, el International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee (www.allergen.org), considera a todos los alérgenos de *A. simplex* como alérgenos alimentarios. Los catorce principales alérgenos derivados de *A. simplex* y sus características se muestran resumidas en la Tabla 1.

2.7. Detección de alérgenos de *A. simplex*

En la actualidad, las alergias alimentarias representan un importante problema de salud, por ello es importante la aplicación de métodos que permitan detectar la presencia de proteínas alérgicas en los alimentos (Poms *et al.*, 2004).

Los métodos que se basan en proteínas implican técnicas inmunológicas (basadas en anticuerpos); mientras que los métodos basados en el ADN amplifican los fragmentos específicos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el que la especificidad se logra mediante el uso de cebadores que facilitan la amplificación de ADN procedente del alimento (Van Hengel, 2007).

La Patente N° 2 340 978 *Método de extracción y detección de antígenos de Anisakis en alimentos destinados al consumo humano y animal* (Tejada *et al.*, 2010), ha desarrollado un método que permite detectar y cuantificar por Western blot y Dot blot alérgenos de *A. simplex* en músculo de pescado y productos procesados (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010; Tejada *et al.*, 2014).

Tabla 1. Alérgenos caracterizados de *A. simplex*

| Alérgeno | Peso molecular (kDa) | Antígeno del Nemátodo | Proteína | Reactividad en pacientes sensibilizados |
|----------|----------------------|-----------------------|------------------------------|---|
| Ani s 1 | 24 | Excretor-Secretor | Inhibidor de serín-proteasas | 85% |
| Ani s 2 | 97 | Somático | Paramiosina | 88% |
| Ani s 3 | 41 | Somático | Tropomiosina | - |
| Ani s 4 | 9 | Excretor-Secretor | Cistatina | 27% |
| Ani s 5 | 15 | Excretor-Secretor | Proteína SXP/RAL | 25-49% |
| Ani s 6 | 7 | Excretor-Secretor | Serpin | 18% |
| Ani s 7 | 139 | Excretor-Secretor | Glicoproteína | 83%-100% |
| Ani s 8 | 15 | Excretor-Secretor | Proteína SXP/RAL | 25% |
| Ani s 9 | 14 | Excretor-Secretor | Proteína SXP/RAL | 13% |
| Ani s 10 | 21 | Somático | - | 39% |
| Ani s 11 | 27 | - | - | 50% |
| Ani s 12 | 31 | - | - | 57% |
| Ani s 13 | 37 | - | Hemoglobina | 64% |
| Ani s 14 | 24 | - | - | 54% |

Fuente: (IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2021)

2.8. *Dosidicus gigas* (D'Orbigny 1835): “pota” o “calamar gigante”

2.8.1. Taxonomía

La “pota”, calamar gigante” o “jumbo squid” *D. gigas* es un organismo invertebrado, que pertenece a la clase Cephalopoda y familia Ommastrephidae. Se ha reconocido que el género *Dosidicus* (que solo incluye a la especie *D. gigas*), de acuerdo con su jerarquía filogenética, tiene mayor cercanía con el género *Omastrephes* que con *Sthenoteuthis*, razón por la cual

presentan características similares en su morfología y distribución (Nigmatullin *et al.*, 2001). La clasificación taxonómica para esta especie, presentada por Alegre (2011):

Phylum: Mollusca
Clase: Cephalopoda
Orden: Teuthida
Superfamilia: Architeutacea
Familia: Ommastrephidae
Subfamilia: Ommastrephinae
Género: *Dosidicus*
Especie: *Dosidicus gigas*

2.8.2. Características morfológicas

La pota es uno de los calamares de mayor tamaño corporal y abundancia. Respecto a su morfología, esta provisto de un manto grande, grueso y robusto y una pequeña concha interna (luma), presenta aletas romboidales cuya longitud representa del 41 al 49% de la longitud del manto, mientras que su ancho representa del 49 al 65% del mismo. (IMARPE, 1993). Tiene un sifón de invaginación profunda, dos tentáculos y ocho brazos en la cabeza tiene dos ojos con proyección anterior, sin párpados y un pico. Se caracteriza por presentar fotóforos pequeños en la superficie del manto y puede llegar a medir 1.2 metros de longitud de manto, 2 metros de longitud total y a pesar hasta 65 Kg (Nigmatullin *et al.*, 2001; Nesis, 1983).

2.8.3. Bioecología y desembarque

La pota es un recurso principalmente oceánico con características neríticas de amplia distribución en el Pacífico Este, desde Baja California (37° N) hasta Chile (47° S), habiendo ampliado su extensión en ambos hemisferios después de El Niño 1997-1998 (Mariátegui *et al.*, 2018; Nigmatullin *et al.*, 2001).

Es una especie abundante y juega un rol importante dentro de los ecosistemas pelágicos del talud continental y aguas costeras adyacentes, se distribuye entre la superficie y los 1200 m de profundidad (Nesis, 1983). Presenta una gran plasticidad fenotípica (adaptación a cambios ambientales) y entre sus características propias, destacan: alta tasa de crecimiento,

que de acuerdo con Roper (1984) puede ser de 6 cm al inicio del primer año de vida y 2 cm durante el segundo. Presenta un ciclo de vida corto (1-2 años), alta fecundidad, metabolismo rápido y ecológicamente oportunista (FAO, 2005).

La pesquería dirigida al calamar gigante en Perú tiene sus inicios en el año 1991, con la participación de una flota calamarera de bandera extranjera que operó bajo licencias de pesca. Actualmente la actividad extractiva de *Dosidicus gigas* lo constituye principalmente la flota artesanal, dividiéndose en flota artesanal del norte (alrededor de los 5°S) y del sur (alrededor de los 18°S). En la costa peruana, Rubio & Salazar (1992) señalaron que la zona comprendida entre Paita y Cabo Blanco frente a Punta Sal y Zorritos presenta una mayor concentración de pota; sin embargo, de acuerdo con Mariátegui *et al.*, (2018), las áreas de pesca de mayor concentración se ubican desde la frontera norte a los 09° y desde los 11° hasta los 17°. En la Figura 7 se presenta la distribución de *D. gigas*.

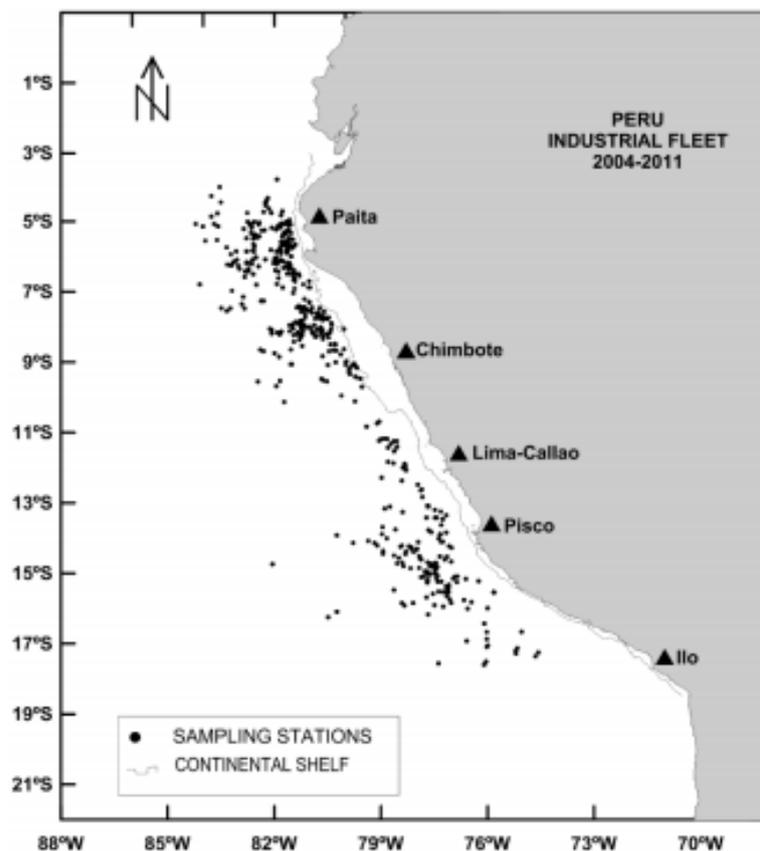


Figura 7. Distribución del calamar gigante *Dosidicus gigas* en la Costa Peruana año 2004-2011 (Alegre *et al.*, 2014)

De acuerdo con PRODUCE (2019), durante la última década, el mayor desembarque de esta especie fue registrado en el año 2014 con 556 156 toneladas. Asimismo, las estadísticas pesqueras proporcionadas por la FAO (2020b) demuestran que, en promedio, las capturas peruanas de pota han representado casi el 50% de los desembarques mundiales de la especie en varios años; sin embargo, la participación peruana se ha reducido por una menor captura influenciada por la variabilidad ambiental ocurrida desde el 2014, es decir, la ocurrencia de un periodo cálido con anomalías positivas en la temperatura superficial del mar peruano incluyendo “El Niño costero” del 2017, año en que se registró el menor desembarque con 295 975 toneladas (Guevara *et al.*, 2018; PRODUCE, 2019).

Actualmente, la captura de pota constituye la segunda actividad pesquera más importante del Perú en términos de volumen de desembarque ubicándose justo después de la anchoveta y en términos de valor FOB exportado, puesto que solo en el 2018 la pota fue el recurso que lideró las exportaciones de congelados pesqueros con una participación del 54,7% teniendo como principales destinos a España y China seguido de Tailandia, Corea del Sur y Japón (PRODUCE, 2019; PROMPERU, 2018). Esto nos indica que para mantener dichos mercados internacionales es necesario que los exportadores peruanos mantengan sus certificaciones de calidad como HACCP, GMP, GAP, BRC, etc. ya que dependiendo del país de destino se deben cumplir ciertos requisitos, siendo la Unión Europea la más exigente en materia sanitaria.

2.8.4. Parásitos en *D. gigas*

Respecto a la fauna parasitaria de *D. gigas*, esta se compone por especies de céstodes como *Phyllobothrium sp.*, *P. speciosum*, *Hepatoxylon trichiuri*, *Tentacularia coryphaenae*, larvas de trematodos de la familia *Didimozoidae*, larvas de nemátodos de la familia *Ascarophididae* como: *Spinitectus sp.* y nemátodos zoonóticos de la familia Anisakidae como: *A. simplex*, *A. physeteris*, *Contracaecum sp.* y *Porrocaecum sp.* (syn. *Pseudoterranova*) con niveles de prevalencia variables (Céspedes, 2010; Iannacone & Alvariño, 2009; Shukhgalter y Nigmatullin, 2001; Gonzáles & Mendo, 1998).

Asimismo, es importante señalar que se ha reportado la presencia de anisákidos en especies de peces que podrían formar parte de la dieta de *D. gigas* (Serrano-Martínez *et al.*, 2017; Chero *et al.*, 2016; Chero *et al.*, 2014; Quiroz LK, 2014; Vásquez-Ruiz & Jara-Campos, 2012; Iannacone *et al.*, 2012). No obstante, el estudio de parásitos zoonóticos, como *Anisakis*

spp., en pota sigue siendo limitado tanto en el recurso biológico como tal, así como las implicancias de las larvas y sus alérgenos en procesos tecnológicos orientados a la obtención de productos alimenticios a base de este recurso pesquero.

2.8.5. Composición química

En general, la composición química del músculo de especies marinas puede variar entre individuos de la misma especie debido a factores como: sexo, talla, alimentación, estación del año, zona de captura, etc. ocasionando cambios en el sabor, color, textura y apariencia (Sikorski, 1994; Huss, 1999). De acuerdo con Ibarra (2006), el estado de madurez sexual al momento de la captura (p. ej., individuos desovados) también influye en la composición química. Al respecto, Perea *et al.* (2018) mencionan que la escala de madurez gonadal para el calamar gigante *D. gigas* consta de cuatro fases para las hembras y tres fases para los machos.

El contenido de proteínas de la pota *D. gigas* es similar al de pescados magros. Los compuestos no proteicos representan el 37% del total de compuestos nitrogenados. Además, esta fracción no proteica es de bajo peso molecular y se compone principalmente de bases volátiles nitrogenadas (N-BVN), óxido de trimetilamina (OTMA) que al degradarse da lugar a la formación de trimetilamina (TMA), el cloruro de amonio (NH_4Cl) el cual es acumulado en el cuerpo con relación al tamaño del animal, aminoácidos libres y octopina que es el producto final del metabolismo anaeróbico en cefalópodos y suele encontrarse en concentraciones entre 450-1110 mg/100g. Estos componentes serían los responsables del sabor desagradable “off-flavor” ácido-amargo (Yamanaka, 1995; Sikorski, 1994; Huss, 1999; Omote, 2019)

En cuanto a la fracción lipídica, esta se compone principalmente por fosfolípidos y alrededor de 4% de colesterol. Asimismo, se ha reportado que presenta una composición de ácidos grasos muy similar a la de tejidos de especies de peces de carne blanca como lisa y lenguado (Sikorski, 1994). Sus componentes minerales más abundantes son fósforo, potasio, sodio y magnesio (Armenta, 2006).

En la Tabla 2 se muestra la composición química proximal del manto de pota de acuerdo con diferentes autores.

Tabla 2. Composición química proximal (g/100 g) del manto de pota *D. gigas*

| Componente | Promedio (g/100 g) ^a | Promedio (g/100 g) ^b | Promedio (g/100 g) ^c | Promedio (g/100 g) ^d |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Humedad | 81,1 | 85,3 | 85,32 | 83,0 |
| Proteína bruta | 16,0 | 14,1 | 11,5 | 14,2 |
| Grasa | 1,1 | 0,5 | 0,48 | 1,4 |
| Ceniza | - | 1,2 | 0,92 | 1,0 |

Fuente: ^a IMARPE(1996), ^b Maza *et al.* (2003), ^c Ibarra *et al.* (2006) y ^d Omote (2019)

La fracción comestible de este cefalópodo es de elevado valor nutricional ya que presenta un importante contenido de proteínas, aminoácidos esenciales y bajo contenido de grasas; asimismo, a diferencia de los peces su carne es de color blanco y no presenta espinas ni escamas, características que favorecen su empleo como materia prima o suplemento proteico en la elaboración de productos alimenticios con valor agregado.

2.9. Concentrado proteico de pota (CPP)

2.9.1. Antecedentes

En el marco del cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), también llamados Objetivos Mundiales, incorporados en las principales políticas y estrategias nacionales de desarrollo, el Gobierno Peruano, como estado miembro de la Organización de las Naciones Unidas, aprobó el “Plan Nacional para la Reducción y Control de la Anemia Materno Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil en el Perú: 2017-2021” con el objetivo de reducir la tasa de desnutrición crónica en menores de cinco años de 13,1% a 6,4% y reducir los niveles de anemia en niñas y niños desde los seis hasta los treinta y seis meses de edad de 43,61% a 19%, para el año 2021.

De acuerdo con la Encuesta Demográfica y de Salud Familiar ENDES, en el 2020 la desnutrición crónica infantil afectó al 12,1% de niñas y niños menores de cinco años de edad. (Instituto Nacional de Estadística e Informática INEI, 2021). Sin embargo, es importante señalar que existe una gran diferencia de prevalencia de acuerdo al área de residencia. Solo en el área urbana la desnutrición crónica afectó al 7,2% de los niños mientras que en el área

rural afectó al 24,8%. Las zonas rurales con mayor prevalencia (>20%) de desnutrición crónica fueron Huancavelica, Cajamarca, Loreto.

La reducción de la tasa coincide con el patrón de la OMS, que señala la tendencia a la disminución a través de los años; sin embargo, esta no se ha reducido lo suficiente. Más aún, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico OCDE señalan que la pandemia causada por el coronavirus (COVID-19) ha agravado la desnutrición y que el efecto combinado de la pérdida de ingresos y el aumento de precios de los alimentos hace difícil garantizar la seguridad alimentaria para una población mundial que sigue creciendo por lo que afirman que sin esfuerzos adicionales de los estados miembros no se alcanzará el objetivo dos (Hambre Cero) de los diecisiete Objetivos de Desarrollo Sostenible ODS, para el 2030. (OECD/FAO, 2021)

A nivel nacional, se vienen implementando políticas públicas como el “Plan Nacional de Seguridad Alimentaria y Nutricional 2015-2021” con el que se busca corregir patrones alimentarios de malnutrición, garantizar la disponibilidad de alimentos nutritivos e inocuos de origen agropecuario e hidrobiológico y asegurar su acceso sobre todo a la población más vulnerable. Asimismo, existen programas sociales que contemplan diversas estrategias que permitirían contribuir a lograr dicho fin como promover el desarrollo de alimentos fortificados ricos en hierro y micronutrientes para la alimentación infantil y la población de zonas críticas, así como el mejoramiento de las prácticas de alimentación infantil y de las gestantes incorporando alimentos ricos en hierro, variados, nutritivos, locales y en cantidades adecuadas.

Por otro lado, existe una tendencia global de consumo de alimentos saludables y al respecto, autoridades como el Ministerio de Producción y el Ministerio de Salud recomiendan la ingesta mínima de dos veces a la semana de pescados o productos derivados de recursos hidrobiológicos. En ese sentido, existe una oportunidad para el desarrollo de alimentos a base de proteínas de origen hidrobiológico altamente nutritivos y que a la vez permitan garantizar su disponibilidad e inocuidad.

2.9.2. Definición

Como se ha descrito en el Apartado 2.8.5, la pota *D. gigas* es un recurso rico en proteínas y aminoácidos grasos poliinsaturados, de poca grasa y sabor menos intenso, en comparación con otras especies, resultando idóneo su empleo en la elaboración de alimentos nutritivos con valor agregado.

De acuerdo con Sonu (1973), existen diferentes métodos para la obtención de concentrados proteicos a partir de animales marinos. Estos pueden dividirse en tres categorías: Métodos a base de extracción por solventes, Métodos enzimáticos y Otros. En la tercera categoría se agrupan los métodos orientados a la preparación de aislados proteicos funcionales manteniendo sus propiedades organolépticas. Además, señala que algunos de estos enfoques son modificaciones o combinaciones de los métodos de extracción por solvente y enzimáticos.

Careche, *et al.* (2004) desarrollaron y mejoraron una patente para la elaboración de un concentrado proteico obtenido a partir del músculo de cefalópodos basándose en la aplicación de un lavado del músculo en medio ácido (pH 4-5) y la consecuente precipitación isoelectrónica de sus proteínas miofibrilares. Este producto está constituido principalmente a base de agua (70-85%) y proteínas miofibrilares de cefalópodos (13-25%), se caracteriza por su alta capacidad gelificante, cuando en otro proceso, se mezcle con cloruro de sodio o potasio, se le añadan aditivos específicos y se someta a calentamiento o a alta presión.

Lazo (2006) desarrolló un método para obtener un concentrado proteico de pota con características sensoriales deseables que permitirían su utilización como insumo alternativo para el enriquecimiento del contenido proteico en productos de panificación, galletería, etc. En congruencia con ello, Roldán (2007), define al concentrado proteico de pota (CPP) como una harina concentrada, elaborada sin el uso de solventes químicos y obtenida únicamente a partir de la parte comestible o fracción muscular, descartando piel, vísceras, cartílagos y tentáculos, que presenta una concentración de proteína mayor al 85%, rica en ácidos grasos de tipo Omega 3 y que muestra buena estabilidad durante el almacenamiento. Ambos autores hacen referencia a una harina de pota precocida como concentrado proteico de pota. Asimismo, con relación a ello, diferentes autores han desarrollado productos de características similares al CPP con el objetivo de utilizarlos para enriquecer productos finales (Córdova, 2016; Calvo *et al.*, 2016; Ortega, 1995 citado por Yenque, 2016).

A modo de comparación, en el caso de concentrados proteicos a base de pescado, durante la lixiviación se puede hacer uso de solventes orgánicos como isopropanol, etanol, etc. que permiten la extracción de grasas. Por lo tanto, se definen dos tipos de concentrado, el tipo A (que utiliza solvente) y el tipo B (que no utiliza solvente), ambos son igual de nutritivos; sin embargo, el empleo de solventes aumenta los costos de producción. En la Tabla 3 se describen las diferencias en cuanto a la composición proximal de los concentrados proteicos de pescado y pota.

Tabla 3. Especificaciones técnicas de los concentrados proteicos de pescado y pota.

| Componente | Concentrado proteico de pescado ^a | | Concentrado proteico de pota ^b | Concentrado proteico de pota ^c |
|------------------|--|------------|---|---|
| | Tipo A | Tipo B | | |
| Proteínas | Mín. 75% | Mín. 60% | 86,04% | 85,70% |
| Humedad | Máx. 10% | Máx. 10% | 6,30% | 7,60% |
| Grasas | Máx. 0,5% | Sin límite | 2,7% | 3,90% |
| Cenizas | Máx. 15% | Máx. 20% | 4,96% | 1,84% |

Fuente: ^a Madrid *et al.* (1994), ^b Lazo (2006) y ^c Rojas (2009)

En cuanto al uso del concentrado proteico de pota “CPP” como insumo, algunos estudios están orientados a determinar su idoneidad evaluando su comportamiento fisicoquímico, organoléptico, funcional; sin embargo, también debe tenerse en cuenta que, en este caso, la materia prima empleada para la elaboración del concentrado proteico es un recurso con evidencia de presencia de helmintos endoparásitos zoonóticos como *Anisakis* spp., tal como se describe en el Apartado 2.8.4., por lo que los tratamientos tecnológicos aplicados en el procesamiento deben garantizar la obtención de un producto inocuo.

En tal sentido, el método de acuerdo con Lazo (2006) implica varias etapas entre las cuales está la cocción a una temperatura aproximada de 85°C con lo cual se estaría asegurando la muerte de las larvas de *Anisakis* spp. que puedan haber quedado enquistadas en el músculo de la pota. Sin embargo, ello no quita que el producto final “CPP” contenga residuos de

proteínas alergénicas de *A. simplex* y por ende se manifiesten cuadros alérgicos en la población previamente sensibilizada. Al respecto, diferentes estudios han demostrado que estos alérgenos son altamente resistentes al calor, a las altas presiones, así mismo se ha comprobado la presencia del alérgeno Ani s 4 tanto en pescado parasitado o larvas luego de someterlos a condiciones extremas de digestión con pepsina (Rodríguez- Pérez *et al.*, 2008; Olivares, 2012; Tejada *et al.*, 2007; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008).

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de ejecución y periodo de experimentación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Procesos e Ingeniería Pesquera y el Laboratorio de Microbiología Pesquera del Departamento Académico de Acuicultura e Industrias Pesqueras de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM).

La identificación de las larvas se realizó en el Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) y en el Departamento de Protozoología, Helmintología e Invertebrados (DPHI) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM)

El período de experimentación estuvo comprendido entre setiembre del 2019 y febrero del 2020.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Materia prima y material biológico

Para el estudio parasitológico se utilizaron 100 ejemplares de pota (*D. gigas*) procedentes de La Puntilla, Atico y Matarani. La longitud y peso promedio del manto fueron de 51.6 ± 3.54 cm y 2.450 ± 0.52 Kg respectivamente.

Para la inmunodetección de *Anisakis* spp. se colectaron 80 larvas anisakideas obtenidas a partir del manto y cavidad celómica de ejemplares de pota (*D. gigas*).

Para la elaboración de los concentrados proteicos se utilizaron los mantos de nueve ejemplares de pota conservados en congelación ($<18^\circ \pm 3^\circ\text{C}$, 4 meses).

3.2.2. Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitado de 50 mL, 100 mL

- Placas Petri de 90 mm. Diámetro
- Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos Crioviales de polietileno de 2mL
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL
- Tubos de ensayo de polipropileno
- Láminas porta objetos y laminillas
- Estuche de disección x 9 piezas, marca: Dura Med
- Otros: Coladora de acero inoxidable, Mesa de fileteo, Recipientes de plástico, Bandejas de plástico, Cuchillos de fileteo, Cronómetro, Wincha, Hielo, Bolsas de polietileno, Utensilios de limpieza.

3.2.3. Equipos

- Microscopio trilocular, marca GREETMED, con cámara CMEX-10 PRO
- Estereoscopio, marca LEICA
- Balanza analítica marca SARTORIUS BL210S
- Balanza digital, marca DENVER INSTRUMENT
- Potenciómetro marca HANNA, modelo EDGE
- Liofilizador FreeZone® Triad™ Freeze Dry System, modelo 7400030, LABONCO.
- Termómetro digital, MULTI-THERMOMETER
- Congeladora horizontal -20°C modelo H300, ELECTROLUX,
- Moledora de carne. Marca BERKEL
- Moledora de harina
- Horno secador, marca KTPERU
- Estufa eléctrica

3.2.4. Reactivos y otros

- Agua destilada
- Alcohol al 70 por ciento
- Suero fisiológico al 0.85 por ciento
- Glicerina
- Ácido láctico (Merck, Alemania)
- Cristales de fenol (Merck, Alemania)

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Análisis sensorial de la materia prima

La evaluación de la materia prima fue realizada tomando como referencia las características organolépticas de cefalópodos fresco-refrigerados de acuerdo con el “Manual de indicadores o criterios de seguridad alimentaria e higiene para alimentos y piensos de origen pesquero y acuícola”, según SANIPES (2010). Este método mide la calidad de la materia prima por valoración de mérito, siendo el máximo de 9 puntos para especímenes muy frescos y 5 puntos el límite por debajo del cual se descalifica y se considera No Apto para Consumo Humano.

3.3.2. Análisis sensorial del Concentrado proteico de pota

La evaluación sensorial de los 6 concentrados proteicos de pota obtenidos fue realizada tomando como referencia la “Tabla de análisis sensorial para harina de pota precocida (*Dosidicus gigas*) para consumo humano”, propuesta por Lazo (2006), detallada en el Anexo 1.

3.3.3. Análisis fisicoquímicos y pH

De acuerdo con el tipo de muestra: Materia prima (MP), muestras de proceso (Músculo cocido (MC), agua de cocción (AC), músculo lavado (ML), agua de lavado (AL)) y producto final (CPP), se realizó la determinación porcentual (%) de humedad, proteína total, grasa, ceniza y pH.

- **Humedad**

Se realizó de acuerdo con el método descrito por AOAC, 950.46 (2005)

- **Proteína total.**

Se realizó de acuerdo con el método descrito por AOAC, 984.13 (2005)

- **Grasa.**

Se realizó de acuerdo con el método descrito por AOAC, 2003.05 (2005)

- **Ceniza**

Se realizó de acuerdo con el método descrito por AOAC, 942.05 (2005)

- **pH**

Mediante el método del potenciómetro, según AOAC (2012)

3.4. Análisis estadístico

Para la evaluación estadística de la composición proximal de los seis concentrados de pota se aplicó el Análisis de Varianza (ANOVA) a fin de verificar la significancia al analizar proteína, humedad, grasa y ceniza.

Para el análisis de las muestras de proceso del presente estudio se realizó la prueba de Friedman para determinar significancias en la proteína de los diferentes tratamientos para la muestra AL1, por otro lado, se aplicó ANOVA para las muestras: AL2, ML1 y ML2.

Para la evaluación estadística de los Lotes de músculo lavado de merluza infestada se validó el cumplimiento de todos los supuestos para el ANOVA, a fin de verificar la significancia de proteína, humedad, pH y antígenos Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex*.

Se utilizó el programa estadístico RStudio versión 1.3.1056, 2009-2020.

3.5. Metodología Experimental

3.5.1. Estudio de nemátodos anisákidos en pota *D. gigas*

3.5.2.1. Obtención de material biológico

Se realizó el muestreo de 100 individuos de *D. gigas* durante el periodo comprendido entre setiembre y noviembre del 2019. Los ejemplares fueron proporcionados por la Empresa Derivados de Pota. La materia prima fue recepcionada en javas en condiciones de refrigeración, eviscerada, entera o seccionada, y fueron seleccionadas al azar en la planta de congelado para su evaluación. La temperatura durante la manipulación de las muestras fue <5°C. Se registraron los datos de procedencia de captura, fecha y hora de recepción e inspección en planta.

3.5.2.2. Registro de datos morfométricos

La examinación de los ejemplares se realizó en diferentes instalaciones. De manera preliminar, se realizó una inspección en condiciones de laboratorio, para lo cual las muestras fueron trasladadas en javas con hielo desde la planta de congelado hacia el Laboratorio de Procesos e Ingeniería Pesquera. Posteriormente, la evaluación se realizó *in situ* en la planta de congelado durante la recepción de materia prima.

Previa a la detección de parásitos, los ejemplares fueron numerados e identificados individualmente, se les realizó un examen visual externo para la revisión de posibles lesiones externas macroscópicas y se determinó su nivel de frescura de acuerdo a SANIPES (2010). Luego se procedió a tomar los datos morfométricos de cada ejemplar, para ello se colocó a los ejemplares ventralmente sobre la mesa de disección y utilizando una wincha y una balanza digital se procedió a determinar la longitud total y dorsal del manto en cm y el peso del manto en kg, respectivamente.

3.5.2.3. *Detección, colecta y fijación de parásitos anisákidos*

Se realizó la detección de parásitos anisákidos mediante examen visual simple y con la ayuda de un estereoscopio se examinaron el manto, restos de la cavidad celómica, pluma y gónadas. Los parásitos encontrados fueron extraídos empleando un bisturí, estilete y pinzas, evitando lesionarlos.

Se realizaron dos inspecciones, en la primera se colectaron y fijaron todas las larvas de anisákidos encontradas en el muestreo de *D. gigas* (n=100), y posteriormente se realizó la identificación morfológica. En la segunda inspección se colectaron larvas adicionales que se mantuvieron vivas en solución salina al 0,85% y en refrigeración ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) para su posterior liofilización e identificación molecular.

Para la fijación de los nemátodos anisákidos, se colocaron las larvas en una placa Petri y se lavaron en solución salina (0,85%); simultáneamente, en un vaso de precipitado, se calentó en baño maría, alcohol de 70% hasta 70°C . Se colocaron las larvas en una nueva placa Petri retirando la mayor cantidad de solución posible y se agregó rápidamente el alcohol caliente. Posteriormente, las larvas fueron preservadas en alcohol de 70% en crioviales de 5 mL previamente rotulados con los datos: Localización del parásito, Nombre científico del huésped, Número de huésped y Nombre del colector.

3.5.2.4. *Identificación morfológica de parásitos anisákidos*

La identificación de parásitos anisákidos se realizó en Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) y se contó con la asesoría de la Dra. Lidia Sánchez del Departamento de Protozoología, Helmintología e Invertebrados (DPHI) del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Las larvas de anisákidos fijadas anteriormente fueron aclaradas con lactofenol para la visualización de las estructuras anatómicas internas. El tiempo de aclaramiento varió entre especímenes debido al grosor de la cutícula. Se utilizó un microscopio estereoscopio que permitió la medición de los parásitos y sus estructuras a partir de lo cual se identificaron tomando como referencia las claves taxonómicas de acuerdo con Timi *et al.*, 2001; Felizardo, *et al.*, 2009; Saad *et al.*, 2012. Se realizó la toma de micrografías.

3.5.2.5. *Identificación molecular de parásitos anisákidos*

En un inicio se planteó la identificación a nivel molecular de los parásitos anisákidos. Para ello se realizó un segundo muestreo de ejemplares *D. gigas*. Se colectaron 40 larvas anisákidas colectadas del músculo y 40 larvas anisákidas colectadas de la cavidad celómica, se mantuvieron en solución salina (0.85%) en refrigeración (5°C, < 48 h) y posteriormente se liofilizaron en tubos Eppendorf de 2 mL. Con el fin de conservarlas en óptimas condiciones para su traslado hasta Madrid, España y poder llevar a cabo su análisis en coordinación con el Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos (ICTAN); sin embargo, debido a la pandemia del Covid – 19 producida por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 se generaron múltiples restricciones por lo que no se logró completar esta parte del estudio. Las muestras liofilizadas se conservan en el Laboratorio de Procesos e Ingeniería Pesquera de la UNALM.

3.5.2.6. *Análisis ecológico*

Se realizó el análisis cuantitativo de los nemátodos anisákidos presentes en los 100 ejemplares de pota muestreados. Se determinó los valores de prevalencia, intensidad media de infección, intensidad de infección y abundancia de acuerdo con Bush *et al.* (1997).

- **Prevalencia de infección (Prev).** Se calcula como la relación entre el número de hospederos parasitados de una especie particular de parásito dividido entre el número total de hospederos examinados y expresado en porcentaje.

$$\text{Prev} = \left(\frac{\text{Número total de ejemplares parasitados}}{\text{Número de ejemplares examinados}} \right) \times 100\%$$

- **Intensidad media de infección (IMI).** Se determina como el número total de parásitos de una especie particular encontrados en una muestra dividido entre el número de hospederos infectados con el parásito.

$$IMI = \left(\frac{\text{Número total de parásitos de una especie particular encontrados}}{\text{Número de hospederos infectados con aquel parásito}} \right)$$

- **Intensidad de infección (II).** Se expresa como el número máximo de individuos de una especie de parásito en particular en un solo hospedero infectado y sirve para conocer el hospedero más infectado.
- **Abundancia media de infección (AMI).** Se calcula como el número de individuos de una especie particular de parásito en una muestra de una especie hospedera dividido entre el número total de hospederos examinados (incluye los hospederos infectados y no infectados).

$$AM = \left(\frac{\text{Número total de parásitos de una especie}}{\text{Número de hospederos examinados}} \right)$$

En la presente investigación no se evaluó toda la población parasitaria, se analizaron solo larvas de nemátodos anisákidos, excluyendo otras especies parásitos.

3.5.2. Estudio comparativo del efecto del proceso de lixiviación de músculo de pota precocida durante la elaboración de concentrado proteico de pota (CPP) y de músculo crudo de merluza durante la elaboración de surimi, en la cuantificación de alérgenos de *A. simplex*

Para este estudio se realizó la elaboración de seis concentrados proteicos de pota de acuerdo con la metodología que se describe en el Apartado 3.5.1.1. Adicionalmente, a partir de data no publicada de Olivares (2012), quien realizó un proceso similar de lavados sucesivos tipo surimi en músculo de merluza, se realizó una evaluación comparativa del comportamiento de la proteína, pH y antígenos Anis 4 y Extracto crudo de *Anisakis simplex*. Se determinó el efecto potencial de la lixiviación, proceso que consiste en la aplicación de lavados sucesivos, en la eliminación de alérgenos de *A. simplex* durante la elaboración del Concentrado proteico de pota

3.5.2.1. Elaboración de Concentrado Proteico de pota

Se utilizaron los ejemplares de pota de los lotes evaluados durante el periodo de muestreo. Se retiró la cabeza, aletas y restos de vísceras quedando solo los mantos a los que se les realizó un lavado para la eliminación de restos de piel y suciedad. Posteriormente, los mantos fueron almacenados en congelación (-18°C; 4 meses) hasta su posterior uso.

La elaboración de los concentrados proteicos (CPP) fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Lazo (2006), con modificaciones para el presente estudio. En la Figura 8 se presenta el esquema experimental para los procesos de cocción de músculo y lixiviación del músculo precocido de pota *D. gigas*. En el Anexo 2 se presenta el diagrama del proceso de elaboración de los concentrados proteicos de pota *D. gigas*.

3.5.2.2. Determinación de alérgenos de *A. simplex* en músculo lavado de merluza

El alérgeno objeto de estudio es el Anis 4 por reunir características idóneas como un bajo peso molecular (9 kDa), resistencia a tratamientos que aplican condiciones extremas de calor y digestión (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007). Asimismo, de acuerdo con Moneo *et al.*, (2005), Anis 4 se considera un alérgeno de relevancia clínica dada la magnitud de los síntomas en los pacientes sensibilizados (27% reactividad), quienes presentaron episodios más severos de anafilaxia. También se ha demostrado su resistencia en procesos de autoclavado y que mantiene su capacidad de unir IgE y activar basófilos en pacientes sensibilizados (Carballeda, 2017).

Se tomaron como referencia los datos de porcentaje de proteína, pH, cantidad de antígenos Anis 4 y Extracto crudo de *Anisakis simplex* a partir de los lavados sucesivos tipo surimi en músculo de merluza con parasitación artificial (50 larvas/100g músculo), en que se utilizaron diferentes soluciones de lavado: H₂O, Agua y NaClO, Hipoclorito sódico 20 ppm. El músculo de merluza fue sometido a tres lavados sucesivos en proporción músculo:solución de lavado (p:v) de 1:4.

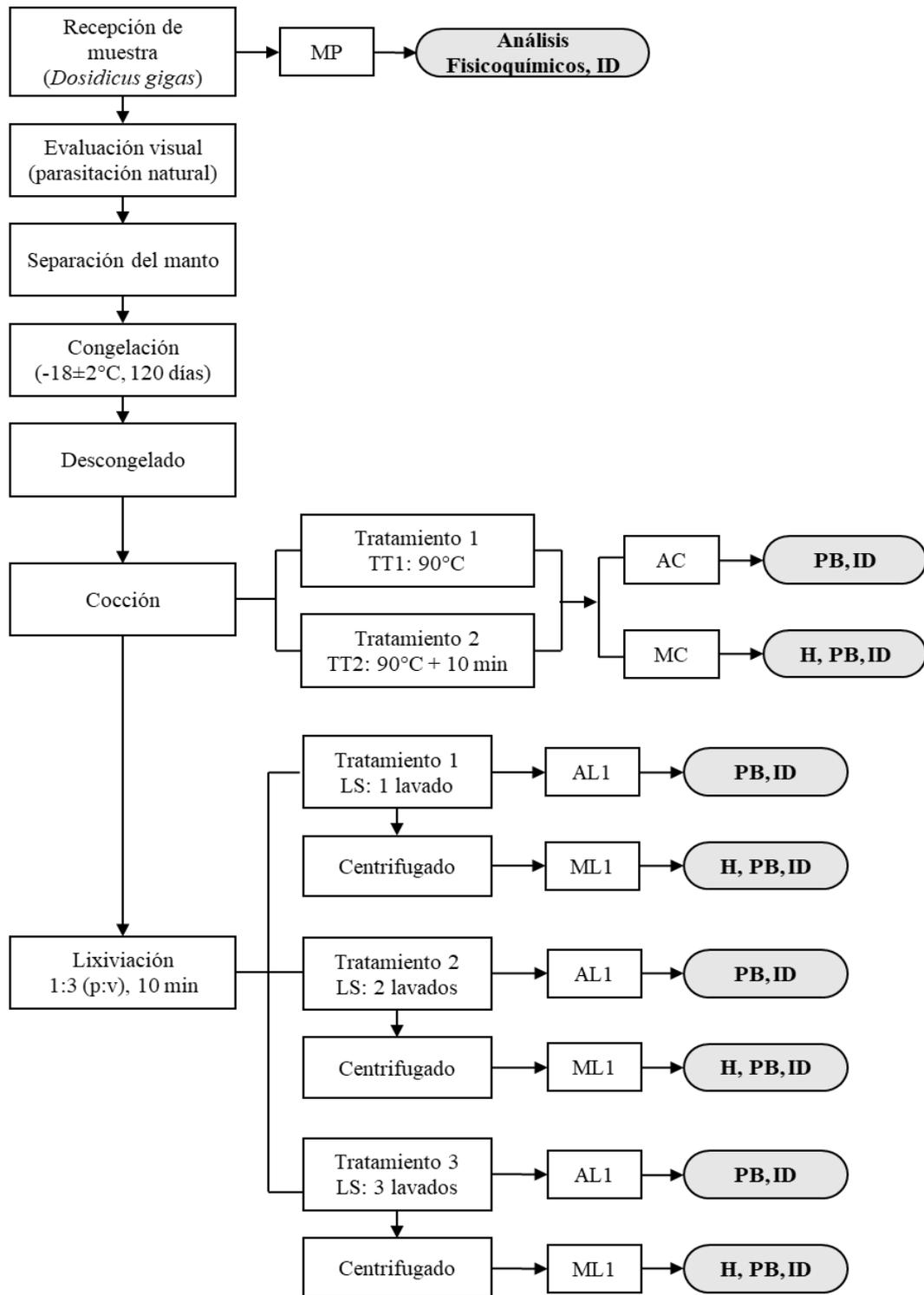
La técnica empleada para la determinación de alérgenos en músculo lavado de merluza y soluciones de lavado seguida por Olivares (2012), se describe a continuación:

1. Elaboración de extracto crudo antigénico de *A. simplex* y Anis 4 recombinante.

2. Elaboración de los antisueros anti-extracto crudo de *A. simplex* y anti-Ani s 4 recombinante, obtenidos a partir de la inmunización de conejos con extracto crudo de *A. simplex* o con Ani s 4 recombinante, respectivamente.
3. Aplicación del método de extracción y detección de alérgenos de *Anisakis simplex* según la Patente N° 2 340 978, de acuerdo con Rodríguez-Mahillo *et al.*, (2010):
 - a. Extracción para inmunoblotting.

Primero se realiza la extracción de alérgenos del músculo de merluza y sus derivados (aguas de lavado), para lo cual las muestras se homogenizan con solución salina en una proporción de 1:3 (p:v). La mezcla se sonica durante 15 minutos y se centrifuga a 5000 x g durante 30 min a 20°C. Se descarta el precipitado y el sobrenadante se acidifica con HCl hasta un pH<1 y concentración final de 0,075 mM. Luego se incuba por 15 min a temperatura ambiente y se neutraliza con NaOH hasta un pH 7. Por último, el sobrenadante resultante es el extracto empleado en la detección de alérgenos.
 - b. Cuantificación de alérgenos mediante Dot Blot (DB).

Se aplica 3 µL del extracto obtenido en el paso anterior en una membrana de nitrocelulosa (10 min, 37°C). La membrana se rehidrata con PBS por 10 min y luego se incuba con anti-Ani s 4 o con anti-extracto crudo de *A. simplex* en proporción 1:10000 por 1 hora. Se realizan 3 lavados sucesivos con TTBS x 5 min. Posteriormente, se incuba con Anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina en solución TTBS (1:2500). Luego de una hora de revela el DB utilizando sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT. Finalmente, los resultados se expresan en microgramos de Ani s 4 o extracto crudo de *A. simplex* por gramo de músculo de merluza (μg^{-1})



| Tratamientos | Muestras de proceso | Análisis |
|-------------------------|---------------------|---------------------|
| TT: Tratamiento térmico | MP: Músculo crudo | H: Humedad |
| LS: Lavados sucesivos | AC: Agua de cocción | PB: Proteína bruta |
| | MC: Músculo cocido | ID: Inmunodetección |
| | AL: Agua de lavado | |
| | ML: Músculo lavado | |

Figura 8. Esquema del diseño experimental para los procesos de cocción de músculo y lixiviación de músculo precocido de pota *Dosidicus gigas*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la materia prima

4.1.1. Análisis sensorial y datos morfométricos

Para el presente estudio se evaluaron un total de 100 ejemplares de pota, dividido en 3 lotes, con Longitud Dorsal del Manto (LDM) entre 44,0 cm y 60,5 cm, procedentes de La Puntilla (n=27), Atico (n=34) y Matarani (n=39), que se mantuvieron en refrigeración ($< 3 \pm 1^\circ\text{C}$, < 48 h) desde su captura hasta su recepción en la planta de congelados.

Se evaluó la frescura de los ejemplares tomando como referencia los criterios físico-organolépticos de los cefalópodos de acuerdo con SANIPES (2010), se asignó puntajes obteniendo como resultado un promedio de 8 puntos correspondiendo a la categoría de “Extra”, valor que indica óptima calidad.

Bravo (2001) y Ordoñez & Plácido (2004) proponen evaluar con mayor detalle el índice de calidad para pota, considerando más atributos y características para cada parámetro (Apariencia de la piel, ojos, textura del músculo, superficie del manto abierto y sin piel y tentáculos). Bravo (2001) asigna un puntaje máximo total de demérito de 21 puntos para pota que ha perdido toda su condición de frescura y le atribuye un máximo de 11,63 puntos demérito para pota de óptima calidad. Omote *et al.* (2014) y Lazo (2006) obtuvieron 6 y 8 puntos demérito, respectivamente. Hurtado (2014), evaluó solo los parámetros correspondientes al manto, obteniendo 2 de un máximo de 7 puntos demérito, correspondiendo en todos los casos a materia prima (conservada en hielo o refrigerada) de buena calidad. No obstante, para este estudio se optó por utilizar la metodología propuesta por SANIPES (2010), que consiste en un método más rápido de evaluación ya que se trataba de materia prima lista para su procesamiento en la planta de congelado. Cabe mencionar que los ejemplares evaluados estuvieron almacenados en refrigeración el menor tiempo posible (< 48 horas desde su captura) asegurando cumplir estrictamente la cadena de frío, a diferencia de ejemplares que son adquiridos en mercados locales donde puede haber un menor control de las condiciones de frío y almacenamiento.

En general el atributo que mostró una ínfima disminución de la frescura fue el brillo, además se entiende que se asigna el máximo puntaje a materia prima recién capturada. De acuerdo con Ordoñez & Plácido (2004), ejemplares de calamar gigante almacenados en hielo mantuvieron sus características de frescura hasta los 9 días, observando que los primeros cambios durante el proceso de descomposición se notan en el brillo y color de la piel y la pérdida de succión de los tentáculos, luego del quinto día observaron el gradiente cambio de color del músculo sin piel tornándose amarillento.

Respecto a los datos morfométricos registrados en el muestreo de los tres lotes de ejemplares de pota (n=100), en la Figura 9 se presenta la relación entre la LDM (Longitud Dorsal del Manto) y el PEM (Peso Estándar del Manto).

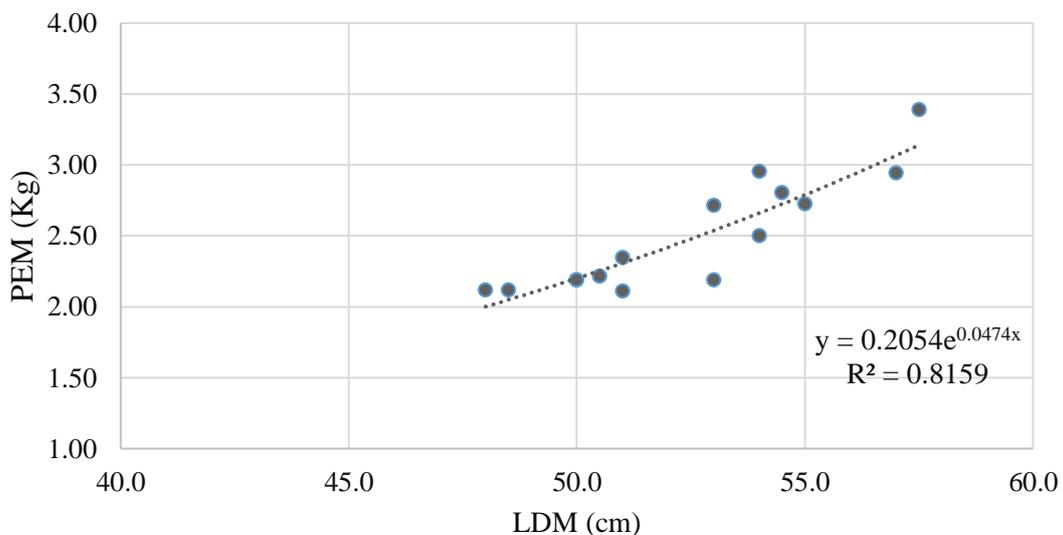


Figura 9. Relación entre la LDM (Longitud Dorsal del Manto) y el PEM (Peso Estándar del Manto) de los 100 ejemplares muestreados de pota *D. gigas*.

Los ejemplares de pota de mayor peso y tamaño fueron los procedentes de La Puntilla mientras que los individuos procedentes de Atico fueron los más pequeños. En el Anexo 3 se presenta la relación LDM vs PEM de acuerdo con la procedencia de captura.

4.1.2. Composición química proximal

La composición química proximal del manto de pota evaluado se detalla en la Tabla 4. Estos resultados fueron semejantes a los reportados por IMARPE (1996), Bravo (2001), Maza *et al.* (2003) y Omote (2019). Las ligeras desviaciones entre los componentes ocurren

posiblemente por la influencia de factores como el estado nutricional, madurez sexual, sexo, época del año, entre otros (Sikorski, 1994; Huss, 1999).

Tabla 4. Composición química proximal (g/100 g) del manto de pota *D. gigas*

| Componente | Promedio (g/100 g) |
|-----------------------|--------------------|
| Humedad | 81.1 |
| Proteína bruta | 16.0 |
| Grasa | 0.41 |
| Ceniza | 1.08 |

4.2. Identificación de Anisákidos

En 100 ejemplares del cefalópodo *Dosidicus gigas*, se registraron dos especies de nemátodos en total, correspondientes a dos géneros de la misma familia Anisakidae: *Hysterothylacium* y *Anisakis*.

El resumen de las especies de larvas encontradas en *D. gigas* de acuerdo con su localización en el hospedero se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resumen de las especies de nemátodos anisákidos encontrados en pota *D. gigas*

| Orden | Familia | Especie | Localización en el hospedero | |
|-----------------|------------|-----------------------------|------------------------------|----------|
| | | | Músculo | Vísceras |
| ASCARIDA | ANISAKIDAE | <i>Hysterothylacium sp.</i> | X | |
| ASCARIDA | ANISAKIDAE | <i>Anisakis</i> Tipo II | | X |

Cabe señalar que el reconocimiento y diferenciación morfológica en nemátodos es más difícil en las larvas L3 en comparación con los especímenes adultos. De acuerdo con Abattouy (2012), en el diagnóstico morfológico de larvas L3 del género *Anisakis* se podría determinar que se trata de *Anisakis* Tipo I o Tipo II, sin embargo, la identificación precisa de las especies incluidas en los morfotipos mencionados es limitada.

4.2.1. Descripción de las especies de los nemátodos identificados

Hysterothylacium sp.

| | |
|--------------------|--|
| PHYLUM: | NEMATODA |
| CLASE: | CHROMADOREA |
| ORDEN: | ASCARIDIDA Yamaguti, 1961 |
| FAMILIA: | ANISAKIDAE Railliet & Henry, 1912 |
| SUBFAMILIA: | RAPHIDASCARIDINAE Hartwich, 1954 |
| GENERO: | <i>Hysterothylacium</i> Ward & Margath, 1917 |

Descripción: (Basada en 5 especímenes) Larvas del tercer estadio de color blanquecino, cutícula con fina estriación transversal, longitud total 23,31 - 33,55mm. Presencia de labios prominentes. En la región anterior, el anillo nervioso ubicado cerca al poro excretor. Presencia de apéndice ventricular y ciego intestinal. En la región posterior, cerca al ano se encontraron de 3 a 4 glándulas rectales y cola cónica alargada que se hace muy delgada en el extremo caudal donde finaliza de forma redondeada con presencia de mucrón. (Ver Anexo 4)

Localización de infección: Libre (sin cápsula) pero incrustada en el músculo, debajo de la piel interna del manto.

Prevalencia de infección: 30%

Intensidad de infección (mín – máx): 1 – 6

Códigos de colección: Material depositado en la Colección Helmintológica y de Invertebrados afines MUSM N° 4757 - 4761

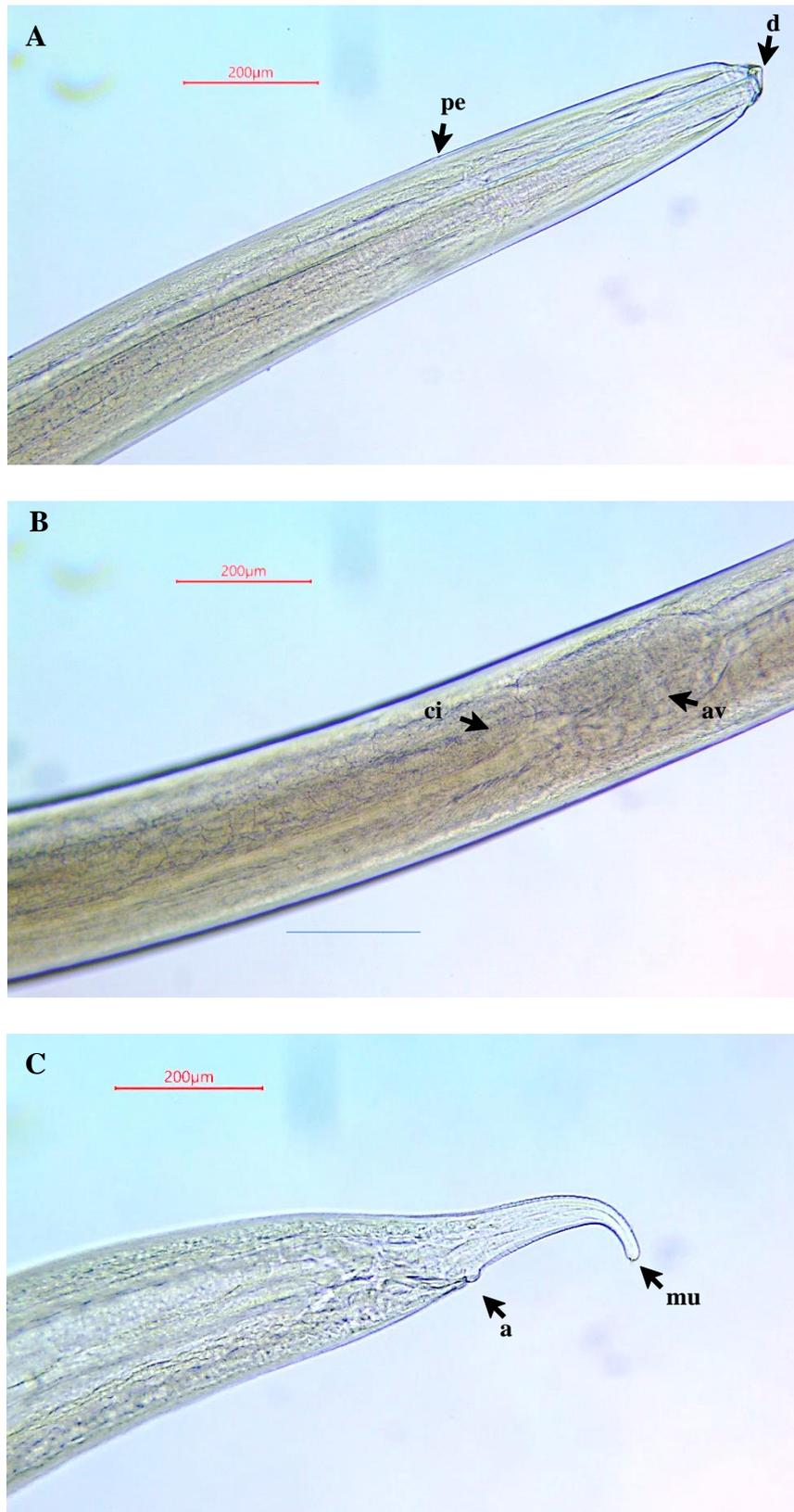


Figura 10. Larva L3 de *Hysterothylacium* sp. A) Extremo anteroventral (d: diente cuticular, pe: poro excretor) B) Región ventricular (ci: ciego intestinal, ap: apéndice ventricular) C) Extremo posterior (a: ano, mu: mucrón)

***Anisakis* Tipo II**

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| PHYLUM: | NEMATODA |
| CLASE: | CHROMADOREA |
| ORDEN: | ASCARIDIDA Yamaguti, 1961 |
| FAMILIA: | ANISAKIDAE Railliet & Henry, 1912 |
| SUBFAMILIA: | ANISAKINAE Railliet & Henry, 1912 |
| GENERO: | <i>Anisakis</i> Dujardin, 1845 |

Descripción: (Basada en 5 especímenes) Larvas del tercer estadio enrolladas en un quiste de color rosa – anaranjada, longitud total 32,72 - 37,48mm. Cuerpo más grueso y cutícula con marcada estriación transversal en comparación con *Hysterothylacium sp.* Presencia de poro excretor cercano al diente cuticular, longitud del esofago 3.88 - 4.28mm, la distancia del anillo nervioso al extremo anterior 0.65 - 0.71mm y longitud de ventrículo corto 1.17 - 1.45mm. Región posterior cónica y extremo caudal con ausencia de mucrón, la distancia de la cola postanal fue de 0.25 - 0.45mm. (Ver Anexo 5)

Localización de infección: Enquistadas en los restos de la cavidad celómica (tejidos de órganos como glándula nidamentaria, gónadas, etc), también se localizó enquistada en la estructura interna de la pluma. Todos los quistes contenían una sola larva.

Prevalencia de infección: 27%

Intensidad de infección (mín – máx): 1 - 5

Códigos de colección: Material depositado en la Colección Helmintológica y de Invertebrados afines MUSM N° 4752-4756

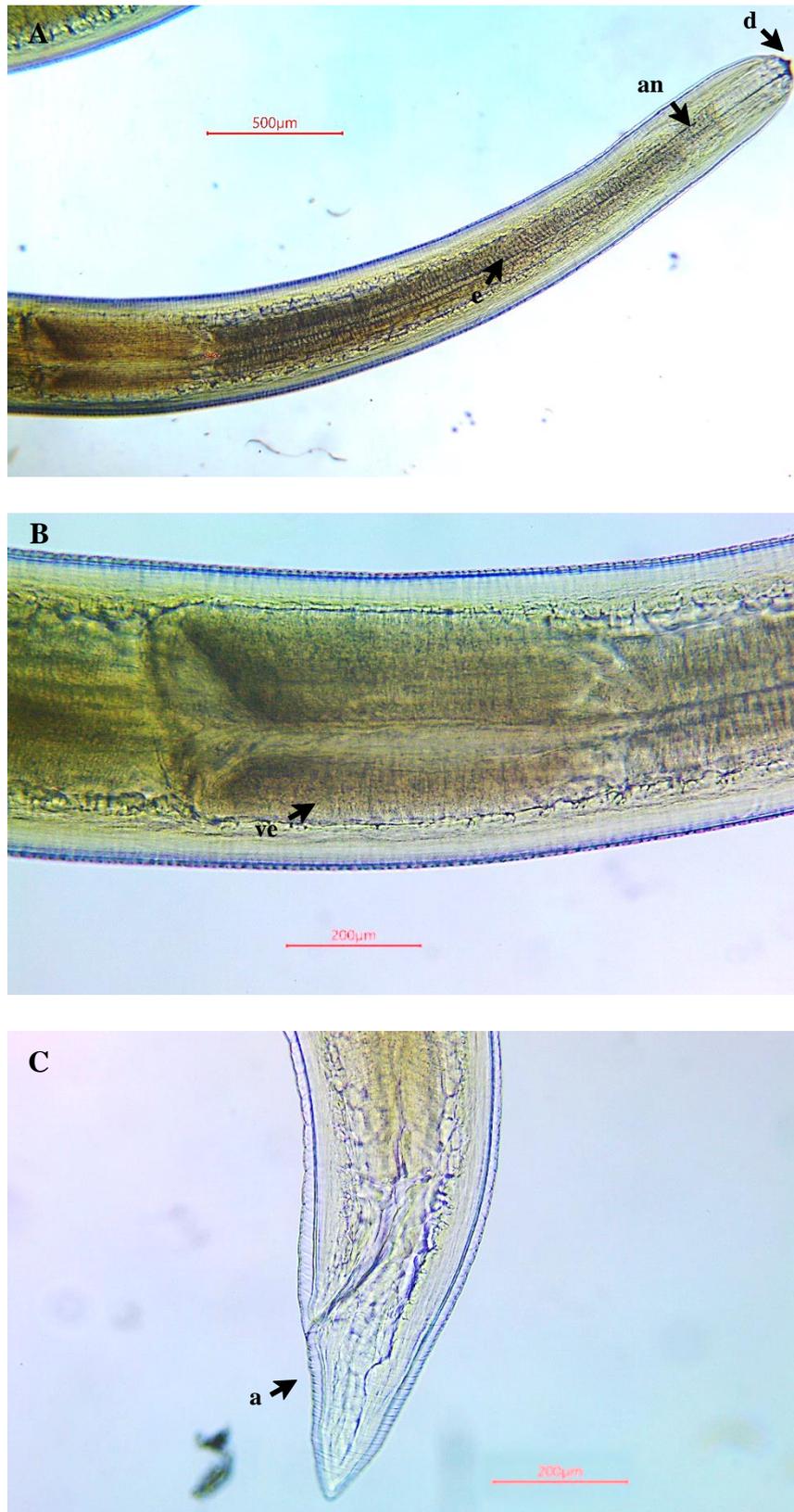


Figura 11. Larva L3 de *Anisakis* Tipo II. A) Extremo anteroventral (d: diente cuticular, an: anillo nervioso, e: esófago) B) Región ventricular (ve: ventrículo) C) Extremo posterior (a: ano)

La identificación y clasificación específica de *Anisakis* spp. resulta de gran importancia ya que se ha determinado que *A. simplex* es el principal responsable de los episodios de parasitosis y alergia alimentaria (Audicana & Kennedy, 2008). Recientemente, en Perú se ha identificado molecularmente larvas de *Anisakis* de los morfotipos I y II colectadas de especies hidrobiológicas del litoral peruano, que se corresponderían con *A. pegreffii* y *A. physeteris*, respectivamente (Aco *et al.*, 2020; Martínez-Rojas *et al.*, 2021), lo cual podría suponer que *Anisakis* spp. infestando a *D. gigas* podría ser *A. physeteris*.

En el Perú, se ha reportado un reducido número de casos de anisakiasis, de los cuales tres presuntamente fueron causados por *Anisakis* del morfotipo II (Tantaleán & Huiza, 1993) y uno por *Anisakis* del morfotipo I (Martínez R. citado por Cabrera & Trillo-Altamirano (2004)). Aunque en los últimos años no se han presentado casos nuevos, no se debería restar importancia o descartar el riesgo de contraer esta zoonosis, la cual en otros países es considerada una amenaza a la salud pública. Son diversos los estudios que han demostrado la presencia de *Anisakis* spp. en especies marinas de mayor consumo procedentes del litoral peruano (Quiroz, 2014; Vásquez-Ruiz & Jara-Campos; 2012; Chero *et al.*, 2014; Chero *et al.*, 2016; Serrano-Martínez *et al.*, 2017), por lo que la enfermedad podría estar subregistrada por falta de diagnóstico.

4.3. Evaluación de la nematofauna

4.3.1. Índices parasitológicos y frecuencia parasitaria

La prevalencia total o parasitismo global por anisákidos fue del 48%. La prevalencia de infección fue ligeramente mayor por *Hysterothylacium* sp que por *Anisakis* Tipo II. Se registró una mayor frecuencia de larvas *Hysterothylacium* sp., sin embargo, *Anisakis* Tipo II tuvo una mayor intensidad media de infección.

En la Tabla 6 se muestra el resumen de los índices parasitológicos y frecuencia parasitaria de los nemátodos anisákidos detectados.

Tabla 6. Prevalencia, Frecuencia parasitaria, Intensidad media de infección (IMI), Intensidad de Infección (II) y Abundancia media (AM) de anisákidos de pota *D. gigas* procedentes de La Puntilla, Atico y Matarani, Perú.

| Especímenes | Prev. (%) | Frecuencia | IMI | II | AM |
|-----------------------------|-----------|------------|------|-----|------|
| <i>Hysterothylacium sp.</i> | 30 | 45 | 1,50 | 1-6 | 0,45 |
| <i>Anisakis</i> Tipo II | 27 | 42 | 1,56 | 1-5 | 0,42 |

Los tres lotes evaluados presentaron prevalencias totales de infección distintas: La Puntilla (n=27, Prev. 41%), Atico (n=34, Prev. 26%) y Matarani (n=39, Prev. 72%). En la Figura 12 se presenta el porcentaje de hospederos infectados con larvas de anisákidos respecto al total de ejemplares examinados en cada lote de pota, mientras que las prevalencias de infección por *Hysterothylacium sp.* y *Anisakis* Tipo II de acuerdo a la procedencia del hospedero se muestran en la Figura 13.

Respecto a la frecuencia parasitaria, en la Tabla 7 se detalla el número de larvas de *Hysterothylacium sp.* y *Anisakis* tipo II, según la procedencia del hospedero *D. gigas*.

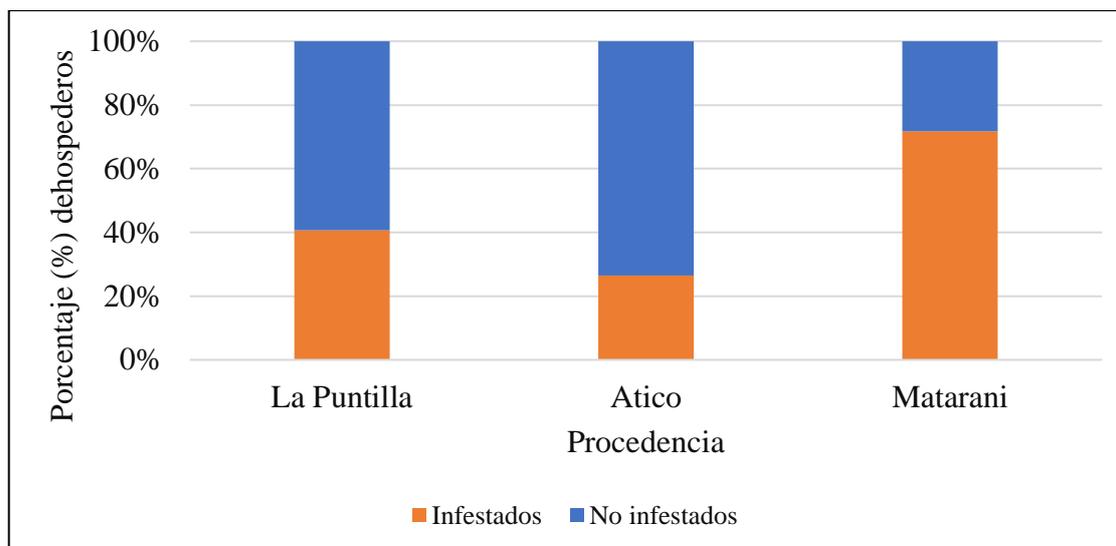


Figura 12. Prevalencia total de infección según la procedencia del hospedero *D. gigas*.

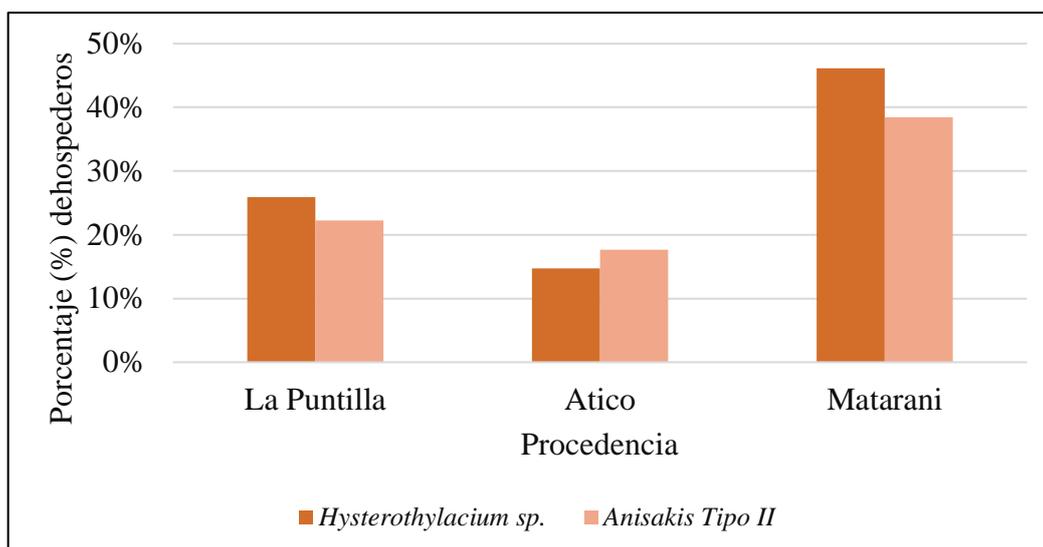


Figura 13. Prevalencia de infección por *Hysterothylacium sp.* y *Anisakis* tipo II, según la procedencia del hospedero *D. gigas*.

Tabla 7. Nemátodos colectados a partir de *D. gigas*, de acuerdo con el lugar de procedencia del hospedero.

| Procedencia | <i>Hysterothylacium sp.</i> | <i>Anisakis Tipo II</i> | Total Nemátodos | %Total Nemátodos |
|-------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|
| La Puntilla | 10 | 9 | 19 | 21,8% |
| Atico | 6 | 9 | 15 | 17,2% |
| Matarani | 29 | 24 | 53 | 60,9% |

En el Perú, la mayoría de las investigaciones se han orientado a evaluar la parasitofauna en especies de peces marinos de importancia comercial en las que se ha reportado la presencia de helmintos zoonóticos de la Familia Anisakidae (Serrano-Martínez *et al.*, 2017; Chero, *et al.* 2016; Chero *et al.*, 2014; Quiroz, 2014; Vasquez- Ruiz & Jara-Campos, 2012; Iannacone, *et al.*, 2012; Iannacone *et al.*, 2010) y solo se tiene un reporte en una especie de la amazonía peruana *Astronotus ocellatus* “Acarahuazú” con presencia de larvas de *Contracaecum sp.* (Serrano-Martínez *et al.*, 2016).

En el caso de cefalópodos, diferentes estudios orientados a la evaluación de parásitos en pota *D. gigas* indican la presencia de céstodos, tremátodos y nemátodos de los cuales, por su implicancia zoonótica, se ha logrado identificar morfológicamente larvas L3 de la familia Anisakidae tales como, *Anisakis simplex* o Tipo I, *Anisakis physeteris* o Tipo II y *Contracaecum sp.* con niveles de prevalencias variables.

Estudios iniciales realizados por Gonzáles & Mendo (1998) y Sarmiento *et al.* (1999) reportaron la presencia de *Anisakis sp.* en pota capturada en la costa peruana. Shukhgalter & Nigmatullin (2001), registraron la presencia de larvas de la familia Anisakidae (*Anisakis*, *Contracaecum* y *Porrocaecum*) en pota capturada del Pacífico Este Central, encontrando una mayor infestación por *A. physeteris* (24,2%) que por *A. simplex* (9,2%). Del mismo modo, Iannacone & Alvarino (2009), reportaron una mayor prevalencia de *A. physeteris* o complejo tipo II (Prev. 19,04%, IMI:1,75), en comparación con *A. simplex* o complejo tipo I (Prev. 4,76%, IMI: 1,5) en pota procedente de la zona norte del Perú. Asimismo, dado que *D. gigas* es un recurso cuya distribución supera los límites marítimos nacionales, en ejemplares procedentes de la costa central de Chile se ha reportado la presencia de *Anisakis* Tipo II y *Anisakis* Tipo I con prevalencias de 17.7% y 6.5%, respectivamente (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2009)

Los estudios detallados anteriormente señalan una mayor prevalencia por *Anisakis* tipo II en comparación con su congénero *Anisakis* tipo I. Asimismo, las prevalencias por *Anisakis* tipo II han sido relativamente bajas (menores al 25%), con excepción de la prevalencia reportada por Céspedes (2010) quien encontró larvas de *A. physeteris* con una prevalencia del 50% en pota capturada en Puerto Lomas, Arequipa. Este mayor nivel de parasitación en ejemplares procedentes de la zona sur del litoral peruano también se observó en el presente estudio, como se puede ver en la Figura 13, los ejemplares de los lotes procedentes de Atico y Matarani, Arequipa presentaron en conjunto una prevalencia por *Anisakis* Tipo II mayor al del lote de La Puntilla, Ica.

La presencia de *Anisakis physeteris*, del morfotipo II, ha sido reportada en otros calamares como *T. sagittatus* y *O. bartrami* (Mattiucci & Nascetti, 2008; Nigmatullin *et al.*, 2009) y *Anisakis simplex* en *T. sagittatus* (Cipriani *et al.*, 2021)

Respecto al género *Hysterothylacium*, se han descrito 65 especies de las cuales doce han sido halladas en América del Norte, América del Sur y en el archipiélago de Hawái (Gopar *et al.*, 2005). Estos nemátodos presentan un ciclo de vida heteroxeno al igual que *Anisakis*.

De acuerdo con Køie (1993) y Gonzáles (1998), estos nemátodos presentan cuatro mudas: las dos primeras ocurren dentro del huevo y las dos últimas en el hospedero definitivo. Tiene como primer hospedero intermedio a invertebrados marinos (misidáceos, isópodos, copépodos y en su mayoría anfipodos); sin embargo, cuando las larvas L3 han adquirido su capacidad infectiva pero aún son muy pequeñas (< 3 mm), estas requieren obligatoriamente de un segundo hospedero intermedio no crustáceo o de un hospedero de transporte como poliquetos o peces. Luego, los especímenes alcanzan la madurez sexual en el tracto digestivo de los hospederos definitivos que generalmente son peces teleósteos marinos, estuarinos o de agua dulce (Anderson, 2000) o mamíferos marinos (Lopes *et al.*, 2011). Raffel & Anderson (2009) encontraron adultos de *H. burtti* n. sp. en el anfibio *Notophthalmus viridescens* sugiriendo, en este caso, que su presencia puede estar ligada a la cercana asociación ecológica que existe entre tritones y los peces de agua dulce que viven en el mismo medio.

Los especímenes *Hysterothylacium* son semejantes a los del género *Contracaecum* por la presencia de apéndice ventricular y el ciego intestinal, pero se diferencian por la posición del poro excretor el cual se ubica al nivel del anillo nervioso en *Hysterothylacium* o cercano al interlabio ventral en *Contracaecum* (Deardorff & Overstreet, 1981a;1981b; Moravec, 1998)

Bower & Margolis (1991) encontraron larvas de *Hysterothylacium* sp. (100%) y *Anisakis simplex* (13,2%) parasitando el cefalópodo *Ommastrephes bartrami* en aguas del Pacífico Norte. Picó-Durán *et al.*, (2016) identificaron larvas de los géneros *Anisakis* y *Hysterothylacium* en el cefalópodo *Ilex coindetti*.

Algunas de las especies de *Hysterothylacium* registradas en el Pacífico Sur son: *H. winteri* (Torres & Soto, 2004) y *H. aduncum* (Gonzáles, 1998; Torres *et al.*, 2010), ambas en Chile. También se han reportado la presencia de estos nemátodos en otros países de la región como Argentina (Moravec *et al.*, 1997; Incorvaia & Díaz de Astarloa, 1998) y Brasil (Pantoja *et al.*, 2016; Saad *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2011; Knoff *et al.*, 2012).

En Perú, aún no hay registros de *Hysterothylacium* en *D. gigas*; sin embargo, la presencia de larvas de *Hysterothylacium* sp. ha sido reportada en otras especies marinas como *Sarda chilensis* (Chero *et al.* 2016), *Paralichthys adspersus* (Iannacone *et al.*, 2012), *Stromateus stellatus* (Iannacone *et al.*, 2010). Además, Cabrera *et al.*, (2002) y Vásquez-Ruiz & Jara-Campos (2012) registraron adultos y larvas de *Hysterothylacium* sp. en *Coryphaena*

hippurus. Luego, Gomez-Puerta (2014) identificó, a nivel de especie, adultos de *Hysterothylacium pelagicum* que se encontraban infestando el mismo hospedero. Recientemente se ha reportado el primer registro de larvas L3 *Hysterothylacium sp.* en *E. volitans* (Naupay *et al.*, 2019).

En el presente estudio, a pesar de presentar un importante grado de prevalencia de anisákidos, se observó una baja intensidad media de infección, es decir, una baja cantidad de larvas por cada ejemplar infestado. Los niveles de infestación por *Anisakis* tipo II obtenidos se asemejan a los reportados por Shukhgalter & Nigmatullin (2001). No se hallaron larvas de *Anisakis* tipo I y el parásito de mayor importancia específica, en términos de prevalencia y abundancia media, fue *Hysterothylacium sp.*

4.3.2. Localización del parásito en el hospedero

En general, estudios han demostrado que la mayor carga parasitaria se ha detectado en la cavidad abdominal o vísceras de las especies hospederas estudiadas. Kalay *et al.*, (2009) sugieren que *Hysterothylacium* puede encontrarse como larvas L3 enquistadas en las vísceras y, como L4 y adultos libres en el intestino de peces teleósteos. La mayoría de los individuos de *Hysterothylacium* reportados en peces estuvieron localizados en la cavidad celómica (mesenterios, estómago e intestino) (Deardoff & Overstreet, 1982; Kjøie, 1999; Iannacone *et al.*, 2010; Iannacone *et al.*, 2012; Gomez-Puerta, 2014; Chero *et al.*, 2016; Diniz *et al.*, 2021). Cabrera *et al.*, (2002) también registró *Hysterothylacium sp.* en la cavidad bucal de *C. hippurus*. A diferencia de lo reportado por estos autores, en este estudio, las larvas de *Hysterothylacium sp.* fueron detectadas de forma libre incrustadas en la pared interna del manto, al igual que lo reportado por Picó-Durán *et al.*, (2016) quienes recuperaron larvas de *Hysterothylacium* localizadas en el músculo de *Ilex coindetti* mediante digestión enzimática.

Aunque los ejemplares de *D. gigas* evaluados estaban eviscerados, se pudo detectar larvas de *Anisakis* Tipo II las cuales se encontraron encapsuladas en la cavidad celómica (restos de membrana celómica y restos de gónadas) y en la concha (al interior de la pluma). En el mismo hospedero, Shukhgalter & Nigmatullin (2001) reportaron larvas L3 de *A. simplex* enquistadas en la membrana celómica y ovario, mientras que las larvas L3 de *A. physeteris* se localizaron adicionalmente en la pared estomacal. Además, Gonzáles & Mendo (1998) describieron a las larvas de *Anisakis sp.* como helmintos de coloración rosada, que se encontraban enrolladas y revestidas individualmente por una cápsula, localizadas en la

cavidad interna del cuerpo a ambos lados de la glándula nidamentaria y del testículo o interiormente debajo de la membrana que envuelve a dichos órganos.

Visualmente, durante la detección de los parásitos, se observaron unas lesiones en la pared interna del manto que permitieron ubicar las larvas de *Hysterothylacium* sp al remover las fibras musculares con ayuda de un estilete, aunque no siempre con éxito. Acosta & Silva (2015) no tuvieron inconvenientes en identificar larvas *Hysterothylacium* sp. en el pez ornamental *Hyphessobrycon eques* previamente congelado; sin embargo, durante el muestreo de los lotes de pota se pudo constatar que la dificultad para detectar y colectar los parásitos por inspección visual es mayor en los ejemplares congelados puesto que las larvas de *Hysterothylacium* sp. al ser de color blanquecino y no presentar motilidad se confunden con las fibras musculares y hacen difícil su reconocimiento. Por esta razón, se sugiere realizar el muestreo con especímenes frescos o refrigerados con un tiempo mínimo de almacenamiento después de su captura.

Por otro lado, las larvas de *Anisakis* Tipo II que se extrajeron de los restos viscerales y pluma se encontraban encapsuladas y tenían una coloración rosa–anaranjada tal como lo reportaron algunos autores (González & Mendo, 1998; Céspedes, 2010), lo cual facilitó su detección. En la Figura 14 se observa la localización de las larvas mencionadas.

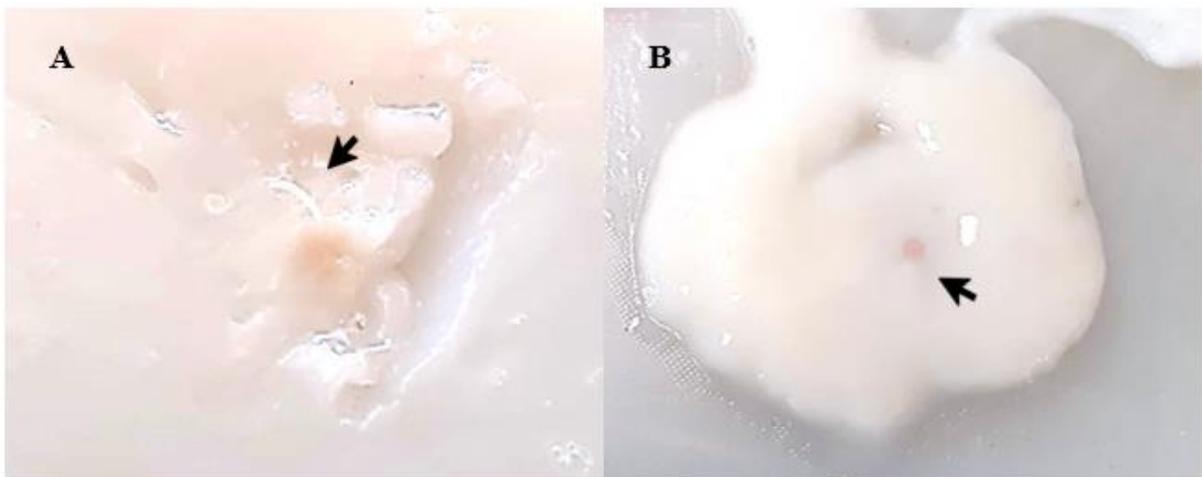


Figura 14. Localización de larvas anisákidas en *D. gigas*. A: Larva L3 de *Hysterothylacium* sp. localizada debajo de la piel interna del manto. B: Larva L3 de *Anisakis* Tipo II localizada en los restos de tejidos de la cavidad visceral.

Normalmente, los cefalópodos como *D. gigas* están involucrados como hospederos paraténicos en el ciclo biológico de nemátodos anisákidos, infestándose al ingerir peces o crustáceos parasitados con larvas L3 las cuales pueden penetrar la pared intestinal y luego enquistarse en la superficie de los órganos internos o también, migrar hacia la musculatura (González, 2018; Karl, 2008).

Cipriani *et al.* (2015), a partir de experimentos con boquerón *Engraulis encrasicolus*, detectó un mayor nivel de infección por *A. pegreffii* en las vísceras (95,74%) en comparación con el músculo (4,03%). Por otro lado, Levsen & Lunestad (2010) observaron la distribución de infección de larvas de *A. simplex* en la musculatura del arenque *Clupea harengus L.*, encontrando mayor cantidad de larvas en los órganos viscerales (96%), seguido de la musculatura ventral (3,5%) la cual rodea la cavidad visceral y un menor porcentaje localizado en los filetes dorsales (0,5%), lo cual podría reforzar la teoría de migración de larvas desde las vísceras hacia el músculo del hospedero.

Smith y Wootten (1975) refieren que esta migración larval suele ocurrir después de la captura (migración post-mortem) cuando el pescado es conservado en hielo por más de 48 horas, mientras que otros autores no descartan que la migración larval puede darse cuando los especímenes aún están vivos (migración intra-vitam) (Cipriani *et al.* 2015, Karl, 2008, Karl *et al.*, 2002, Quiazon *et al.*, 2011, Smith, 1984). Karl *et al.* (2002) observaron que en peces sin eviscerar conservados en hielo ocurre un aumento significativo de nemátodos en la musculatura.

Cipriani *et al.* (2015) sustentan que existe una disminución significativa de la prevalencia de infección de larvas de *Anisakis pegreffii* en las vísceras y un incremento de la prevalencia de infección de *A. pegreffii* en la musculatura de boquerones conforme aumenta la temperatura (5°C y 7°C) y el tiempo de almacenamiento post-mortem (24, 48 y 72 h), tal como se observa en la Figura 15. Asimismo, notaron que se recuperan más larvas en el líquido de drenado de las muestras conservadas en hielo pero expuestas a mayores temperaturas, sugiriendo que para reducir la migración de larvas desde las vísceras hacia el músculo de pescado es necesario asegurar la conservación a temperaturas menores de 2°C desde la captura y previo al consumo.

En tal sentido, en el presente estudio a pesar de que se aseguró la cadena de frío desde la captura, no se puede descartar una posible migración intra-vitam de las larvas *Anisakis* spp. hacia el músculo, por lo que existe el riesgo de la presencia de sus productos de excreción-

secreción liberados en los tejidos los cuales pueden provocar posteriormente una respuesta inmune (Morris & Sakanari, 1994; Moneo *et al.*, 2007).

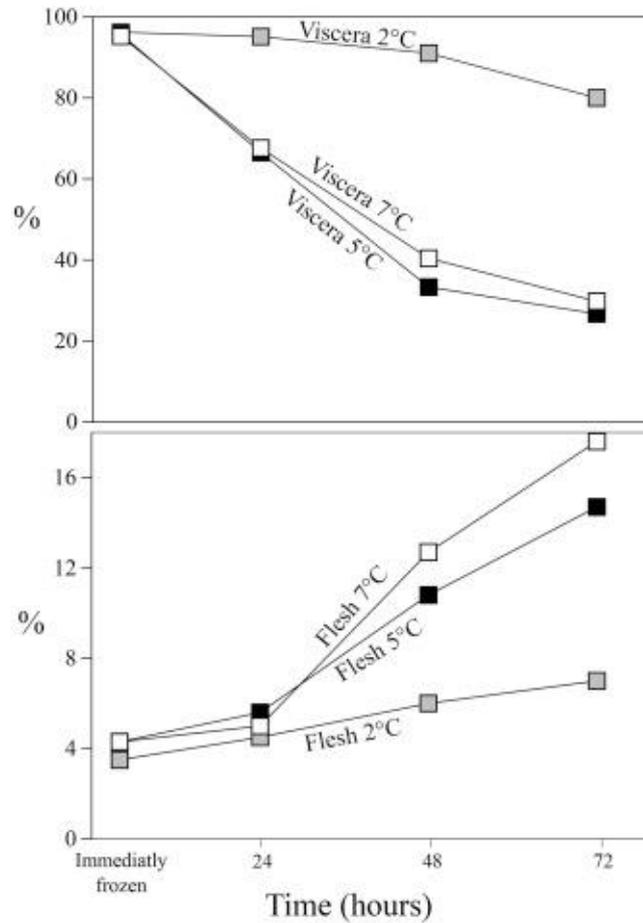


Figura 15. Frecuencias relativas de la distribución de las larvas de *A. pegreffii* entre las vísceras y el músculo de *E. encrasicolus*, a diferentes temperaturas de almacenamiento (2 °C, 5 °C y 7 °C) y a diferentes intervalos de tiempo (Control, 24 h, 48 h y 72 h) (Cipriani *et al.*, 2015).

Para Yagi *et al.*, (1996) y Valero *et al.*, (2003), *Hysterothylacium* es considerado agente causal de anisakiosis humana ya que han reportado pacientes con síntomas gastrointestinales en caso de infección con larva viva y pacientes que manifiestan reacciones alérgicas luego de consumir pescado. En tal sentido, la presencia de *Hysterothylacium* en la parte comestible de *D. gigas* sugiere que hay un potencial riesgo de infección en el humano, ya que dependiendo de la preparación culinaria esta puede consumirse marinada (con 2 minutos de cocción previa) o en preparaciones, como el cebiche de pota, cuyo tiempo de cocción puede

variar desde los 5 hasta los 8 minutos, aproximadamente. Además, aún cuando no se encontraron *Anisakis* spp. en el músculo del manto, no se podría descartar la posible migración de las larvas *intra-vitam* o *post-mortem* cuando no se asegura la cadena de frío lo cual puede ocurrir, con mayor probabilidad durante la comercialización de este recurso en mercados locales aumentando el riesgo de anisakidosis.

4.3.3. Factores que podrían influir en la tasa de parasitación

El muestreo realizado en la presente investigación tuvo lugar durante la primavera del 2019. De acuerdo con Csirke *et al.*, (2018) y Tafur *et al.*, (2001) en esta época del año ocurren las migraciones reproductivas de este cefalópodo, estableciéndose el periodo principal de desove durante octubre y enero (primareva – verano).

Las bajas tasas de parasitación o prevalencias de las larvas Anisakidae respecto a los ejemplares evaluados en el presente estudio podría estar relacionada con la variación ontogénica de la alimentación, la época del año y la zona de captura de *D. gigas*.

La infestación con las larvas del tercer estadio (L3) ocurre por la depredación e ingestión de peces u otras especies de cefalópodos (mayormente calamares) parasitados. De acuerdo con Céspedes *et al.*, (2011) los principales grupos que componen la dieta de *D. gigas* son los calamares Ommastrephidos, peces mictophidos y voladores que se comportarían como hospederos paraténicos para *A. simplex*. En este estudio, los ejemplares evaluados presentaron una LDM entre 44,0 - 60,5 cm, rango similar a un grupo de potas evaluado por Alegre (2011) que señala que la dieta de individuos de 41,0 - 60,0 cm estuvo compuesta principalmente por *Vinciguerria lucetia*, *Cephalopoda* spp. y *D. gigas* de menor tamaño.

Respecto a la influencia de la época del año, Shukhgalter & Nigmatullin (2001) evaluaron la relación entre la variabilidad estacional con la prevalencia de infección de la fauna de helmintos de *D. gigas* en la región peruana, no encontrando diferencias cualitativas y cuantitativas significativas. Por otro lado, Alegre (2011) encontró que durante los veranos 2004, 2006 y 2008, otoño 2005 y 2008 e invierno 2004 las presas más importantes de *D. gigas* fueron eufásidos, mientras que en las primaveras del 2006 y 2008 predominó *Vinciguerria lucetia*. Sin embargo, es importante señalar que la zona de captura también podría influir ya que los lotes de *D. gigas* evaluados tuvieron como lugar de procedencia a La Puntilla, Atico y Matarani, es decir, la zona sur del litoral peruano.

En tal sentido, Blaskovic *et al.*, (2011) encontraron que, durante la época de primavera, calamares gigantes de la zona sur del Perú presentaron en su dieta un importante nivel de canibalismo así como presas de otras especies de cefalópodos; adicionalmente observaron que durante la primavera se da una menor dinámica alimentaria en comparación con las demás estaciones del año, ya que los individuos presentaron el mayor número de estómagos vacíos.

Dado que el muestreo tuvo lugar durante la primavera y teniendo en cuenta el rango de tallas de los ejemplares de *D. gigas* evaluados, podríamos entonces considerar, para el presente estudio, que los componentes más importantes de la dieta que se comportarían como hospederos de transporte para *Hysterothylacium sp.* y *Anisakis* Tipo II son *V. lucetia* y *D. gigas* de menor tamaño. No obstante, el alto índice de vacuidad de estómagos reportado por Blaskovic *et al.*, (2011) para ejemplares capturados en la misma estación del año y similar lugar de procedencia podría explicar la baja tasa de parasitación obtenida.

4.4. Evaluación del Concentrado proteico de pota

Se realizó el procesamiento del manto de pota siguiendo la metodología descrita en el Apartado 3.5.1.1, obteniendo seis concentrados proteicos (CPP). Cabe señalar que para ello se utilizó solo mantos de pota con infestación natural.

4.4.1. Análisis sensorial de los Concentrados proteicos de pota

Lazo (2006) propone evaluar las características de color, olor, sabor y textura (puntaje máximo 12) para determinar la calidad de los concentrados proteicos; sin embargo, de acuerdo al objeto de la presente investigación se evaluaron solo las características de color, olor y sabor (puntaje máximo de 9 puntos) bajo el sustento de que el tamaño de partícula final del producto CPP no influiría en la presencia o no de alérgenos de *A. simplex*. No se realizó la molienda fina para evitar mayor pérdida de rendimiento en los procesos.

Se determinó que cuatro CPP tenían características similares, con excepción de los CPP obtenidos con un solo lavado sucesivo (CPP1) en ambos tratamientos térmicos TT1 y TT2 los cuales presentaron olor y sabor ligero a pota.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la evaluación sensorial tomando como referencia la tabla propuesta por Lazo (2006).

Tabla 8. Evaluación sensorial de los concentrados proteicos de pota obtenidos de acuerdo al tratamiento de lixiviación y tratamientos térmicos aplicados.

| Características | TT1 | | | TT2 | | |
|----------------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| | CPP1 | CPP2 | CPP3 | CPP1 | CPP2 | CPP3 |
| Color | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Olor | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| Sabor | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| Puntaje total | 6 | 7 | 8 | 7 | 8 | 8 |
| Calificación | Regular | Buena | Buena | Regular | Buena | Buena |

TT1: Tratamiento térmico 1; **TT2:** Tratamiento térmico 2; **CPP1:** Concentrado proteico obtenido a partir de 1 lavado sucesivo; **CPP2:** Concentrado proteico obtenido a partir de 2 lavados sucesivos; **CPP3:** Concentrado proteico obtenido a partir de 3 lavados sucesivos.

En general, los seis CPP presentaron un color blanco cremoso tenue, lo cual puede deberse a una posible reacción de Maillard por las condiciones de tiempo y temperatura de secado; sin embargo, podría estar más relacionado con el grado de molienda aplicado ya que se pudo observar que muestras de CPP de partículas más pequeñas presentaron una coloración más luminosa, coincidiendo con lo mencionado por otros autores (Espinoza, 2017; Lazo, 2006).

Adicionalmente, solo en los CPP2 y CPP3, el olor y sabor fue suave con tendencia a neutro, lo cual se debe a que la aplicación de lavados sucesivos se realizó en pota cocida molida desmenuzada favoreciendo la eliminación de los compuestos nitrogenados no proteicos como: cloruro de amonio (NH_4Cl), bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT), trimetilamina (N-TMA), péptidos y aminoácidos, responsables del olor y sabor característicos de la especie *D. gigas* (Maza *et al.*, 2003; 2008). Estas características son relevantes de evaluar a nivel comercial ya que limitan la aceptación del producto en el mercado (Lazo, 2006; Carriosa, 2000; Yamanaka *et al.* 1995).

4.4.2. Composición química proximal de los Concentrados proteicos de pota

Respecto a la evaluación fisicoquímica de los concentrados proteicos de pota (CPP), el contenido de proteína y humedad en todos los casos se encuentra dentro del rango propuesto por Madrid *et al.*, (1994) para los Concentrados Proteicos de Pescado Tipo A; sin embargo, de acuerdo a la clasificación establecida según D.S. N° 015-2016-PRODUCE, por poseer un contenido de grasa mayor a 0.75% pero menor al 3%, los concentrados estarían catalogados como del Tipo B, clasificación que es de interés para el cumplimiento de disposiciones para el acceso a la actividad de producción de concentrados proteicos en el Perú.

En general, se observó que el contenido total de los componentes dio una suma entre 93,4% y 96,53%, la diferencia podría corresponder a la varianza registrada en el cálculo de la proteína y grasa, más que con el contenido de carbohidratos ya que estos se presentan en un contenido muy ínfimo en la materia prima además que los carbohidratos de bajo peso molecular habrían sido eliminados parcialmente en el proceso de lixiviación por su naturaleza soluble. Los concentrados proteicos obtenidos a partir de la aplicación de dos y tres lavados sucesivos (CPP-LS2 y CPP-LS3) en ambos tratamientos térmicos son los que más se asemejan a los reportados por Lazo (2006) y Rojas (2009). En la Tabla 9 se presentan los resultados de composición química proximal de los seis CPP obtenidos.

Tabla 9. Composición química proximal (g/100 g muestra) de los concentrados proteicos de pota (CPP) obtenidos de acuerdo con los tratamientos de lixiviación y según el tratamiento térmico aplicado.

| Tratamiento | | Humedad | Proteína total | Grasa | Ceniza |
|-------------|-----|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| TT1 | LS1 | 7,40 ± 0,13 ^a | 82,74 ± 0,33 ^a | 1,44 ± 0,01 ^a | 2,08 ± 0,01 ^a |
| | LS2 | 6,06 ± 0,25 ^b | 86,81 ± 0,67 ^b | 1,69 ± 0,25 ^a | 1,64 ± 0,06 ^b |
| | LS3 | 6,56 ± 0,05 ^b | 84,02 ± 0,03 ^b | 1,33 ± 0,24 ^a | 1,49 ± 0,01 ^c |
| TT2 | LS1 | 7,31 ± 0,09 ^a | 84,34 ± 0,47 ^c | 1,75 ± 0,25 ^a | 2,08 ± 0,01 ^a |
| | LS2 | 6,41 ± 0,00 ^b | 86,19 ± 0,70 ^d | 1,56 ± 0,24 ^a | 1,61 ± 0,01 ^b |
| | LS3 | 6,31 ± 0,21 ^b | 87,30 ± 0,03 ^d | 1,46 ± 0,09 ^a | 1,46 ± 0,01 ^c |

TT1: Tratamiento térmico 1 (90°C + 0 min); **TT2:** Tratamiento térmico 2 (90°C + 10 min); **LS1:** Tratamiento de lixiviación (1 lavado); **LS2:** Tratamiento de lixiviación (2 lavados); **LS3:** Tratamiento de lixiviación (3 lavados). Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p-valor >0,05).

Respecto a los tratamientos de lixiviación, solo la grasa no mostró diferencias significativas. La humedad y proteína de los concentrados proteicos obtenidos con dos y tres lavados sucesivos tampoco mostraron diferencias significativas. Únicamente la ceniza presentó diferencias significativas en los tres tratamientos, aunque sus valores fueron similares a lo reportado por otros autores (Madrid *et al.*, 1994; Lazo, 2006 y Rojas, 2009). Al comparar los tratamientos térmicos, solo se encontraron diferencias significativas a nivel de proteína, observándose que se obtuvieron concentrados con mayor porcentaje de proteína al aplicar un mayor tiempo de cocción.

4.5. Evaluación de las muestras de proceso obtenidas de la elaboración de CPP

4.5.1. Composición fisicoquímica y pH de las muestras de proceso.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de porcentaje de humedad y proteína y valores de pH de las muestras de proceso: Músculo crudo (MP), músculo cocido (MC), músculo lavado (ML) y aguas de lavado (AL1, AL2 y AL3) obtenidas durante la elaboración de los seis concentrados proteicos de pota CPP.

Tabla 10. Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de músculo de pata y de las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de lixiviación (1:3 p:v; 10 min) aplicando dos tratamientos térmicos de cocción: TT1 (90°C + 0 min) y TT2 (90°C + 10 min)

| Lote | Tratamiento | Muestra | Humedad (%) | Proteína (%) | pH | |
|------|-------------|---------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|------|
| TT1 | Control | MP | 86,70 ± 0,01 ^a | 11,78 ± 0,01 ^a | 6,28 | |
| | | MC | 75,14 ± 0,05 ^a | 23,16 ± 0,10 ^a | 6,24 | |
| | TT | AC | - | 2,38 ± 0,52 | 5,95 | |
| | | ML1 | 75,81 ± 0,09 ^a | 22,77 ± 0,04 ^a | 6,56 | |
| | LS 1 | AL1 | - | 1,25 ± 0,06 ^{a/x} | 6,22 | |
| | | ML2 | 73,38 ± 0,06 ^a | 25,05 ± 0,12 ^a | 6,66 | |
| | LS 2 | AL1 | - | 2,69 ± 0,76 ^{a/x} | 6,24 | |
| | | AL2 | - | 0,59 ± 0,11 ^{b/y} | 6,31 | |
| | LS 3 | ML3 | 73,66 ± 0,1 ^a | 25,43 ± 0,18 ^a | 6,79 | |
| | | AL1 | - | 1,02 ± 0,01 ^{a/x} | 6,23 | |
| | | AL2 | - | 0,42 ± 0,11 ^{b/y} | 6,28 | |
| | | AL3 | - | 0,17 ± 0,00 ^{c/z} | 6,38 | |
| | TT2 | Control | MP | 86,70 ± 0,01 ^a | 11,78 ± 0,01 ^a | 6,61 |
| | | | MC | 73,75 ± 0,05 ^a | 24,68 ± 0,12 ^a | 6,52 |
| TT | | AC | - | 2,40 ± 1,38 | 5,99 | |
| | | ML1 | 71,26 ± 0,07 ^a | 27,26 ± 0,23 ^a | 6,56 | |
| LS 1 | | AL1 | - | 1,19 ± 0,01 ^{d/x} | 6,31 | |
| | | ML2 | 74,15 ± 0,04 ^a | 23,87 ± 0,21 ^a | 6,78 | |
| LS 2 | | AL1 | - | 1,16 ± 0,07 ^{d/x} | 6,31 | |
| | | AL2 | - | 0,43 ± 0,00 ^{e/y} | 6,35 | |
| LS 3 | | ML3 | 74,26 ± 0,04 ^a | 24,58 ± 0,20 ^a | 6,83 | |
| | | AL1 | - | 1,37 ± 0,00 ^{d/x} | 6,35 | |
| | | AL2 | - | 0,51 ± 0,12 ^{e/y} | 6,40 | |
| | | AL3 | - | 0,34 ± 0,00 ^{f/z} | 6,52 | |

MP: Materia prima; **MC:** Músculo cocido; **AC:** Agua de cocción; **ML1:** Músculo del 1° lavado; **ML2:** Músculo del 2° lavado; **ML3:** Músculo del 3° lavado; **AL1:** Agua del 1° lavado; **AL2:** Agua del 2° lavado; **AL3:** Agua del 3° lavado. Letras diferentes (a, b, c, d, e, f) en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos térmicos. Letras diferentes (x, y, z) en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas entre fracciones ALn del mismo proceso de lixiviación (p-valor >0,05).

Para la elaboración de los concentrados proteicos se emplearon nueve ejemplares de pota, los cuales fueron mantenidos en refrigeración luego de su captura ($< 3 \pm 1^\circ\text{C}$, $< 48\text{h}$), y cuyos mantos fueron congelados ($< 18^\circ \pm 3^\circ\text{C}$, 4 meses) para llevar a cabo los experimentos. Por lo tanto, el lote control es el manto descongelado de pota.

El contenido de humedad y proteína del manto previamente congelado es similar a lo que reportan diversos autores para la materia prima *D. gigas* (IMARPE, 1996; Bravo, 2001; Maza *et al.*, 2003 y Omote, 2019). Sin embargo, se pudo notar una diferencia respecto a los valores de pH obtenidos en comparación con lo que se reporta para calamar gigante fresco.

Ordoñez & Plácido (2004), señalaron una relación entre el aumento de N-TMA y el pH, ambos índices para determinar la aceptabilidad para el consumo humano directo; en ese sentido, reportaron valores óptimos de pH dentro del rango 5,98 a 6,02 para músculo fresco de pota mantenida en refrigeración con hielo. Otros autores que también realizaron la medición de pH en muestras frescas conservadas en hielo fueron Bravo (2001) que reportó un pH de 6,17 y Omote (2019) que reportó un valor de 6,0.

Cabe señalar que, a diferencia del metabolismo de los peces, en los cefalópodos vivos ocurre el fenómeno de acidosis metabólica que se da por acumulación de cloruro de amonio (NH_4Cl) en relación a su tamaño, por ello el músculo de los cefalópodos es más ácido en comparación con el de los peces (Yamanaka *et al.*, 1995). Sin embargo, de acuerdo con Huss (1999) y Ruiz *et al.*, (2002), el pH dependerá de factores propios de la especie como el estado fisiológico y metabólico del animal, así como factores externos como el tiempo transcurrido desde la captura y la temperatura de almacenamiento. Maza *et al.*, (2008) señalaron que la medición del pH en especímenes tiene mayor validez para su uso como índice de calidad que como parámetro de monitoreo de la calidad durante el almacenamiento.

Los valores de pH del manto de pota descongelado obtenidos en el presente estudio, se asemejan a los de Sánchez-Alonso *et al.*, (2007) y Maza *et al.*, (2008) que reportaron valores de pH: 6,4 y 6,45, respectivamente, mientras que Márquez-Ríos *et al.*, (2007), Hernández *et al.*, (2018) y Yamanaka *et al.*, (1995) reportaron valores más altos, entre 6,6 y 6,7. En tal sentido, los valores de pH del manto crudo descongelado de pota registrados se encuentran dentro del rango aceptable para la especie y si bien estos pueden ser descritos como superiores a lo normal, puede deberse al método de descongelación utilizado (en agua), así como la pérdida de humedad y la eliminación de compuestos nitrogenados propias del

proceso de descongelación. Tampoco se descarta que puedan influir factores como el estadio fisiológico o el tiempo desde la captura (Ruiz *et al.*, 2002)

4.5.2. Efecto de los procesos de congelación y cocción sobre el músculo, larvas y alérgenos de *A. simplex*

Si bien el objeto de estudio del presente estudio es la evaluación de la reducción de la alergenicidad durante el proceso de lixiviación, de acuerdo al flujo presentado en el Anexo 2, previamente se realizaron dos procesos adicionales de relevancia en el presente estudio.

4.5.2.1. Efecto del proceso de congelación

El proceso de congelación ($<18^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 4 meses), fue realizado únicamente con el propósito de preservar las muestras hasta el momento idóneo de su uso (almacenamiento), es decir, no tiene relevancia en el proceso tecnológico de elaboración del concentrado proteico de pota; sin embargo, podría tener un efecto sobre las larvas ubicadas dentro del manto, así como sobre los alérgenos de *Anisakis simplex*.

La congelación de los alimentos busca conservar la calidad inhibiendo los cambios físicos, químicos y microbianos de forma que al descongelar sus características sean lo más parecidas a los del producto fresco; sin embargo, puede dar lugar a cambios indeseables que pueden afectar la calidad de los productos finales limitando su uso (IIF, 1990; Torrejón, 1996). De acuerdo a Fennema (2000), al disminuir la temperatura del alimento se debilita la fuerza de las interacciones hidrofóbicas, las cuales contribuyen a la estabilidad de las proteínas globulares, produciendo disociación oligomérica, cambios de conformación y agregación.

En la industria pesquera, dependiendo el tiempo que tome el proceso de congelación o la duración del almacenamiento en congelación, el músculo de pescado sufre cambios químicos y estructurales. Los cambios de mayor importancia tecnológica están ligados a las proteínas miofibrilares que incluyen la variación conformacional, la formación de enlaces proteína-proteína y la pérdida de solubilidad lo cual dificulta su extracción en soluciones salinas y otro tipo de agentes impactando negativamente en la textura y en la pérdida de otras propiedades funcionales (Tejada *et al.*, 2003a; 2003b).

Sotelo (2011) señala que el músculo de calamar gigante también sufre de cambios estructurales como una desnaturalización parcial de las proteínas en la congelación-

descongelación; sin embargo, las proteínas miofibrilares de esta especie presentarían una gran estabilidad térmica lo que permite la conservación de la capacidad gelificante en la congelación o durante su almacenamiento bajo tales condiciones, sin necesidad de adicionar estabilizantes en el proceso.

Por otro lado, se ha demostrado que la congelación de productos infestados con *Anisakis sp.* no solo produce la muerte de larvas, sino que puede ocasionar fracturas y cambios en la microestructura de la cutícula modificando así la permeabilidad de esta, lo cual podría generar una liberación de los alérgenos en el alimento al aplicar tratamientos culinarios posteriores provocando la consecuente reacción inmune en los consumidores (Tejada *et al.*, 2006; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Olivares, 2012).

Rodríguez-Mahillo *et al.*, (2010) demostró la presencia de alérgenos de *Anisakis simplex*, entre ellos Ani s 4, en músculo infestado de merluza conservada en congelación (-20°C) por un periodo de once meses. Olivares (2012) señala que la técnica más adecuada para la detección de antígenos para evaluar alérgenos en productos congelados es la Inmunohistoquímica por su alta sensibilidad, en contraste con las técnicas de inmunodetección por Western Blot o Dot Blot cuyas eficacias dependen en primera instancia de la extracción de proteínas alergénicas de la matriz alimenticia. Asimismo, afirma que la técnica utilizada para la extracción de las proteínas alergénicas no se vio influenciada por la formación de agregados proteicos (la cual se evidenció a los 210 días de conservación) ya que pudo detectar Ani s 4 en muestras congeladas por más de 400 días. Por lo tanto, en base a lo observado por estos autores y tomando en cuenta las condiciones de conservación en congelación que fueron aplicadas al músculo de pota, no podría afirmarse la eliminación total de los posibles antígenos de *A. simplex* contenidos en el mismo, pero sí que contribuye a reducir la capacidad alergénica desde el proceso inicial en la elaboración del CPP.

4.5.2.2. Efecto del proceso de cocción

También debería considerarse el efecto del tratamiento térmico de cocción, que de acuerdo al esquema experimental del Apartado 3.5.1.1, se corresponde con dos experimentos: El primero consistió en someter el músculo a una cocción rápida (hasta que el centro del músculo alcanza los 90°C) y el segundo consistió en una cocción prolongada (diez minutos adicionales desde que el centro del músculo alcanzó los 90°C). Cabe señalar que el tiempo para alcanzar dicha temperatura en el centro de cada listón de músculo de pota fue de 11 minutos aproximadamente.

El objetivo de estos procesos fue determinar la influencia de un mayor tiempo de cocción en la detección de alérgenos, estudio que no logró concretarse por las razones anteriormente expuestas. No obstante, estudios han demostrado que los tratamientos térmicos de cocción o esterilización tienen un efecto sobre la viabilidad de las larvas y en la reducción de alergenidad (Vidaček *et al.*, 2011; Olivares, 2012).

Respecto al tratamiento térmico de cocción como tal, autores como Sikorski & Pan (1994) señalaron que el proceso de cocción en productos pesqueros tiene un objetivo distinto al de los alimentos de otra naturaleza, con el cual principalmente se busca la inactivación de enzimas endógenas y bacterianas para evitar el deterioro en la calidad de los pescados y mariscos. Además, la duración y temperatura de cocción inducen cambios en el color, las propiedades reológicas y la pérdida de la capacidad de retención de agua. También ocurre una mejora del sabor por la liberación de proteínas sarcoplasmáticas y otros compuestos hidrosolubles como el cloruro de amonio (NH_4Cl) y las bases volátiles nitrogenadas (N-BVT) (Carrizoza, 2000; Maza *et al.*, 2003 y Porturas *et al.*, 2019).

El tratamiento térmico de cocción induce cambios fisicoquímicos en el músculo de calamar como la ruptura de complejos de actomiosina, hidrólisis inespecífica, desnaturalización y/o agregación de proteínas. Asimismo, la conversión de colágeno intramuscular en gelatina ocurre en mayor proporción durante la cocción de aletas y tentáculos en comparación con el músculo, debido a la concentración inicial del componente en dichas porciones anatómicas del cuerpo (Torres-Arreola *et al.*, 2008; 2018).

En la Tabla 10 del Apartado 4.5.1 a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticas del porcentaje de proteína entre tratamientos (TT1 y TT2) ni con el Control (MP), se puede observar que, el contenido de proteína de los músculos cocidos (MC) es mayor respecto al músculo crudo (MP). Hernández *et al.*, (2018) observó un comportamiento similar reportando un 16% de proteína en pulpa fresca de calamar y 43% en pulpa precocida (90°C, 15 min). Este aumento de la fracción proteica se debe a la disminución de otros componentes (principalmente de la humedad) producto de la desnaturalización de proteínas y consecuente pérdida de la capacidad de retención del agua, así como la solubilización y gelatinización del tejido conectivo (Lanier *et al.*, 2005; Torres-Arreola *et al.*, 2018).

Asimismo, se observó que al someter el músculo a una cocción prolongada (TT2), este pierde más humedad en comparación al músculo sometido a una cocción rápida (TT1). En relación con ello, Torres-Arreola *et al.*, (2018) observó que el contenido de proteína soluble

en manto de pota disminuyó conforme aumentó el tiempo de cocción, y reportó que el músculo cocido por 30 minutos presentó aproximadamente la tercera parte del contenido de proteína soluble inicial (músculo crudo).

De acuerdo con Lazo (2006), en la elaboración del concentrado proteico se recomienda realizar el proceso de cocción previo a los lavados sucesivos

s durante la lixiviación con el fin de conferirle estabilidad al músculo de pota reduciendo el contenido de humedad e inactivando la actividad enzimática.

Según Franssen *et al.*, (2019) es necesario someter a los alimentos de origen animal a temperaturas superiores a 60°C por un tiempo de 15 a 30 minutos para producir la muerte de parásitos de transmisión alimentaria, que de acuerdo con FAO/WHO (2014) de los 24 parásitos de mayor relevancia son 14 los que están asociados a alimentos de origen animal o FoAA “Food of animal origin” entre los cuales destacan las larvas de *Anisakis* spp.

Vidaček *et al.*, (2010), comprobó que la muerte de larvas de *Anisakis* spp. al aplicar calor por encima de los 60°C ocurre de manera parcial ya que observó un pequeño porcentaje de movilidad de larvas después del tratamiento térmico de 60°C a 2 y 10 minutos, por lo que recomienda temperaturas mayores (70°C por un mínimo tiempo de 1 minuto) para evitar la infestación en el consumidor (hospedero accidental).

Los tratamientos térmicos contemplados en el diseño experimental del presente estudio: TT1 (90°C + 0 min) y TT2 (90°C + 10 min), estarían asegurando la inviabilidad de larvas que podrían haber quedado enquistadas en el manto de la pota, ya que de acuerdo a EFSA (2010) para garantizar la muerte de las larvas de *Anisakis* spp. es necesaria la aplicación de calor \geq 60°C en el centro térmico durante 1 minuto o incluso tomando como referencia a Vidaček *et al.*, (2010) que observaron la muerte de larvas (0% movilidad) desde los 30 segundos al aplicar calor a 90°C. En ese orden, Wootten & Cann (2001) señalan que, solo para mantener una temperatura de 60°C en el centro más frío en filetes de pescado de 3 cm de espesor, el tiempo total de exposición al calor es de 10 minutos. Por lo tanto, la aplicación de calor bajo las condiciones dadas en el presente estudio estaría previniendo la infestación y potencial sensibilización del consumidor desde el punto de vista de inactivación del parásito.

Similar al efecto que tiene la congelación en las larvas de *Anisakis* (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008), determinadas condiciones de temperatura y tiempo en la cocción pueden ocasionar daño en la cutícula de la larva y la consecuente liberación de alérgenos hacia el

músculo o medio. Al respecto, Olivares (2012) determinó que existe una menor detección de alérgenos, Anisakis 4 y Extracto crudo de *A. simplex*, en muestras de Atún Rabil *Thunnus albacares* sometidas al proceso de enlatado (115°C, 70 minutos de esterilización) en las que solo se evaluó el músculo, en comparación con muestras que consideraron tanto el músculo como el líquido de gobierno para la extracción de proteínas alergénicas.

Por lo tanto, se ha comprobado la liberación de alérgenos de la larva al tejido de la musculatura de pescado infestado con *Anisakis* luego de someterlo a tratamientos de calor por cocción (Vidaček *et al.*, 2011) así como la liberación de los alérgenos de la larva hacia el medio líquido de contacto como el exudado que se desprende del músculo debido a la cocción y que se quedarían retenidos en el líquido de gobierno en el caso de conservas de pescado. Con esas evidencias se apoyaría la hipótesis de que en el agua de cocción del músculo de pota descongelado (AC), fracción que presentó un porcentaje de proteínas más elevado que el agua del primer lavado (AL1) según la Tabla 10, se podría estar eliminando parcialmente las proteínas alergénicas.

4.6. Evaluación del efecto del proceso de lixiviación sobre los alérgenos de *Anisakis simplex*.

Como se ha descrito en el Apartado 4.5.2, los procesos de congelación y cocción realizados previo al proceso de lixiviación tienen un efecto en las proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma, por ende, los antígenos de *Anisakis* spp. al ser proteínas pueden también sufrir variaciones en su composición que afecten su detección o ser parcialmente extraídos en fracciones solubles por lo que la actividad alergénica al inicio del proceso de lixiviación sería mucho menor.

Los métodos de obtención de productos proteicos difieren dependiendo la aplicación tecnológica y por ende la funcionalidad que se desea conservar en el producto (Sonu, 1973; Canahualpa, 2008; Omote *et al.*, 2014). Así por ejemplo el surimi de pescado es una pasta estabilizada de proteína miofibrilar obtenida a partir de lavados sucesivos que posee una buena estabilidad durante su almacenamiento por largos periodos de tiempo y una excelente capacidad para formar geles (Moreno *et al.*, 2014).

La aplicación de lavados sucesivos en el proceso de lixiviación del presente estudio tuvo por finalidad la eliminación de compuestos nitrogenados no proteicos que le confieren olor y sabor desagradables al músculo de la especie *D. gigas*, como: cloruro de amonio (NH₄Cl),

bases volátiles nitrogenadas totales (N-BVT), trimetilamina (N-TMA), péptidos y aminoácidos (Maza *et al.*, 2003; 2008). Estas características hacen que la especie no resulte atractiva para su utilización en concentrados de proteína tipo surimi ya que desde otra perspectiva presenta músculo de color blanco y su gran disponibilidad en el ecosistema permite asegurar su abastecimiento a nivel mundial (Sánchez-Alonso *et al.*, 2007).

El porcentaje de proteína de los músculos lavados (ML) de los lotes 1 y 2 no tuvo significancias estadísticas entre sí; sin embargo, estos fueron significativamente menores al del lote Control. Adicionalmente, se demostró que las tres soluciones de lavado de cada lote presentaron porcentajes con significancias estadísticas, la solución del primer lavado (S1) concentró la mayor cantidad de proteína mientras que la solución del tercer lavado (S3), la menor. Al respecto, Tejada *et al.*, (2003b) reportó que la cantidad de proteína extraída en un primer lavado aumenta a mayor tiempo de almacenamiento en congelación, Morrissey *et al.*, (2005) calculan que tras un primer lavado podría eliminarse hasta un 50% de los componentes solubles mientras que Olivares *et al.*, (2014) reportaron la eliminación del 77% de proteínas en el primer lavado de músculo crudo de merluza.

La metodología aplicada para obtener surimi de pescado guarda cierto grado de similitud con lo ejecutado en la elaboración de concentrado proteico de pota ya que ambos aplican lavados sucesivos al músculo, razón por la cual se ha elegido realizar una comparación con data no publicada de Olivares (2012) del proceso de lavados sucesivos tipo surimi de músculo de merluza infestada. Si bien el objetivo de los lavados en ciclo realizados en la elaboración de surimi, que parte de materia prima cruda picada, es de eliminar grasa, enzimas, pigmentos, proteínas sarcoplásmicas, así como compuestos indeseables (amoniacaes) y evitar interferencia con las proteínas miofibrilares gelificantes para concentrar la fracción miofibrilar que es la que aporta funcionalidad (capacidad de retención de agua, emulsificación y gelificación) (Gallo, 2004); en el caso de surimi de calamar no se recomienda seguir el mismo método ya que la proteína miofibrilar de los cefalópodos es mucho más soluble en agua que la de los peces (Careche *et al.*, 2004). Por tal motivo se han desarrollado técnicas que incluyen la solubilización ácida-alcalina, filtrado, precipitación isoelectrica, neutralización, adición de crioprotectores y congelado (Maza *et al.*, 2003; Maza y Rosales, 2004; Careche *et al.*, 2004; Sánchez-Alonso *et al.*, 2007).

La detección de alérgenos de *Anisakis* spp. en productos pesqueros es importante dada la relevancia clínica que presentan. En ese orden, *Anisakis simplex* es el único helminto parásito que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune asociada a su parasitación. A la fecha,

de los catorce alérgenos caracterizados de *A. simplex* (Ani s 1 – 14), solo siete se consideran principales por ser reconocidos en más del 50% de pacientes alérgicos/sensibilizados. Entre ellos figuran Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 11.0201, Ani s 12, Ani s 13 y Ani s 14. (González, 2018)

De acuerdo a Gonzáles (2018), se recomienda el uso de los alérgenos Ani s 1, Ani s 7 y Ani s 13 para el diagnóstico serológico de anisakiosis por su sensibilidad y especificidad. Además, sugiere que la exposición y sensibilización previa a tropomiosina de camarón nórdico *Pandalus borealis* (alérgeno Pan b 1) podría ocasionar reactividad cruzada con la tropomiosina de *Anisakis* (alérgeno Ani s 3) ocasionando la detección de falsos positivos en el diagnóstico mediante InmunoCAP®.

Por otro lado, se ha determinado que Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5 y Ani s 11.0201 son alérgenos termoestables de relevancia clínica idóneos para el diagnóstico resuelto de pacientes sensibilizados a *Anisakis* mediante el uso del Test de Activación de Basófilos TAB (Carballeda, 2017). Los que tienen mayor valor diagnóstico son Ani s 1 y Ani s 11.0201 (84 y 78% de positividad en pacientes, respectivamente), mientras que Ani s 4 a pesar de presentar 27% de reactividad cobra importancia por su asociación con episodios de anafilaxia (Audicana *et al.*, 2002; Moneo *et al.*, 2005), además que ha sido objeto de estudio en evaluaciones de la actividad alérgica en productos de la pesca ya que se ha comprobado su resistencia al calor, digestión con pepsina y autoclavado (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Vidaček *et al.*, 2011; Carballeda-Sangiao *et al.*, 2014; Tejada *et al.*, 2014).

4.6.1. Análisis comparativo del comportamiento de alérgenos de *A. simplex* en músculo infestado de merluza sometido a lavados sucesivos tipo surimi con las condiciones del proceso de lixiviación durante la elaboración de Concentrado proteico de pota (CPP)

La detección de alérgenos de *A. simplex* en muestras de alimentos puede realizarse utilizando distintas metodologías, sin embargo, en todas es necesaria la fabricación de antisueros específicos. Debido a que no se logró completar el estudio de inmunodetección de las muestras obtenidas del procesamiento de CPP, con el objetivo de comparar e inferir el comportamiento de los alérgenos en las condiciones del presente estudio, se ha tomado como referencia data no publicada de los valores cuantitativos de los antígenos de *A. simplex* (Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex*) obtenidos por Olivares (2012) como resultado de la

inmunodetección por DB de músculo crudo (MP), músculo lavado y prensado (ML) y soluciones de lavado (S1, S2 y S3) de los lotes evaluados por la autora durante el experimento de lavados sucesivos tipo surimi en músculo infestado refrigerado de merluza *Merluccius merluccius*. Se seleccionaron los lotes que guardan mayor semejanza con el proceso de elaboración de los concentrados proteicos de pota (CPP), en términos del tipo de solución de lavado empleada y sus valores de pH correspondientes.

Para la elaboración de los concentrados proteicos de pota (CPP), del presente estudio, la solución utilizada en el proceso de lixiviación fue agua H₂O; sin embargo, el hipoclorito de sodio NaClO es normalmente utilizado en la industria para la limpieza y desinfección de productos pesqueros previamente a su procesado (Hernández *et al.*, 2018). De acuerdo con SANIPES (2010) el contenido de cloro libre residual en agua/hielo para el lavado o puesta en contacto de productos pesqueros deberá estar entre 0,5 y 2,0 ppm; no obstante, también señala que el límite máximo permisible de cloruros en agua/hielo que no resulta peligroso para la salud de los consumidores es de 250 ppm. En tal sentido, se seleccionaron los lotes cuyas soluciones de lavado fueron agua (H₂O) e hipoclorito de sodio (NaClO, 20 ppm).

Los valores de pH, que varían de acuerdo a la solución empleada, fueron relevantes de considerar por su relación con la solubilidad de las proteínas. La variación del pH modifica la carga neta de las proteínas, es decir, su balance electrostático por lo que, a valores cercanos al punto isoeléctrico, la carga neta se aproxima a cero y la interacción con las moléculas de agua es mínima conduciendo a una precipitación isoeléctrica mientras que, a valores superiores o inferiores a su pI, con cargas negativas o positivas, ocurre mayor interacción con las moléculas de agua favoreciendo su solubilización (Cheftel *et al.*, 1989; Abugoch, 2006).

En la Tabla 11 se presenta el porcentaje de proteína y la cantidad de antígenos de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* presente en las muestras (ML, S1, S2 y S3) respecto al lote Control (MP), correspondientes al estudio de lavados sucesivos tipo surimi aplicado a músculo infestado de merluza.

Tabla 11. Porcentaje de humedad y proteína (%), cantidad de antígenos de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) y valores de pH en músculo lavado y soluciones de lavado, de merluza infestada artificialmente (50 larvas/ 100g músculo) sometida a lavados sucesivos tipo surimi.

| Lote | Muestra | Humedad (%) | Proteína (%) | Anis 4 | Extracto crudo de <i>A. simplex</i> | pH |
|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Control | MP | 81,01 \pm 0,27 ^a | 17,24 \pm 1,93 ^a | 0,58 \pm 0,61 ^a | 1,55 \pm 1,78 ^a | - |
| Lote 1 | ML | 88,6 \pm 0,14 ^b | 11,93 \pm 0,58 ^b | 0,88 \pm 0,60 ^a | 8,19 \pm 6,19 ^a | 6,77 \pm 0,02 ^a |
| | S1 | - | 1,58 \pm 0,05 ^{a/x} | 4,42 \pm 2,69 ^{a/x} | 13,33 \pm 5,92 ^{a/x} | 7,10 \pm 0,04 ^a |
| | S2 | - | 1,13 \pm 0,10 ^{a/y} | 4,74 \pm 3,2 ^{a/x} | 11,13 \pm 4,23 ^{a/x} | 7,20 \pm 0,02 ^a |
| | S3 | - | 0,59 \pm 0,13 ^{a/z} | 2,06 \pm 0,7 ^{a/x} | 3,59 \pm 1,54 ^{a/x} | 7,34 \pm 0,02 ^a |
| Lote 2 | ML | 88,72 \pm 0,18 ^b | 11,93 \pm 1,17 ^b | 0,83 \pm 0,47 ^a | 6,56 \pm 0,11 ^{a/x} | 7,10 \pm 0,01 ^a |
| | S1 | - | 2,09 \pm 0,04 ^{a/x} | 3,70 \pm 2,72 ^{a/x} | 11,52 \pm 8,45 ^{a/x} | 7,12 \pm 0,02 ^a |
| | S2 | - | 1,24 \pm 0,08 ^{a/y} | 3,44 \pm 0,64 ^{a/x} | 11,26 \pm 9,07 ^{a/x} | 7,22 \pm 0,04 ^a |
| | S3 | - | 0,71 \pm 0,06 ^{a/z} | 1,85 \pm 0,21 ^{a/x} | 3,33 \pm 1,01 ^{a/x} | 7,23 \pm 0,01 ^a |

MP: Músculo infestado sin tratamiento (Control); **ML:** Músculo obtenido después del 3º lavado; **S1:** Solución del 1º lavado; **S2:** Solución del 2º lavado; **S3:** Solución del 3º lavado; **Lote 1:** H₂O; **Lote 2:** NaClO 20 ppm. Letras diferentes (a, b, c.) en la misma columna significan diferencias entre lotes (p-valor>0,05). Letras diferentes (x, y, z) en la misma columna significan diferencias entre fracciones Sn del mismo lote (p-valor>0,05).

Ani s 4 presenta un peso molecular estimado de 12,7 kDa y un punto isoeléctrico de 5.56 (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007). Por lo tanto, durante el proceso de lixiviación es importante controlar los niveles de pH que permitan solubilizar los antígenos de *Anisakis* spp. para evitar que estos precipiten y se complique su extracción en la fracción soluble.

En los Lotes 1 y 2, los valores de pH de las soluciones de lavado (S1, S2 y S3) oscilaron entre 6.76 – 7.36, por lo tanto, la proteína del músculo se encontró expuesta a un pH superior al pI de Ani s 4, lo cual favorece la solubilización y posterior eliminación de dicha proteína alérgica (Olivares, 2012). De manera similar, los pH de las aguas de lavado (AL1, AL2 y AL3) durante la elaboración de los CPP oscilaron entre 6.22 – 6.38 en el primer tratamiento térmico y entre 6.31 – 6.52 en el segundo tratamiento térmico, estos valores son ligeramente más próximos al pI de Ani s 4 en comparación con los de lavado tipo surimi, sin embargo, siguen siendo superiores por lo que se estaría manteniendo la solubilidad del antígeno facilitando su extracción en la fracción soluble.

Ani s 1, al igual que Ani s 4, es un alérgeno clínicamente relevante (Carballeda, 2017; Moneo *et al.*, 2000) y para algunos autores es el alérgeno más importante de *Anisakis simplex*. (Moneo *et al.*, 2000; D'Amelio *et al.*, 2020) ya que ha presentado hasta 93% de positividad en pacientes sensibilizados (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2007). Este presenta dos isoformas con pesos moleculares de 24 kDa y 21 kDa (Shimakura *et al.*, 2004) y también muestra estabilidad al calor. El pI de Ani s 1 es 7,48 de acuerdo a Kochanowski *et al.* (2020), por lo que este alérgeno tendría una mayor solubilidad que Ani s 4 en las mismas condiciones de elaboración de CPP y podría estar siendo eliminado en mayor proporción en las aguas de lavado (AL) junto con otros antígenos que en suma representan el Extracto crudo de *A. simplex*.

Respecto a la inmunodetección de los alérgenos de *A. simplex* presentado en la Tabla 11, en general, la cantidad ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Extracto crudo antigénico de *A. simplex* superó significativamente a la de Ani s 4 en cada una de las muestras evaluadas. Asimismo, la cantidad detectada de ambos antígenos en los músculos lavados (ML) de los dos lotes no mostró diferencias estadísticas significativas en comparación con el músculo sin tratamiento (MP). Al respecto, cabe señalar que la cuantificación de antígenos fue realizada por duplicado observándose una alta variación en los resultados lo cual podría estar relacionado con que no todas las repeticiones fueron analizadas al mismo tiempo ya que el segundo batch

de muestras serológicas fueron conservadas en frío por un mayor tiempo lo cual pudo influir en el marcaje.

Por otro lado, al comparar la cuantificación de antígenos Anis 4 y de Extracto crudo de *A. simplex* entre lotes, se observó que el Lote 1, presentó la mayor detección en todas sus fracciones (músculo lavado y soluciones de lavado), con excepción del Extracto crudo de *A. simplex* detectado en la solución de lavado S2 del Lote 2.

En ambos lotes se observó que la cantidad de antígenos detectada en la fracción soluble disminuye con el número de lavados y aunque no se evidenciaron significancias estadísticas entre sí, se comprueba la eliminación de proteínas alergénicas en músculo infestado sometido a lixiviación con lavados sucesivos que emplean H₂O y NaClO 20 ppm, dado que se pudo cuantificar la presencia de Anis 4 y de Extracto crudo de *A. simplex* en las tres soluciones de lavado (S1, S2 y S3) (Ver Figura 16). Este mismo comportamiento podría reproducirse en una detección de antígenos de *A. simplex* en las muestras del experimento del CPP por tener características similares.

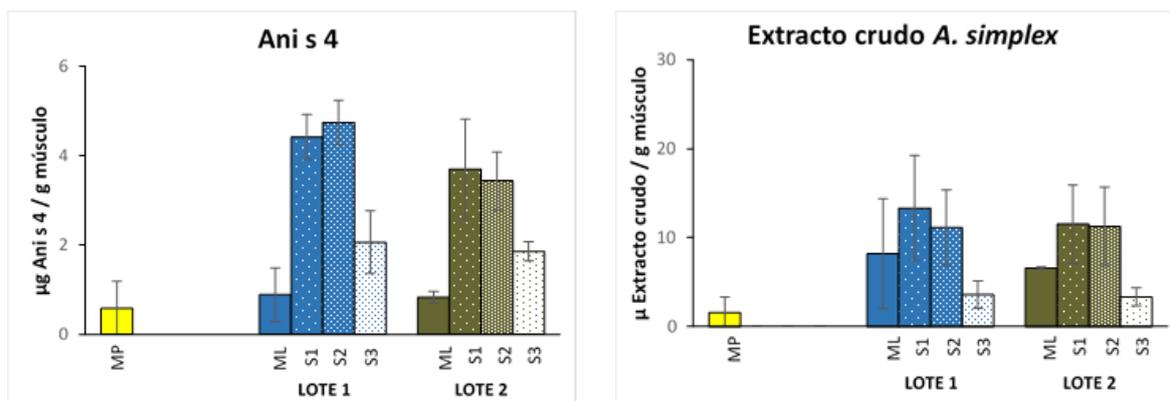


Figura 16. Cantidad de antígenos de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min) con dos tipos de soluciones de lavado. **MP:** Músculo crudo de merluza (Control); **ML:** Músculo obtenido después del 3° lavado; **Lote 1:** H₂O; **Lote 2:** NaClO 20 ppm. **S1:** Solución del 1° lavado; **S2:** Solución del 2° lavado; **S3:** Solución del 3° lavado.

Otro punto importante por considerar es que la mayor o menor detección de antígenos puede estar influenciada por el tipo de parasitación del músculo empleado. En el experimento realizado por Olivares (2012) se realizó una infestación artificial del músculo de merluza

con una alta tasa de parasitación (50 larvas/ 100 g músculo) por lo que es más probable encontrar una mayor detección de antígenos, a diferencia de los experimentos realizados durante la elaboración de los concentrados proteicos en donde se trabajó con músculo de pota con parasitación natural, la cual resultó ser muy baja (Apartado 4.3.1.) e incluso se comprobó que los parásitos hallados no fueron todos del género *Anisakis*, aunque pertenecían a la misma familia.

El proceso tecnológico para la obtención de los seis concentrados proteicos de pota (CPP) seguido en el presente estudio fue realizado empleando solo los mantos, por lo tanto, para cuantificar la tasa de parasitación inicial de la materia prima se ha realizado el cálculo en función a la cantidad de larvas encontradas exclusivamente en el manto respecto al total de potas parasitadas de los tres lotes. Se observó, en promedio, una cantidad de 1.45 larvas anisákidas en potas con PEM de 2.66 ± 0.52 Kg, lo que se traduce en una tasa de infestación natural promedio aproximada de 0.054 larvas/100g de músculo del manto. Al comparar esta información con datos de infestaciones naturales o artificiales (\approx 10-90 larvas/100g de músculo) utilizadas en investigaciones que aplican tratamientos tecnológicos de lavado y cocción (en especies como merluza, boquerón, etc.) con el fin de inactivar las larvas de anisákidos pero enfocadas también en la eliminación de la alergenicidad por *Anisakis simplex* (Olivares, 2012; Olivares *et al.*, 2014; Tejada *et al.*, 2014), podemos notar una diferencia altamente significativa que pone en desventaja la posibilidad de detectar antígenos en las muestras de músculo crudo de pota (infestación natural heterogénea) pero más aún en las muestras de proceso (ML y AL) y el producto final (CPP) desarrollados en la presente investigación.

De la misma manera, otro factor que podría influir en la mínima o nula detección de alérgenos es la especie de parásito que se encontraba infestando el manto de pota, el cual como se ha señalado en el Apartado 4.3.1. fue exclusivamente *Hysterothylacium sp.* Algunos autores refieren que *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) es una especie anisákida cosmopolita no zoonótica (González, 1998); sin embargo, se han reportado casos de infección con esta especie de parásito (Yagi *et al.*, 1996; Kalay *et al.*, 2009) y se ha revelado su potencial alergénico empleando modelos murinos (Ribeiro *et al.*, 2017).

Por otro lado, las larvas de *Anisakis* tipo II se encontraron infestando tejidos de la cavidad celómica o pluma, y aunque ha reportado la presencia de *A. physeteris* (*Anisakis* Tipo II) infestando el manto de un calamar del género *Histioteuthis* (Palomba *et al.*, 2021), los

antígenos de interés a detectar pertenecen a *A. simplex* que es del morfotipo I, por lo que la probabilidad de detectar alérgenos se reduce aún más. No obstante, existe evidencia de que *A. simplex* parasita pota de la costa peruana por lo que no podría descartarse la presencia del parásito en el recurso en próximos muestreos y por lo tanto en la materia prima utilizada en el procesamiento industrial de concentrado proteico.

Finalmente, se podría inferir que de estar presentes los alérgenos de *A. simplex* en el músculo de pota, lo cual puede ocurrir sin la presencia del parásito vivo, el proceso de lixiviación que emplea como solución de lavado Agua H₂O, estaría favoreciendo la eliminación de los antígenos más importantes como Ani s 4 y Ani s 1 ya que los niveles de pH registrados durante la operación permitirían que estos se mantengan solubles facilitando su extracción en las aguas de lavado. Además, los procesos de congelación, cocción, y sobre todo la ínfima tasa de parasitación natural reportada influirían en la reducción de la alergenicidad lo cual hace suponer que, bajo las condiciones del presente estudio, la cantidad de antígenos residual en el producto final sería indetectable ya que no alcanzaría el umbral mínimo (1ppm) de detección de la técnica de inmunodetección por DB de acuerdo a Rodríguez-Mahillo *et al.*, (2011).

Por último, es importante señalar que la técnica de inmunodetección anteriormente mencionada ha sido estandarizada y por lo tanto es aplicable en productos pesqueros con humedades superiores (>60%), como es el caso de músculo de pescado. Por lo tanto, en el caso de evaluar la alergenicidad en los concentrados proteicos de pota, que consisten en polvo precocido con un porcentaje de humedad muy bajo (<8%), sería necesario resuspender las muestras secas, es decir, adaptar la técnica a muestras de bajo contenido de humedad.

V. CONCLUSIONES

- De los 100 ejemplares de *Dosidicus gigas* “pota” muestreados se identificaron, de acuerdo con sus características morfológicas, larvas L3 de dos especies de nemátodos parásitos: *Anisakis* Tipo II y se reporta por primera vez el género *Hysterothylacium* sp en dicho recurso.
- La prevalencia total de infección fue de 48%. La zona de captura con mayor prevalencia fue Matarani (72%), seguido de La Puntilla (41%) y la menor prevalencia reportada fue de Atico (26%) donde se registraron ejemplares *D. gigas* con las menores tallas. La prevalencia por *Hysterothylacium* sp predominó sobre *Anisakis* Tipo II; sin embargo, *Anisakis* Tipo II tuvo una mayor intensidad media de infección.
- La localización de las larvas fue exclusiva de la especie. Las L3 de *Anisakis* Tipo II se localizaron encapsuladas en la cavidad celómica (restos de órganos y gónadas) y en la concha (al interior de la pluma) mientras que las larvas de *Hysterothylacium* sp. se localizaron de forma libre incrustadas debajo de la pared interna del manto.
- Las condiciones del proceso de lixiviación durante la elaboración del concentrado proteico de pota son semejantes al proceso de lavados en ciclo en la elaboración de surimi de pescado, en tal sentido, en base a la comparación realizada con los datos presentados de inmunodetección de músculo lavado de merluza parasitada y los pH registrados cuando la solución de lavado es agua H₂O, se puede inferir que dicho proceso favorece la eliminación no solo de los compuestos nitrogenados amoniacales sino también de los alérgenos de *Anisakis simplex* en la fracción soluble.
- Al emplear una parasitación natural, la tasa de parasitación (0.054 larvas/100 g de músculo) es ínfima, a diferencia del experimento comparativo que emplea una parasitación artificial de 50 larvas/100g de músculo y que aún en dichas condiciones la cantidad detectada en el tercer lavado bordea los 3 ppm (cercano al umbral de detección de 1 ppm). Por lo tanto, se sospecha que, bajo tales condiciones, la cantidad de alérgenos de *A. simplex* sería indetectable en el músculo lavado y el producto final CPP.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación molecular de las especies de anisákidos que infestan a *D. gigas* “pota” y los demás recursos hidrobiológicos con los que tiene interacción en la red trófica, dada su importancia zoonótica.
- Evaluar la fauna parasitaria de *Dosidicus gigas* “pota” en diferentes épocas del año.
- Se sugiere el empleo de infestación experimental artificial con mayores tasas de parasitación (≥ 50 larvas/100g músculo) en próximos estudios para validar la eficacia de los procesos de cocción y lixiviación en la eliminación de alérgenos de *Anisakis* durante la elaboración de concentrado proteico de pota dado que en estudios anteriores se ha demostrado la presencia de *A. simplex* en pota *D. gigas* capturada en la costa peruana.
- Se sugiere considerar la aplicabilidad de la técnica de extracción de antígenos de *A. simplex* citada en el presente estudio, con el fin de aplicarla a los productos pesqueros de bajo contenido de humedad.
- Continuar con el estudio de alergenicidad en productos pesqueros desarrollados a nivel comercial - industrial.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abattouy, N. (2012). Prevalencia y factores de riesgo de la anisakiosis en el norte de Marruecos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Abollo, E; Gestal, C; Pascual, S. (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitol Res*, 87, 492–499.

Abugoch, L. (2006). Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). Tesis doctoral. Universidad de La Plata, Facultad de ciencias exactas, Buenos Aires, Argentina

Aco Alburqueque, R.; Palomba, M.; Santoro, M.; Mattiucci, S. (2020). *Molecular Identification of Zoonotic Parasites of the Genus Anisakis (Nematoda: Anisakidae) from Fish of the Southeastern Pacific Ocean (Off Peru Coast)*. *Pathogens*, 9(11), 910. doi:10.3390/pathogens9110910

Acosta, A., & Silva, R. (2015). First record of *Hysterothylacium* sp. Moravec, Kohn et Fernandes, 1993 larvae (Nematoda: Anisakidae) infecting the ornamental fish *Hyphessobrycon eques* Steindachner, 1882 (Characiformes, Characidae). *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 75(3), 638–642. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.19913>

Adelina, N. (2017). Evaluación del potencial zoonótico de *Contraecaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) e *Hysterothylacium* spp. (Nematoda: Raphidascauridae) como agentes de anisakidosis humana. Tesis doctoral. Bahía blanca, Argentina, Universidad Nacional del Sur. 184 pp.

Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN. (2011). La alergia por *Anisakis* y medidas de prevención. Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia, en relación con los factores favorecedores de la aparición de alergia a *Anisakis*, así como de las medidas de prevención aplicables.

- Alegre, A. (2011). Relaciones ontogénicas y espacio-temporales en la dieta del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en Perú, utilizando un modelo aditivo generalizado. Tesis Máster. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria la Molina. 114 pp.
- Alegre, A.; Ménard, F.; Tafur, R.; Espinoza, P.; Argüelles, J.; Maehara, V.; Bertrand, A. (2014). Comprehensive Model of Jumbo Squid *Dosidicus gigas* Trophic Ecology in the Northern Humboldt Current System. Doi: 10.1371/journal.pone.0085919
- Anderson, R.; Chabaud, A.; Willmott, S. (1974). CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. Nº 2. *Keys of the Ascaridoidea*. U.K: CAB International Farnham Royal, Nº 1-10.
- Anderson, R. C. (2000). Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission, 2nd ed. CABI Publishing, New York, New York, 650 p.
- Armenta, A. (2006). Elaboración y evaluación de vida de anaquel de salchichas tipo frankfurter a partir de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*)". Tesis de Título. México, Instituto tecnológico de los Mochis. 145pp.
- Audicana, M; Fernández de Corres, L; Muñoz, D; Fernández, E; Navarro, J; Dolores del Pozo, M. (1995). Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *J Allergy Clin Immunol*, 96, 558-560.
- Audicana, M.; Ansotegui, I.; de Corres, L.; Kennedy, M. (2002). *Anisakis simplex*: dangerous--dead and alive? *Trends in parasitology*, 18(1), 20–25. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02152-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02152-3)
- Audicana, M. & Kennedy, M. (2008). *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21(2): 360-379.
- Baeza, M.; Zubeldia, J.; Rubio, M. (2001). *Anisakis simplex* allergy. *ACI International*, 13: 242-249.
- Berland, B. (1961). Nemátodos from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*. 2:1-50
- Bier, J. (1976). Experimental anisakiasis: cultivation and temperature tolerance determinations. *J. Milk Food Technol.*, 39: 132-137.
- Blaskovic, V.; Alegre, A.; Tafur, R. (2011). Alimentación del calamar gigante *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) en aguas peruanas (2010). Doi: 10.13140/RG.2.1.1750.4244.

- Bravo, V. 2001. Desarrollo de una tabla de evaluación por análisis sensorial del calamar gigante o pota (*Dosidicus gigas*). Lima. Tesis de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria.
- Bower, S. & Margolis, L. (1991). Potential use of helminth parasites in stock identification of flying squid, *Ommastrephes bartrami*, in North Pacific Waters. *Can. J. Zool.* **69**: 1124-1126.
- Bush A.; Lafferty K.; Lotz J.; Shostak A. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology.* **83**: 575-583.
- Cabrera, R. & Trillo-Altamirano, M. (2004). Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Revista de Gastroenterología del Perú*, **24**(4), 335-342.
- Cabrera, R.; Martínez, R.; Leiva, R. Gambirazio, C. y Ruiz, J. (2002). Larvas de *Anisakis physeteris* y otros helmintos en *Coryphaena hippurus* "perico" comercializados en el Mercado Pesquero de Ventanilla, Callao, Perú. *Revista Peruana de Biología.* **9**. doi:10.15381/rpb.v9i1.2517.
- Calvo, M., Carranco, M., Salinas, C, Carrillo, S. 2016. Composición química de harina de calamar gigante *Dosidicus gigas*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. **66** N°1: 74-81. ISSN: 0004-0622.
- Canahualpa, L. (2008). Obtención de un aislado proteico a partir del manto de pota o calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis de pregrado. Huancayo, Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú. 112 pp.
- Carballeda-Sangiao, N.; Olivares, F.; Rodríguez-Mahillo, A.; Careche, M.; Tejada, M.; Moneo, I.; Gonzalez-Muñoz, M. (2014). Identification of autoclave-resistant *Anisakis simplex* allergens. *J Food Prot*; **77**: 605–609.
- Carballeda, N. (2017). Caracterización del riesgo de exposición al parásito de pescado *Anisakis sp.* Tesis Doctoral. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. 215 pp.
- Careche, M.; Borderías, A.; Sánchez, I. (2004). Method of producing a functional protein concentrate from cephalopod muscle and product thus obtained, which is used in the production of analog products and other novel products. (PCT 24/06/04) Patent No. W2004/052117.

- Carrizoza, M. (2000). Determinación de los Niveles de Bases Volátiles Totales y amonio de muestras comerciales de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Fresco y cocido y su relación con el sabor ácido-amargo. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ciencias Químicas Biológicas. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora; México.
- CECOPESCA. (2012). Guía sobre los principales parásitos presentes en productos pesqueros: técnicas de estudios e identificación. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Céspedes, RE. (2010). Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* “pota” eviscerada y el rol zoonótico de *Anisakis* en Arequipa, Perú. Tesis Lic. Lima, Perú, Universidad Ricardo Palma. 57p.
- Céspedes, R.; Iannacone, J. y Salas, A. (2011). Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* “Pota” eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecología Aplicada*, 10(1), 1-11.
- Chai, J; Darwin, K; Lymbery, A. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), pp. 1233-1254.
- Chappuis, F. & Loutan, L. (2006). Helminthiases humaines transmises par les poissons. *Revue Médicale Suisse*, 2(65): 1245-1247.
- Cheftel, J; Cug, J; Lorient, D. (1989). Proteínas alimentarias: Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones químicas. España. Acribia
- Cheng, T. (1982). Anisakiasis. En: Handbook series in zoonoses: parasitic zoonoses. Vol. II. Florida. CRC Press. Pp: 37-52
- Chero, J.; Sáez, G.; Iannacone, J.; Cruces, C.; Alvarino, L.; Luque, J. (2016). Ecología Comunitaria de Metazoos Parásitos del Bonito *Sarda chiliensis* Cuvier, 1832 (Perciformes: Scombridae) de la Costa Peruana. *Rev Inv Vet Perú*. 27(3): 539-555.
- Chero J.; Cruces, C.; Iannacone, J.; Sáez, G.; Alvarino, L.; Rodríguez, C.; Rodríguez, H.; Tuesta, E.; Pacheco, A.; Huamani, N. (2014). Índices parasitológicos de la Merluza peruana, *Merluccius gayi peruanus* (ginsburg, 1954) (perciformes: merlucciidae) adquiridos del Terminal Pesquero de Ventanilla, Callao, Perú. *Neotrop. Helminthol*. 8(1): 141- 162.
- Chiclla, A. & Verano, R. (1997). Presencia de larvas de *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda, Anisakidae) en *Dosidicus gigas* (Cephalopoda, Ommastrephidae) ‘calamar

gigante del Mar Peruano. In: Farfan, C. (Ed.), Proceedings of the Third Congreso Latinoamericano de Malacología, Ensenada, pp. 138-140)

Cipriani, P.; Acerra, V.; Bellisario, B.; Sbaraglia, G.; Cheleschi, R.; Nascetti, G.; Mattiucci S. (2015). Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: implications to seafood safety. Food Control, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.04.043

Cipriani, P.; Palomba, M.; Giuliotti, L.; Bao, M.; Mattiucci, S.; Levsen, A. (2021). *Anisakis simplex* (s.s.) larvae (Nematoda: Anisakidae) hidden in the mantle of European flying squid *Todarodes sagittatus* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in NE Atlantic Ocean: Food safety implications. International Journal of Food Microbiology. 339. 109021. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109021.

Córdova, J.S. (2016). Efecto del polvo proteico de pota (*Dosidicus gigas*) como insumo en la elaboración de yogurt. Tesis Mg. Lima-Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 104p.

Csirke, J.; Argüelles, J.; Alegre, A.; Ayón, P.; Bouchon, M.; Castillo, G.... y Yamashiro Guinoza, C. (2018). Biología, estructura poblacional y pesquería de pota o calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Perú. *Boletín Instituto Del Mar Del Perú*, 33(2), 302-364. Recuperado a partir de <https://revistas.imarpe.gob.pe/index.php/boletin/article/view/46>

D'Amelio, S.; Mathiopoulos, K.; Santos, C.; Pugachev, O.; Webb, S.; Picanço, M. y Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology* 30, 223-226.

D'Amelio, S., Lombardo, F., Pizzarelli, A., Bellini, I., & Cavallero, S. (2020). Advances in Omic Studies Drive Discoveries in the Biology of Anisakid Nematodes. *Genes*, 11(7), 801. doi:10.3390/genes11070801

Daschner, A. & Cuéllar, C. (2010). The hidden sense of symptoms: urticaria can be beneficial. *Medical hypotheses* 75, 623-626.

Daschner, A.; Rodero, M.; De Frutos, C.; Valls, A.; Cuéllar, C. (2010). Chronic urticaria is associated with a differential helminth-arthropod-related atopy phenotype. *The Journal of Dermatology* 37, 780-785.

- Daschner, A., Cuéllar, C., y Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology* 28, 9-15.
- Deardorff T. & Overstreet R. (1981a). Larval *Hysterothylacium* (= *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from fishes and invertebrates in the Gulf of Mexico. *Proc Helminthol Soc Wash* 48: 113-126.
- Deardorff, T. & Overstreet, R. (1981b). *Raphidascaris camura* sp. n., *Hysterothylacium eurycheilum* (Olsen) comb. n., and comments on *Heterotyphlum* Spaul (Nematoda, Ascaridoidea) in marine fishes. *Journal of Parasitology* 67: 426-432.
- Deardorff, T. & Overstreet, R. (1982). *Hysterothylacium pelagicum* sp. n. and *Hysterothylacium cornutum* (Stossich, 1904) (Nematoda: Anisakidae) from Marine Fishes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, vol. 49, p. 246-251.
- Debenedetti, A; Madrid, E; Fuentes, M. (2013). Study of helminth parasites in the red mullet, *Mullus barbatus*, from the Mediterranean Sea and acquired in greater València, Spain. *Revista IberoLatinoamericana de Parasitología*, 72(2), pp. 118-123.
- Desportes, G. & McClelland, G. (2001). Sealworms in the North Atlantic: Ecology and Population Dynamics. Tromsø, Norway: North Atlantic Marine Mammal Commission.
- Diniz, J.; Knoff, M.; Gonçalves da Fonseca, M.; Corrêa, D.; Carmona, S. (2021). Cestode and nematode larvae of hygienic-sanitary importance parasitizing *Percophis brasiliensis* (Actinopterygii) collected from fish markets of the municipality of Niterói, RJ, Brazil. *Food Science and Technology*. ISSN 1678-457X. <https://doi.org/10.1590/fst.33021>.
- Dollfus, R. (1964). Enumeration des cestodes du plankton et des invertébrés. 6e contribution. *Ann. Parasitol. Hum. Comm.* 39, 329-379.
- European Food Safety Authority EFSA. (2010). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 8(4): 1543.
- Eiras, J; Velloso, A; Pereira, J. (2016). Parasitos de peixes marinhos na América do Sul. Rio Grande, Editora da FURG, 441 p.
- Espinoza, K. M. (2017). Desarrollo de un snack extruído a base de maíz enriquecido con harina de papa (*Dosidicus gigas*) precocida y determinación de su vida útil. Tesis de grado. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 156 pp.

- Food Agricultural Organization FAO. (2005). Examen de la situación de los recursos pesqueros marinos mundiales. Documento Técnico de Pesca. N° 457. Roma, FAO. 260 páginas.
- Food Agricultural Organization FAO. (2020a). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Food Agricultural Organization FAO (2020b). Base de datos de estadísticas pesqueras. FAO FishStat J. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
- Food Agricultural Organization / World Health Organization FAO/WHO. (2014). *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. Report of a Joint FAO/WHO Expert Meeting, 3–7 September 2012, FAO Headquarters*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nation y World Health Organization.
- Felizardo, N., Knoff, M., Pinto, R.; Correa, D. (2009). Larval anisakid nematodes of the flounder, *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) from Brazil. *Neotropical Helminthology*. 3. 57-64.
- Fennema, O. R. (2000). Agua y hielo. In O. R. Fennema (Ed.), *Química de los alimentos*. Zaragoza, Spain: Acribia
- Franssen, F.; Gerard, C.; Cozma-Petruț, A.; Vieira-Pinto, M.; Jambrak, A.; Rowan, N... Robertson, L. (2019) Inactivation of parasite transmission stages: Efficacy of treatments on food of animal origin. *Trends Food Sci Technol*, 83:114–128.
- Gallo, M. (2004). Anchoveta: Un recurso alternativo para el procesamiento de Surimi. *Revista Investigación y Tecnología Pesquera*.
- Garbin, LE. (2009). Taxonomía y evaluación de la especificidad hospedatoria de nemátodos Anisakidae parásitos de aves marinas en el área de Península Valdés, Chubut, Argentina. Tesis Dr. Buenos Aire, Argentina, Universidad Nacional de La Plata. 182p.
- Gomez-Puerta, L. A. (2014). Primeros registros de *Hysterothylacium pelagicum* (Anisakidae) y *Toxocara alienata* (Toxocaridae) en el Perú. *Revista Peruana De Biología*, 21(2), 171–174. <https://doi.org/10.15381/rpb.v21i2.9820>
- González, L. (1998). The life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. *Aquaculture* 162(3-4):173-186.

- González, J. (2018). Nuevos alérgenos de *Anisakis simplex*: estudios *in silico* e *in vitro*. Tesis Máster. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 299 pp.
- González, J. & Mendo, J. (1998). Distribución de larvas de helmintos en el “calamar gigante” *Dosidicus gigas* (Ommastrephidae) de la costa norte del Perú. *Anal. Cient. UNALM*, Lima. Vol. 36: 99-108.
- Gopar, L.; Osorio, D. & García, L. (2005). A new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) parasite of *Ariopsis guatemalensis* (Osteichthyes: Ariidae) from Tres Palos lagoon, Mexico. *Journal of Parasitology* 91: 909-914.
- Guevara, R.; Mariátegui, L.; Yamashiro, C. (2018). Aspectos de la ordenación pesquera del calamar gigante o pota (*Dosidicus gigas*) y la variabilidad climática en el Perú. *Bol Inst Mar Perú*. 33(2): 285-301.
- Hernández, F.; Benavides, R.; Carlos, C.; Inostroza R.; Castillo, E.; Villafuerte, Ú.; Byrne, R. (2018). Procesamiento y evaluación química y tecnológico nutricional de producto precocido a base de pota (*Dosidicus gigas*). *Ciencia E Investigación*, 20(1), 25–28. <https://doi.org/10.15381/ci.v20i1.14318>
- Huang, W. (1990). Méthodes de recherche des larves d'anisakidés dans les poissons marins. Possibilités d'application à l'inspection des poissons commercialisés en région parisienne. *Réc. Méd. Vet.*, 166: 895-900
- Hurst, R. (1984). Identification and description of larval *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Anisakidae: Nematoda) from New Zealand waters. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 18:177-186.
- Hurtado, L.M. (2014). Elaboración de pasta untable a partir de recortes de pota (*Dosidicus gigas*) en envase ¼ club. Tesis de grado. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 130 pp.
- Huss, H. (1999) El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 348. 202p. Roma.
- Iannacone, J. & Alvarino, L. 2009. Metazoos parásitos de *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Mugilidae: Perciformes) procedentes del terminal pesquero de Chorrillos, Lima, Perú. *Neotrop Helminthol* 3: 15-27.

- Iannacone, J.; Cárdenas-Callirgos, J.; Alvarino, L. (2010). Ecología comunitaria de los parásitos de la chilindrina *Stromateus stellatus* (Cuvier, 1829) (Perciformes: Stromateidae) de la zona costera de Chorrillos, Lima, Perú. *Neotropical Helminthology*. 4(2): 159 -167
- Iannacone, J.; Dávila, J.; Hon, E.; Sánchez, C. (2012). Parasitofauna de *Paralichthys adspersus* (Steindachner) (Osteichthyes, Paralichthyidae) capturados por pesquería artesanal en Chorrillos, Lima, Perú. *Neotropical Helminthology*. 6: 127 - 133.
- Ibarra, L.R. (2006). Efectos sobre la calidad y funcionalidad del músculo de manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sometido al almacenamiento en hielo. Tesis Profesional. Instituto tecnológico de Tepic. Nayarit. México.
- Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F.; Santamarina, M.; Sanmartin, M. (1993). *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol.*, 15: 243-250.
- Incorvaia I. & Díaz de Astarloa J. (1998). Estudio preliminar de las larvas (Nematoda: Ascaridida) parásito de *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) y *Paralichthys patagonicus* (Pisces: Pleuronectiformes) Boletín Chileno de Parasitología 53(1-2): 38-42.
- Instituto del Mar del Perú IMARPE. (1993). Trabajo Técnico Científico en Buques Pesqueros. I Curso de Capacitación. Callao. 47 pp.
- Instituto del Mar del Perú IMARPE. (1996). Compendio Biológico Tecnológico de las Principales Especies Hidrobiológicas Comerciales del Perú. Instituto del Mar del Perú (IMARPE) e Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP). Ed. Stella, Lima. 143 p.
- Instituto Internacional del Frío IIF. (1990). En Alimentos congelados. Procesado y distribución. Ed. Acribia, SA. Zaragoza. España.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. INEI. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar 2020. [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Estadística e Informática. Recuperado de INFORME_PRINCIPAL_ENDES_2020.pdf (inei.gob.pe)
- International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub- Committee. IUIS Allergen Nomenclature. Consultado 14 abr. 2019. Recuperado de <http://www.allergen.org/index.php>
- Kalay, M.; Dönmez, A.; Koyuncu, E.; Genc, E.; Sahin, G. (2009). Seasonal variation of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) infestation in sparid fishes in

the Northeast Mediterranean Sea. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 33. 517-523. 10.3906/vet-0703-12.

Karl, H. (2008). Nematode larvae in fish on the German market: 20 years of consumer related research. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 59, 107-116.

Karl, H. & Leinemann, M. (1993). A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 44, 124-125.

Karl, H.; Meyer, C.; Banneke, S.; Jark, U.; Feldhusen, F. (2002). The abundance of nematode larvae *Anisakis sp.* in the flesh of fishes and possible post mortem migration. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 53, 118-120

Kirstein, F.; Nieuwenhuizen, N.; Worsnell, G.; Brombacher, F.; Mattiucci, S.; Lopata, A. (2007). Different routes of sensitization to *Anisakis pegreffii* in a mouse model of allergic asthma. *Parassitologia* 49(2): 222

Knoff, M.; Felizardo, N.; Iñiguez, A.; Maldonado, A.; Torres, E.; Magalhães, R.; Corrêa, D. (2012). Genetic and morphological characterisation of a new species of the genus *Hysterothylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the Neotropical Region, state of Rio de Janeiro, Brazil (1). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.107, p.186-193, 2012.

Kobayashi, A.; Kumada, M.; Ishizaki, T. (1972). Evaluation of somatic and “ES” antigens causing immunological injury of mast cells in mice infected with *Anisakis* larvae. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 25: 335-344.

Kochanowski, M., Różycki, M., Dąbrowska, J., Bełcik, A., Karamon, J., Sroka, J., & Cencek, T. (2020). Proteomic and Bioinformatic Investigations of Heat-Treated *Anisakis simplex* Third-Stage Larvae. *Biomolecules*, 10(7), 1066. doi:10.3390/biom10071066

Køie, M. (1993). Aspects of the life-cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology*, vol. 7, p. 1289-1296.

Køie, M. (1999). Metazoan parasites of founder *Platichthys flesus* (L.) along a transect from the southwestern to the northeastern Baltic Sea. *ICES Journal of Marine Science*, vol. 56, pp. 157-163.

- Køie, M. (2001). Experimental infections of copepods and sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* with small ensheathed and large third-stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Parasitology Research* 87, 32-36.
- Køie, M.; Berland, B.; Burt, M. (1995). Development to third-stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 52 [Suppl 1]:134-139.
- Koyama, T.; Kobayashi, A.; Kumada, M.; Komiya, Y.; Oshima, T.; Kagei, N.; Ishii, T.; Mashida, M. (1969). Morphological and taxonomical studies on Anisakidae larvae found in marine fishes and squids. *Japanese Journal of Parasitology*. 18: 466-487.
- Lanier, T.; Carvajal, P.; Yongsawatdigul, J. (2005). Surimi gelation chemistry. In: J. W. Park (Ed.), *Surimi and Surimi Seafood* (2nd ed.) (pp. 435-489). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lazo, L. (2006). Elaboración de Harina de Pota (*Dosidicus gigas*) precocida para consumo humano. Tesis Ing. Lima, Perú, Facultad de Pesquería. UNALM. 104 p.
- Levsen, A. & Lunestad, B. (2010). *Anisakis* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. *Vet. Parasitol.*, 171(3-4): 247-53.
- Levsen, A. & Karl, H. (2014). *Anisakis simplex* (s.l.) in grey gurnard (*Eutrigla gurnardus*) from the North Sea: food safety considerations in relation to fishing ground and distribution in the flesh. *Food Control*, 36, 15-19.
- Lopes, L., Pimpão, D., Takemoto, R., Malta, J., Varella, A. (2011). *Hysterothylacium* larvae (Nematoda, Anisakidae) in the freshwater mussel *Diplodon suavidicus* (Lea, 1856) (Mollusca, Unioniformes, Hyriidae) in Aripuanã River, Amazon, Brazil, *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 106, Issue 3, 357-359, ISSN 0022-2011, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.12.002.1>
- Lymbery, A. & Cheah, F. (2007). Anisakid Nematodes and Anisakiasis. En S. (Ed.) Black, & R. Seed, *World Class Parasites. FOOD-BORNE PARASITIC ZOOSES. Fish and Plant-Borne Parasites*. Volume 11 (págs. 185-209). New York, USA: Springer.
- Madrid, A.; Madrid, J.; Madrid, R. (1994). *Tecnología del Pescado y Productos Derivados*. 1º Edición. AMV Ediciones. Mundiprensa. España. 376 p.

Madrid, E. (2015). Estudio de anisákidos en pescado fresco expedido en supermercados de València y análisis del riesgo de adquirir anisakidosis asociado a su consumo. Tesis Dr. Valencia, España. Universitat de València. 367p.

Mariátegui, L.; Sanjinez, M.; Taipe, A.; Yamashiro, C. (2018). Distribución y concentración de *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) en el mar peruano y aguas adyacentes. Bol Inst Mar Perú. 33(2): 178-211.

Márquez-Ríos, E., Morán-Palacio, E. F., Lugo-Sánchez, M. E., Ocano-Higuera, V. M., & Pacheco-Aguilar, R. (2007). Postmortem biochemical behavior of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle stored in ice and its relation with quality parameters. Journal of food science, 72(7), C356–C362. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00468.x>

Martínez-Rojas, R.; Mondragón-Martínez, A.; De-Los-Santos, E.; Cruz-Neyra, L.; García-Candela, E.; Delgado-Escalante, A.; Sanchez-Venegas, J. (2021). Molecular identification and epidemiological data of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) larvae from Southeastern Pacific Ocean off Peru. International journal for parasitology. Parasites and wildlife, 16, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.09.001>

Matsuura, T.; Sun, S.; Sugane, K. (1992). The identity of *Anisakis* type II larvae with *Anisakis physeteris* confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA. Journal Helminthology. 66: 33-37.

Mattiucci, S.; Fazii, P.; De Rosa, A.; Paoletti, M.; Megna, A.; Glielmo A... Nascetti, G. (2013). Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. Emerg Infect Dis. Mar; 19 (3): 496-9.

Mattiucci, S. & D'Amelio, S. (2014). Anisakiasis. En Helminth Infections and their Impact on Global Public Health, F. Bruschi, ed. (Wien: Springer-Verlag), pp. 325-365.

Mattiucci, S. & Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of *Anisakis* nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite coevolutionary processes. Advances in Parasitology, 66: 47-148.

Mattiucci, S.; Paoletti, M.; Webb, S. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: Morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. Systematic Parasitology 74, 199-217.

- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S.C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D.I., y Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology* 100, 199-214.
- Mattiucci, S.; Paoletti, M.; Colantoni, A.; Carbone, A; Gaeta, R; Proietti, A; Frattaroli, S; Fazii, P; Bruschi, F. & Nascetti, G. (2017). Invasive anisakiasis by the parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): Diagnosis by real-time PCR hydrolysis probe system and immunoblotting assay. *BMC Infectious Diseases*. 17.
- Mattiucci, S.; Cipriani, P.; Levsen, A.; Paoletti, M.; Nascetti, G. (2018). Molecular Epidemiology of *Anisakis* and Anisakiasis: An ecological and evolutionary Road Map. *Advances in Parasitology*, 99, 93-263. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.001>
- Maza, S. & Rosales, M. (2004). Procesamiento de surimi de “pota” (*Dosidicus gigas*) por solubilización ácida-alcalina y precipitación isoeléctrica. *Boletín de Investigaciones del Ins. Tec. Pes. Perú*. 6: 1-7.
- Maza, S.; Rosales, M.; Castro, R. (2003). Efecto de un proceso de lixiviación ácida salina sobre la calidad del surimi de *Dosidicus gigas* “pota”. *Boletín de Investigaciones del Ins. Tec. Pes. Perú*. Vol. 5: 81-88.
- Maza, S.; Solari, A.; Albrecht-Ruiz, M. (2008). Reducción de la intensidad del sabor ácido amargo de la pota mediante lavados con soluciones ácidas y neutralizantes. *Boletín de Investigaciones del Ins. Tec. Pes. Perú*. Vol. 8: 23-29.
- Möller, H. & Anders, K. (1986). Nematelminthes. En: *Diseases and parasites of marine fishes*. Kiel (Alemania). Ed. Verlag Möller. Pp 165-178.
- Moneo, I.; Caballero, M.; Gómez, F.; Ortega, E.; Alonso, M. (2000). Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 177–182.
- Moneo, I., Caballero, M.; Gonzalez-Muñoz, M.; Rodríguez-Mahillo, A.; Rodríguez-Pérez, R.; Silva, A. (2005). Isolation of a heatresistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 96:285–289

- Moneo, I.; Caballero, M.; Rodríguez-Pérez, R; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M. (2007). Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol. Res.*, 101(4): 1051-1055.
- Moravec, F.; Uruwa, S.; Coria, C. (1997). *Hysterothylacium patagonense* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from freshwater fishes in Patagonia, Argentina, with a key to the species of *Hysterothylacium* in American freshwater fishes. *Syst Parasitol* 36: 31-38.
- Moravec, F. (1998). Nematodes of fresh water fishes of neotropical region. Academia, Praha, p.382-384
- Moreno, H.; Herranz, B.; Pérez-Mateos, M.; SánchezAlonso, I.; Borderías, J. (2014). New Alternatives in Seafood Restructured Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56(2): 237-248.
- Morris, S. & Sakanari, J. (1994). Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J. Biol. Chem.*, 269: 27650-27656.
- Morrissey, M.; Lin, J.; Ismond, A. (2005). Waste management and by-products utilization. (J Park eds.). *Surimi and surimi seafood*. (2° ed.) Florida, USA: Taylor & Francis. Pp. 279-323.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 51, pp. 263-273.
- Murata, R.; Suzuki, J.; Sadamasu, K.; Kai, A. (2011). Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitology International* 60, 193-198.
- Myers, BJ. (1976). Research then and now on the Anisakidae nematodes. *Transactions of the American Microscopical Society*. 95(2): 137-142.
- Nagasawa, K. (1990). The Life Cycle of *Anisakis simplex*: A Review In: Ishikura H., Kikuchi K. (eds) *Intestinal Anisakiasis in Japan*. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-68299-8_4
- Naupay, A., Castro, J. y Avalos, C. (2020). Larvas de *Hysterothylacium* sp. (NEMATODA: RAPHIDASCARIDIDAE) en el pez volador *Exocoetus volitans* LINNAEUS, 1758

(EXOCOETIDAE, BRUUN, 1935) Lima, Perú. *Neotropical Helminthology*, 13(2).
<https://doi.org/10.24039/rmh2019132653>

Nesis, KN. (1983). *Dosidicus gigas*. In: Boyle, P.R. (Ed.), *Cephalopod Life cycles*, Vol. 1. Species Accounts. Academic Press, London, pp 216-231 (Chapter 13)

Nigmatullin C M, Nesis K N, Arkhipkin A I. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fish Res.* 54: 9–19

Nigmatullin, C.M., Shchetinnikov, A.S. y Shukhgalter, O. (2009). On feeding and helminth fauna of neon flying squid *Ommastrephes bartramii* (Lesueur, 1821) (Cephalopoda: ommastrephidae) in the southeastern Pacific. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44, 227–235.

Organization for Economic Co-operation Development (OECD) and the Food and Agricultural Organization FAO (2021), *Agricultural Outlook 2021-2030*, OECD Publishing, Paris. Recuperado de <https://doi.org/10.1787/19428846-en>

Olivares, F.O. (2012). Efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de *Anisakis* al aplicar tratamientos selectivos en pescado parasitado. Tesis Doctoral. Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. 340 pp.

Olivares, F.; de las Heras, C.; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Tejada, M. (2014). Efecto de lavados sucesivos de músculo infestado en la extracción y detección de alérgenos de *ANISAKIS*. *Anales Científicos*, 75(1): 185 - 190. doi: <http://dx.doi.org/10.21704/ac.v75i1.949>

Omote, J.R. (2019). Optimización de la extracción y caracterización de las proteínas solubles del concentrado de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Tesis Mg. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria la Molina. 87 pp.

Omote, J.; Roldán, D.; Juscamaita, J. (2014). Elaboración de un hidrolizado de músculo desmenuzado de pota (*Dosidicus gigas*), con proteasa alcalina. *Anales Científicos*, 75, 227-233

Ordoñez, L. & Plácido, M. 2004. Aplicación del Método del Índice de Calidad en Pota (*Dosidicus gigas*). *Bol. Investig. Inst. tecnol. Pesq. Perú* 6:75-80.

Ortega, A. (1995). Obtención de harina de pota (*Dosidicus gigas*) para consumo humano directo. Tesis de grado. Universidad Nacional de Piura. Piura, Perú.

- Osanz, AC. (2001). Presencia de larvas de anisákidos (nematoda: ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona. Tesis Dr. Bellaterra, España, Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. 147pp.
- Palomba, M.; Mattiucci, S.; Crocetta, F.; Osca, D.; Santoro, M. (2021). Insights into the role of deep-sea squids of the genus *Histioteuthis* (Histioteuthidae) in the life cycle of ascaridoid parasites in the Central Mediterranean Sea waters. *Sci. Rep.* 11 (1), 1–12.
- Pantoja, C.; Pereira, F.; Santos, C.; Luque, J. (2016). Morphology and molecular characterization hold hands: clarifying the taxonomy of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) larval forms. *Parasitology research*, 115(11), 4353–4364. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5221-0>
- Pardo, S.; Mejía, K.; Navarro, Y.; Atencio, V. (2007). Prevalencia y abundancia de *Contracaecum sp.* en rubio *Salminus affinis* en el río Sinú y San Jorge: descripción morfológica. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 887-896. ISSN: 0122-0268.
- Pardo-Gandarillas, M.; Lohrmann, K.; Valdivia, A.; Ibáñez, C. (2009). First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Revista de biología marina y oceanografía*, 44(2), 397-408.
- Perea, A.; Sánchez, J.; Buitrón, B. (2018). Escala de madurez gonadal del calamar gigante *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835). *Bol Inst Mar Perú*. 33(2): 137-152
- Petersen, F.; Palm, H.; Möller, H.; Cuzi, M. (1993). Flesh parasites of fish from central Philippine waters. *Diseases of Aquatic Organisms*. 15:81-86.
- Picó-Durán, G., Pulleiro-Potel, L., Abollo, E., Pascual, S., y Muñoz, P. (2016). Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial cephalopods from the Spanish Mediterranean coast. *Veterinary parasitology*, 220, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.020>
- Plan Nacional para la Reducción y Control de la Anemia Materno Infantil y la Desnutrición Crónica Infantil en el Perú: 2017 - 2021. Recuperado de [Plan_nacional_para_la_reduccion_y_control_de_la_anemia_materno_infantil_y_la_desnutricion_cronica_infantil_en_el_Peru_2017_2021_Documento_tecnico20190621-17253-s9ub98.pdf](http://www.gob.pe) (www.gob.pe)

- Poms, R; Klein, C; Anklam, E. (2004). Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Addit. Contam.*, 21: 1-31.
- Porturas, R.; Hurtado, M.; Crispín, F. (2019). Preparation of single pasta from potato (*Dosidicus gigas*) cuttings in pack ¼ club. *Agroindustrial Science*, 9(2), 145-153.
- Ministerio de la Producción PRODUCE. (2019). Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2018. Perú
- Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo PROMPERU. (2018). *Desenvolvimiento del comercio exterior pesquero y acuícola en el Perú. Informe anual 2017.*
- Quiazon, K.; Yoshinaga, T.; Ogawa, K. (2011). Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International* 60, 126-31.
- Quiroz, L.K. (2014). Estudio de la parasitofauna en el jurel (*Trachurus picturatus murphyi*, Chirichigno y Vélez 1998), con énfasis en Zoonosis Parasitaria. Tesis de grado. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 92 pp.
- Raffel, T. & Anderson, T. (2009). A new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) from the stomach of the red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*, from Pennsylvania fishles ponds. *The Journal of Parasitology*, 95(6), 1503-1506.
- Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el revista del comité científico 34 que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DO L 226 de 25/06/2004, págs. 22-82.
- Rello, F.; Adroher, F.; Valero, A. (2004). Anisákidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 17: 173 – 197.
- Ribeiro, J.; Knoff, M.; Felizardo, N.; Vericimo, M.; Clemente, S. (2017). Resposta imunológica a antígenos de *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum* de peixes teleósteos *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 69. 422-428. 10.1590/1678-4162-9383.
- Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Gómez-Aguado, F.; Rodríguez-Pérez, R.; Corcuera, M.; Caballero, M.; Moneo, I. (2007). Cloning and characterisation of the *Anisakis*

simplex allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. Int J Parasitol. Jul; 37 (8- 9): 907-17.

Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Moneo, I.; Solas, M.; Mendizábal, A.; De las Heras, C.; Tejada, M. (2008). Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. J. Food Prot. 71(12): 2578-2581

Rodríguez-Mahillo, A.; Tejada, M.; González-Muñoz, M.; Moneo, I.; Solas, M. (2010). Patente N° 2 340 978. Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal. España.

Rodríguez-Pérez, R; Moneo, I; Rodríguez-Mahillo, A; Caballero ML. (2008). Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. Mol Biochem Parasitol. 159(2): 92-97.

Rodríguez-Pérez, R.; Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A., y Moneo, I. (2007). Cloning and expression of a biologically active *Anisakis simplex* allergen Ani s 1 in the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and biochemical parasitology* 154, 115-118.

Roldán, D. (2007). Industrialización de harina de pota (*Dosidicus gigas*). Revista de la Sociedad Química del Perú, 73(2), 120-121.

Rojas, D. (2009). Evaluación de la Toxicidad a dosis repetidas (90 días) por vía oral del concentrado de proteína de pota (*Dosidicus gigas*) en ratas *Sprague Dawley*. Tesis Mg. La Molina, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 139 p.

Roper C. (1984). Cephalopods of the world (FAO). United Nations Development Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Italy. 1 – 277 p

Rubio, J. & Salazar, C. (1992). Prospección Pesquera del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) a Bordo del Buque Japonés “Shinko Maru 2” (4 de nov–17 de dic. De 1989). Inf. Inst. Mar Perú – Callao, N° 103. p. 31.

Ruiz Capillas, C.; Moral, A.; Morales, J.; Montero P. (2002). Characterisation of non-protein nitrogen in the Cephalopods volador (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). Food Chemistry 76:165-172.

Saad, C.; Vieira, F.; Luque, J. 2012. Larvas de Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945 (Nematoda, Aascaridoidea) em *Lophius gastrophysus* Miranda-Ribeiro, 1915

(Actinopterygii, Lophidae) no litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Neotropical Helminthology*. 6. 159-177.

Sánchez-Alonso, I.; Careche, M.; Borderías, A. (2007) Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chemistry* 100: 48–54.

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera SANIPES. (2018). Opinión técnica-científica sobre la evaluación del riesgo relativo a los parásitos en productos hidrobiológicos. Informe técnico de evaluación de riesgo ER-001-2018-SDIP

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera SANIPES. (2010). Manual: Indicadores o criterios de seguridad alimentaria e higiene para alimentos y piensos de origen pesquero y acuícola.

Sarmiento, L.; Tantaleán, M.; Huiza, A. (1999). Nemátodos parásitos del hombre y de los animales en el Perú. *Rev Per Parasitol* 14: 9-65.

Serrano-Martínez, E., Tantalean, M., Quispe, M. y Casas, G. (2016). Presencia de larvas de *Contraecium* sp. (Nematoda, Anisakidae) en el pez *Astronotus ocellatus*, destinado al consumo humano en Loreto, Perú. *Salud Y Tecnología Veterinaria*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.20453/stv.v3i1.2757>

Serrano-Martínez, E.; Quispe, H.; Hinostroza, M; Plasencia, P. (2017). Detección de Parásitos en Peces Marinos Destinados al Consumo Humano en Lima Metropolitana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 28(1): 160-168.

Shimakura, K.; Miura, H.; Ikeda, K.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y.; Shirai, T.; Kasuya, S.; Shiomi, K. (2004). Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135, 69–75.

Shiraki, T. (1974). Larval nematodes of family Anisakidae (Nematoda) in the northern sea of Japan as a causative agent of eosinophilic phlegmone or granuloma in the human gastrointestinal tract. *Acta Med. Biol* 22: 57-98

Shukhgalter, O. & Nigmatullin, M. (2001). Parasitic helminthes of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. *Fish. Res.* 54, -110.

Sikorski, E. (1994). Tecnología de los productos del mar: recursos, composición nutritiva y conservación. Zaragoza. ACRIBIA, 330 p.

- Sikorski, Z. & Pan B. (1994). The Effect of Heat-Induced Changes in Nitrogenous Constituents on the Properties of Seafoods. In: Sikorski Z.E., Pan B.S., Shahidi F. (eds) Seafood Proteins. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7828-4_7
- Smith, J. (1971). *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate hosts of *Anisakis sp.* (Nematoda: Ascaridata) in the Northern Sea, to the north of Scotland and at Faroe. *Nature*. 234: 478.
- Smith, J. (1983). *Anisakis simplex*. (Rudolphi, 1809, del Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaroidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *J. Helminthol.*, 57: 205-224.
- Smith J. W. (1984). The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body-cavity and flesh of marine teleosts. *International Journal for Parasitology*, 14, 491–495.
- Smith, J. W. & Wootten, R. (1975). Experimental studies on the migration of *Anisakis sp.* larvae (Nematoda: Ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. *International Journal of Parasitology*, 5, 133–136.
- Smith, J. & Wootten, R. (1978). *Anisakis* and Anisakiasis. *Advances in Parasitology*. Volume 16. Academic Press.
- Sonu, S.C. (1973). "Isolation of Squid Protein Concentrates and Their Physical and Chemical Properties.". *LSU Historical Dissertations and Theses*. 2501. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_disstheses/2501
- Sotelo, C.R. (2011). Efecto de la congelación sobre la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y su relación con los cambios estructurales de las proteínas. Tesis Mg. Hermosillo, Sonora, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. 115 p.
- Tafur, R.; Villegas, P.; Rabí, M. y Yamashiro, C. (2001). Dynamics of maturation, seasonality of reproduction and spawning grounds of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in Peruvian waters. *Fisheries Research*, 54: 33-50.
- Tantaleán V. & Huiza F. (1993). Nematode larvae with medical importance found in sea fish from the peruvian shore, with two records of human infections. *Rev Per Med Trop (UNMSM)*; 7:61-65.

- Tejada, M.; Mohamed, G.; Huidobro, A.; García, M. (2003a). Effect of frozen storage of hake, sardine and mixed minces on natural actomyosin extracted in salt solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 83: 1380-1388.
- Tejada, M.; Huidobro, A.; Fouad Mohamed, G. (2003b). Comparison of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and hake (*Merluccius merluccius*) muscle proteins during iced and frozen storage. *J Sci Food Agric*, 83(2): 113-122.
- Tejada, M.; Solas, M.; Navas, A.; Mendizábal, A. (2006). Scanning Electron Microscopy of *Anisakis* Larvae following Different Treatments. *J. Food Protect.*, 69(6): 1379-1387.
- Tejada, M.; Solas, M.; De las Heras, C.; Rodríguez-Mahillo, A.; González- Muñoz, M.; Moneo, I; Mendizábal, A. (2007). Antigenic activity of *Anisakis* larvae is conserved after food processing and pepsin treatments. *Parassitologia*, 49:406.
- Tejada, M.; Moneo, I.; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Solas, M. (inventores); Consejo Superior de Investigaciones Científicas, España; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Carlos III (titulares). (2010). Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal. Madrid, España, Oficina Española de Patentes y Marcas. Pat. ES 2340978 A1, 11 jun.
- Tejada, M.; Olivares, F.; de Las Heras, C.; Careche, M.; Solas, MT; García, M...González-Muñoz, M. (2014). Antigenicity of *Anisakis simplex* s.s. L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing. *J Sci Food Agric*.
- Timi, J., Sardella, N.; Navone, G. (2001). Parasitic nematodes of *Engraulis anchoita* Hubbs et Marini, 1935 (Pisces, Engraulidae) off the Argentine and Uruguayan coasts, South West Atlantic. *Acta Parasitologica*. 46. 186-193.
- Torrejón, P. (1996). Agregación de proteínas de músculo de pescado congelado. Acción del formaldehído. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. pp 295.
- Torres, P. & Soto, M. S. (2004). *Hysterothylacium winteri* sp. n. (Nematoda: Anisakidae), a parasite of Chilean rock cod, *Eleginops maclovinus* (Perciformes: Eleginopidae), from South Chile. *Folia Parasitologica*, 51(1), 55–60. <https://doi.org/10.14411/fp.2004.008>

- Torres, P.; Quintanilla, J.; Rozas, M.; Miranda, P.; Ibarra, R.; San Martín, M... Silva R. (2010). Endohelminth parasites from salmonids in intensive culture from southern Chile. *J Parasitol* 96: 669-670
- Torres-Arreola, W, Ocaño-Higuera, VM, Ezquerria-Brauer, JM. (2018). Effect of cooking on physicochemical and structural properties of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *J Food Process Preserv.* <https://doi.org/10.1111/jfpp.13528>
- Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar, R., Sotelo-Mundo, R. R., RouzaudSandez, O., & Esquerria-Brauer, J. M. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 101–108
- Wootten, R., & Cann, D. (2001). Round Worms in Fish. Escocia: Marine Laboratory of the Department of Agriculture and Fisheries for Scotland and the Torry Research Station of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- Valero, A.; Terrados, S.; Díaz, V.; Reguera, V.; Lozano, J. (2003). Determination of IgE in the serum of patients with allergic reactions to four species of fish-parasite anisakids. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 13, 94–99
- Valls, A., Pascual, C., y Martín Esteban, M. (2003). Anisakis and anisakiosis. *Allergologia et Immunopathologia*, 31(6), 348-355.
- Van Hengel, A. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 389: 11-118.
- Vásquez-Ruiz, C & Jara-Campos, C. (2012). Prevalencia e intensidad parasitaria en *Coryphaena hippurus* y *Mugil cephalus* (Teleostei,) desembarcados en los puertos Salaverry y Paita (Perú). *Sciéndo*, vol. 15, pp. 22-32.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; Mendizábal, A.; Rodríguez-Mahillo, A.; Tejada, M. (2010). Antigenicity and Viability of *Anisakis* larvae heated at different time-temperature conditions. *J. Food Protect.*, 73(1): 62-68.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; García, M.; Mendizábal, A.; Tejada M. (2011). Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. *J. Food Protect.* 74 (12): 2119-2126.

Villalobos, M.A. (2019). Evaluación de una técnica de PCR convencional para la detección molecular de parásitos anisákidos en tres líquidos de escurrido de conservas de caballa. Tesis Mg. Lima, Perú. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Pp 86.

Yagi, K.; Nagasawa, K.; Ishikura, H.; Nakagawa, A.; Sato, N.; Kikuchi, K.; Ishikura, H., (1996). Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. Jpn J. Parasitol. 45, 12–23.

Yamanaka, H.; Matsumoto, M.; Hatae, K.; Nakaya, H. (1995). Studies of components of off-flavors in the muscle of american jumbo squid. Nippon Suisan Gakkaishi. 61(4), 612-618.

Yenque, K. (2016). Formulación y caracterización de barras energéticas a base de kiwicha (*Amaranthus caudatus linnaeus*) expandida enriquecidas con concentrado proteico de pota (*Dosidicus gigas*). Tesis para optar por el título de ingeniero agroindustrial e industrias alimentarias. Facultad de Ingeniería Industrial. Universidad Nacional de Piura. p. 121.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. “Tabla de análisis sensorial para harina de pota precocida (*Dosidicus gigas*) para consumo humano”, propuesta por Lazo (2006).

| CARACTERISTICAS | | PUNTAJE |
|-----------------|-------------------------------|---------|
| Color | Blanco lechoso | 3 |
| | Blanco cremoso | 2 |
| | Amarillo opaco | 1 |
| Olor | Sin olor a pota | 3 |
| | Ligero olor a pota | 2 |
| | Con olor a pota | 1 |
| Sabor | Sin sabor a pota | 3 |
| | Ligero sabor a pota | 2 |
| | Con sabor a pota | 1 |
| Textura | Suave al tacto y pulverulenta | 3 |
| | Áspero y pulverulenta | 2 |
| | Duro y granuloso | 1 |

Calificación:

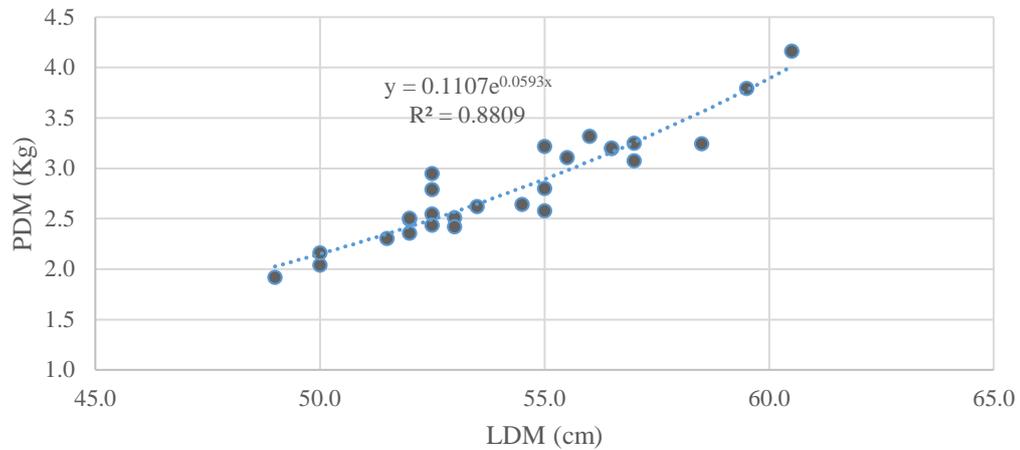
| PUNTUACIÓN | CALIDAD |
|----------------|---------|
| 10 a 12 puntos | Buena |
| 7 a 9 puntos | Regular |
| Hasta 6 puntos | Mala |

Anexo 2. Flujograma de la elaboración de concentrado proteico de pota (CPP)

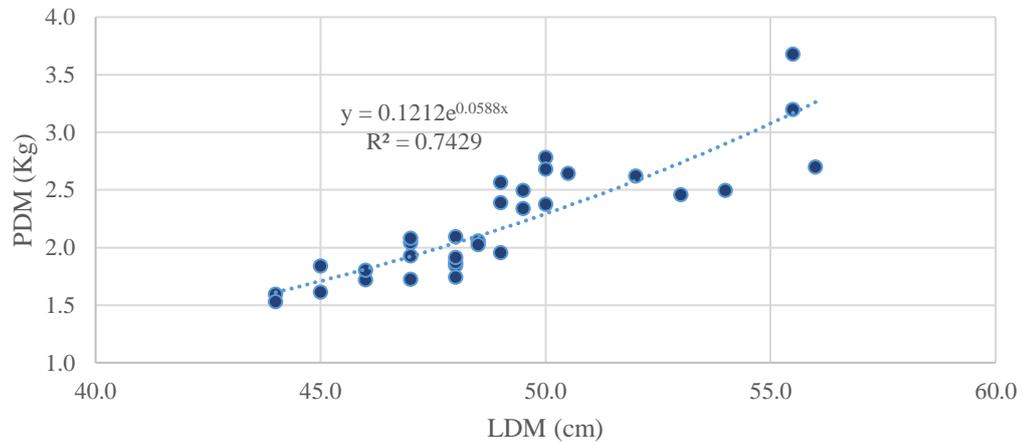


Anexo 3. Relación entre la LDM (Longitud Dorsal del Manto) y el PEM (Peso Estándar del Manto) de los 100 ejemplares muestreados de pota *D. gigas* de acuerdo a su procedencia de captura.

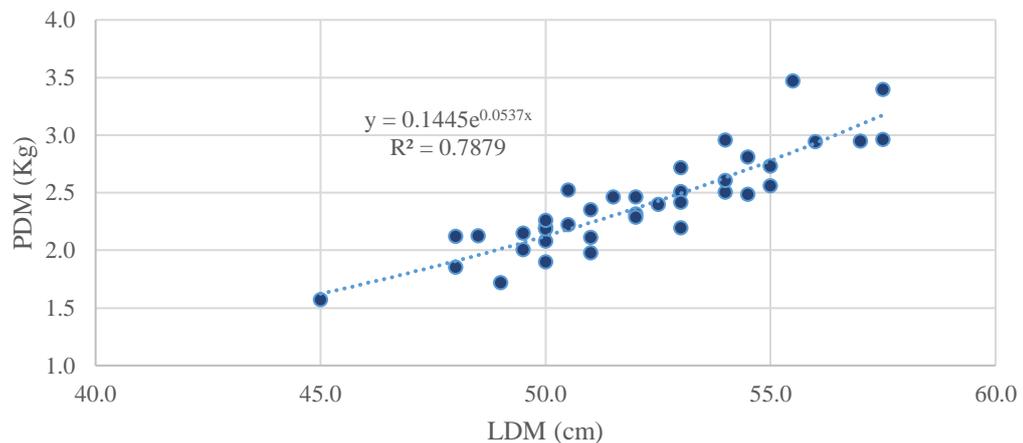
La Puntilla - Pisco



Atico - Arequipa



Matarani - Arequipa



Anexo 4. Medidas en milímetros (mm) de *Hysterothylacium* sp. presente en *Dosidicus gigas* y comparación con otros autores.

| <i>Hysterothylacium</i> sp. | | | | | | |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | PROMEDIO |
| Long. Total | 25,52 | 32,74 | 23,31 | 33,55 | 24,64 | 27,95 |
| Ancho | 0,373 | 0,568 | 0,351 | 0,495 | 0,341 | 0,426 |
| Long. Esófago | 4,162 | 3,496 | 3,571 | 4,593 | 3,746 | 3,914 |
| Long. Ano* | 0,262 | 0,327 | 0,242 | 0,333 | 0,242 | 0,281 |

* Distancia del extremo posterior al ano.

| <i>Hysterothylacium</i> sp. | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Long. Total | 14,99 (2,97-23,13) | 10,10 (3,62-16,70) | 27,95 (23,31-33,55) |
| Ancho | 0,35 (0,08-0,56) | 0,25 (0,11-0,40) | 0,43 (0,34-0,58) |
| Long. Esófago | 0,93 (0,40-1,25) | 0,69 (0,23-1,16) | 0,39 (0,35-0,46) |
| Long. Ano* | 0,31 (0,12-0,47) | 0,20 (0,10-0,32) | 0,28(0,24-0,33) |
| Referencia | Bicudo <i>et al.</i> (2005) | Felizardo <i>et al.</i> (2009) | Presente estudio |
| Hospedero | <i>Prionoctus punctatus</i> | <i>Paralichthys isosceles</i> | <i>Dosidicus gigas</i> |
| Procedencia | Brasil | Brasil | Perú |

* Distancia del extremo posterior al ano.

Anexo 5. Medidas en milímetros (mm) de *Anisakis* Tipo II *sp.* presente en *Dosidicus gigas* y comparación con otros autores.

| <i>Anisakis</i> Tipo II | | | | | | |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | PROMEDIO |
| Long. Total | 36,027 | 36,122 | 35,481 | 32,721 | 37,483 | 35,567 |
| Ancho | 0,661 | 0,709 | 0,793 | 0,701 | 0,674 | 0,707 |
| Long. Esófago | 4,111 | 4,269 | 4,283 | 4,002 | 3,884 | 4,109 |
| Long. Anillo nervioso* | 0,707 | 0,653 | 0,649 | 0,674 | 0,662 | 0,670 |
| Long. Ventrículo | 1,252 | 1,448 | 1,239 | 1,168 | 1,356 | 1,293 |
| Long. Ano** | 0,448 | 0,421 | 0,246 | 0,298 | 0,277 | 0,342 |

* Distancia del extremo anterior al anillo nervioso.

** Distancia del extremo posterior al ano.

| <i>Anisakis</i> Tipo II | | |
|-------------------------|--|------------------------|
| Long. Total | 27-33 | 35,57 (32,72-37,48) |
| Ancho | 0,63-0,74 | 0,71 (0,66-0,79) |
| Long. Esófago | 1,82-2,89 | 4,11 (3,88-4,28) |
| Long. Anillo nervioso* | 0,35-0,43 | 0,67 (0,65-0,71) |
| Long. Ventrículo | 0,53-0,65 | 1,29 (1,17-1,45) |
| Long. Ano** | 0,17-0,32 | 0,34 (0,25-0,45) |
| Referencia | Pardo-Gandarillas <i>et al.</i> (2009) | Presente estudio |
| Hospedero | <i>Dosidicus gigas</i> | <i>Dosidicus gigas</i> |
| Procedencia | Chile | Perú |

* Distancia del extremo anterior al anillo nervioso.

** Distancia del extremo posterior al ano.