

Universidad Nacional  
**Federico Villarreal**

Vicerectorado de  
INVESTIGACIÓN

**ESCUELA UNIVERSITARIA DE POSGRADO**

**“CAMBIOS EN LA ALERGENICIDAD DE PARVALBÚMINAS DE PESCADO SOMETIDO A**

**TRATAMIENTO TÉRMICO:**

**INSTITUTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA, 2017”**

**MODALIDAD PARA OPTAR EL GRADO:**

**DOCTOR EN SALUD PÚBLICA**

**AUTOR:**

**MARIA ESTELA AYALA GALDÓS**

**ASESOR:**

**DR. ELÍAS MELITÓNARCE RODRIGUEZ**

**JURADO:**

**DR. FÉLIX MAURO CORDERO PINEDO**

**DR. FILOMENO JÁUREGUI FRANCIA**

**DR. EDGAR MIRAVAL ROJAS**

**LIMA – PERÚ**

**2018**

**“CAMBIOS EN LA ALERGENICIDAD DE PARVALBÚMINAS DE PESCADO SOMETIDO A  
TRATAMIENTO TÉRMICO: INSTITUTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA, 2017”**

	<b>pág</b>
<b>RESUMEN (palabras claves)</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT (Key Words)</b>	<b>2</b>
<b>ZUSSAMENFASSUNG (Schlüsselwörter)</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
<b>1. Antecedentes</b>	<b>6</b>
<b>2. Planteamiento del Problema</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Percepción e Identificación del Problema</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Delimitación del Problema</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Problema General y Problemas Específicos</b>	<b>9</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>11</b>
<b>5. Alcances y Limitaciones del Estudio</b>	<b>12</b>
<b>6. Definición de Variables</b>	<b>13</b>

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

<b>1. Concepto: Seguridad Alimentaria y Nutrición a base de Recursos Pesqueros</b>	<b>15</b>
<b>2. Concepto: Componentes Nutricionales y Funcionales del Pescado</b>	<b>16</b>
<b>3. Marco Legal</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Reglamentación Internacional</b>	<b>19</b>
<b>3.2 Regulaciones de la Agencia Norteamericana FDA</b>	<b>20</b>
<b>3.3 Reglamentación de la Autoridad Sanitaria de la Unión Europea</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Reglamentación de la Autoridad Sanitaria de Chile</b>	<b>21</b>
<b>3.5 Reglamentación de la Autoridad Sanitaria Nacional</b>	<b>22</b>
<b>4. Panorama General de las Alergias Alimentarias</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Prevalencia de Alergias por Consumo de Productos Pesqueros</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Aspectos Clínicos de las Alergias Alimentarias</b>	<b>30</b>
<b>5. Mecanismo de Desarrollo de la Alergia mediada por IgE</b>	<b>34</b>
<b>5.1. Reactividad Cruzada</b>	<b>37</b>
<b>5.2. Propiedades Moleculares en Alérgenos Alimentarios</b>	<b>40</b>
<b>6. Proteínas Alergénicas en Pescado: Parvalbúminas</b>	<b>44</b>
<b>7. Estabilidad de las Proteínas Alergénicas ante la Digestibilidad</b>	<b>47</b>
<b>8. Efecto del Procesamiento Tecnológico en Proteínas Alergénicas</b>	<b>52</b>
<b>8.1 Tratamiento Térmico</b>	<b>54</b>
<b>8.2 Tratamiento Enzimático</b>	<b>59</b>
<b>8.3 Tratamientos de Alta Presión</b>	<b>60</b>
<b>9. Guía para la Gestión de Alérgenos en la Industria Alimentaria</b>	<b>62</b>
<b>10. Métodos para Detectar y Evaluar Proteínas Alergénicas en Alimentos</b>	<b>65</b>

### **CAPÍTULO III. MÉTODO**

<b>1. Tipo de Estudio</b>	<b>69</b>
<b>2. Diseño De Investigación</b>	<b>69</b>
<b>3. Estrategia De Prueba De Hipótesis</b>	<b>70</b>
<b>4. Variables</b>	<b>71</b>
<b>5. Población</b>	<b>74</b>
<b>6. Muestra</b>	<b>74</b>
<b>7. Técnicas De Investigación</b>	<b>75</b>
<b>Instrumentos de Recolección de datos</b>	<b>75</b>
<b>Procesamiento y Análisis de datos</b>	<b>77</b>

### **CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS**

<b>Contrastación de Hipótesis</b>	<b>86</b>
<b>Análisis e Interpretación</b>	<b>86</b>

### **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

<b>Discusión</b>	<b>103</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>110</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>111</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>113</b>

### **ANEXOS**

<b>Ficha Técnica de los Instrumentos a utilizar</b>	<b>127</b>
<b>Definición de Términos</b>	<b>138</b>
<b>Tratamiento Estadístico de Datos</b>	<b>143</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>166</b>
<b>Índice de Tablas.</b>	<b>167</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias Dios mío por las bendiciones que has derramado sobre mí. Gracias por darme en esta vida a Avelina, madre amorosa, noble y luchadora de quien aprendí la fortaleza y el valor para continuar, para culminar lo iniciado y para enfrentar el temor. También a Aurelia, abuela y querida gran maestra cuyas enseñanzas y reprimendas tengo grabadas en mi mente. Gracias por Alonso y Mariana, maravillosos hijos regalos de vida, bellos seres humanos que han sabido llenarme de amor y orgullo, a través de los que vivo mis mayores alegrías. Gracias por los buenos amigos, por sus consejos y aprendizajes, con los que aprendo y comparto tantos diversos momentos. Gracias Señor porque siempre estas a mi lado.

Agradezco a Miguel Albrecht, a Alberto Salas y a Carlos Daniel, por sus acertadas orientaciones, por la colaboración brindada durante la elaboración de este trabajo y por la gran calidad humana que me demuestran con su amistad.

Al Dr. Jorge Chávez Perez, Director del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina por su apoyo y amistad.

Al Dr. Melitón Arce, maestro y amigo, quien con sus consejos, paciencia y gentileza fue un apoyo importante para este logro.

## RESUMEN

Las Parvalbúminas (PA) representan un grupo importante de proteínas alergénicas que conforma la fracción sarcoplasmática del músculo de pescado y que en el presente estudio fueron extraídas de las especies jurel (*Trachurus symmetricus murphyi*) y lorna (*Sciaena deliciosa*) de acuerdo a la metodología propuesta por Arif S.H., Jabeen M. and Hasnain A., (2007) y analizadas mediante técnicas electroforéticas (SDS-PAGE) y de valoración densitométrica. Las cantidades aproximadas obtenidas de PA fueron 6.999mg/100g en jurel y 7.329 mg/100g en lorna. El efecto térmico a 121°C durante 0, 5, 10 y 15 minutos sobre la estabilidad de PA fue valorado en términos de cantidades relativas (CR) referidas a muestras crudas (0 minutos) en ambas especies; el calentamiento a 10 y 15 minutos provocó los efectos más severos reduciendo hasta en 63.50% y 71.25% las CR de PA de lorna y jurel respectivamente. A fin de estimar el efecto luego de la ingestión se sometió las muestras a hidrólisis enzimática en un Fluido Gástrico Simulado (FGS) observando valores de reducción hasta de 83.25% en jurel y 79% en lorna, que sugieren un posible efecto sinérgico y la conveniencia del procesamiento térmico de elaboración de conservas de pescado para la reducción de la alergenicidad de PA. Los resultados del estudio fueron realizados entre octubre 2016 y agosto 2017 y contribuyen en el campo de la inocuidad, protección de la salud y nutrición del consumidor.

**Palabras Clave:** Pescado, Proteínas alergénicas, Parvalbúminas, *Trachurus symmetricus murphyi*, *Sciaena deliciosa*, electroforesis SDS-PAGE, Cantidad Relativa, Temperatura, Fluido Gástrico Simulado, Inocuidad de alimentos.

## ABSTRACT

Parvalbumins (PA) represent an important group of allergenic proteins conforming the sarcoplasmatic fraction of fish muscle. PA of Pacific mackerel (*Trachurus symmetricus murphyi*) and Lorna drum (*Sciaena deliciosa*) were extracted according with methodology proposed by Arif S.H., Jabeen M. and Hasnain A., (2007) and analyzed by means of SDS-PAGE electrophoretic and densitometric assays. Approximate PA amounts obtained were 6.999mg/100g in Pacific mackerel 7.329 mg /100g and Lorna drum. Thermal treatment at 121°C applied for 0, 5, 10 and 15 minutes affected PA stability of both species in terms of relative quantities (RQ) referred to raw samples (0 min). Heating for 10 and 15 minutes provoked the most drastic effects reducing even in 63.50% and 71.25% RQ of Pacific mackerel and Lorna drum's PA respectively. In order to estimate the effect after consumption samples were subjected to enzymatic hydrolysis in Simulated Gastric Fluid (SGF). Values show an increase of heating effects to 83.25% and 79% in Pacific mackerel and Lorna drum's PA suggesting a probable synergic effect and the convenience of thermic process of canned fish to reduce PA allergenic effects. Results obtained from october 2016 and august 2017 contribute to food safety, health protection and nutrition for consumers.

**Key Words:** Fish, Allergenic proteins, Parvalbúmins, *Trachurus symmetricus murphyi*, *Sciaena deliciosa*, SDS-PAGE Electrophoresis, Relative Quantity, Temperature, Simulated Gastric Fluid, Food Safety.

## ZUSSAMENFASSUNG

Parvalbumins (PA) bedeuten eine wichtige Gruppe von allergenic Protein, die den sarcoplasmatic Bruchteil des Fishmuskels gehören. Der PA der Pazifischen mackerel (*Trachurus symmetricus murphyi*) und Lorna drum (*Sciaena deliciosa*) wurden mit der Methodik von Arif S.H., Jabeen M. and Hasnain A., (2007) herausgenommen und bei SDS-PAGE electrophoretic und densitometric feinproben analysiert.

Ungefähre PA Menge waren 6.999mg/100g in Pazifischen mackerel und 7.329 mg/100g in Lorna drum. Thermalbehandlung um 121°C während 0, 5, 10 und 15 Minuten haben PA Stabilitäte von beiden Species in Bezug auf Relative Quantität (RC) betroffen, die auf rohe Proben (0 Minute) verwiesen sind. Die Heizung in 10 und 15 Minuten hat die drastischsten Effekten verursacht, die sogar in 63.50% und 71.25% der Pazifischen mackerel und Lorna drum beziehungsweise abnehmen. Um die Wirkung zu schätzen, nachdem Verbrauchsproben der enzymatischen Hydrolyse in Simulated Gastric Fluid (SGF) unterworfen wurden. Werte zeigen eine Zunahme, Effekten zu 83.25 % und 79 % in der Pazifischen makerel und dem PA von Lorna drum zuheizan zuheizen, der einewahrscheinliche synergic Wirkung und die Bequemlichkeit des thermischen Prozesses des konservierten Fischesvorschlägt, PA allergenic Effekten zu reduzieren. Die Untersuchung wurde duchgeführt von Oktober 2016 bis August 2017. Ergebnisse tragen zu Lebensmittelsicherheit, Gesundheitsschutz und Nahrung für Verbraucher bei.

**Schlüsselwörter:** Fisch, Allergenic Proteine, Parvalbumine, *Trachurus symmetricus murphyi*, *Sciaena deliciosa*, *Trachurus symmetricus murphyi*, *Sciaena deliciosa*, SDS-PAGE Electrophoresis, Relative Quantität, Temperatur, Simulierte Magenflüssigkeit, Lebensmittelsicherheit.

## INTRODUCCIÓN

Los hábitos de consumo de alimentos influyen decisivamente en el desarrollo y salud del ser humano y se asocian con algunos factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades. La alimentación saludable es tendencia actual a la que contribuyen los nutrientes y alimentos funcionales procedentes en especial de los productos pesqueros, propone inclusive el aprovechamiento de sus vísceras y de los tradicionales subproductos harina y aceite de pescado denominados actualmente “Ingredientes Marinos”.<sup>1</sup>

Sobre al reconocimiento del pescado como excelente fuente proteica y su repercusión sobre la Seguridad Alimentaria<sup>2</sup> y la Nutrición FAO en su 14ª Reunión en Bergen (Noruega), estableció entre otras ventajas, que su ingesta representa un valor aproximado promedio de 17% de la proteína animal consumida en el mundo.

Perú, país eminentemente pesquero<sup>3</sup> contribuye con su enorme riqueza ictiológica en términos de bienestar, ingresos –principalmente por exportación- y modo de vida para gran parte de la población. Sin embargo, desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria es necesario referir que para algunos individuos alérgicos el consumo de pescado puede representar un impacto negativo en su calidad de vida desarrollando síntomas que pueden llegar a ser severos. La provisión de alimentos sanos e inocuos al consumidor depende de la capacidad de la industria para identificar, procesar y comercializar alimentos correctamente etiquetados y de la reglamentación sanitaria apropiada que establezca un adecuado manejo de riesgo de alimentos

---

<sup>1</sup> La International Fishery Food Products (IFFO) utiliza esta denominación para los subproductos harina y aceite de pescado elaborados a partir de materia prima muy fresca y conservada a bordo bajo la aplicación de modernas tecnologías.

<sup>2</sup> Los últimos informes elaborados por expertos de alto nivel, organizaciones internacionales, la industria y representantes de la sociedad civil coinciden en destacar el enorme potencial que tienen los océanos y las aguas continentales en la actualidad, que será incluso mayor en el futuro, de contribuir de forma destacada a la seguridad alimentaria y la nutrición adecuada de una población mundial que se prevé alcance los 9.700 millones de habitantes en 2050 (FAO, 2016. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Contribución a la Seguridad Alimentaria y la Nutrición para todos. FAO, 2016 -I5798ES/2/01.17.

<sup>3</sup> Durante los años 2014 y 2015, el aporte de la captura de productos marinos en nuestro país ha representado el 4.45% y 5.90% de las capturas a nivel mundial. FAO, 2016. FAO Global Capture Production database updated to 2015. Summary Information. Fisheries and Aquaculture Department.

alergénicos, incluyendo la declaración obligatoria de la etiqueta para prevenir daños a la salud humana, de lo cual las Autoridades Competentes son responsables<sup>4 5 6</sup>

Las PA son proteínas alergénicas del músculo de pescado que cumplen funciones fisiológicas y resisten altas temperaturas y la digestión gastrointestinal. Ello ha motivado investigaciones correlacionando su potencial alergénico con su estabilidad a las condiciones mencionadas. A nivel nacional no se cuenta con información sobre este tema por lo cual el presente trabajo alcanza información sobre el comportamiento de PA en jurel y lorna -especies pesqueras de gran importancia comercial y nutricional en nuestro país- ante condiciones de tratamiento térmico, evaluando adicionalmente el efecto digestibilidad en fluido gástrico simulado (FGS).

El esquema del presente trabajo corresponde al de un estudio de investigación, el Capítulo I plantea el problema identificando y delimitando alergenicidad en pescado. En el Capítulo II el marco teórico presenta información actualizada a nivel nacional e internacional entre otros, sobre aspectos biológicos y estructurales de estas moléculas alergénicas y su respuesta a parámetros de procesamiento utilizados en los procesos tecnológicos (temperatura) para la elaboración de alimentos. El diseño experimental y la metodología analítica aplicada son descritas en el Capítulo III mientras que en el Capítulo IV se presenta el planteamiento y contrastación de hipótesis informando los resultados sobre los efectos del tratamiento térmico y de la hidrólisis en FGS sometidos a la validez de significancia estadística. La discusión de resultados, conclusiones y recomendaciones realizadas tienen el propósito de motivar el interés y propiciar el desarrollo de estudios epidemiológicos sobre el tema de alergenicidad de pescado y en general de alimentos y se describen en el Capítulo V.

---

<sup>4</sup> El Reglamento 1169/2011 de la Unión Europea sobre la información alimentaria facilitada al consumidor en lugares de expendio público obliga desde 2014 a informar sobre alérgenos entre ellos, los contenidos en pescado.

<sup>5</sup> En Chile, desde 2011 la Reglamentación Sanitaria de Alimentos (D.S. 977/96) obliga a rotular alimentos que contienen alérgenos

<sup>6</sup> En Argentina la Resolución Conjunta 57/2010 y 548/2010 de la Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (Capítulo V “Normas para la rotulación y publicidad de los alimentos, Artículo 235 séptimo del Código Alimentario Argentino “sobre el rotulado de alérgenos y sustancias capaces de producir reacciones adversas en individuos susceptibles”.

## **CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

### **1. ANTECEDENTES**

La gran variedad y el volumen de recursos pesqueros nacionales favorecen la generación de divisas por exportación (Tomida M. 2008) y el cumplimiento de políticas de Estado para combatir el hambre y desnutrición, sumada la ventaja de provisión de importantes nutraceuticos como los ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Entre 2013 y 2016 el 24.55% al 32.52% de los volúmenes desembarcados de pescado fueron destinados al consumo humano interno, siendo las especies de mayor consumo anchoveta, jurel, bonito, caballa, y lorna. Entre 1990 y 2016 la ingesta anual per cápita de pescado subió de 7 kg a 24.4 kg (Ministerio de la Producción, 2015).

El consumo de pescado es fomentado por el Ministerio de la Producción, la Sociedad Nacional de Pesquería (SNP 2013) a través de campañas. En 2015 la organización ecologista Oceana convocó al reconocido chef peruano Gastón Acurio para desarrollar la campaña “Salvar los océanos y alimentar al mundo”, fomentando el consumo de pescado sin agotar especies en vías de extinción con adecuada gestión en pro de mejor alimentación en el mundo. (Perú 21, 2015).

Por otro lado, el Codex Alimentarius (2007) refiere el pescado como uno de los “Los Grandes Ocho” alimentos que provocan alergia alimentaria y emite recomendaciones que son adoptadas por las Autoridades Sanitarias de los países, (resalta el etiquetado preventivo) y una Guía de Evaluación para los Alimentos Genéticamente Modificados Cabe anotar que en nuestra legislación sanitaria nacional de alimentos este tema aún no se encuentra regulado y tampoco en el área de salud se cuenta con información sistematizada sobre alergias alimentarias.

De la abundante información sobre características de los alérgenos pesqueros y sus efectos en la salud humana se conoce la reactividad cruzada debida a la similitud entre estructuras

alergénicas de diversos alimentos y la exposición repetida al alérgeno. Son usuales los casos de alergias a una especie pesquera que responden igual a otros alimentos e inclusive a alérgenos no alimentarios (Valenta R., Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C., Valent P.,1999 citados por Ferreira F., Hawranek T., Gruber P., Wopfner N., Mari A., 2004). Sin embargo, AESAN (2007), (*Thunnus alalunga*), Helbling et al., 1999, referido por Lee P, Nordlee J., Koppelman S, BAumert J and Taylor S. (2012) refieren casos de pacientes españoles alérgicos a una especie pescado pero que no reaccionaron adversamente al consumir bonito del norte.

Un antecedente importante en este tema es la reducción de la capacidad del alérgeno para ligar el IgE por efecto de la digestión gástrica que mitiga la intensidad de los síntomas y que se relaciona a su vez con una significativa menor absorción. Se conoce también que los agentes antiúlceras favorecen la sensibilización y la fase efectora de la alergia alimentaria debido a que impiden la digestión gástrica de la proteína. (Untersmayr, E. and Jensen-Jarolim E., 2008).

En adición a lo anterior, la medida del potencial alergénico está relacionada a la unión de los epítopos (parte específica del antígeno). Hildebrandt S, Schutte L, Stoyanov S, Hammer G, Steinhart H, and Paschke A. (2010) demostraron que el tratamiento térmico ejerce efectos significativos de reducción del potencial alergénico.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **2.1. PERCEPCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

Las alergias alimentarias son inmunopatologías cuya incidencia se incrementa cada vez más y resultan de la ingestión, contacto o inhalación de alimentos que contienen proteínas o glicoproteínas (alérgenos alimentarios). Bajo el enfoque de inocuidad, uno de los alérgenos alimentarios más importante está conformado por proteínas de pescado PA (AESAN 2007),

sin embargo, reducir o evitar su ingesta representa prescindir de una fuente proteica de alto valor biológico. En este sentido la comunicación de riesgos, en particular la educación de los consumidores para la elección de especies con bajo nivel de alérgenos, es un instrumento importante. (FAO and Nutrition Paper 87. 2006).

Otro enfoque no menos importante que se plantea es evaluar el efecto de la aplicación de tratamiento térmico y su posterior digestibilidad gástrica considerando que la estabilidad de la estructura en las proteínas alergénicas sufre alteraciones ante el tratamiento térmico y ello repercute en su potencial inmunogénico. A fin de evaluar los cambios en la estructura proteica de las PA de especies pesqueras jurel y lorna, se utiliza la técnica de Electroforesis “SDS-PAGE” (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio).

## **2.2. DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA**

### **Delimitación Espacial**

Las muestras analizadas fueron obtenidas de dos especies de pescado de mayor consumo a nivel local: jurel y lorna expandidas en Terminal Pesquero Ventanilla. El estudio fue desarrollado en los Laboratorios de Bioquímica y Biología Molecular del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### **Delimitación Temporal**

El lapso necesario para desarrollar el proyecto fue un año, desde octubre 2016 a agosto 2017.

### **Delimitación Social**

En Perú, los recursos pesqueros constituyen valioso recurso nutricional y de generación de mano de obra. Últimamente se observa la tendencia al incremento del consumo per cápita de pescado y la consecuente mejora de los valores de ingesta de proteína de alto valor biológico. Es necesario además considerar a nivel comercial, que existe prevalencia de alergias por consumo de pescado a nivel mundial y que las regulaciones de los mercados compradores de estos recursos son exigentes a este respecto.

A nivel internacional la preocupación por el tema de alergias alimentarias ha llevado a establecer niveles de alérgenos en las regulaciones sanitarias de alimentos. Entre nuestros países vecinos, Chile incorpora vigilancia y control de alérgenos en alimentos.

En nuestro País no se cuenta con información sobre datos ni estudios de prevalencia sobre pacientes que presenten alergia a las PA ni sobre estos alérgenos como sus agentes causales.

### **Delimitación Conceptual**

Las bases teóricas del problema fueron alérgenos: Parvalbúminas (PA) de las especies pesqueras de mayor consumo en el país y comercialización a nivel mundial (jurel y lorna).

Los métodos para la extracción y purificación de las PA fueron técnicas químicas, electroforesis SDS-PAGE que permite identificar la presencia de estos alérgenos y evaluar su estabilidad ante la aplicación de tratamiento térmico.

La aplicación de tratamiento térmico es una de las alternativas para desestabilizar la estructura proteica de las PA y su habilidad de desencadenar una reacción alérgica.

## **2.3. PROBLEMA GENERAL Y PROBLEMAS ESPECÍFICOS**

### **Problema General**

¿Se podrá determinar que el efecto del tratamiento térmico produce cambios sobre la alergenicidad de las PA en especies pesqueras de importancia nutricional en Perú: jurel y lorna, en un estudio a ser realizado durante octubre 2016 a agosto 2017 en los laboratorios del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la UN Agraria La Molina?

### **Problemas Específicos**

1. ¿qué cantidades de PA se encuentran en jurel, especie pesquera de importancia nutricional en Perú, desembarcada en el Terminal Pesquero Ventanilla durante octubre 2016 a agosto 2017?

2. ¿qué cantidades de PA se encuentran en lorna, especie pesquera de importancia nutricional en Perú, desembarcada en el Terminal Pesquero Ventanilla durante octubre 2016 a agosto 2017?
3. ¿cómo determinar el efecto del tratamiento térmico a 121°C aplicado durante 5, 10 y 15 minutos, sobre la alergenicidad de PA de jurel, una de las especies pesqueras de importancia nutricional en Perú, desembarcada en Terminal Pesquero Ventanilla, durante octubre 2016 a agosto 2017?
4. ¿cómo determinar si el efecto del tratamiento térmico a 121°C aplicado durante 5, 10 y 15 minutos, provoca cambios sobre la alergenicidad de PA de lorna, una de las especies pesqueras de importancia nutricional en Perú, desembarcada en Terminal Pesquero Ventanilla, durante octubre 2016 a agosto 2017?

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General**

Determinar el efecto del tratamiento térmico sobre la alergenicidad de PA en especies pesqueras de importancia nutricional en Perú: jurel y lorna, octubre 2016 a setiembre 2017.

#### **Objetivos Específicos**

1. Determinar el contenido de PA en jurel, especie pesquera desembarcada en el Terminal Pesquero Ventanilla durante octubre 2016 a setiembre 2017
2. Determinar el contenido de PA en lorna, especie pesquera desembarcada en el Terminal Pesquero Ventanilla durante octubre 2016 a setiembre 2017
3. Determinar el efecto del tratamiento térmico a 121°C aplicado durante 5, 10 y 15 minutos, sobre la alergenicidad de PA de jurel, especie pesquera desembarcada en Terminal Pesquero Ventanilla, durante octubre 2016 a setiembre 2017

4. Determinar el efecto del tratamiento térmico a 121°C aplicado durante 5, 10 y 15 minutos, sobre la alergenicidad de PA de lorna, especie pesquera desembarcada en Terminal Pesquero Ventanilla, durante octubre 2016 a setiembre 2017.

#### **4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **Justificación Teórica**

Las PA son proteínas sarcoplasmáticas abundantes en el pescado y uno de los principales alérgenos alimentarios de nocivas repercusiones en la salud humana. No se dispone de información sobre sus cantidades en especies pesqueras peruanas. Considerando que estas proteínas son polimórficas y se distribuyen en las especies de acuerdo a patrones específicos y de estabilidad molecular distinguida, diversos autores las proponen como biomarcadores en especímenes de pescado calentado. El tratamiento térmico es una alternativa de reducción de sus niveles de alergenicidad.

##### **Justificación Práctica**

Los resultados de la presente investigación contribuyen con información básica para fines de vigilancia, control, y prevención sanitaria en el consumo de alimentos de la pesca, para establecer estudios de exposición, evaluación y manejo de riesgo–beneficio en el consumo de pescado. El reconocimiento temprano de factores de riesgo al consumir pescado favorece el establecimiento de medidas preventivas en sujetos con riesgo alérgico elevado.

La evaluación del efecto producido al aplicar tratamiento térmico en la estabilidad de PA constituye alternativa de reducción de los niveles de alergenicidad en productos pesqueros.

##### **Justificación Metodológica**

Para el desarrollo del presente estudio fueron aplicados métodos químicos (de extracción de proteínas, proteínas sarcoplasmáticas y PA), tratamientos de calentamiento, métodos de digestión y de separación como la Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida.

Entre las características predictivas utilizadas para evaluar el riesgo de alergenicidad de alimentos se encuentra la estabilidad al procesamiento térmico y la digestibilidad (FAO/WHO 2001, referido por Herman et al (2007)).

### **Justificación Económico Social**

Perú es proveedor importante de productos pesqueros a nivel mundial. Además de la contribución del presente estudio a la prevención de la salud y aseguramiento del consumo de proteína de alta calidad biológica, la información es básica para facilitar el comercio internacional de productos pesqueros. Es necesario establecer información sobre contenidos de PA en nuestras especies pesqueras, en relación a los límites que han sido establecidos como permisibles por la reglamentación sanitaria internacional a nivel internacional, por países en los cuales las alergias alimentarias constituyen un problema de salud. Chile, cercano competidor en producción pesquera, ya ha establecido las especificaciones y restricciones para alérgenos de alimentos en su reglamentación de inocuidad alimentaria.

## **5. ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO**

### **Alcances:**

Se busca informar sobre un tema de prevención de la salud pública en relación al consumo de alimentos pesqueros, que no ha sido desarrollado a nivel nacional y que permitirá contribuir con el desarrollo del conocimiento sobre los niveles de exposición y reacciones inmunológicas ocasionadas por la presencia de alérgenos en las especies de pescado de mayor consumo a nivel nacional y que son nutricional y económicamente importantes, así como la alternativa de aplicar tratamientos térmicos que modifiquen su estabilidad y reduzcan su potencial alergénico.

### **Limitaciones:**

En nuestro país existe confusión respecto a alergias e intolerancias alimentarias. No existen estadísticas sobre pacientes alérgicos al pescado, por lo cual la alergenicidad *in vivo* no será realizada en el presente estudio.

La mayoría de casos de alergia responden a síntomas de tipo respiratorio y son ocasionados por factores ambientales. Las personas sensibles que presentan síntomas cuando consumen pescado no acuden usualmente a un especialista ni se someten a pruebas de detección, lo usual es que opten por retirar el alimento de su ingesta.

Otra limitación se refiere a la disponibilidad permanente del recurso o especies pesqueras, respecto a la ejecución experimental del presente trabajo por cuanto existen épocas de veda que son de cumplimiento legal obligatorio, y de la infraestructura de laboratorios. Estas limitaciones podrían afectar el cumplimiento del cronograma de actividades planteadas.

## **6. DEFINICIÓN DE VARIABLES**

### **V. Independiente: Tratamiento térmico (T) en tres niveles + blanco:**

- Blanco (sin Tratamiento Térmico) denominado ( $T_0$ )
- Tratamiento Térmico a 121°C por 5 minutos ( $T_5$ )
- Tratamiento Térmico a 121°C por 10 minutos ( $T_{10}$ )
- Tratamiento Térmico a 121°C por 15 minutos ( $T_{15}$ )

### **V. Dependientes:**

- Estabilidad al tratamiento térmico de PA de Jurel ( $E_J$ )
- Estabilidad al tratamiento térmico de las PA de Lorna ( $E_L$ )
- Digestibilidad de PA de Jurel ( $D_J$ ) sometidas a tratamiento térmico
- Digestibilidad de PA de lorna ( $D_L$ ) sometidas a tratamiento térmico

El efecto de la variable independiente fue evaluado sobre las variables dependientes, luego de someter las muestras en FGS.

### Identificación De Las Relaciones Entre Variables

Relacionar:

- tratamiento térmico 121°C por 5 minutos (T<sub>5</sub>) con Estabilidad de PA de jurel (E<sub>J</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 10 minutos (T<sub>10</sub>) con Estabilidad de PA de jurel (E<sub>J</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 15 minutos (T<sub>15</sub>) con Estabilidad de PA de jurel (E<sub>J</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 5 minutos (T<sub>5</sub>) con Estabilidad de PA de lorna (E<sub>L</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 10 minutos (T<sub>10</sub>) con Estabilidad de PA de lorna (E<sub>L</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 15 minutos (T<sub>15</sub>) con Estabilidad de PA de lorna (E<sub>L</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 5 minutos (T<sub>5</sub>) con Digestibilidad de PA de Jurel (D<sub>J</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 10 minutos(T<sub>10</sub>)con Digestibilidad de PA de Jurel (D<sub>J</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 15 minutos(T<sub>15</sub>) con Digestibilidad de PA de Jurel (D<sub>J</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 5 minutos (T<sub>5</sub>) con Digestibilidad de PA de lorna (E<sub>L</sub>)
- tratamiento térmico 121°Cpor 10 minutos(T<sub>10</sub>)con Digestibilidad de PA de lorna (E<sub>L</sub>)
- tratamiento térmico 121°C por 15 minutos (T<sub>15</sub>)con Digestibilidad de PA de lorna(E<sub>L</sub>)

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 1. CONCEPTO: SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN A BASE DE RECURSOS PESQUEROS

Nuestro mar privilegiado en riqueza y diversidad ictiológica cuenta con más de 737 especies de peces (Vildoso A.; Vélez J.; Chirichigno N.; Chirinos A. 1998. IMARPE ubica la pesca como la segunda mayor actividad más importante. De 2009 a 2016 el desenvolvimiento de consumo per cápita de productos pesqueros procesados y frescos mostró un crecimiento lento pero sostenido (de 22.10 a 25.97kg), basado principalmente en pescado fresco (51.13 a 63.44% respecto a las variedades de producto procesado como enlatado, congelado y curado).

La Seguridad Alimentaria es la capacidad de un país para asegurar alimentos básicos imprescindibles en cantidad y calidad para que la población satisfaga sus necesidades de desarrollo de una vida activa y saludable, significa el derecho a la autodeterminación de los pueblos para ejercer sus derechos a la alimentación desde sus propios medios ecológicos, socioeconómicos y culturales, garantizando el bienestar.<sup>7</sup>

Entre 2007-2008 la gran inestabilidad social, económica y política afectó especialmente a los países en desarrollo como resultado de la crisis alimentaria mundial. En 2011 aproximadamente de 40 a 44 millones de personas fueron afectados por la carestía de alimentos y ya se conocía que diversos problemas sociopolíticos en 33 países fueron consecuencia de la subida de precios en alimentos.<sup>8 9</sup>

---

<sup>8</sup> <http://www.bancomundial.org/es/results/2013/04/11/global-food-crisis-response-program-results-profile>. Programa de Respuesta a la Crisis Mundial de los Alimentos. Leído el 13/05/2007.

<sup>9</sup> World Bank. 2012. *Global food crisis response program : progress and lessons learned*. Washington DC : World Bank. <http://documents.worldbank.org/curated/en/960011468337870506/Global-food-crisis-response-program-progress-and-lessons-learned>. Leído el 13/05/2007.

El potencial de los mares y la contribución de la pesquería son reconocidos por los estados miembros de las Naciones Unidas (Sioen I. 2007). El pescado es uno de los alimentos de mayor comercio a nivel mundial, más de la mitad de sus volúmenes procede de países en desarrollo. FAO y OMS (2010) son entidades internacionales que trabajan analizando y alcanzando sugerencias y recomendaciones a los gobiernos para la formulación de políticas para afrontar la sostenibilidad alimentaria y nutricional a base de pescado<sup>10</sup> y aprobando iniciativas que refuercen la seguridad alimentaria y su resiliencia (FAO,2016)<sup>11</sup>

La segunda Conferencia Internacional FAO sobre Nutrición (Roma, noviembre 2014) estableció el compromiso de erradicar la malnutrición y transformar los sistemas alimentarios a dietas nutritivas resaltando la importancia de los productos pesqueros especialmente para poblaciones costeras –enfátizando grupos poblacionales de mujeres en edad fértil y niños-. El logro de este propósito está ligado a la responsabilidad en la gestión de los recursos pesqueros para garantizar una alimentación sana y nutritiva.

## **2. CONCEPTO: COMPONENTES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DEL PESCADO**

Los datos de composición proximal en alimentos son útiles para fines nutricionales y de aprovechamiento integral. Por su cantidad y aporte de aminoácidos esenciales la proteína de pescado y su cantidad es un valor constante, a diferencia de la grasa y la humedad que varían de manera inversa (IMARPE-ITP, 1996; Ayala M., Barriga M., Plácido M., Salas A., 2003). De acuerdo al Balance mundial de contribución de Pescado y Productos Pesqueros al suministro de proteína, los recursos pesqueros peruanos representan 22.7% del aporte de

---

<sup>10</sup> High Level Panel of Experts HLPE, 2014. La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición. Un informe del Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición. Junio 2014. Comité de Seguridad Alimentaria Mundial, Roma, 2014.

proteína animal. Adicionalmente el aceite de pescado es la principal fuente de ácidos grasos omega 3 (nutracéuticos), en anchoveta (la sumatoria de C20:5 (EPA) y C22:6 (DHA) representa un rango de 29.1 a 33.1% respecto al contenido total de ácidos grasos, que es destacado a nivel mundial). (Salas A., Ayala M., Albrecht M., 2003), Barriga M., Ayala M., Plácido M. y Salas A., 2003). La ingesta de grandes cantidades de DHA es asociada con menor velocidad de sensibilización alérgica en mujeres adultas (Schnappinger M., Sausenthaler S., Linseisen J., Hauner H and Heinrich J. 2009).

Ensayos de intervención dietaria controlados al azar en adultos jóvenes obesos con sobrepeso en países europeos (Islandia, Irlanda y España) indican que el consumo de salmón modula los niveles de hormonas circulantes (insulina, ghrelina y leptina). Ramel A., Parra D., Martinez J., Kiely M y Thorsdottir I., (2009). Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Adamczyk, M., and Szatkowska, U. (2011) han sistematizado información respecto a las propiedades funcionales de los suplementos de aceite de pescado en la mejora de funciones renales después de trasplantes de órganos (corazón y riñón) así como la mejora de las funciones corporales en mujeres embarazadas, lactantes y la prevención de desórdenes del sistema nervioso en niños. Estos investigadores informan que en los últimos 20 años se ha confirmado los beneficios significativos de la presencia de vitamina D3 de pescado en especial en lugares de poco acceso a luz solar. Los beneficios de constituyentes minerales en el pescado también son relevantes: micronutrientes como iodo, fluor y selenio, y macronutrientes como calcio, fósforo y selenio (antioxidante esencial que regula el balance celular (glutación peroxidasa GP1ta) y funciones de la tiroides. Waegeneers N, Thiry C, De Temmerman L y Ruttens A. (2013), cuantificaron selenio en 800 productos alimenticios expendidos en Bélgica, encontrando las mayores concentraciones en pescado (0.2 – 0.9 mg/kg, cantidad superior a la ingesta recomendada 60 a 70 ug/día por el Comité Científico en Alimentos de la Unión Europea).

Sotos Prieto M., Guillen M, Sorli J, Asensio E., Gillem Sáiz P, González J y Corella D. (2011) desarrollaron un estudio PREDIMED-Valencia con pacientes de edad avanzada concluyendo la asociación de alto riesgo cardiovascular con la carencia de consumo de pescado, en tanto que en jóvenes universitarias del País Vasco la ingesta de pescado estuvo asociada con alto un buen perfil dietético.

### **3. MARCO LEGAL**

La condición de perecible en el pescado determina la exigencia de las condiciones para su preservación y utilización desde su extracción. Inocuidad significa las buenas prácticas de higiene durante la manipulación, la transformación y su transporte o expendio y asegurando la cadena de frío. Los riesgos de la inocuidad en productos pesqueros están asociados a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).

Las alergias a productos pesqueros son reacciones adversas específicas y estimuladas en el sistema inmunológico, responden a la ingestión de proteínas alergénicas que usualmente conforman el músculo de la especie.

A nivel internacional es exigencia que los alérgenos alimentarios sean regulados en el etiquetado, especialmente en Estados Unidos, Canadá, Europa, Australia, Nueva Zelanda, Reino Unido y Japón se aplica el etiquetado precautorio a fin de cautelar a consumidores hipersensibles. Sin embargo, en países en desarrollo las regulaciones sobre etiquetado de alérgenos no están bien definidas, salvo se trate de productos para exportación. Desde 1985 Codex reconoce la declaración como responsables de más del 90% de alergias mundiales de “Los Grandes Ocho” (Cereales conteniendo gluten de trigo, Crustáceos y productos, Huevos y ovoproductos, Pescado y productos pesqueros, Maní, soya y sus productos, Leche y productos lácteos (incluyendo lactosa), Nueces y productos de nueces y Sulfito en

concentraciones de 10 mg/kg o más). Algunas frutas y vegetales se encuentran involucradas con el síndrome de alergia oral aunque este no se encuentra incluido en la lista precitada.

La introducción de nuevas proteínas en la cadena alimentaria y animales modificados genéticamente puede ocasionar reacciones alérgicas a través de dos vías: reactividad cruzada con otro alérgeno en pacientes susceptibles o como un alérgeno completamente nuevo. La alergenidad en alimentos genéticamente modificados fue regulada en Consulta FAO/WHO (2002) sobre Biotecnología e Inocuidad de Alimentos, con los siguientes criterios:

- 1) No debe haber gen de transferencia de alimentos comúnmente alérgicos
- 2) Apropriadas medidas deben ser empleadas por organizaciones si algún alimento conteniendo nuevas proteínas muestra alergenidad
- 3) La identificación de posibles alérgenos alimentarios y definición de sus características.

Codex (2007) regula la declaración de alérgenos en las etiquetas de las siguientes maneras:

- “Puede contener trazas de (nombre del alérgeno)
- “Contiene trazas de (nombre del alérgeno), o
- “Producido en una fábrica donde (nombre del alérgeno) es también manipulado

El Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón en 2002 reforzó un sistema de etiquetado de alérgenos para ingredientes alimentarios alérgicos que inicialmente recomendaba etiquetar caballa y salmón, debido principalmente a la falta de métodos analíticos armonizados para identificar proteína alérgica de pescado en alimentos. (Shibahara Y., Uesaka, Y., Wang, J., Yamada S. and Shiomi K. 2013).

### **3.1 REGLAMENTACIÓN INTERNACIONAL**

En Canadá el Ministerio de Salud establece las normas y políticas en materia de inocuidad y calidad nutricional de productos pesqueros y su cumplimiento se encuentra a cargo de la Agencia de Inspección. La Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos está

supervisada por autoridades federales provinciales y locales refuerza las leyes del etiquetado en coordinación con asociaciones, distribuidores, procesadores e importadores. Establece diversas acciones, entre ellas la información a través de su página [www.canada.ca/en/health-canada](http://www.canada.ca/en/health-canada) pudiendo disponer el recojo del producto.

En Europa los alimentos denominados Novel también pueden causar alergia (derivados de la modificación genética y tecnología del ADN recombinante) La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI) promueve campañas paneuropeas de sensibilización sobre anafilaxia y reacciones alérgicas alimentarias para de promover la educación sanitaria, prevención y tratamiento de las alergias alimentarias.

La agencia británica Food Standards Agency cumple con asegurar la disponibilidad de alimento inocuo para consumidores afectados por condiciones de alergia e intolerancia alimentaria, señalando advertencias proteger a este grupo de individuos: entre ellas:

1. Negociar e implementar la legislación para mejorar controles en el etiquetado de alérgenos en alimentos
2. Proveer de guías a la industria y reforzar entidades que propicien mayor conciencia en el control de alérgenos alimentarios a través de la cadena de suministro.
3. Proveer consejo respecto a alergias e intolerancias en los consumidores y distribuidores
4. Establecer investigación científica e investigación sobre el consumidor respecto a alergias e intolerancias alimentarias para mejorar la comprensión de estos aspectos para asegurar así que las políticas se basen en evidencia científica.

### **3.2 REGULACIONES DE LA AGENCIA NORTEAMERICANA FDA**

El Acta original FDA de 1906 no disponía regulación de ingredientes alérgicos en la elaboración de alimentos, ello ocasionó numerosos casos de enfermedades, por lo cual

fue reformulada en 1938 estableciendo etiquetar todo material elaborado a partir de dos o más materiales o ingredientes y declararlos por su nombre usual o común. Esta acta entró en vigencia después que 107 personas murieron intoxicadas, estableciendo estándares para alimentos y procedimientos para conducir inspecciones en planta; también la información para consumidores alérgicos. El Acta de Protección al consumidor y de etiquetado de Alimentos Alergénicos de 2004 estableció el listado de los alérgenos del grupo de los ocho y sus derivados por ser responsables del 90% de problemas de salud, estableciendo sean declarados (especialmente nueces, pescado y crustáceos) (Shravani S. 2012)

### **3.3 REGLAMENTACIÓN DE LA AUTORIDAD SANITARIA UNIÓN EUROPEA**

Esta legislación establece que 14 alérgenos (cereales que contienen gluten, crustáceos, moluscos, huevos, pescado, maní, nueces, soya, leche, apio, mostaza, sésamo, lupin y dióxido de sulfuro en niveles sobre 10mg/kg o 10 mg/litro) sean declarados cada vez que se encuentren presentes en un alimento o sean utilizados para elaborar ingredientes, o para la alimentación humana, inclusive bebidas alcohólicas..

En los países de la UE la declaración de ciertos ingredientes alérgicos es obligatoria y se encuentra establecida en las Directivas 2003/89/EC y 2005/26/EC; directivas que en España se difunden a través de AESAN (2007).

La Agencia de inocuidad alimentaria europea (EFSA) está autorizada para agregar más ingredientes alérgicos a la lista según se reporten intolerancias en los consumidores y también para autorizar temporalmente excepciones de etiquetado al alimento procesado en el cual se han removido los riesgos alérgicos debido a algún tipo de procesamiento.

### **3.4 REGLAMENTACIÓN DE LA AUTORIDAD SANITARIA DE CHILE**

El Ministerio de Salud Pública de Chile (2010) establece que los alimentos inocuos pueden no serlo para quienes sufren de alergias puesto que éstas son reacciones que no

dependen de la toxicidad del alimento, sino de una susceptibilidad individual. Las alergias alimentarias son inmunopatologías y su incidencia va en aumento cada vez más, por ello es importante informar en los alimentos sus ingredientes. Informar sobre su potencial alérgico es un salto cualitativo en la calidad de los alimentos que se ofrecen a la población. La legislación alimentaria en Chile define la “Lista de Alérgenos Alimentarios que Deben Rotularse Conforme Al Artículo 107 Letra H Del Reglamento Sanitario de Los Alimentos”. Esta norma incorpora y define como alérgenos de alimentos y sus derivados a crustáceos, huevos y sus productos, maní, soya, nueces y sus derivados, sulfitos en concentraciones de 10 mg/kg o más. (Resolución N° 427 Subsecretaría de Salud Pública del Ministerio de Salud Pública de Chile). El Departamento Salud Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile como laboratorio de referencia vela por la calidad analítica para la determinación de los alérgenos en los alimentos.

La red de protección social de Chile propuso en consulta pública entre el 23 de julio y 23 de octubre de 2009, agregar en el artículo 106, lo siguiente: “Para efectos de este reglamento se entiende por: 32) Hipersensibilidad alimentaria: Reacciones adversas a los alimentos de origen no tóxico. Se dividen en Alergia alimentaria e Hipersensibilidad no alérgica a los alimentos”. La Resolución resolvió que una lista de alimentos –entre ellos pescados y productos pesqueros – deberán ser etiquetados en forma obligatoria de acuerdo a lo establecido en del Reglamento Sanitario de los Alimentos, artículo N° 107, letra h). (FAO/OMS, Johansson SGO et al. (2004).

### **3.5 REGLAMENTACIÓN DE LA AUTORIDAD SANITARIA NACIONAL**

En la normatividad nacional pesquera, el Decreto Supremo N° 040-2001-PE. (2001) constituye el instrumento legal que rige las actividades de vigilancia y control en la extracción y procesamiento de pescado y productos pesqueros y acuícolas, en el marco

de la higiene y sanidad para asegurar la salud humana. Este dispositivo legal no ha sido sujeto de modificaciones y se observa carece de dispositivos para prevenir el impacto de los alérgenos de pescado y productos pesqueros en la salud humana.

El instrumento legal que establece la Ley de Inocuidad de los Alimentos es el Decreto Legislativo 1062, cuyo Artículo I (Finalidad) establece el régimen jurídico aplicable para garantizar la inocuidad de los alimentos destinados al consumo humano con el propósito de proteger la vida y la salud de las personas. En general a nivel nacional, no existen referencias sistematizadas en centros médicos sobre las reacciones de hipersensibilidad ocasionadas por alimentos, existiendo poca difusión sobre alérgenos de pescado y las diferencias entre alergia e intolerancia alimentaria.

#### **4. PANORAMA GENERAL DE LAS ALERGIAS ALIMENTARIAS**

Inocuidad y calidad son aspectos ligados al procesamiento de alimentos, la alergia alimentaria es una respuesta inmunológica anormal a alérgenos alimentarios de origen animal o vegetal, un peligro de salud creciente—especialmente niños susceptibles—. La alergia alimentaria además de ser un peligro creciente (Gómez E.; Maroga C.; Blásquez A.; Diaz Perales A.; Blanca M.; y Torres M.; 2013) señalan que la alergia alimentaria es un problema creciente en países occidentales con la eliminación de la fuente alimentaria como tratamiento confiable y no es un problema de salud reciente pues se conocía aun antes de la era cristiana. De acuerdo al padre de la medicina, Hipócrates (460 -370 AC) el alimento podía causar algunos malestares en los seres humanos, en 1906, el médico Clemens von Pirquet sugirió el término “alergia” para describir las repentinas reacciones a alimentos y otras sustancias. De acuerdo a las fuentes alimentarias, en el caso de las de origen animal la leche es el primer antígeno alimentario con el cual el ser humano establece contacto, entre los antígenos destacan la caseína, B lactoglobulina, a-lactalbúmina. De ello se infiere la facilidad con la cual su consumo puede desencadenar reacciones alérgicas mediadas por IgE. Similar efecto

ocurre en personas sensibles debido a proteínas como los grupos de ovomucoide, ovalbumina, conalbúmina, lisozima. Entre los alérgenos de origen marino destacan los procedentes de pescado (parvalbúminas) y mariscos (tropomiosinas). AESAN (2010)

Entre las proteínas alergénicas de origen vegetal destacan las globulinas 7S y 11S y la 2S albúmina en semillas de maní, en soya las proteasas que inactivan papaína y en trigo las prolaminas de semillas, los inhibidores de  $\alpha$ -amilasa y tripsina y la peroxidasa glicosilada.

En España, la Alergología es una especialidad médica multidisciplinar reconocida oficialmente por los Ministerios de Sanidad, Política Social e Igualdad y de Educación, que diagnostica y trata la patología resultante de alergias, utilizando técnicas reconocidas oficialmente (Programa oficial del BOE Número 241, 09 de octubre de 2006).

Sin embargo, la prevención de las alergias presenta un panorama aun desconcertante. La sensibilización es frecuente en edades tempranas y es la primera señal de futura enfermedad atópica, por ello la mejor opción es la intervención preventiva en edad temprana. Algunas manipulaciones dietarias en la infancia –lactancia materna prolongada, dietas maternas durante el embarazo y lactancia, uso de fórmulas hipoalergénicas- aún son evaluadas; sin embargo, en infantes de alto riesgo incapaces de completar su lactancia materna se observa que la alimentación prolongada con una fórmula hidrolizada en comparación de la fórmula de leche de vaca, reduce la alergia. Mavroudi A., Xinias I. (2011)

La alergia alimentaria es un tema dinámico que puede desarrollar hacia cualquier alimento aún en estadios de edad avanzados, e incluso mantenerse por el resto de su vida. Se conoce que en noviembre de 2011, en Alemania fue informado el caso de un individuo encontrado muerto cerca a un lago con dos latas vacías de pescado en conserva; las investigaciones demostraron se trató de un suicidio pues esta persona conocía su alergia a la proteína de pescado. La autopsia reveló su muerte originada por una reacción anafiláctica. (Sterzik V., Drendel V., Will M., and Bohnert M. (2012).

En 2009, Kanagawa Y., Matsumoto S., Koike S. and Imamura T. aplicaron la minería o exploración de datos<sup>12</sup> para analizar asociaciones de alergias en 1510 familias, encontrando que 6549 casos procedían de 878 familias y de ellos 402 presentaban anafilaxis. Las asociaciones más comunes fueron *huevo-leche*, *huevo-trigo*, *leche-trigo*. La probabilidad de ocurrencia de la combinación –si una persona que sufre ante cierto alérgeno también sufre ante otro- fue mayor para las relaciones establecidas del consumo de alimentos tales como *pollo-huevo*, *abalones-huevos de salmón*, *hongos-leche*. *Cangrejo-camarón*, *calamar-cangrejo*, *salmón-caballa*. A partir de estos estudios de asociación quedó claro que algunos alérgenos (como los contenidos en abalones, naranja, salmon, pollo, cerdo, hongos, duraznos y manzana) no inducen las alergias alimentarias de modo independiente.

Jenkins J., Breiteneder H., Mills C. (2007) identificaron las relaciones entre secuencias de proteínas, su estructura y propiedades alérgicas con su cercanía a homólogos humanos. Definieron una clasificación de alérgenos de origen animal en tres principales superfamilias: tropomiosinas, EF- proteínas y caseínas (con 14 familias menores). La relación de evolución de cada una de estas superfamilias demostró que las proteínas con identidad de secuencia mayor al 62% presentaban escasa alergenicidad. Los datos obtenidos de este estudio explican las diferencias de alergenicidad de las proteínas; a diferencia de las de origen vegetal, los alérgenos animales desafían la capacidad del sistema inmune humano para discriminar orígenes y las respuestas inmunes se convierten en respuestas autoinmunes. La cercanía entre alérgenos animales y sus homólogos humanos es importante en el desarrollo de alérgenos recombinantes con fines de inmunoterapia.

---

<sup>12</sup> La minería de datos (data mining) es el conjunto de técnicas y tecnologías utilizadas para identificar y extraer información de los datos para transformarla en un conjunto de datos a manera de una estructura comprensible para su uso posterior. Involucra aspectos de bases de datos, su gestión y procesamiento, busca encontrar patrones repetitivos, tendencias o reglas que permitan explicar el comportamiento de los datos en un determinado contexto.

#### **4.1 PREVALENCIA DE ALERGIAS POR CONSUMO DE PRODUCTOS PESQUEROS**

La alergia a pescado es relativamente frecuente en países costeros donde su consumo es elevado (Japón, países escandinavos o España) y las especies involucradas con mayor frecuencia en las reacciones alérgicas son los gadiformes (bacalao, merluza), peces planos (lenguado, gallo); los clupeiformes (sardina, boquerón) y el atún (Pascual C., Reche M., Fiador A., Valbuena T., Cuevas T. y Esteban M., 2008).

Los datos epidemiológicos indican que al menos 4% de la población estadounidense es alérgica con mayor prevalencia es durante la infancia (más del 6% de niños pequeños). (Breitender H. and Mills, 2005)

En Canadá (2008 a 2009) un estudio basado en reportes propios y diagnóstico médico de 9667 hogares estableció la prevalencia de alergias alimentarias severas pescado 0,51% y mariscos 1,6%. (Ben-Shoshan M., Harrington D., Soller L., Fraganane J., Joseph L., St Pierre Y., Godefroy S., Elliot., Clarke A., 2010).

La prevalencia y factores asociados a conductas alimentarias de riesgo fueron a través de un estudio transversal analítico con 1,134 adolescentes estudiantes en la Universidad de Guadalajara, México, con prevalencia de 7.2% de alergia alimentaria y asociación con la impulsividad, síntomas depresivos, ideación suicida, estrés y dificultades para establecer relaciones interpersonales Nuño-Gutierrez B., Celis de la Rosa A., Unikel-santocini C. (2009) investigaron. También en México, Rodriguez-Ortiz P., Muñoz-Mendoza D., Arias-Cruz A., Gonzales-Diaz S., Herrera-Castro D., Vidaurri-Ojeda A. (2009) en un estudio observacional y retrospectivo en 60 niños atendidos por alergia alimentaria, (51% menores de 5 años) durante 1.45 años, observaron que los alimentos de mayor alergenidad fueron lácteos, huevo y pescado, camarón, frijol, soya, chile, mango, cacao y fresa, la distribución de los síntomas fue 58% cutáneos, 23% gastrointestinales y 17%

respiratorios. La distribución de comorbilidades de mayor frecuencia fue 38% urticaria-angioedema, 20% rinitis alérgica, 15% dermatitis atópica, 6.6% asma.

De acuerdo a Gomez E., Mayorga C., Gomez F., Blásquez A., Diaz-Perales A., Blanca M. & Torres M. (2013) la prevalencia estimada de alergia alimentaria en la población mundial es 1 a 3% en adultos y del 4 – 6% en niños, estimando que 5 % son niños menores de 3 años. Estos autores elaboraron una revisión muy completa respecto al manejo, diagnóstico y estrategias de tratamiento de las alergias alimentarias iniciando con una recopilación de los resultados de investigaciones en prevalencia provocada por diversos alimentos en poblaciones de niños menores de 16 años y adultos en EE.UU. y Europa que reflejan la mayor prevalencia de alergias por pescado y mariscos en adultos:

Alimento	EE.UU.		Europa	
	Niños	Adultos	Niños	Adultos
Leche	2.5	0.3	0.5 -2	0.5
Huevos	1.5	0.2	0.5 -2	0.5 -2
Maní	1.4	0.6	0-1.5	2.5
Nueces	1.1	0.5	0-7.3	NR
Trigo	0.4	0.3	0.5	>3
Soya	0.4	0.3	0-0.7	0.2-2.9
Pescado	0.1	0.4	0-0.5	1.4
Mariscos	0.1	2	0-0.5	1.4

Aunque el consumo de pescado es muy popular a nivel mundial, representa permanente preocupación por ser una de las causas más comunes de alergia, especialmente en países costeros. En Noruega fueron reportadas reacciones adversas atribuibles al pescado en 30% de niños, 3% de los cuales (edad aproximada 2 años). En España, la alergia al pescado constituye 18 % de casos de alergia alimentaria infantil. (Torres Borrego, J.; Martinez J. y Tejero García J. 2003).

De acuerdo a Gomez E., Mayorga C., Gomez F., Blásquez A., Diaz-Perales A., Blanca M. & Torres M. Immunotherapy. (2013), en 2013 los datos de prevalencia de Reacciones Alérgicas en Productos Pesqueros. E.E.U.U. fueron referidas, en el caso de pescado a:

<b>Alimento</b>	<b>Reacción</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Dosis respuesta</b>
Anchoveta, pescado azul, carpa, bagre, bacalao, ánguila, lenguado, arenque, caballa, lenguado, perico, perca, platija, salmón, sardina, tiburón.	Alergia a pescado por PA puede causar anafilaxis. Se relaciona con reactividad cruzada a otros alimentos.	EE.UU. 0.2% de niños y 0.55% de adultos. Entre adultos, 0.6% de mujeres y 0.2% sufren alergia al pescado	En bacalao, tan bajo como 5mg.

Y en el caso de mariscos:

<b>Alimento</b>	<b>Reacción</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Dosis respuesta</b>
Mariscos, crustáceos (cangrejo, langosta, langostinos, camarón), almejas, conchas, choros, pulpo, ostras, conchas de abanico, calamar,	2% de adultos en EE.UU. sufren de alergia a mariscos (mayor causa de anafilaxis inducida	En EE.UU., 0.5% de niños y 2.5% de adultos. Entre adultos, el 2.6% de mujeres y 1.5% de hombres	Inclusive la inhalación de alérgenos de mariscos puede provocar reacciones

En E.E.U.U. la alergia a productos pesqueros es reportada por el 2.3 al 3.3% de 5529 hogares (14.948 individuos) (Sicherer S. 2004) y al menos 5.9% de los distribuidores. Sicherer citado por Wild L. y Lehrer S. (2005) señala que estas alergias representan entre el 0.1% y 0.45 de alergias alimentarias en niños y 2% adultos norteamericanos.

Hajeb P. and Selamat J., (2012) refieren información sobre la Prevalencia y síntomas clínicos de alergia a pescado en diversos lugares del mundo:

Países	Prevalencia	Síntomas clínicos	Referencia
Singapur	3.3%	Anafilaxis	Thong B., Cheng Y., Leong K., Tang C., Ching H. (2005)
Corea	12.5– 4.9%	Dermatitis atópica	Oh JW, Pyun BY, Choung JT, Ahn K, Kim CH, Song SW, Son JA, Lee S, Lee SI (2004)
Japón	85% (1)	Inflamación oral y dolor	Shibata R, Nishima S (2004)
	5.6% (2)	No reportados	Yoneyama K, Ono A (2002)
Suiza	84%	Síndrome alergia oral	Helbling A, Haydel R Jr, McCants ML, Musmand JJ, El-Dahr J, Lehrer SB (1999)
USA	0.4%	No reportados	Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA (2004)
	Merluza 24.8%		Lopata AL, Zinn C, Potter PC (1997)
	Atún 21.9%		

Sugita K., Kabashima K., Nakashima K. and Tokura Y. (2007) informaron sobre alergias orales y síntomas respiratorios debidos a exposición de alérgenos en el ambiente en mujeres jóvenes trabajadoras de un sushi bar en Japón; inicialmente desarrollaron urticaria en manos y brazos, posteriormente mostraron reactividad cruzada a los diversos tipos de pescado crudo que manipulaban en dicho lugar. Similar efecto fue observado en trabajadores de zonas de fileteo e inspección de plantas pesqueras (Dahlman-Hoglund A., Renstrom A., Acevedo F., and Andersson E., 2013).

Hajeb P. and Selamat J. (2012) indican que la alergia a pescado es ubicua en algunos lugares del mundo y de similares síntomas-síndromes de alergia oral, urticaria y anafilaxis-. En Asia se consume 24.9 kg de pescado per cápita al año y la prevalencia de sensibilización es más del 40% de niños y 33% de adultos, detectándose casos de alérgenos pesqueros biológicamente muy activos en muestras de suero luego de los 10 minutos de la ingestión. Estos autores refieren lo observado por Jirapongsananuruk O., Bunsawansong W. Piyaphanee N., Visitsunthorn N., Thongngarm T. and Vichyannond P (2007) sobre el incremento anual de anafilaxis de 9.16/100,000 pacientes admitidos en 1999 a 55.45/100,000 en 2004 por consumo de pescado y mariscos.

## 4.2 ASPECTOS CLÍNICOS DE LAS ALERGIAS ALIMENTARIAS

Los síntomas generales que acompañan las alergias alimentarias incluyen afecciones respiratorias (asma, dificultad para respirar, dolor de oídos, desvanecimiento, picazón, palidez), circulatorias (calambres, mareo, desvanecimiento, ataque cardiaco, taquicardia y pulso débil), nerviosas (mareo, fatiga, hiperactividad y migrañas), digestivas (dolor abdominal, constipación, diarrea, dificultad para deglutir, indigestión, vomitos (Góngora-Meléndez, M.; Sienra-Monge J.; Del Rio-Navarro B; y Avila L.,2010). Otros síntomas complejos son los de tipo circulatorio y respiratorio: anafilaxis, mareos, desmayo, arritmias cardiacas, angioedema, presión baja, visión borrosa. Richer A.(2009) citado por Shrivani S. (2012) refiere que 40% de niños en países europeos, que presentan eczema también presentan alergia alimentaria.

Los síntomas clínicos son explicados por diferentes mecanismos: asociados a IgE son causantes de síntomas inmediatos luego del consumo y que afectan la piel, el sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal y/o aparecen como reacciones anafilácticas (colapso cardiovascular, sincope o incontinencias), Kattan J., Cocco R., Jarvinen K.(2011) referidos por Hochwallner H., Schulmeister Ul, Swoda I., Spitzauer S., Valenta R. (2013) En el Servicio de Alergia del hospital Niño Jesús de Madrid, Jimenez A., Ibáñez M., Fernández L., Alonso E., Laso M. (2001) observaron 60 niños diagnosticados con alergia a PA y la primera reacción alérgica (asociada frecuentemente a urticaria aguda) se produjo alrededor de los 12 meses de vida coincidiendo con la introducción del pescado en su dieta.

Una forma de diagnosticar alergias mediadas por IgE es posible determinando anticuerpos específicos utilizando el sistema UniCAP CAP-FEIA (Phadia, Uppsala, Suecia) correlacionándolos con el incremento de síntomas clínicos. Las pruebas de puntura (Prick test) detectan sensibilización de modo rápido y menos costoso, sin embargo, un resultado



**Figura 1.** Prueba Cutánea de Prick Test. Zubeldia M., Baeza M., Jauregui I., Senent C. (2012).

angioedema, diarrea, asma y, en algunos casos shock anafiláctico

Los afectados de alergia sufren exposición ante bajas cantidades del alérgeno (miligramos) via gastrointestinal durante la ingestión (la mayor ruta de sensibilización), por vía sistema respiratorio (aeroalérgenos) o por contacto con la piel, (Jeebhay M., Robins t., Seixas N., Baatjies R., George D. citados por Kuehn (2014). La información especializada indica que últimamente las alergias han aumentado especialmente en países desarrollados por cuanto el sistema inmune se encuentra menos expuesto a agentes de infección durante la infancia en razón a buenas condiciones sanitarias ambientales y prácticas de inmunizaciones. Ello provoca que el sistema inmune no sea forzado a reconocer y combatir los agentes infectivos. Strachan D. (2000) citado por Barros A y Cosme F. (2013).

Allen K and Dharmage S. (2010) refieren la anafilaxis (una de las manifestaciones más severas de alergia alimentaria) como un predictor de la manifestación alérgica. Mencionan estudios prospectivos que consideran la alergia alimentaria como línea base para evaluar su rol en la predisposición a asma persistente o incidente.

En 2011, Johansson S., Wold A., and Sandberg A. (2011) investigando sobre la composición de ácidos grasos en la leche materna de 23 mujeres alérgicas y un grupo de referencia de 22 mujeres sanas, observaron que las primeras presentaron menores niveles

positivo no define absolutamente que la alergia sea mediada por IgE si es que no se utiliza un IgE específico. Diversos estudios han demostrado que las PA pueden ocasionar problemas de salud de diferente intensidad en

gravedad en los consumidores, malestares que incluyen urticaria aguda, dermatitis,

de ácidos grasos omega en su leche, a diferencia de las mujeres sanas, concluyendo que estos nutrientes ejercerían un efecto protector contra el desarrollo de las alergias.

En referencia a los factores que contribuyen al desarrollo de las alergias alimentarias, la creciente prevalencia de enfermedades alérgicas en niños muestra relación con cambios dietarios, especialmente con bajoconsumo de fruta, vegetales y minerales. Peroni D., Bonomo B., Casarotto S., Bonner A. y Piacentini G. (2012) refieren asociación entre los efectos antioxidantes de la vitamina C y selenio, vitamina E, zinc y carotenoides, al igual que la fibra, durante la gestación y el riesgo de asma en niños.

Los resultados de un estudio transversal en 4272 pacientes alérgicos correspondientes a 214 centros de salud en México Distrito Federal indicaron que en 42% de ellos existían antecedentes hereditarios al igual que la ingestión temprana de leche de vaca, cereales, pescado, carne, leguminosas y huevo. Otros factores como el tabaquismo, convivencia con animales, plantas intradomiciliarias, viviendas húmedas, polvo ambiental, compuestos bifenil clorinados, pesticidas organoclorados, dioxinas, ftalatos, metales pesados, entre otros, indicaron que la enfermedad alérgica es multifactorial. Los autores resaltan la importancia de establecer los factores de riesgo de manera preventiva a fin de reducir el impacto negativo a la salud de pacientes con riesgo elevado de alergia. López Pérez, G., Morfín M., Huerta López J., López López, J., Rivera Pérez, J. L., López Medina, L., Mejía Covarrubias, F., Aguilar, G., Vargas F. (2010). (Prescott S., Nowak-Wegrzyn A., 2011) señalan que los factores genéticos relacionados con su aparición no pueden ser modificados

Respecto al riesgo alimentario, factores de riesgo pre y posnatales son involucrados, con resultados variables y controvertidos. De los agentes estudiados, los principales factores de riesgo asociados con alergia alimentaria son la herencia atópica, la falta de lactancia

materna exclusiva (al menos tres a seis meses) y el destete temprano (antes de los cuatro a seis meses de vida). (Hidalgo, E.; Del Río B., Sierra J.,2009)

Un fenómeno general para todos los alérgenos alimentarios es su sensibilización en el tracto gastrointestinal, aun cuando sus proteínas desplegadas puedan retener su reactividad IgE, reteniendo algunos epítomos termoestables, o que los individuos desarrollen respuestas primarias hacia epítomos cortos residuales en alimentos sometidos a cocción. La presencia de grandes estructuras proteicas agregadas en el alimento podría potenciar sus propiedades alérgicas, por contener múltiples epítomos IgE y propiciar mayor liberación de histamina.

Se puede resumir que existen tres factores conjuntos causantes de la sensibilización de un individuo atópico con algún tipo de alergia: su disposición genética, la estructura del alérgeno y sus propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de los alérgenos.

Los factores favorables a la sensibilización de alergia alimentaria mediada por IgE.:

- 1º. La capacidad alérgica propia de cada alimento.
- 2º. La frecuencia de consumo: depende del hábito alimentario en relación con la edad del individuo y su área geográfica (la leche de vaca es el alérgeno alimentario más frecuente en los lactantes) y la alergia a pescado predomina en países escandinavos.
- 3º. La edad de introducción de los alimentos en la dieta del niño: Alergia a alimentos como huevo, leche de vaca y pescados, ocurre muy temprano (lactantes).
- 4º. La presentación del alérgeno: En el lactante son frecuentes los síntomas con la aparente primera ingestión del alimento sensibilizante. Este hecho implica la existencia de contactos previos, inaparentes o no constatados con el alérgeno, oa través de la leche materna. Dosis mínimas de antígeno pueden favorecer respuesta IgE.
- 5º. Otras sensibilizaciones no alimentarias asociadas: Es frecuente la asociación de sensibilización a frutas y hortalizas, principalmente, con sensibilizaciones a pólen.

6°. Alta capacidad de respuesta IgE: factor fundamental, muy frecuente en pacientes conocidos como “de riesgo atópico” como lo muestran los indicadores clásicos de atopia: alta incidencia de antecedentes alérgicos familiares, valores elevados de IgE y polisensibilizaciones a los más variados alérgenos. (AESAN, 2007)

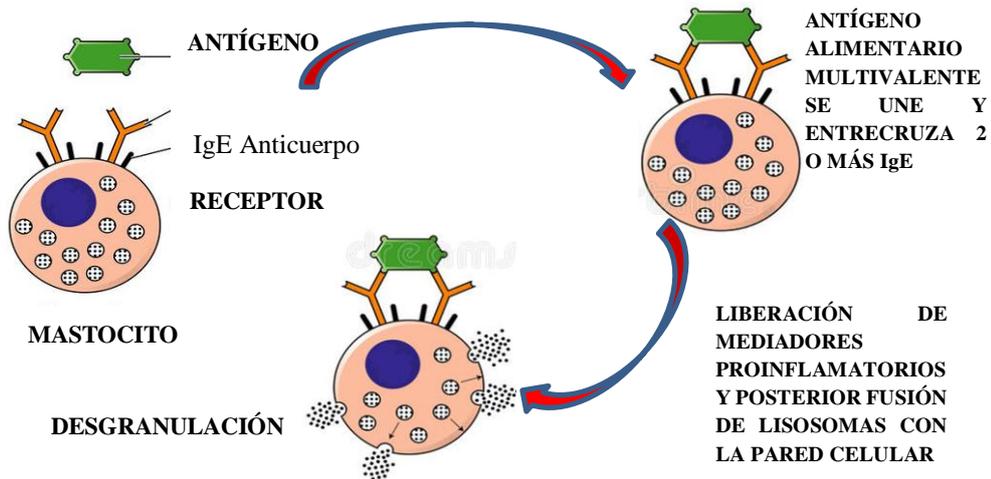
## **5. MECANISMOS DE LA ALERGIA ALIMENTARIA MEDIADA POR IgE**

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas (82 al 96% polipéptidos y de 4 a 18% carbohidrato) con actividad de anticuerpo que expresan en la forma específica de combinarse con el antígeno (inmunógeno que fue precisamente la sustancia que provocó su formación). Son específicas ante un antígeno en particular (por ejemplo ante las PA), su diversidad estructural, y su actividad biológica relacionada con las defensas ante enfermedades.

Entre las inmunoglobulinas, la IgA predomina en el sistema inmunitario de las mucosas participando en los mecanismos de defensa antiviral, la IgM determina respuestas inmunitarias tempranas contra la mayor parte de los antígenos, la IgD está presente en el suero y con actividad de anticuerpo hacia ciertos antígenos que incluyen entre otros la insulina, la penicilina, antígenos nucleares y de la tiroides.

De las inmunoglobulinas plasmáticas la IgE representa el 0.04%; sin embargo, mantiene elevada afinidad con las células cebadas. Al combinarse con sus antígenos específicos (alérgenos) liberan mediadores a través de las células cebadas provocando reacciones características de edema y eritema causados por exposición de la piel a alérgenos.

La IgE fluye en el sistema sanguíneo y se fija en basófilos y en mastocitos (células granulares que sintetizan y almacenan histamina), cuando reconoce un antígeno desencadena reacciones inmunitarias variadas: liberación de sustancias vasoactivas –histamina - como resultado de la desgranulación de mastocitos y activan respuestas inflamatorias (actividad de los eosinófilos). (Véase Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo de Desarrollo de Alergia (Elaboración propia, referencia imagen <https://www.google.com.pe/search?q=imagen+de+IgE&tbm> vista el 13 agosto 2017)

En el desarrollo de una alergia alimentaria los anticuerpos IgE ligan a mastocitos tisulares y a basófilos de la sangre y circulan a través del organismo. Algunas porciones terminales de la molécula de IgE poseen propiedades antígeno- específicas con afinidad por una o varias zonas específicas de la molécula del antígeno (epítipo). Otras porciones –de zonas terminales- son afines a los mastocitos, cuando se unen se produce la sensibilización frente al alérgeno.

Luego de la primera exposición al antígeno a través del paso del alimento por el intestino, existe la probabilidad de ocurrencia de tres efectos en el consumidor:

1. Adquiere tolerancia al antígeno y no expresa se observa respuesta inmune incluso a exposiciones sucesivas. Esta respuesta es usual.
2. Puede desarrollar respuesta inmunitaria y resultar recurrente ante siguientes exposiciones, no suele producir síntomas.
3. Se vuelve sensible y produce IgE en siguientes exposiciones con aparición de los síntomas.

En una siguiente exposición al alérgeno ocurre la segunda fase de la alergia, la cual se considera la reacción alérgica. El alérgeno contenido en el alimento interacciona con dos

anticuerpos IgE en la superficie de dichas células y estimula histamina u otras sustancias mediadoras (leucotrienos y prostaglandinas).

Existen dos categorías de alergias alimentarias dependiendo de la naturaleza de la respuesta del sistema inmune (Saulo A.2008) (Fiocchi A, Schünemann H., Brozek j., Restani P., Beyer K Troncone R. citados por Barros A and Cosme F. 2013).

- *Hipersensibilidad inmediata* con formación de IgE con síntomas evidentes entre unos minutos y una hora después de ingerido el alimento causante, generalmente ocasionadas por los denominados Ocho Alérgenos. Reacciones. severas y aún de gravedad mortal
- *Hipersensibilidad Retrasada*, involucra desarrollo de células no- IgE (células T sensibilizadas), los síntomas ocurren dentro de las 24 horas o más después de la ingestión del alimento. Un ejemplo de este tipo de hipersensibilidad es la enfermedad celiaca que ocurre en individuos sensibles por el consumo de granos (trigo y cebada).

La mayoría de alergias son mediadas por IgE y su incidencia no sólo involucra la dieta, también se ha establecido una interacción con factores genéticos. (Shimada J., Yano H, Mizumachi K., 2004) citados por Barros A and Cosme F. ,2013).

El reconocimiento de antígenos alimentarios ocasiona los siguientes tipos de alergia:

- Tipo I: denominada alergia atópica, su aparición obedece a factores genéticos cuando muchas proteínas ingresan al torrente sanguíneo procedentes de la dieta.
- Tipo II: por actuación de la inmunoglobulina IgE, se trata de una reacción en la cual el complejo se forma y se une a la superficie de la célula
- Tipo III: se refiere a reacciones entre un antígeno soluble y un anticuerpo asociado al complemento que producen un complejo provocando reacciones que incrementan la permeabilidad capilar, la liberación de enzimas del lisosoma y la destrucción celular.
- Tipo IV: se produce una interacción entre el antígeno y los linfocitos T sensibilizados a este antígeno, provocan la liberación de linfoquinas (mediadores solubles).

Las proteínas responsables de reacciones alérgicas mediadas por IgE presentan peso molecular mayor de 3kDa y pueden provocar respuesta de anticuerpo, son estables ante degradaciones químicas, físicas o enzimáticas y presentan epítomos de células B y T.

La sensibilización inicial de un alimento ocurre a través de la mucosa intestinal o exposición cutánea, sin embargo en algunos casos puede ocurrir a través de transferencia vía placenta o la lactancia e incluso por inhalación. Es una etapa sin sintomatología que prepara al organismo para reaccionar de forma inmediata tras un segundo contacto con el alérgeno.

### **5.1 REACTIVIDAD CRUZADA**

“*Reactividad cruzada*” es el reconocimiento de distintos antígenos por un mismo anticuerpo IgE, demostrable mediante pruebas in vivo e in vitro. Dos alérgenos presentan reactividad cruzada si comparten características estructurales reconocibles por anticuerpos IgE de sueros de pacientes contra alguna de estas dos proteínas. Esta similitud estructural de PA en las diferentes especies de pescado determina que en los pacientes sensibilizados a alergias se presenten con gran frecuencia reacciones cruzadas. AESAN (2007) refiere que un tercio de pacientes españoles alérgicos a pescado toleraba la ingesta de especies de túnidos como el bonito del norte (*Thunnus alalunga*); similares resultados fueron informados en pacientes alérgicos a alguna(s) especie(s) de pescado capaces de tolerar la ingestión de otras especies de pescado (Helbling et al., 1999, referido por Lee P, Nordlee J., Koppelman S, BAumert J and Taylor S. (2012).

La reactividad cruzada recibe la influencia de la exposición repetida y el alérgeno. Los niveles de anticuerpos IgE específicos y su afinidad son aspectos importantes. También es posible la sensibilización subclínica: caso de pacientes sensibilizados a determinados pescados o mariscos que no presentan síntomas al consumirlos. Describe características clínicas que muestran la reactividad a una fuente sin exposición previa. La característica principal de alérgenos con reactividad cruzada es el plegamiento de más del 70% de su

secuencia aminoacídica y la similitud de estructuras primarias y terciaria, y la semejanza de las secuencias de su estructura a homólogos humanos. Así se ha observado reacciones de los anticuerpos IgE con profilina y manganeso-superóxido dismutasa en pacientes alérgicos a polen y hongos (Valenta R., Duchene M, Pettenburger K, Sillaber C., Valent P.,1999 citados por Ferreira F., Hawranek T., Gruber P., Wopfner N., Mari A., 2004)

Muchas proteínas alergénicas pueden ser agrupadas sin considerar su fuente biológica, su similaridad con otras de diferente origen es la base molecular de la reactividad cruzada. Hansen T., Bindsley-Jensen C., Skov P., Poulsen L. (1996) demostraron reactividad cruzada en treinta adultos alérgicos (a bacalao) hacia otras especies: caballa, arenque y platija, las mismas que comparten una estructura antigénica común.

El bacalao y la gamba son modelos para el estudio de la alergia a pescado y crustáceos. Los alérgenos mayores responsables de reactividad cruzada entre distintas especies de pescados y anfibios son proteínas que controlan el flujo de calcio en el sarcoplasma muscular de dichos animales (PA). Recientemente se ha reproducido PA recombinante de carpa, comprobándose que contiene el 70 % de epítomos para IgE presentes en el extracto natural de bacalao, atún y salmón, y actualmente es utilizado en diagnóstico de pacientes con alergia a pescado. Este alérgeno recombinante podría constituir la base para el desarrollo de la inmunoterapia frente a la alergia al pescado. (Torres Borrego, J.; Martinez J. y Tejero García J. (2003)

En diversas especies de pescado de consumo popular en España fueron aisladas PA y enfrentadas a muestras de suero de 16 pacientes alérgicos. El grado de reactividad cruzada de estas PA fue investigado por ensayos de inhibición de ELISA, además de la determinación de sus secuencias de ADN. Los resultados indicaron que las PA de bacalao y pez espada fueron las de mayor reactividad y que ello a su vez se asocia con sus niveles

de PA. Las secuencias de aminoácidos altamente idénticas demostraron reactividad cruzada al IgE. (Griesmeier U et al 2010)

La reactividad cruzada se muestra más pronunciada entre especies de pescado relacionadas. La monosensibilidad a especies únicas ha sido demostrada para especies de lenguado, pez espada, tilapia, atún y salmon. (Kuehn A., Swoboda I., Arumugam K., Hilger C. and Hentges F. (2014). En España, Perez-Gordo M., Cuesta-Herranz J., Maroto A., Ibañez M., Vivanco F y Pastor-Vargas C., (2011) confirmaron resultados de reactividad cruzada por consumo de especies pesqueras (salmon, bacalao, platija) en dieciocho pacientes clínicos. Aplicando Prick Tests, se ha encontrado respuestas únicas de pacientes alérgicos a pez sierra que demostraron formación de IgE a una proteína de 13kD, pescado (alergia monoespecífica) (Kelso J., Jones R., Yunginger J., 2010)

Algunos pacientes hipersensibles al pescado pueden tolerar algunas especies y ser alérgicos a otras, tal como lo refieren algunos estudios en los que se enfrentaron sueros de 10 pacientes expuestos a PA de nueve especies de pescado de mayor consumo en Noruega, demostrando que las PA de bacalao, salmón, arenque y pez lobo fueron las más potentes en producir reacciones de reactividad cruzada entre ellos, a diferencia de las PA de arenque, lenguado, atun y caballa que tuvieron menor severidad o no se pronunciaron. (Van Do T., Elsayed S., Florvaag El, Hordvik I. Endresen C., 2005)

En países de elevado consumo de pescado es común observar reacciones alérgicas en pacientes diagnosticados con hipersensibilidad alimentaria, Yamada S., Nolte H., and Zychlinsky E. (1999) comprobaron que los sueros de pacientes alérgicos a atún, presentaban anticuerpos con reacciones cruzadas a albacora y otros tipos de atún.

Un estudio de reactividad cruzada en España, Griesmeier U. (2010) determinó los niveles de expresión y alergenidad de PA en bacalao y pez espada ante suero de 16 pacientes alérgicos mediante ensayos de inhibición de ELISA y secuencias de ADN de las muestras

de PA de las especies investigadas. Los resultados indicaron secuencias de aminoácidos altamente idénticas en ambas especies y reactividad cruzada al IgE.

En relación a la alergenicidad variable y las isoformas de PA , Kuehn (2014) explica primero, que las PA de diversas especies pesqueras podrían variar su potencial alergénico debido a la sensibilización específica del paciente (hábitos de consumo, edad en la cual expresó la alergia, etc), y segundo, que la alergenicidad de isoformas/isoalérgenos de PA de la misma especie podría ser variable (caso de salmón, carpa y bagre, cuyas isoformas parecen jugar un rol fisiológico en la adaptación del músculo a cambios ambientales)

La evaluación del potencial alergénico es esencial para la inocuidad de alimentos incluso los derivados de la biotecnología. FAO y OMS (2001) proponen que una proteína sea considerada potencialmente de reactividad cruzada si esta tuviera una identidad de al menos 6 aminoácidos contiguos o más de 35% de similaridad comparados con alérgenos conocidos, o identificando sus epítopos potenciales alérgenos y su antigenicidad potencial, o por la concordancia con epítopos conocidos de las IgE (tal como el aplicado para epítopos en la alergia al polen) (Ivanciuc O, Mathura V and Schein C. 2003).

Durante los últimos años algunos alérgenos encontrados en bacalao y camarón son potenciales para reacciones cruzadas ante alérgenos de arácnidos y otros insectos. En algunos casos los afectados pueden no estar conscientes de las diversas formas de exposición debido a que el contenido de producto pesquero de algunos alimentos no es conocido con certeza, o forma parte de ensaladas, aderezos, ovas, caviar u otros platos preparados (*alérgenos escondidos*).

## **5.2 PROPIEDADES MOLECULARES EN ALÉRGENOS ALIMENTARIOS**

La identificación de una molécula alergénica se inicia con la observación de síntomas alérgicos luego de su ingestión, posteriormente el suero de los sujetos es utilizada para probar un extracto de proteína obtenido del alimento involucrado. La detección,

identificación y funciones bioquímicas de uno o más componentes reconocidos por el IgE contenido en el suero del sujeto provee la información preliminar de la molécula alergénica y permiten su agrupación en familias de proteínas alergénicas Ciardello M.A., Tamburrini, M.; Liso, M.; Crescenzo, R.; Rafaiani, Ch.; and Mari, A. (2013).

La estructura de las proteínas juega un rol importante en la estabilidad del alérgeno para resistir la digestión. Las propiedades bioquímicas y fisico-químicas de estabilidad térmica y resistencia a la acción enzimática dependen de la habilidad de unión de los ligandos. Una característica estructural muy importante relacionada a la estabilidad es la modificación de los enlaces intramoleculares disulfuro, promotora de las propiedades alergénicas de algunas proteínas alimentarias.

Bannon G., Jen Fu T., Kimber I. and Hinton D. (2003) desarrollaron una clasificación de familias de Panalérgenos en relación a sus tamaños (peso molecular expresado en kDa) y el porcentaje de identidad de su secuencia en diversas fuentes alergénicas, tal como se observa en el cuadro:

Familias de Panalérgenos más comunes	Tamaño (kDa)	Identidad de Secuencia (%)	Fuentes
<u>Profilinas de plantas</u>	12 – 15	> 75	Polen, alimentos, latex
Polcalcinas	9	30 - 80	
Tropomiosinas	65 – 70	≥ 50	Animales
<i>B</i> - parvalbúmina 2S	12	≥ 53	Pescado
<u>Proteínas de semillas</u>			
2S albúmina	9.5 – 20	18 – 40	Nueces, granos
7S vicilin	30 – 80	NR	
Legumina	40 – 60	NR	

Algunos alérgenos alimentarios son capaces de unir ligandos (ion metálico, esteroides, o una variedad de moléculas lipídicas) integrándolos dentro de su estructura. La pérdida de

un ion metálico por desnaturalización de la proteína frecuentemente desordena su plegamiento incrementando la movilidad del polipéptido y su transición a una forma parcialmente plegada. Algunas proteínas forman una cavidad o túnel que permite alojar al ligando mediante interacciones de superficie. Esta unión puede reducir la movilidad del polipéptido, aumentando su estabilidad térmica y resistencia a la proteólisis, tal el caso de las lipocalinas<sup>13</sup> y las proteínas no específicas de transferencias de lípidos que incrementan su estabilidad cuando el ligando se ubica en la cavidad.

Algunos alérgenos se asocian con membranas celulares y otras estructuras lipídicas formadas en los alimentos –por ejemplo la albúmina 2S Sin-a1 de la mostaza provoca la agregación-, lo que según Onaderra M, Monsalve R., Mancheno J, Villalba M, Martínez del Pozo A y Gavilanes J. (2001), citados por Breitender and Mills (2005), afectaría el ingreso y procesamiento de tales alérgenos en el tracto gastrointestinal, atenuando su alergénico. En el procesamiento de emulsiones (mayonesa) se produce la interacción con lípidos y la adsorción de lípidos por las regiones hidrofóbicas de las proteínas desenrolladas que se agregan formando una capa bidimensional tipo gel estabilizando las gotas de aceite. A pesar que las emulsiones y otras estructuras lipídicas son ampliamente usadas como adyuvantes en el incremento de anticuerpos, no se conoce su efecto en el potencial alergénico de los alimentos; sin embargo, resulta evidente que cualquier proteína en esta forma ante los sistemas inmunes sería al menos parcialmente desnaturalizada.

Otro tipo de interacción entre proteínas y membranas es a través de receptores unidos a membrana y cuya existencia ha sido propuesta en células enteroendocrinas para la  $\alpha$ -

---

<sup>13</sup> Las lipocalinas son proteínas que transportan pequeñas moléculas hidrofóbicas tales como, esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Comparten regiones limitadas de secuencias homólogas y una estructura terciaria común. Se asocian con diversos procesos biológicos (respuesta inmune, transporte de feromonas, síntesis de prostaglandinas, unión de retinoides e interacciones entre células cancerosas)

caseína. Este tipo de interacción se desarrollaría en membranas animales, lo que resulta relevante para el potencial alergénico. (Buhot N., Douliez J., Jacquemard A., Marion D., Tran V., Maume B. 2001, citados por Breitender and Mills (2005).

Los alérgenos son proteínas globulares de estructura tridimensional bien definida; sin embargo, algunas poseen ciertos dominios o regiones de estructura desordenada por lo que son denominadas reomórficas. (Holt C. and Sawyer L. 1993). Por su naturaleza dinámica estas proteínas no sufren una transición drástica de un estado conformacional a otro durante el calentamiento y por tanto se presentan como potenciales epítomos termoestables. Un ejemplo son las prolaminas (a pesar de poseer cisteína) poseen una región insertada de secuencias variadas que provocan la interconversión a estructuras secundarias propensas a formar agregados y que ocasionan su insolubilidad.

También la glicosilación afecta las propiedades biológicas e inmunológicas de los alérgenos, así, la actividad inmunológica de los anticuerpos IgE se sitúa a la porción de glicolalérgenos en pacientes con alergia al polen y con reacciones cruzadas a otras plantas y no producen síntomas clínicos. La glicosilación permite estabilizar la estructura proteica y su resistencia a la desnaturalización química. (Wormald M., Dwek R. 1999 y Pedrosa C., De Felice F., Trisciuzzi C., Ferreira S. 2000, citados por Breiteneder and Mills 2005).

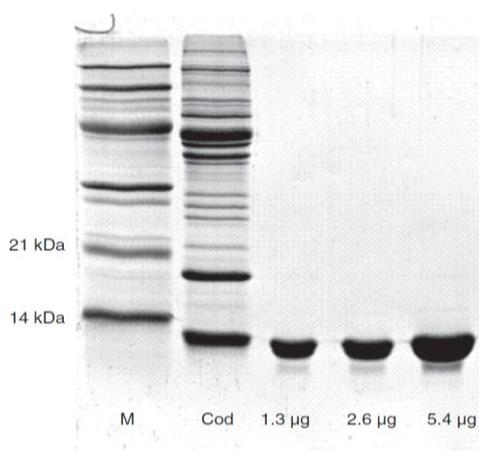
Las estructuras repetitivas en las proteínas alergénicas propician agregación -incluso bajo condiciones fisiológicas o por efecto del procesamiento tecnológico- y pueden potenciar la habilidad de los epítomos IgE para liberar histamina por los mastocitos. (Braun A, Kwee L, Labow MA, Alsenz J., 1997). Tal es el caso de las tropomiosinas, contienen diversas isoformas y adoptan estructura  $\alpha$ -helicoidal conteniendo 2 moléculas enrolladas una alrededor de la otra unidas como una hélice. Existen hipótesis sobre la insensibilidad de sus epítomos a la desnaturalización térmica e hidrólisis parcial; son alérgenos

termoestables y de reactividad cruzada, algunos son hidrosolubles y se liberan en el agua de cocción. (Lehrer S.B, Ibanez MD, McCants ML, Daul CB, Morgan JE., 1990).

## 6. PROTEINAS ALERGÉNICAS EN PESCADO: PARVALBÚMINAS

Estudios alergológicos seguidos en 60 niños durante 5 años en el Servicio de Alergia del hospital Niño Jesús de Madrid determinaron que la especie pesquera más involucrada fue el perico (*Coryphaena hippurus*) seguida de sardina, boquerón y trucha; mientras que el atún y el emperador fueron las mejor toleradas (Jiménez A., Ibáñez M., Fernández L., Alonso E., Laso M., 2001).

Las PA se encuentran en el sarcoplasma muscular de manera especial en la carne blanca de los animales vertebrados y pertenecen a la familia de las calmodulinas. Las PA son proteínas



**Figura 3.** Parvalbúmina de bacalao. M: marcador de peso molecular, Cod: extracto PA bacalao.

que a su vez incluyen moléculas de troponina C y las cadenas de miosina ligera. La función de estas moléculas es básicamente controlar y ligar el calcio durante los procesos de contracción y relajación, juegan un rol de factor relajante soluble y se encuentran en proporción inversa con el contenido de mioglobina, por lo que abundan menos en el músculo oscuro. La alergenicidad de las PA sufre considerables

reducciones cuando se produce el agotamiento de calcio (Kobayashi et al, 2006), son de naturaleza ácida, presentan característica de bajo peso molecular (rango entre 10 a 12 kDa), hidrofílicas y muy resistentes a la degradación enzimática. Las PA de bacalao (*Gadus morhua*) Gad c1 (Figura 3) y carpa (*Cyprinus carpio*) Cyp c1 han sido las primeras identificadas y utilizadas como marcadores representativos para la sensibilización al pescado en general, demostrando que diferentes contenidos de PA parecen explicar la tolerancia a

algunas especies. (Borres M., Ebisawa M., & Eigenmann P., 2011 y Aas M. en 1966 referido por Lee, P.; Nordlee J., Koppelman S., Baumert J., Taylor S., 2012)), en tanto que la Sal s 1 fue identificada en el salmón. Las PA de carpa por ejemplo, contienen 70% de los epítomos de IgE presentes en extractos naturales de bacalao, atún y salmón. El colágeno es el alérgeno de pescado más conocido. (Hamada 2002, referido por Wild L., y Lehrer S. 2005).

Entre los diversos alérgenos de pescado existe alta homología. Se ha observado que por lo general los peces cartilaginosos expresan *a*-PA mientras que los de esqueleto óseo presentan el subtipo *b* (referido como el de mayor potencia alérgica). Independientemente de su similitud estructural, los homólogos *a* son considerados no alérgicos. (Gajewski K., Hsieh Y. 2009; Griesmeier U., Vasquez-Cortes S., Bublin M., Radauer C., Ma Y., Briza P., Fernandez-Rivas M. & Breiteneder H. 2010)

Dos linajes filogenéticos de PA en pescado han sido establecidos según su secuencia aminoacídica: los subtipos alfa y beta, (puntos isoeléctricos pI 5.0 y 4.5 respectivamente), presentes en el sistema nervioso central y en el músculo, en muchas especies se encuentra ambos tipos, e indican diferencias que explicarían la alergenidad variable de ambos linajes. La secuencia aminoacídica de las PA presenta variaciones entre 55 – 95%; Goodman M., Pechere J. Haiech J., Demaill J. citados por Kuehn (2014) indican que los epítomos de unión a IgE se encuentran en regiones bien conservadas de la PA de unión a Calcio. Bugaiska-Shretter A., Elfman L., Fuchs t., Kapiotis s., Rumpold H., Valenta R., Spitzauer s. (2005) investigaron la ausencia de calcio en la unión a los alérgenos en el suero de 30 pacientes expuestos a seis diferentes especies (bacalao, atun, salmon, perca, carpa y anguila), encontrando reactividad a una proteína de 12 kD, demostrando que los epítomos de las PA la convierten en un alérgeno pesquero reactivo sensible a la eliminación del calcio.

Una cantidad considerada abundante de PA supera 5 mg/g de peso fresco de pescado provoca la relajación de las fibras musculares a través del ligando de calcio libre intracelular y resulta

ser la mínima dosis reportada que ha causado reacciones clínicas es 5mg. (The EFSA Journal, 2004). La pérdida de calcio asociado a la proteína provoca un gran cambio en la conformación y pérdida asociada de epítomos IgE. Aun cuando las PA muestran marcada resistencia térmica, no inducen a manifestaciones clínicas y enzimáticas se ha reportado la reducción entre 100 a 200 veces de su actividad de ligar IgE en pescado enlatado respecto a pescado sancochado. Sin embargo se observó la permanencia de algunos epítomos reactivos a IgE. (Bernhisel-Broadbent, Scanlon SM Sampson H. 1992 et al citados por Breitender and Mills 2005).

Considerando que las PA son proteínas polimórficas y no se distribuyen de manera uniforme, Arif S.; Jabeen, M.; and Hasnain, A. (2007) las propusieron como un excelente biomarcador en especímenes de pescado sometido al calor.

En relación a la distribución de PA en el músculo de pescado, se debe considerar la diferencia fisiológica entre el músculo claro y oscuro: el primero desarrolla actividad que requiere bajo gasto energético, mientras que el músculo oscuro es característico de actividad natatoria intensa. Así se observa, entre las especies pesqueras, el atún y la caballa presentan mayor cantidad de músculo oscuro que el bacalao y el lenguado. Las Investigaciones al respecto permitieron identificar secuencias de nucleótidos del ADNc que codifican PA de 12kDa en ambos tipos de músculo. En estos estudios se observó que los sueros de pacientes fueron menos reactivos a los extractos de músculo oscuro que a los de músculo claro. Los experimentos de biología molecular revelaron que la misma molécula de PA presenta variaciones extremadamente amplias, según Kuehn A., Swoboda I., Arumugam K., Hilger C. and Hentges F. (2014) el contenido de PA de las especies de pescado de mayor consumo varía considerablemente (hasta en 100 veces), ello debe ser tomado en cuenta para diseñar pruebas de enfrentamiento con pacientes alérgicos.

Kobayashi A., Tanaka H., Hamada Y., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K. (2006) establecieron a partir de sus investigaciones los diferentes contenidos de PA en el músculo claro y oscuro y la evidente mayor cantidad en el primero:

Especie	Músculo	Contenido PA (ug/g)		CV (%)
		Rango	Promedio±DS	
Sardina	Blanco	114-187	149 ± 33	22.14
	Oscuro	21 - 50	38 ± 13	34.21
Jurel	Blanco	12 - 25	20 ± 7	35.00
	Oscuro	No determinado	No determinado	-
Caballa	Blanco	1332 - 2066	1618 ± 312	19.28
	Oscuro	231 - 489	306 ± 108	35.29
Besugo	Blanco	318 - 611	417± 168	40.28
	Oscuro	88 - 129	105 ± 21	20.00
Estornino	Blanco	154 - 1376	686±626	91.25
	Oscuro	18 - 130	80 ± 57	65.51

Estudios realizados por Lee, P.; Nordlee J.; Koppelman S.; Baumert J.; Taylor S. (2012) establecieron la medida de los niveles de PA en tejido muscular de pescado y la importancia de las localizaciones musculares y las condiciones de almacenamiento. La proteína extraída de las muestras fue sometida a una prueba ELISA y a electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida. Los resultados permitieron demostrar que el contenido de PA disminuía en el tejido muscular de las especies, desde las posiciones anteriores (dorsal y ventral) hacia las posteriores (cercanas a la aleta caudal). Este factor podría explicar en parte la inconsistencia en la alergenicidad de las proteínas PA de las diferentes especies.

## **7. ESTABILIDAD DE LAS PROTEINAS ALERGÉNICAS ANTE LA DIGESTIBILIDAD**

La estabilidad de proteínas alergénicas obedece la adopción de *B*-estructuras, su fraccionamiento y menor capacidad térmica (Thompson M., Eisenberg D. 1999) así como a sus interacciones iónicas, dipolo-dipolo, enlace hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas y su enlace disulfuro (intra o intermolecular) que mantiene la estructura tridimensional, o por agentes

químicos y manteniéndola reversible en condiciones de frío, un ejemplo son los alérgenos de las prolaminas, inhibidores de tripsina y *A*-amilasa. (Van Ree R., 2002)

La presencia de enlaces disulfuro cruzados provoca en la zeamatina (proteína antifúngica del maíz) elevada resistencia a la proteólisis mientras que las proteínas alergénicas del kiwi (pobres en azufre) son degradadas en hidrólisis por 1 minuto en FGS. Algunas quitinasas alergénicas y de propiedades antifúngicas presentan uniones muy conservadas, residuos de cisteína formando puentes disulfuro y epítomos de unión a IgE localizados, y aunque sufren degradación por hidrólisis enzimática, resultan positivos en las pruebas de Prick Test, probablemente debido a que sus enlaces disulfuro mantienen unida la proteína. Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo T, Salcedo G (2003).

Cualquier modificación de la conformación nativa de la proteína a nivel de estructuras cuaternaria, terciaria o secundaria causada por agentes físicos, químicos o enzimáticos se denomina “Desnaturalización”, para el caso de procesamiento de alimentos es generalmente irreversible. La desnaturalización afecta la solubilidad, la modificación de la capacidad para fijar agua, pérdida de actividad biológica, incremento de viscosidad, y mayor susceptibilidad al ataque enzimático, facilitando la digestibilidad de la proteína (Jimenez-Saiz R.,2012).

Las proteínas alergénicas suelen resistir la digestión, su baja digestibilidad se asocia con su elevado potencial de sensibilización por ello la digestión incompleta resulta en péptidos que se exponen al sistema inmune facilitando la unión al alérgeno. (De Jongh H.; Lopez C.; Timmerman E.; Nordlee J.; Lee P.; Baumert J.; Hamilton R.; and Koppelman S., 2013).

La estabilidad digestiva de una proteína alergénica correlaciona con su “*alergenicidad relativa*” descrita en función del número de individuos que desarrollan la sensibilización y que depende de la naturaleza, grado y duración de la exposición a la proteína per se. Estos estudios se basan en la hidrólisis directa del sustrato por pepsina o FGS, algunos en combinación con tripsina y quimotripsina para una degradación más profunda. La simulación

de condiciones de digestión ha sido desarrollada en modelos estáticos o dinámicos a semejanza de la condición in vivo (hidratación y mezcla) considerando los efectos de la matriz del alimento en la cinética de liberación del alérgeno. (Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickman, M. S. J., Bottrill, A. R and Mills, E., 2005). Este método evita el uso de animales experimentales o personas y utiliza pequeñas cantidades de proteína, por lo cual actualmente el desarrollo de nuevos péptidos fármacos, requiere de la evaluación de su estabilidad digestiva antes de su administración.

Bowman C. and Selgrade M. (2008) evaluaron el potencial alergénico y la digestibilidad de proteínas utilizando suero de animales de experimentación mediante pruebas ELISA y ensayos de Reactividad del IgE. Observaron mayor probabilidad de las proteínas estables a la digestión de provocar IgE después de la exposición oral en animales y se asocian a mayor riesgo. Concluyeron en que la ruta oral es la más relevante para exposición a alérgenos y que la estabilidad de la proteína a la digestión es una herramienta actual de evaluación del riesgo. El primer ensayo de digestión vitro con pepsina fue desarrollado en 1996 por Astwood et al. Kenna, G. and Evans, M., (2000) observaron la estabilidad de alérgenos hasta por 60 minutos, sin embargo, diversos autores concluyen que la digestión por pepsina ocasiona la hidrólisis con facilidad (Fu T.J., Abbott R., Hatzos C., 2002), (Thomas et al, 2004; Goodman, 2005)

El uso actual de la resistencia a la pepsina desarrollada en FGS es utilizado en el árbol de decisiones –aunque aún no de manera absoluta, ya que no todas las proteínas estables son capaces de inducir sensibilización alérgica- para la evaluación de alergenicidad potencial de proteínas. (Comité de Consulta de Expertos en Alergenicidad de Alimentos derivados de la Biotecnología de la FAO/OMS, 2001) en base a los primeros estudios de Astwood et al (1996), Becker 1997, Besler et al 1987, Taylor y Lehrer (1996) citados por Bannon G. Jen Fu T., Kimber I. and Hinton D. (2003). FAO (Codex Alimentarius Guidelines FAO/WHO, 2003) establece que si la ruta de sensibilización alérgica en humanos es oral, las proteínas capaces

de sobrevivir el paso a través del estómago estarán disponibles para provocar respuestas inmune en o más allá de la mucosa intestinal. En base a los numerosos resultados de investigación evaluados la entidad propone que aquellos alimentos conteniendo proteínas estables a la digestión presentan mayor probabilidad de comprometer IgE después de la exposición oral, más aún si se asocian con alimentos de riesgo alergénico (Bowman C. 2008). El desarrollo de una reacción alérgica requiere de la exposición del sistema inmune con la proteína, ante ello se entiende la importancia de los procesos de fragmentación, absorción, biodisponibilidad, conjugación con otras macromoléculas que son los que ocurren en el tracto gastrointestinal. En el caso de las ovoproteínas, su resistencia a la digestión es uno de los criterios utilizados para evaluar su alergenicidad, lo que resalta la importancia del efecto de los tratamientos tecnológicos aplicados en las proteínas alimentarias.

Entre los factores que influyen en la evaluación de la estabilidad de alérgenos alimentarios ante la digestión gástrica resaltan las interacciones de las proteínas con otras moléculas, por ejemplo lípidos que actúan en los procesos de adsorción en la interfase aceite/agua y protegen enlaces susceptibles al ataque enzimático, es el caso del 80% de las lipoproteínas de la yema de huevo y de la fosfatidilcolina - secretada a nivel gástrico y biliar que interfiere con la degradación de la *b*-lactoglobulina (Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Esdaile, D.J, 2004). Otros factores son las diferencias en el pH del ensayo, la pureza de la enzima, la relación enzima/sustrato, la pureza y forma de la proteína, tal como lo observó Seppala 1999, citado por Bannon (2003) en Patatina, un alérgeno de papa que se comporta inestable en el ensayo de pepsina.

La reducción de la acidez gástrica por inhibidores de la bomba de protones también influye en la alergenicidad, permite absorber fragmentos más completos y activos inmunológicamente. Inclusive el estrés crónico puede afectar la permeabilidad epitelial y promover la presencia de antígenos en el sistema inmune de la mucosa intestinal. A su vez,

los alimentos conteniendo surfactantes activa la desgranulación de mastocitos y provocan ordenamiento de los enterocitos facilitando la penetración de las proteínas alergénicas. (Taylor L., Lehrer B., 1966).

Al comparar la estabilidad a la digestión (de 0 a 120 minutos) de 17 alérgenos alimentarios y 18 proteínas no alergénicas Bannon (2003) observó que los alérgenos no son necesariamente más resistentes a la digestión que las proteínas no alergénicas, por ello, aunque la estabilidad digestiva es considerada un prerrequisito clave para la alergenicidad se requiere evaluar en base a la respuesta alérgica mantenida en ambientes ácidos y proteolíticos (previos a la absorción por la mucosa intestinal).

De Jongh H., Lopez Robles C., Timmerman e., Nordlee J., Lee P., Baumert J., Hamilton R., Taylor S. and Koppelman S. (2013) investigaron efectos de la glicosilación sobre la digestibilidad y la unión de PA de bacalao con IgE simulando condiciones gástricas en presencia de pepsina a diferentes pH: Refieren cambios menores en las estructuras secundarias y terciarias de las PA ,la formación de algunos péptidos de 3 y 4 kDa no alergénicos y la formación de pequeños dímeros muy capaces de unión a IgE.

Los alérgenos de bacalao muestran considerable reducción ante digestión gástrica que si es incompleta representa un factor de riesgo para anafilaxis inducida por alérgenos. Además, la ingestión de antiácidos incrementa el pH gástrico conduciendo a una sensibilización potencial. Untersmayr, E.; Vestergaard, H.; Malling HJ.; Boltz-Nitulescu, G.; Scheiner O.; Stahl P., Jensen-Jarolim E. and Poulsen L. (2007). La resistencia de las proteínas de esta especie ante la digestión gástrica (FGS) evaluada in vitro en rangos de pH 1.25 a 5.0, mostró reducción por degradación a 1 minuto, siendo más evidentes las respuestas en el rango de pH de 2.5 a 2.75. (Untersmayr E., Pulsen L., Platzer M., Pedersen M., Boltz G., Skov P. Jensen E., 2005).

Al evaluar el efecto del tratamiento térmico sobre la estructura de las proteínas, la prueba de digestibilidad in vitro y la técnica de separación electroforética en geles de poliacrilamida han sido probadas con éxito. Los resultados de diversos estudios sugieren que la ruta subcutánea es inadecuada para distinguir alérgenos de no alérgenos, pero que la exposición oral bajo condiciones experimentales apropiadas permite respuestas alérgicas diferenciales de acuerdo a la alergenicidad conocida. (Coura T., Lopes S y Bressan J.,2013).

## **8. EFECTO DEL PROCESAMIENTO TECNOLÓGICO EN PROTEINAS ALERGÉNICAS**

Las proteínas alergénicas presentan características bioquímicas y físico-químicas muy relacionadas con la estabilidad térmica y resistencia a la proteólisis, resaltadas por la habilidad de unir ligandos (iones metálicos, lípidos o esteroides). Los principales alérgenos son termoestables, pero algunos son susceptibles a pH bajo y a la acción de las enzimas proteolíticas. Todo daño que sufra un alérgeno puede ser explicado básicamente por la pérdida de su conformación estructural de origen y dentro de esto el daño o cambio a menor estabilidad de los epítopos conformacionales, lo cual los hace más sensibles a la digestión enzimática. (Pedraza M., Rodriguez A., 2004).

La modificación de las propiedades de unión de un alérgeno con IgE por efecto de la cocción no sigue reglas fijas. La aplicación de tratamientos tecnológicos (cocción, fritura, asado, salado, deshidratación o congelado) podría crear nuevos epítopos alergénicos y destruir los existentes. Se ha observado que el tostado ocasionado por la Reacción Maillard, incrementa la alergenicidad del maní, en tanto que el calentamiento de la leche de vaca reduce –aunque no elimina por completo- la alergenicidad de sus proteínas. (Scurlock M and Burks W., citados por Chatterjee, 2006)

Los tratamientos tecnológicos de transformación de alimentos (e incluso su estado de madurez) afectan el nivel de alergenicidad, aunque no de manera general. En huevos se ha reportado la reducción de alergenicidad por efecto de combinaciones de tratamiento térmico y enzimático. (Paschke A. citado por Barros A. and Cosme F., 2013)

Soler-Rivas C. and Wichers H. (2001) refieren que es necesario conocer la estructura del alérgeno y su epítipo(s) y los factores que rigen su estabilidad, para establecer la resistencia de los alérgenos a los tratamientos tecnológicos. En relación a los epítopos, estos pueden ser removidos (utilizando álcalis: 10% NaOH a 60°C por 90 segundos), destruidos mediante procesamiento térmico o por tratamientos enzimáticos con tripsina, bromelina, pepsina, etc.

Los lugares de unión entre alérgeno alimentario y el IgE son secuencias aminoacídicas afectados por la desnaturalización proteica y desenvolvimiento de las hélices proteicas, pero también pueden surgir determinantes por la modificación covalente causada por la ruptura de enlaces peptídicos. La acción peptídica puede influir en la alergenicidad de la albúmina de suero mediante la ruptura de secuencias aminoacídicas transformando una proteína alergénica en una no alergénica (Davis P.J, Smales C.M, James D.C. 2001).

Los métodos de procesamiento ejercen diversos efectos en la estructura de la proteína alergénica según los cambios de conformación estructural química que provoquen e interfieran con la capacidad de unión de los alérgenos frente a los anticuerpos. En general, el impacto referido resulta del tipo de tratamiento tecnológico, su intensidad y condiciones de aplicación; se puede referir a tratamientos térmicos y no térmicos.

La congelación no ocasiona efecto en la alergenicidad de las PA de pescado; aunque puede modificar la estructura de las proteínas debido a la reducción del agua; la liofilización es el método más comúnmente usado para deshidratar proteínas que deben mantener estabilidad adecuada durante periodos de almacenamiento prolongados a temperatura ambiente, las primeras etapas de procesos de extracción de calor inician congelando el agua y separándola

mediante sublimación, seguida de desorción a baja temperatura y presión reducida. Lee, P.; Nordlee J.; Koppelman S.; Baumert J.; Taylor S. (2012)

Los cambios de pH y algunos tratamientos químicos también pueden afectar las propiedades de las PA por modificación de su estructura. Los tratamientos ácidos suelen afectar los aminoácidos glutamina y asparagina, en tanto que los tratamientos alcalinos destruyen cisteína, serina y treonina. Las aplicaciones de tratamientos químicos como acilación, glicolisación, fosforilación, aplicados para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas, pueden provocar la formación de residuos o cambios en la secuencia aminoacídica. Davis P.J., Smales C.M, James D.C. (2001).

### **8.1 TRATAMIENTO TÉRMICO**

El calentamiento (blanqueado, cocción, pasteurización y esterilización) es aplicado en alimentos para reducir su flora microbiana, reducir deterioro y mejorar su digestibilidad y palatabilidad al modificar la estructura terciaria de las proteínas. Además de desnaturalizar proteínas, suele ser eficiente para reducir el potencial alergénico de alimentos. Las temperaturas de tratamiento térmico usualmente son: cocción a 100 °C, esterilización a 121°C y fritura en rangos de 160 a 180°C (dependiendo del tipo de aceite que se utilice).

Breiteneder and Mills (2005) refieren que la cocción o la fritura pueden desnaturalizar las proteínas y reducir su alergenicidad, señalando además intercambio sobre los disulfuros y modificaciones de otros aminoácidos así como el enlace cruzado de proteínas

Los procesos de elaboración de alimentos pueden incrementar o reducir el potencial alergénico aunque la información aún no es definitiva para esbozar recomendaciones generales en este sentido. Numerosas investigaciones informan sobre la distribución variable de PA en las diferentes especies de pescado, inclusive en las diversas partes del músculo así como la influencia del grado de frescura de las especies pesqueras.

El potencial inmunogénico de las proteínas alergénicas está asociado con su digestibilidad y transformaciones estructurales (Santos –Yap, 2006, citado por Lee P. et al 2012 y por Carrillo W. 2013). Ha sido referida la asociación entre el efecto del tratamiento térmico y la reducción de la alergenicidad en salmón y atún (Bernhisel-Broadbent J., Strause D, Sampson H, 1992; y Astwood JD., Leach JN, Fuchs RL, 1996; Rancé F., Kanny G., Dutau G., Moneret-Valtrin DA, 1990 citados por citados por Coura T., Lopes Lima S and Bressan J., 2013).

En general, el tratamiento térmico reduce significativamente la reactividad frente a los anticuerpos IgE de algunos alérgenos por ejercer mecanismos de desdoblamiento y o agregación y la reacción con otras moléculas contenidas en la matriz alimentaria durante el calentamiento. (Besler, M., Steomjart, H., Paschke, A., 2001). La termoresistencia y estabilidad de algunas proteínas a la digestión en el tracto gastrointestinal permite correlacionar el potencial alergénico de alimentos. Además de la desnaturalización térmica, influyen algunas reacciones de oxidación lipídica.

El primer alérgeno del grupo de Parvalbúminas fue Gad c 1, purificado y caracterizado en bacalao (*Gadus callarias*), antes designado como Alérgeno M (Aas M. en 1966 referido por Lee, P.; Nordlee J., Koppelman S., Baumert J., Taylor S., 2012), es muy termoestable y resistente a la proteólisis, pero cuya alergenicidad fue reducida considerablemente ante la acción de tratamientos esterilización como los aplicados en la elaboración de conservas. En el caso de las PA de carpa (punto isoeléctrico 4.7) se observa una remarcable estabilidad y capacidad de plegamiento y unión al calcio que explican su resistencia a la cocción y exposición al tracto gastrointestinal (Bugajska-Schretter A., Grote M., Vangelista L., Valent P., Sperr W., Rumpold H., Pastore A., Reichelt R., Spitzauer, 2000).

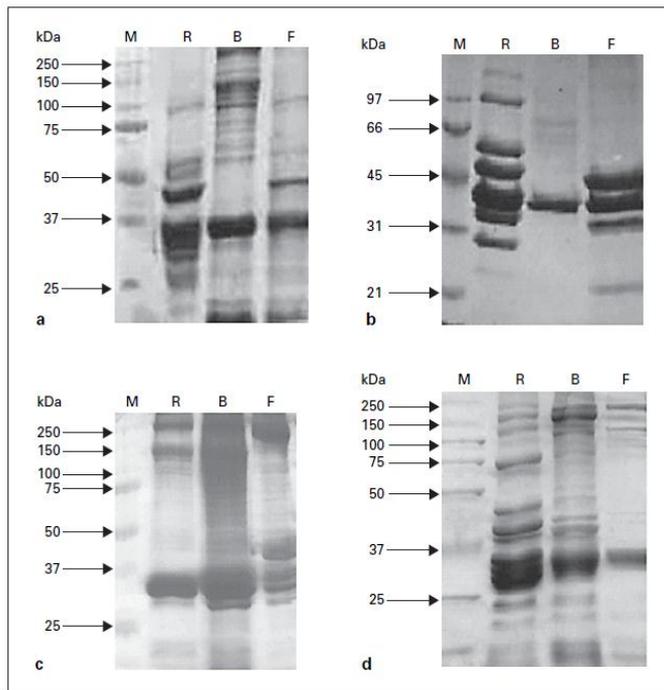
Arif S.; Jabeen, M.; and Hasnain, A. (2007) caracterizaron PA en especies pesqueras del género *Cahanna* y evaluaron su capacidad de termoresistencia a 90°C durante 30, 60, 120

y 180 minutos. Las pruebas de electroforesis SDS-PAGE demostraron efecto de reducción sobre isoformas de PA en las posiciones entre 10 y 12.4 kDa de manera proporcional a la intensidad (tiempo) de calor aplicado

En estudios desarrollados en el Departamento de Química Biológica (Asociación Hindú para el Cultivo de la Ciencia) sobre el efecto de procesamiento térmico en especies de pescado locales, Chatterjee U., Mondal G, Chakraborti P, Patra H y Chatterjee B. (2006) evaluaron los cambios en el nivel de alergenicidad de extractos de cuatro especies pesqueras de mayor consumo en India (pomfret, hilsa, bhetki y caballa) sometidos a fritura en aceite durante 5 minutos y enfrentándolos al suero de 110 pacientes previamente diagnosticados como alérgicos a otros alimentos diferentes al pescado.

La figura 4 muestra perfiles de bandas de los extractos crudos, cocidos y fritos de las cuatro especies pesqueras, sus rangos de bandas en los extractos crudos fueron, 25 a 60 kDa en pomfret, 28 a 97 kDa en hilsa, en bhetki de 35 a 250 kDa y en caballa de 20 a 250 kDa.

El estudio demostró que los tratamientos de cocción y fritura afectaron las bandas –aunque no de manera uniforme en todas las especies- produciendo perfiles marcadamente diferentes a los observados en los extractos crudos. Algunas bandas de polipéptidos presentes en los extractos crudos desaparecieron por el efecto de la cocción, dando lugar a nuevas bandas de peso molecular elevado y que serían resultado de la desnaturalización progresiva de las proteínas presentes en el extracto crudo. Los estudios de inmunoensayo y ELISA demostraron la ausencia de actividad de unión de la proteína al IgE y confirmaron su termosensibilidad. El estudio estableció que algunos alérgenos en pescado no son termoestables y que la cocción o la fritura pueden disminuir su alergenicidad.



**Figura 4.** Perfiles de proteína en extractos de pescado pomfret (a), hilsa (b), bhetki (c) y caballa (d) separados en geles de 10% SDS-PAGE, bandas teñidas con Azul de Coomassie. M: marcador de peso molecular, R: extracto crudo, B: extracto cocido, F: extracto frito. (Chatterjee et al, 2006)

Por estar el consumo del salmón del Atlántico involucrado como causante de alergia con PA,

algunos estudios de biología molecular buscaron establecer los efectos del horneado y cocción al vapor en la presencia de ADN codificante de la PA, concluyendo que los tratamientos reducen el número de copias del gen en proporción directa con el tiempo de calentamiento (Hildebrandt S., Garber E.2010).

Shibahara Y, Uesaka, Y., Wang, J., Yamada S. and Shiomi K. (2013) desarrollaron pruebas (ELISA) a fin de determinar proteína de pescado en alimentos procesados utilizando un anticuerpo policlonal confrontado con PA de caballa. La precisión del método fue validada con muestras de alimentos procesados aplicando calentamientos de 100 y 121°C por 5, 15, 30 y 60 min. Los resultados indicaron entre 22.6 y 99% de reactividad y los límites de detección y cuantificación entre 0.23 y 0.70 ug proteína/g de alimento respectivamente. La reactividad de las PA fue considerablemente reducida a 121°C.

Carballeda-Sangiao N., Olivares F., Rodriguez-Mahillo A., Careche M., Tejada M., Moneo I. and González-Muñoz M. (2014) refieren un estudio de resistencia térmica en *Anisakis simplex* -parásito de pescado capaz de inducir reacciones alérgicas en humanos infectados por la ingesta de pescado crudo o mal cocido-. Los alérgenos del parásito fueron sometidos a autoclave durante 20, 40 y 80 minutos, los resultados de los electroforegramas,

inmunoblot y test de activación del flujo citométrico en basófilos, demostraron efecto de reducción del número e intensidad de bandas de modo proporcional al tiempo de autoclavado. Algunos alérgenos de las bandas correspondientes a pesos moleculares de 9 y 14 fueron resistentes al tratamiento térmico. Los autores concluyeron que el tratamiento térmico de autoclavado puede reducir considerablemente el potencial de algunos alérgenos. Sletten G., Egaas E., Lindvik H., Van Do T. and Florvaag E (2005) aplicaron tratamientos de curado, enlatado, fermentado, en bacalao, merluza, salmon, atun, caballa y trucha, evaluando mediante pruebas de electroforesis SDS-PAGE e inmunoensayo y anticuerpos policlonales. Los resultados demostraron mayor susceptibilidad térmica con menor inmunogenicidad en los tratamientos de enlatado.

La desnaturalización provocada por 100°C durante 5 minutos favorece la digestión (Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H and Sawada, J. ,2003). Resultados de cuantificación de  $\alpha$ -lactoalbúmina nativa y desnaturalizada por calor obtenidos al aplicar esterilizaciones de corto tiempo (UHT) demuestran la destrucción de algunos epítomos con la aparición gradual de otros (Dupon, D., Rolet-Ropecaud, O and Muller-Renaud, S., 2004). También Sletten G., Van Do T., Lindvik HI; Egaas E.; and Florvaag E. (2010) comprobaron reducción de la alergenicidad de extractos de pescado ahumado, curado salado, enlatado, fermentado en pacientes.y evaluaron la inmunogenicidad a través de electroforesis y pruebas ELISA.

Estudios realizados por de Jongh H., Lopez C., Timmerman E., Nordlee J., Lee P.W. , Baumert J., Hamilton R., Taylor S. and Koppelman S. (2013) en extractos de bacalao sometidos a temperaturas mayores de 80°C han demostrado el impacto del tratamiento térmico en la polimerización de esta molécula en base a su desdoblamiento parcial y complejación con otras proteínas concluyendo que la unión del anticuerpo a la PA está determinada por el potencial de los complejos proteicos formados inducidos por el calor.

## 8.2 TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

La termoresistencia de diversos alérgenos alimentarios y su estabilidad a la digestión han despertado el interés de investigadores para establecer dicha correlación. (Astwood and Rancé (2010) y Restani H. (2012) citados por Coura Olivera T) obtuvieron resultados de actividad proteásica aplicada en alérgenos alimentarios de carne durante 5 minutos, lo que permitía reducir el número de Prick tests positivos Lopes S.; Bressan J. (2013).

Las proteínas transferasas de lípidos son muy estables a tratamiento térmicos con pepsina y mantienen elevada alergenicidad. (Scheurer S, Lauer I, Foetisch K., Moncin M., Retzek M, Hartz C, Enrique E, Lidholm J, Cistero-Bahima A, Vieths S.,2004).

Sun Ming, Liang Chengzhu, Gao Hongwei, Lin Chao, And Deng Mingjun (2010) analizaron el ADN de 30 especímenes de pescado pertenecientes a 22 familias, utilizando Proteinasa K para su digestión a 56°C. La amplificación de ADN fue realizada en un ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) con un programa de predesnaturalización a 94°C por 2 min; 45 ciclos de amplificación (94°C por 20 s, 55°C por 20s y 68°C por 40s). El ensayo tuvo una sensibilidad mayor de 5 pg de ADN de pescado y no mostró reacción cruzada con otras especies tales como vacuno, ovino, cerdos, pollo, camarón, langosta, cangrejo, pulpo, almejas, cereales y papa. El coeficiente de variabilidad demostró alta reproducibilidad y exactitud. El ensayo probó ser una herramienta potencial para la detección y etiquetado de alérgenos de pescado.

### Fermentación Ácidoláctica

El uso de bacterias ácido lácticas (LABs) -una de las tecnologías más antiguas-, es de uso prácticamente ilimitado y prometedor para prolongar la vida útil y mejorar las características sensoriales de los alimentos. Algunos cultivos starter para la industria alimentaria son los *Lactococcus*, *Lactobacillus spp*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, etc.

Actualmente representan una alternativa para cortar epítomos de las proteínas alergénicas reduciendo su severidad. La proteólisis es uno de los procesos bioquímicos más importantes y deseables para mejorar la digestibilidad y resaltar la calidad nutricional del alimento.

Durante la fermentación láctica los alérgenos pueden ser degradados ocasionando reducción del número de epítomos y favoreciendo la inclusión de hidrolizados proteicos en formulaciones específicas incluso para infantes hipoalergénicas (Bertrand-Harb, Ivanova, Dalgalarondo, & Haertl\_E, 2003; Cocco et al., 2003; Penas, Prestamo, Baeza, Martinez-Molero, & Gomez, 2006; Pescuma, H., Mozzi, & Font de Valdez, 2010; Pescuma et al., 2009, 2011; El-Ghaish et al., 2010a, 2010b, 2011b), citados por El Ghaish et al, 2011).

Recientemente se estudia la combinación de métodos (fermentación e hidrólisis con proteasas animales y vegetales, tratamiento térmico, alta presión y microondas combinadas con proteólisis enzimática) observando que la acidificación derivada de la fermentación de carbohidratos por LABs es uno de los efectos más deseables y postula ventajas al actuar sobre la conformación estructural de proteínas alergénicas. La degradación de proteínas cárnicas durante la fermentación se produce por la acción sinérgica de proteasas endógenas, e induce a pensar en el efecto de la proteólisis para desorganizar la estructura y reducir la alergenicidad. El-Gaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., Elmecherfi K., Bazukyan I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y., Kuliev A. Mozzi F., Chobert J., and Haertle T. (2011).

### **8.3 TRATAMIENTOS DE ALTA PRESIÓN**

Estos tratamientos no térmicos pueden afectar la antigenicidad de las proteínas de suero. Chichon R., Belloque J., Alonso, E and Lopez-Fandino, R.(2008) al someter proteínas a elevadas presiones –dependiendo de la intensidad de la presión- observaron:

- Efectos elásticos a bajos valores de presión: distorsiones reversibles a nivel de enlaces primarios y secundarios. La compresión es muy baja y no contribuye a variar el volumen del sistema pero en el caso de los enlaces de hidrógeno puede distorsionar su conformación y reducir el tamaño de las cavidades internas de la proteína.
- Ante la aplicación de 200 MPa (2 kbar), las interacciones moleculares y enlaces terciarios son desestabilizados, lo que podría ser ocasionar el incremento de la superficie de la molécula por mayor hidratación en su estado como monómero y por las cavidades en la superficie interna de los oligómeros o agregados.

• El efecto de presiones mayores puede desdoblarse la proteína, dependiendo de su tamaño. El desorden inducido por la presión en la estructura es casi único entre las macromoléculas. A pesar de la estructura nativa compacta de la proteína, esta presenta cavidades de diferentes tamaños que pueden incorporar agua o quedar vacías contribuyendo con la presión para provocar el desdoblamiento. Es importante considerar si las proteínas se encuentran en solución acuosa ya que el agua conforma una delgada capa alrededor de la proteína. Igualmente existe la influencia sobre la estabilidad de la proteína que se encuentra rodeada además de otros sistemas líquidos en el alimento.

Hildebrandt S, Schutte L, Stoyanov S, Hammer G, Steinhart H, and Paschke A. (2010) refieren la variación de la estabilidad de PA ante la presión, dependiendo de su estructura secundaria y de la presencia de factores estabilizantes tales como los puentes disulfuro y el calcio ligado. Realmente no ha sido muy bien establecido si la presión elevada reduce la alergenicidad, tomando en cuenta la multivariabilidad de matrices en las cuales se encuentran las proteínas alergénicas, presencia de aditivos, enzimas y otras sustancias. Pero ellos comprobaron que el incremento del tratamiento térmico a alta presión incluso a 70°C, redujo la unión a IgE, lo cual es una medida del potencial alergénico.

La reversibilidad del efecto de la presión es un tema muy importante y discutido. Se conoce que el desplegamiento de proteínas a elevadas temperaturas es acompañado usualmente por la agregación irreversible de las cadenas polipéptidas, lo cual no ocurre durante la aplicación de presión. A pesar que actualmente no se conoce un método oficialmente reconocido para reducir la alergenicidad de alimentos, la combinación de los factores mencionados puede ser exitosa. Unos cientos de MPa de presión pueden conducir a la desnaturalización de estructuras proteicas. Somkuti J., Smeller L. (2013).

## **9. GUÍA PARA LA GESTIÓN DE ALÉRGENOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Uno de los efectos del mejoramiento genético es la introducción de mayor diversidad proteínica en el suministro de alimentos y con ello la contribución al aumento de la sensibilidad alérgica. Se observa que a través del tiempo nuevos alérgenos son reconocidos.

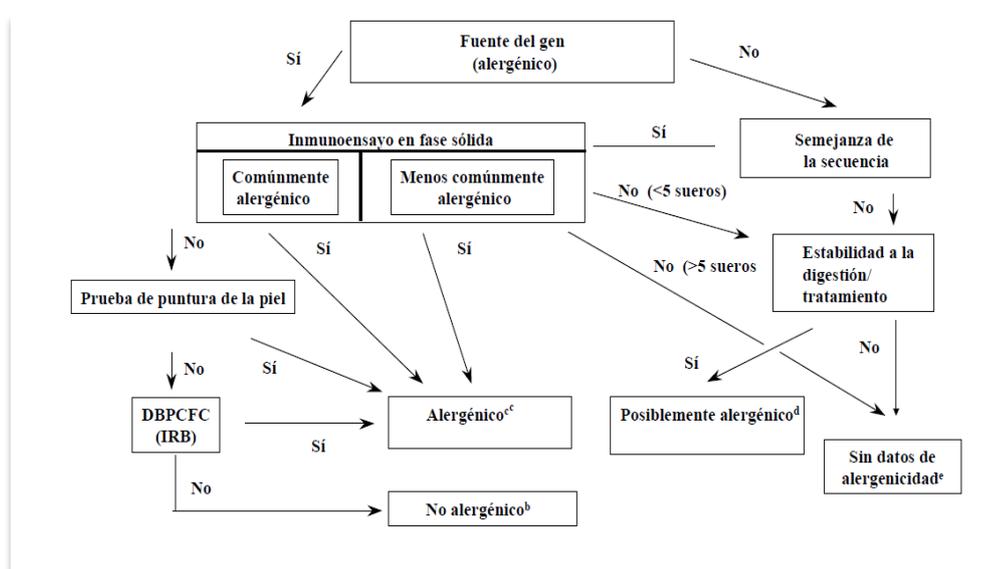
FAO y OMS consideran que estos alimentos no son intrínsecamente menos inocuos que los originales no manipulados. Como consecuencia, la Equivalencia Sustancial fue recomendada como componente importante en la evaluación de la inocuidad de los alimentos e ingredientes de alimentos que derivan de la modificación genética. Evaluación de la alergenicidad de alimentos modificados genéticamente

Uno de los acuerdos de la Consulta FAO/OMS de Expertos sobre Alergenicidad de los Alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (2001) establecía la determinación de su potencial alérgico. La reunión anterior acordó establecer modificaciones de un Árbol de Decisiones antes propuesto, considerando casos en los cuales la hipoalergenicidad fuera inducida por una regulación genética. Como resultado de las discusiones, se determinó la necesidad de valorar la alergenicidad de una proteína expresada y determinar la homología de su secuencia con sensibilidad y especificidad suficientes que permitan además detectar reactividad cruzada y la cantidad de alérgeno que sensibiliza y provoca episodios alérgicos.

Estas consultas reconocen la importancia de actualización permanente en la información sobre alérgenos y el uso de modelos animales, ya que los métodos *in vivo* en seres humanos plantean problemas éticos. Fue acordado que la Susceptibilidad a la Pepsina sea el parámetro pertinente para identificar posibles alérgenos.

### Método Del Árbol De Decisiones Para Evaluar La Alergenicidad De Alimentos

Esta herramienta fue planteada desde 1996 por el Consejo Internacional sobre Biotecnología de los Alimentos y el Instituto de Alergia e Inmunología del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, representa una estrategia para evaluar alergias que pueda ser adoptada por la industria biotecnológica agrícola. (Metcalfé et al., 1996 referido por FAO/OMS 2001). El fundamento incluye, la procedencia del gen, la homología de la secuencia proteica introducida con alérgenos conocidos, el enlace inmunoquímico de la proteína introducida con la IgE del suero sanguíneo de individuos con alergias conocidas al material genético transferido y las propiedades físico químicas de la proteína que se introduce (Metcalfé 1996; Taylor 1997, referidos por FAO OMS 2001).



**Figura 5. Árbol de Decisiones FAO/OMS 2000.** Evaluación del potencial alergénico de los alimentos derivados de cultivos modificados genéticamente. (Anexo 3. Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Enero 2001).

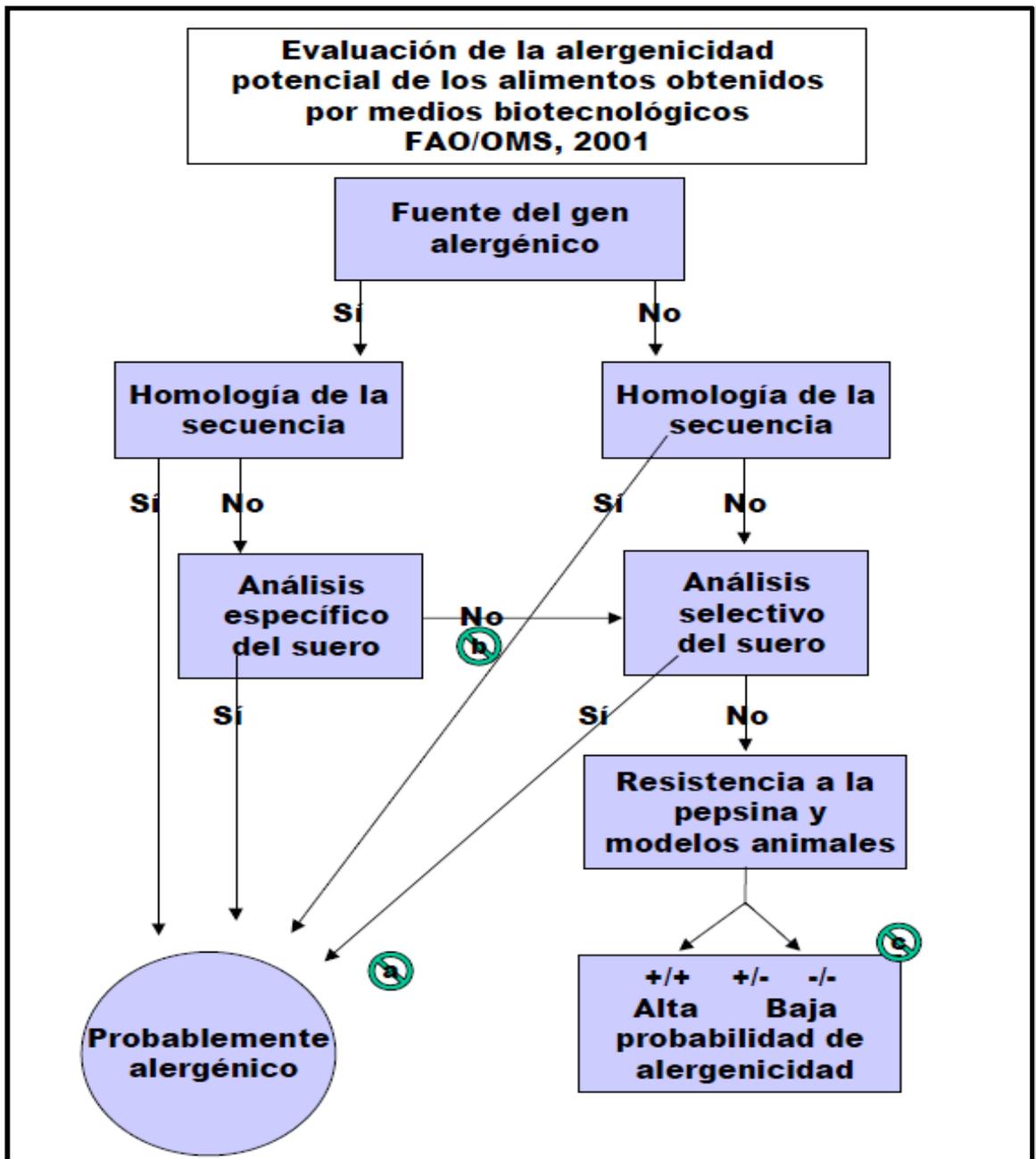
Un Árbol de Decisiones (FAO/OMS 2000) para evaluar las nuevas proteínas introducidas en los alimentos modificados genéticamente (Figura 5) señala *“si un alimento modificado genéticamente contiene el producto de un gen procedente de fuente con efectos alérgicos conocidos, se debe suponerse que el producto del gen es alérgico a menos que se demuestre lo contrario. Deberá desalentarse la transferencia de genes de alimentos comúnmente alérgicos a menos que pueda documentarse que el gen transferido no se codifica en un alérgeno. Las nuevas proteínas introducidas en un alimento modificado genéticamente deben ser evaluadas para determinar su alergenidad en base al árbol de decisiones del Anexo 3.”*

Esta herramienta combina el análisis en alérgicos asegurando un elevado grado de confianza. La incertidumbre partía de la probabilidad que un alérgeno poco importante afecte a un pequeño porcentaje de la población alérgica al material de origen. El esquema considera como un posible alérgeno a toda nueva proteína. Si la proteína es alérgica el Árbol de Decisiones propone que el primer estudio realizado sea un análisis de la homología de la secuencia con alérgenos conocidos y referentes para el alimento en cuestión. Si los resultados son negativos se continúa con la prueba de digestibilidad.

En la consulta del año 2000 se realizaron algunas críticas respecto a los criterios base para la construcción del árbol y se concluyó necesario examinar la posibilidad de añadir otros criterios de alergenidad a este método en especial si no se conoce la fuente del material genético.

Los criterios seleccionados fueron el nivel y lugar de expresión de la nueva proteína y sus propiedades funcionales.

En 2001 nuevas consultas examinaron el bagaje científico acumulado y de los debates resultó el Árbol de Decisiones FAO/OMS de 2001 (Figura 6). Este nuevo árbol de decisiones fue basado en los métodos de evaluación de alergenidad existentes y en otras estrategias



**Figura 6.** Árbol de Decisiones FAO/OMS 2001. (Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos.)

## 10. MÉTODOS PARA DETECTAR Y EVALUAR PARVALBÚMINAS

Para identificar y caracterizar moléculas se requiere técnicas separativas que permitan observar sus componentes y sus características. Las técnicas de mayor aplicación para análisis de proteínas alergénicas son la electroforesis y el inmunoensayo (ELISA) y entre las

técnicas de análisis de ADN, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction o PCR).

### **Electroforésis SDS-PAGE**

El término *electroforesis* Laemmli (1970) describe el desplazamiento de una molécula con carga eléctrica neta dentro de un campo eléctrico. La separación selectiva se realiza sobre un soporte sólido de matriz porosa (gel o papel) a partir de muestras complejas. La movilidad o migración de las moléculas depende de la carga de la proteína, de su solubilidad y tamaño o peso molecular, así como de la intensidad de la corriente eléctrica aplicada y la densidad del soporte a través del cual ocurre la migración. La electroforesis para moléculas alergénicas se desarrolla en matrices de poliacrilamida (las siglas PAGE significan “*polyacrilamide gel electrophoresis*”) por ser químicamente inertes, estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica. Algunas características de la Electroforésis SDS-PAGE son:

1. Los geles de poliacrilamida polimerizan por acción de la bis-acrilamida - agente que propicia el entrecruzamiento-, en presencia de un iniciador que es la N,N,N,N-tetrametilneodiamina y de un catalizador que es el ion persulfato ( $S_2O_8$ )
2. La presencia de oxígeno inhibe la polimerización
3. La velocidad de polimerización depende de la concentración de catalizador e iniciador.
4. La porosidad del soporte o gel depende de las proporciones de poliacrilamida/bisacrilamida (que determina menor diámetro de poro en el gel)
5. SDS es un detergente desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas en relación 1.4 g por g de proteína. Provoca migración de las proteínas hacia el ánodo como una función lineal del logaritmo de su peso molecular.

El gel se coloca dentro del equipo de electroforesis con dos cámaras separadas cada una con tampón de electroforesis. Finalizado el proceso el gel es sometido a tinción con un colorante (Azúl de Coomassie). Las proteínas pueden ser visualizadas en el gel teñido identificadas por

el desplazamiento o migración (Rf) respecto a una proteína estándar. Esta técnica permite determinar su peso molecular y diferenciar su termoestabilidad.

Kanamori M., Tanaka H., Hamada Y., Nagashima Y., Shiomi K. (2011). Sometieron varios extractos de músculo de seis especies de pescado japonés a 80°C durante 20 minutos con posterior purificación de PA y colágeno mediante técnica de electroforesis HPLC. El método de extracción aplicado en condiciones de calentamiento de los homogeneizados del músculo fue útil para analizar alérgenos y preparar antígenos para diagnóstico de alergias de pescado.

### **Enzimoimmunoensayo ELISA**

Es un ensayo inmunológico que utiliza anticuerpos como reactivos enlazantes, muy utilizado en el área de salud, cuantifica moléculas que experimentan cambios en diferentes estados, tales como infecciones microbianas o fases activas de alguna enfermedad autoinmune (hormonas, anticuerpos, inmunoglobulinas, toxinas, agentes infecciosos, etc.). Utiliza una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo mediante puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. En esta técnica uno de los inmunoreactivos es absorbido por una fase sólida de soporte (nitrocelulosa, polivinilo, látex, u otros) y el otro es marcado con una enzima que reacciona con un sustrato formando un producto coloreado; el cambio de color. Su fundamento es:

- 1) el antígeno y el anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica
- 2) la elevada especificidad enzimática puede transformar gran cantidad de sustrato
- 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento
- 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se somete a análisis.

## **Técnica PCR**

Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifica las secuencias de ADN *in vitro* y obtener gran número de copias de un fragmento específico de ADN. Es una técnica que permite identificar secuencias genéticas. Para que se lleve a cabo es necesario un ADN molde, cebadores que flanqueen la secuencia de ADN a ser amplificada, nucleótidos (guanina, citosina, adenina y timina), una enzima ADN polimerasa termoestable y iones de magnesio además de un buffer de reacción. La prueba se produce en una secuencia de temperaturas que se repiten de forma cíclica, inicialmente 95°C para separar las hebras de ADN, luego una temperatura menor para que los cebadores se unan al ADN molde, el tercer ciclo generalmente de 72°C por ser temperatura óptima para la enzima polimerasa que inicia la síntesis de una nueva hebra utilizando los nucleótidos añadidos; el proceso incluye de 25 a 40 veces el ciclo de las tres etapas descritas. El soporte utilizado es un gel, el cual es sometido a tinción y posterior lectura.

Hanak P., Laknerova I., Svatora M. (2012) utilizaron esta técnica para discriminar la carne de varias especies de pescado y sus PA; el método está basado en secuencias de diversas regiones del gen de PA, utilizando para el efecto un enfoque bioinformático que permitió describir la variabilidad de los pares de bases de ADN en las secuencias de PA. En este estudio fue utilizado un esquema del gen de PA de caballa, además de la identificación en especies se pudo establecer homólogos, lo cual a su vez es de gran utilidad para los estudios de reactividad cruzada entre especies de pescado.

## **CAPÍTULO III. MÉTODO**

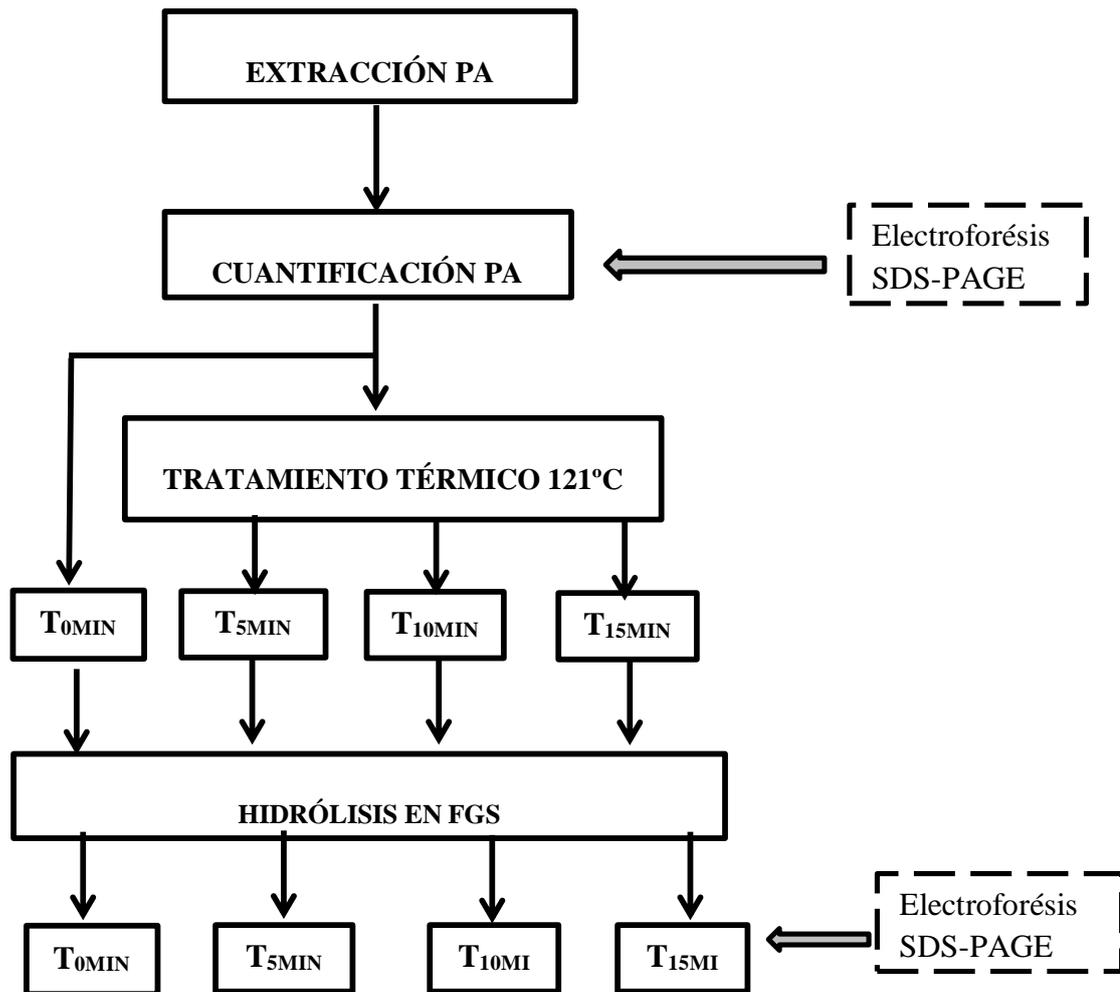
### **3.1 TIPO DE ESTUDIO**

- a) Según Niveles de Diferenciación, es un estudio Descriptivo Cuasi-Experimental que plantea estudiar el impacto del tiempo de tratamiento térmico en unidades de observación (Parvalbúminas de pescado) que no han sido asignados de acuerdo a criterio aleatorio, pero serán evaluadas ajustando las variables de control.
- b) Según los Objetivos de la Investigación, es un estudio explicativo causal, porque describe y explica relaciones de causa efecto entre dos variables.
- c) Según el período en el que se capta la información, es un estudio prospectivo, ya que la información se colecta después de la planeación.
- d) Según la Evolución del Fenómeno estudiado, es un estudio longitudinal, porque se repetirá medidas de las variables: serán medidas en cinco momentos (cinco meses).

### **3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **Pasos en el Diseño del Estudio:**

- Selección de muestras: de acuerdo a las variables de control establecidas (tamaño, grado de frescura y evaluación sensorial )
- Preparación de muestra: músculo dorsal sin piel, picado finamente
- Extracción de proteínas totales y sarcoplasmáticas: Kjeldahl y Lowry
- Extracción y purificación de parvalbúminas: Electroforésis SDS-PAGE.
- Calentamiento de PA a 121 °C durante 0, 5, 10 y 15 minutos
- Hidrólisis de PA en FGS (pepsina a 37 °C)
- Consolidar los datos y aplicar método estadístico ANVA



**Figura 7.** Representación Gráfica del Diseño Experimental del Estudio

### 3.3 ESTRATEGIA DE PRUEBA DE HIPÓTESIS

#### Hipótesis General

No se plantea por ser un estudio descriptivo cuasi experimental causal.

#### Hipótesis Específica 1:

Se podrá afirmar que el tratamiento térmico a 121°C aplicado durante las condiciones de tiempo propuestas, no produce cambios sobre la alergenicidad de PA de jurel, una de las especies pesqueras de importancia nutricional desembarcada en Ventanilla, durante octubre 2016 a agosto 2017.

$H_0$  = Todos los tratamientos ejercen el mismo efecto sobre las PA de jurel

$$H_0 = \mu_{1J} = \mu_{2J} = \mu_{3J} = \mu_{4J}$$

$H_1$  = al menos uno de los tratamientos ejerce un efecto diferente

$$H_1 = \mu_{iJ} \neq \mu_{jJ}$$

### **Hipótesis Específica 2:**

Se podrá afirmar que el tratamiento térmico a 121°C aplicado durante las condiciones de tiempo propuestas, produce cambios sobre la alergenicidad de PA de lorna, una de las especies pesqueras de importancia nutricional desembarcada en Ventanilla, durante octubre 2016 a agosto 2017.

$H_0$  = Todos los tratamientos ejercen el mismo efecto sobre las PA de lorna

$$H_0 = \mu_{1L} = \mu_{2L} = \mu_{3L} = \mu_{4L}$$

$H_1$  = al menos uno de los tratamientos ejerce un efecto diferente

$$H_1 = \mu_{iL} \neq \mu_{jL}$$

## **3.4 VARIABLES**

**Identificación y Medición de Variables.** Se muestra en el siguiente esquema.

## ESQUEMA DE VARIABLES

<b>Variables</b>	<b>Tipos de variables- indicadores</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Valores de medición</b>
<b>V. DEPENDIENTE</b>			
Estabilidad de Proteína  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cantidad de PA estable al tratamiento térmico</li> <li>• Cantidad de PA estable a la acción de FGS</li> </ul>	Variable Numérica. Cuantitativa	Continúa	mg PA/kg muestra.
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>			
Tratamiento Térmico a 121°C por <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 minutos</li> <li>• 5 minutos</li> <li>• 10 minutos</li> <li>• 15 minutos</li> </ul> Hidrólisis Gástrica Simulada en FGS	Variable Numérica. Cuantitativa	Continua	minutos
<b>VARIABLES DE CONTROL /COMPARACIÓN: características de las muestras (especies de pescado)</b>			
<b>VARIABLES</b>	<b>TIPOS DE VARIABLES-INDICADORES</b>	<b>ESCALA DE MEDICION</b>	<b>VALORES DE MEDICION</b>
Tamaño comercial de la especie	Numérica. Cuantitativa	Continua	cm
Valor de Frescura Química de la especie (N de BVT).	Numérica. Cuantitativa		mg N/ 100g músculo
Valor de Evaluación Sensorial de pescado	Catagórica Cualitativa, Politómica	Continua. Escala numérico descriptiva con valores de 1 a 5	números
Condiciones de Expendio de la especie	Catagórica Cualitativa, Politómica	Nominal 4 valores	números

- **Variables Dependientes para referir los cambios en la Alergenicidad:**

Estabilidad de PA. expresada para cada especie de pescado como la diferencia entre los contenidos relativos de PA en las muestras crudas y después de someterlas al tratamiento térmico e hidrólisis gástrica simulada. En ambos grupos de muestras fue preparada una muestra (T<sub>0</sub>) a la que no se aplicó tratamiento térmico, sólo la hidrólisis gástrica.

% de cambio de Estabilidad =  $((E_1 - E_2) / E_1) \times 100$  donde:

E<sub>1</sub> = cantidad de PA en muestra cruda

E<sub>2</sub> = cantidad de PA en muestra sometida a cada tratamiento térmico (T<sub>5</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>15</sub>)

- **Variable Independiente :**

Tratamiento Térmico: 121 °C es la temperatura de esterilización de los productos pesqueros en conserva que fue aplicada en tres niveles o tratamientos:

- Un blanco T<sub>0</sub> (sin tratamiento térmico: 121 °C durante 0 minutos)
- (T<sub>5</sub>) 121 °C durante 5 minutos,
- (T<sub>10</sub>) 121°C durante 10 minutos,
- (T<sub>15</sub>) 121 °C durante 15 minutos

- **Variables de Control o Comparación:**

El control en determinados factores durante la ejecución del experimento, permitió asegurar la ejecución del experimento en condiciones constantes, reduciendo el error experimental procedente de la selección de las muestras y reducir sesgos.

Tamaño/ peso Comercial de la Especie: la longitud estándar de la especie (desde el extremo de la boca hasta la aleta caudal), Jurel: 31 cm , Lorna: 24 cm. (RM 209-2001-PE)

Valor de Frescura Química de la especies de pescado:

Los especímenes fueron seleccionados de acuerdo a rangos de frescura: Sólo se seleccionó especímenes con un valor  $35 \pm 5$  mg N de Bases Volátiles Totales/100g de muestra.

Valor de Evaluación Sensorial de pescado: los especímenes fueron seleccionados de acuerdo a valores de evaluación sensorial utilizando una escala numérico descriptiva para pescado, en la cual 1: muy malo, 2: malo, 3: aceptable, 4: bueno y 5: muy bueno.

### **3.5 POBLACIÓN**

La investigación fue llevada a cabo en ejemplares de las especies de pescado: jurel y lorna, adquiridos del Terminal Pesquero Ventanilla.

#### **a) Criterios de Inclusión:**

- Ejemplares expendidos en condiciones apropiadas: buena estiba, baja temperatura ( $10 \pm 2$  °C), buenas prácticas de manipuleo del vendedor y lugar e instalaciones de expendio en buenas condiciones de limpieza
- Ejemplares de talla comercial establecida por el Ministerio de la Producción (31 cm para jurel y 24 cm para lorna)
- Ejemplares en grado de frescura química y sensorial bueno y muy bueno

#### **b) Criterios de Exclusión:**

- Ejemplares que no cumplen con los criterios de inclusión

#### **c) Ubicación de la población en el espacio y tiempo**

- Ubicación en el espacio: Terminal Pesquero de Ventanilla.
- Ubicación en el tiempo: octubre 2016 a agosto 2017.

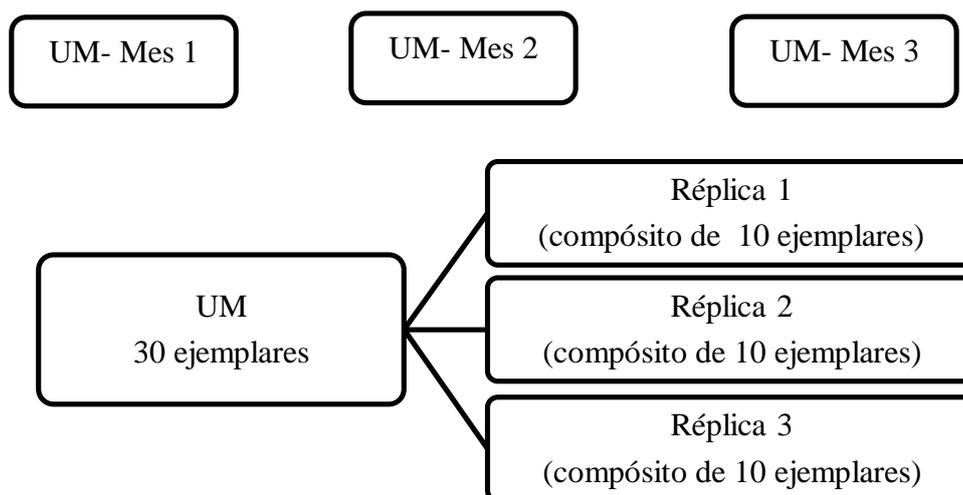
### **3.6 MUESTRA**

**a) Unidad de análisis u observación:** cada uno de los ejemplares de las especies de pescado (lorna y jurel).

**b) Unidad de muestreo:** Tres unidades de muestreo cada una conformada por 30 especímenes de cada especie y dividida en tres grupos (réplicas) cada uno por un compósito de 10 ejemplares.

- c) **Marco Muestral:** 90 ejemplares de jurel y 90 de lorna para todo el estudio.
- d) **Tipo de muestreo:** Por tratarse de volúmenes muy elevados (alrededor de cientos de toneladas diarias), se aplicó el muestreo no probabilístico o discrecional por cuotas. Las pruebas realizadas implicaron la destrucción de las unidades muestrales.
- e) **Tamaño Muestral:** En los 3 meses establecidos (enero, febrero y marzo 2017) fueron seleccionados tres grupos de muestras denominadas Unidades de Muestreo (UM). Cada UM estuvo conformada por 30 ejemplares de cada especie de pescado (unidad de muestreo mensual). En cada muestreo se trabajó 3 réplicas, tal como se explica en la Figura 8.

**UNIDADES DE MUESTREO:**



**Figura 8.** Descripción de la conformación de las Unidades de Muestreo.

### 3.7 TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

#### 3.7.1 INSTRUMENTOS Y RECOLECCIÓN DE DATOS

**Recolección de Datos**

**Métodos a Utilizar:** Prolectivo.

Por ser un estudio de Experimentación, la recolección de datos se realizó en base a la observación de los resultados de las pruebas desarrolladas. El estudio plantea descubrir las relaciones de causa-efecto.

En el estudio se preparó las muestras de cada especie, el contenido de PA en muestra cruda y en muestra cocida a 121°C durante tres tiempos (5, 10 y 15 minutos). A cada muestra le fue aplicada una prueba de digestión en FGS que constituye la medida de la variable dependiente “Y” Estabilidad de la proteína, medida como digestibilidad.

El método de experimentación permite el manipuleo de la variable independiente - X - para el presente caso, los tiempos del tratamiento térmico a 121 °C (temperatura de esterilización aplicada en alimentos de baja acidez) de modo que permite observar si existen diferencias y si están resultan estadísticamente significativas.

**Instrumentos:** Formatos de Registro, identificados mediante numeración del Registro seguido del N° de su Hoja de Registro, indicando nombre de la evaluación realizada, la fecha el código de la muestra y el resultado obtenido (en Anexos)

N°	Nombre del Registro
1	Análisis Descriptivo de las Características Físicas (Tamaño en cm) de las especies pesqueras Jurel y Lorna.
2	Análisis Descriptivo de las Características Sensoriales de las especies pesqueras Jurel y Lorna
3	Análisis Descriptivo de las Características de Frescura Química de las especies pesqueras Jurel y Lorna. (Datos expresados en mg de N de bases volátiles /100 g de músculo dorsal)
4	Análisis Descriptivo del Contenido de Proteína Total de las especies pesqueras Jurel y Lorna. (Datos expresados en g de proteína / 100 g músculo dorsal)
5	Análisis Descriptivo del Contenido de Proteína Sarcoplasmática de las especies pesqueras Jurel y Lorna
6	Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas de las especies pesqueras Jurel y Lorna. (Datos expresados en mg/g músculo dorsal)
7	Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas Digeribles de las especies pesqueras Jurel y Lorna. (Datos expresados en mg/g músculo dorsal)

8	Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas de Jurel, sometidas a tratamiento térmico (*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro(**). (Datos expresados en mg/g músculo dorsal)
9	Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas de Lorna, sometidas a tratamiento térmico (*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro(**). (Datos expresados en mg/g músculo dorsal)
10	Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas Digeribles de Jurel, sometidas a tratamiento térmico (*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro(**). (Datos expresados en mg/kg músculo dorsal)
11	Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas Digeribles de Lorna, sometidas a tratamiento térmico (*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro(**). (Datos expresados en mg/g músculo dorsal)
12	Análisis Estadístico de Valores de diferencias de Estabilidad de PA antes y después de los tratamientos. Jurel y lorna
13	Análisis Estadístico de Valores de diferencias de digestibilidad entre PA antes y después de los tratamientos). Jurel y Lorna

**Tiempo de recojo de muestras:** octubre 2016 a enero 2017

**Selección de los especímenes** de pescado, en cada uno de los meses (enero, febrero, marzo) se trabajó una UM para cada especie. En el terminal pesquero la selección fue de acuerdo a las condiciones de expendio, tamaño y evaluación sensorial. En el laboratorio, la selección en base a los resultados de frescura química ( $35 \pm 5$  mg de N de BNT por 100 g muestra de músculo dorsal sin piel). Un compuesto del músculo antero dorsal sin piel de 10 especímenes para cada una de las tres (3) réplicas de la unidad de muestreo.

### 3.7.2 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:

El Procesamiento de datos fue desarrollado en las siguientes etapas:

- a) Codificación de los datos:** fue realizada en los especímenes preseleccionados que cumplieran con las características de inclusión (dimensiones talla, calificación sensorial y valor de frescura química). La codificación de las muestras para todas las evaluaciones

realizadas, fue realizada asignando la primera letra del nombre de la especie de pescado (“J” o “L”), seguida de un número de 3 cifras (del 001 al 100) para cada especie.

**b) Clasificación de los datos:**

En las variables numéricas, todos los datos fueron obtenidos mediante experimentación sometidos a clasificación.

c) **Procesamiento y Análisis de los datos:** mediante Programa Estadístico SPSS 25 (Estadístico de Levine, Welch, etc), determinando ANOVA y Tukey para las diferencias. Las evaluaciones fueron desarrolladas con nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ . Parte de la información fue ilustrada mediante Gráficos y tomas fotográficas de los electroforegramas SDS-PAGE.

**d) Métodos de Análisis de las Muestras:**

Análisis Sensorial de las muestras: El Método numérico descriptivo con escala de 1 a 5 (1 muy malo, 5 muy bueno). Los atributos evaluados fueron evaluados en especies enteras: olor (fresco, a mar, ausencia de olores desagradables), apariencia de la piel (brillante, iridiscente, con presencia de mucus claro y limpio), apariencia y color de ojos (convexos, pupila bien definida, ausencia de sangre), textura (firme y elástica, las escamas en la lorna no se desprenden fácilmente), órganos internos (íntegros y de color brillante) Para las siguientes determinaciones se utilizó el compuesto trabajado con el músculo desintegrado de la zona dorsal de filetes sin piel.

Determinación de Frescura de pescado: Método de Determinación de Nitrógeno de Bases Volátiles Totales (N-BVT) Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 95/149/CE. (NºL 97/84–NºL 97/85–NºL 97/86), utilizando 10 g de muestra.

Extracción de proteínas totales: Método Semi micro Kjeldahl AOAC (1980), utilizando 1 g de muestra.

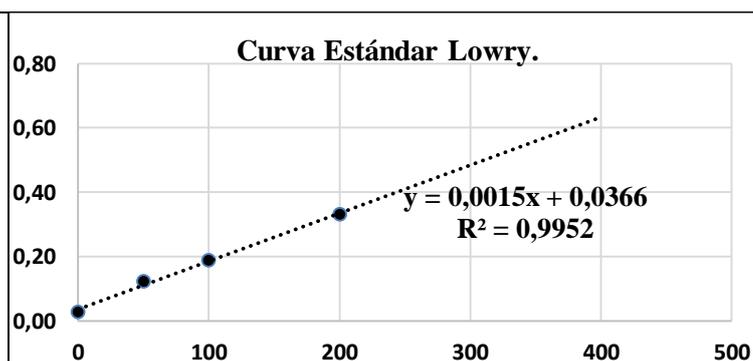
Extracción de proteínas sarcoplasmáticas fue realizada mediante el Método de Lowry O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951) para proteínas. La formulación de reactivos fue realizada el siguiente esquema:

<u>Reactivo Lowry</u>	<u>Reactivo Folin</u>
1 mL solución A en 50 mL solución A	1 mL diluido con agua destilada desionizada
<u>Sol. A:</u> 2g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en 100 mL 0.1N NaOH	3 mL
<u>Sol. B:</u> 0.5g CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O en 100 mL de Tartrato NaK 1%	

Lectura realizada en espectrofotómetro a 580 nm de absorbancia, previo reposo de las muestras en oscuridad durante 10 minutos para permitir la reacción. En cada extracción fue preparada una curva estándar tomando albúmina de suero bovino (BSA), con 95% de pureza como estándar. Los valores obtenidos en la curva estándar fueron:

Preparación de la curva estándar y muestras para Determinación de Proteína Sarcoplasmática mediante método Lowry.

Tubo	1	2	3	4	5
Estándar de Albúmina (uL)	10	20	30	50	100
Agua destilada (uL)	990	980	970	950	900
React. Folin (uL)	500	500	500	500	500
React. Lowry (uL)	5000	5000	5000	5000	5000



**Figura 9.** Representación Gráfica de las Curvas Estándar (Albúmina Bovina) para las determinaciones de Proteína Sarcoplasmática en las muestras de jurel y lorna

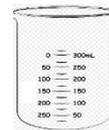
**Procedimiento de Extracción de PA:** según metodología referida por Arif S.H., Jabeen M. and Hasnain A. (2007). La cuantificación de PA fue realizada en base a la densitometría en los geles de electroforesis SDS-PAGE.

Para la extracción de proteínas PA se utilizó especies de jurel y lorna, previa selección por tamaños y buen grado de frescura. Los especímenes fueron cortados como filetes sin piel y fueron picados finamente. Todas las operaciones que se ilustran en la Figura 10 fueron llevadas a cabo en frío, utilizando bandejas con hielo en escamas, pre enfriando las soluciones (buffers y acetona), utilizando centrifuga refrigerada a 4°C y congelación a -20°C, para mantener las condiciones recomendadas por los autores referentes. La Fig. 11 muestra el tratamiento térmico aplicado.

### SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN MIOFIBRILAR

#### DISOLUCIÓN

40g de pescado (músculo dorsal sin piel) finamente picado en solución previamente refrigerada + 200 mL Buffer Tris 0.05M (pH 7.5 HCl) + 5% glicerol.



#### MEZCLA

Colocar el vaso de precipitado sobre una bandeja con hielo. La solución pescado + Tris fue homogeneizada en equipo Stirrer a 20.000 rpm x 30 segundos. Este paso fue repetido 5 veces



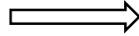
#### CENTRIFUGACIÓN (4°C)

La mezcla fue repartida en tubos y centrifugada a 10.000 a 4°C x 30 min.

Centrífuga eppendorf 5801 R



## FILTRACIÓN



Sólo se utilizó el sobrenadante.  
El precipitado contiene fracción miofibrilar, fue eliminado

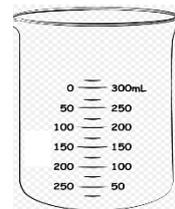


## LIOFILIZACIÓN

Sobrenadante colocado en equipo liofilizador durante 36 horas.

## DILUICIÓN DEL LIOFILIZADO

El liofilizado fue disuelto en 20 mL Buffer TRIS 0.05 M (pH 7.5 HCl)



## **SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES SARCOPLASMÁTICAS**

### CENTRIFUGACIÓN (4°C) 10.000 x 30 min



Se agregó al liofilizado 20 mL Acetona en concentración 40% (para las muestras de lorna), 55% (para las muestras de jurel)



### CENTRIFUGACIÓN (4°C) 10.000 x 30 min

El sobrenadante + 20 mL Acetona **85%**.

Retirar la grasa mediante filtración en papel Filtro

Whatman



## SEPARACIÓN DEL PELLET

El sobrenadante fue colocado en una pera de decantación.



El Pellet final (contiene Proteínas de Bajo Peso Molecular que agrupa las PA)

**Figura 10.** Protocolo seguido para la extracción de PA a partir de las muestras de músculo dorsal de jurel y de lorna.



**Figura 11.** Pellets sometidos a tratamiento térmico 121°C a diferentes tiempos, J<sub>1</sub>: 5 minutos, J<sub>2</sub>: 10 minutos, J<sub>3</sub>: 15 minutos; L<sub>1</sub>: 5 minutos, L<sub>2</sub>: 10 minutos, L<sub>3</sub>: 15 minutos.

Los pellets J y L no fueron sometidos a tratamiento térmico.

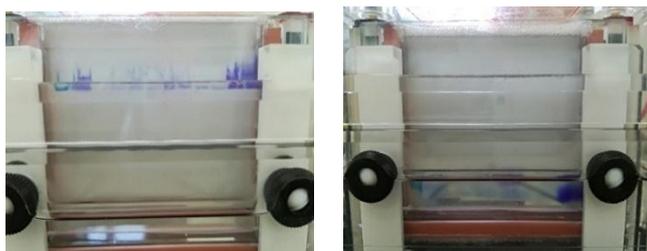
Electroforésis: (método Laemmli, U. 1970). Geles SGS-PAGE preparados: concentración 20% para el gel de apilamiento y 5% para el gel de separación. Los detalles de formulación e indicaciones para la preparación de los geles se muestran a continuación:

Reactivo	Cantidades	Procedimiento
Acrilamida	44.4 g	Colocar en fiola de 100 mL y enrasar con agua destilada desionizada
Bisacrilamida	1.2 g	
Persulfato de amonio	100 mg	Disolver en 1 mL de agua destilada desionizada
Duodecil sulfato de sodio (SDS)	5 g	Colocar en fiola de 50 mL y enrasar con agua destilada desionizada
Buffer 1.5 M Tris pH 8.8	11.15g	Diluir en agua destilada desionizada, llevar a pH 8.8 y enrasar a 100 mL
Buffer 0.5 M Tris pH 6.8	6g	Llevar a pH 6.8 y enrasar a 100 mL

La Formulación de Soluciones utilizadas para la Preparación de Geles SDS-PAGE fue preparada de acuerdo al siguiente esquema:

(Cantidades en mL)	Geles	
	De Separación 20 %	De Apilamiento 5%
Agua destilada desionizada	4.2	3.1
Buffer tris 1.5 M pH 8,8	3.75	- - -
Buffer tris 0,5 M pH 6,8	-----	1.25
SDS 10%	0.15	0.05
Acrilamida	6.75	0.55
TEMED (N,N,N',N''-tetrametiletlenodiamina)	0.015	0.005
Persulfato de Amonio	0.15	0.05

Los geles SDS-PAGE (10cm x 6 cm) fueron preparados de acuerdo a formulación indicada (Tabla 10). El equipo de electroforesis para mini-geles con accesorios (peines con 12 pocillos, espaciadores de vidrios espesor 0.75 mm) fue un Mini Protean 3 cell de BioRad®, fuente de poder. El sistema Buffer utilizado para la separación electroforética fue la Buffer tris-glicina pH 8.3 (1.51 G Tris base, 7.2 g glicina en 500 mL de agua destilada desionizada) cámara interna (cátodo) y de Buffer de glicina (glicina 0.1M, pH 2.2 -3.6) para la cámara externa (ánodo). (Figura 12).



**Figura 12.** Geles SDS-PAGE dentro de la cámara de electroforesis en los cuales se observa el desplazamiento de las proteínas (frente de corrida) puede ser visible gracias a la coloración que imprime el colorante azul de bromofenol.

La corrida fue desarrollada a temperatura ambiente utilizando 40 miliamperios, el término se produjo cuando el frente de corrida identificado tomando como referencia el colorante azul de bromofenol. La lectura de geles fue obtenida mediante un Analizador de Imagen con Transiluminación Gel Doc TM XR+. Para facilitar el despliegue de las cadenas polipeptídicas las muestras fueron disueltas en igual cantidad de Buffer de desnaturalización (50 mL 8 M urea + 20 mM buffer fosfato pH 6.8 + 1% SDS +

Mercaptoetanol 1%). 10 uL de muestra mezclados con 5 uL de colorante Azul de bromofenol (10 mg de BPB + 2 mL de glicerol + 0.2 mL 0.5 M buffer tris pH 6.8) fueron colocados en el gel. El Marcador de peso Molecular (estándar) fue Sigma-Aldrich (Nº Catálogo SDS7) de un rango MW. 14.000 – 66.000 conteniendo:

Proteína	Peso Molecular
• Albúmina bovina	66.000
• Albúmina de huevo	45.000
• Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa	36.000
• Anidrasa carbónica bovina	29.000
• Tripsinógeno de páncreas bovino	24.000
• Inhibidor de Tripsina de soya	20.000
• $\alpha$ -lactalbúmina de leche de bovino	14.200

Tinción de Geles: al término de la electroforesis los geles fueron retirados de la cámara de corrida y sumergidos en una Solución Fijadora (500 mL metanol, 70 mL ácido acético glacial, 420 mL agua) durante 10 minutos. La tinción fue realizada con colorante Azul de Coomassie (0.25g en 225 mL metanol, 46 mL ácido acético y 230 mL agua) y la decoloración con solución de decolorante (200 mL, 100 mL etanol, 50 mL ácido acético y 650 mL agua) durante 6 horas. Las imágenes y cuantificación de moléculas fue realizada mediante equipo Transiluminador. Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System, utilizando el White Light Transilluminator marca BIORAD.

**Para la Digestión en FGS:** el FGS es definido como la solución de reactivos mantenidos bajo condiciones específicas y ha sido desarrollado para representar las condiciones gástricas en el estómago (Herman R., Storer N., and Yong Gao, 2006), (Akimov M. and Bezuglov S., 2012). Para la prueba se estableció una relación de 10U de actividad de pepsina/ ug de proteína, tomando en cuenta la recomendación de la US Pharmacopoeia (2000) que utilizada por numerosos autores. (Lucas et al. 2007, Untersmayr E. 2005)

La solución FGS fue preparada disolviendo 200 mg de ClNa en 100 mL de agua destilada desionizada ajustada a pH 1.2 con HCl 3M. En esta solución se agregó Pepsina (Sigma, Gillingham UK) con actividad 2235 U/mg en concentración 0.32%.



**Figura 13.** Microcentrífuga Eppendorf® Minispin® con Rotor Blackline.

Para desarrollar los experimentos de digestión se utilizó una proporción de 1.9 mL de muestra. Para dicho fin se realizó los cálculos de proteína en las muestras de acuerdo al método de Lowry. Antes de agregar la solución FGS a las muestras, fue precalentada por 2 minutos a 37°C. Al terminar el tiempo de digestión se agregó a las muestras 800 uL de un buffer de neutralización o Buffer Laemmli

(40% glicerol, 5% *B*-mercaptoetanol, 10% SDS, 0.33 MTris, 0.05% azul de bromofenol, pH 6.8) para detener la reacción. La homogeneización de los tubos fue realizada en una minicentrífuga eppendorf. (Figura 13).

**Para el análisis estadístico de los resultados:** el programa estadístico SPSS versión 25 para las pruebas (Estadístico de Levine, Welch, etc) que determinen el análisis de variancia ANOVA, Tukey en el experimento, evaluaciones desarrolladas con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

### CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

Para iniciar el estudio se trata de establecer que los grupos de especies lorna/jurel utilizados en cada uno de los tres meses del estudio corresponden a una misma población. Con esta finalidad se estableció que la media y la variabilidad es la misma que de la cualquiera de los grupos por separado.  $H_0$  = Todas las poblaciones analizadas presentan las mismas características

$$H_0 = \mu_{1j} = \mu_{2j} = \mu_{3j}$$

$H_1$  = al menos uno de los grupos presenta diferentes características

$$H_1 = \mu_{ij} \neq \mu_{kj}$$

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

#### Características Físicas de las especies pesqueras

**Tabla N° 1.** Análisis Estadístico de las Características Físicas (Tamaño cm) de Jurel y Lorna

Especie	N	Promedio	Desviación estándar	CV %	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
Jurel	90	29.19	1.27	4.35	28.92	29.45
Lorna	90	22.78	1.45	6.36	22.47	23.08

El valor de la longitud promedio de jurel estuvo comprendido entre los rangos  $24.7 \pm 1.1$  y  $35.2 \pm 2.3$  cm en 2001 y  $26.5 \pm 1.2$  y  $36.2 \pm 1.4$  cm durante 2002 reportada por (Barriga M., Ayala M, Plácido M. y Salas A., 2003). Similar modelo fue observado en lorna, su longitud promedio corresponde con los respectivos observados entre 2001 a 2003 (22.56cm) y entre 2009 y 2012 (22.89 cm) por Culquichicón Z., Tresierra A. Solano A. y Atoche D. (2012). Los valores de desviación estándar (DS), coeficientes de variabilidad (CV) y estadísticos de Levine (EV) de los valores de longitud en ambas especies demuestran una elevada homogeneidad de varianzas con un 95% de intervalo de confianza para la media ( $\alpha = 0.05$ ). (Tabla 1 y Anexos 1 y 2).

## Frescura Sensorial de las Especies

**Tabla N° 2.** Análisis Estadístico de las Características Sensoriales de Jurel y Lorna

Especie	N	Promedio	Desviación estándar	CV %	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
Jurel	90	4.21	0.24	5.70	4.15	4.26
Lorna	90	4.23	0.25	5.91	4.18	4.28

Del mismo modo es importante referir la condición de frescura de las muestras de ambas especies utilizadas en el presente estudio –tomando en cuenta la percibibilidad del recurso pesquero- los valores obtenidos en la Tabla 2 y Anexos 3 y 4 (subconjuntos homogéneos no presentan diferencias significativas  $\alpha=0.05$ ), sus atributos olor, color, textura, apariencia y sabor corresponden con un buen grado de calificación y al igual que los datos de tamaño, reflejan un bajo grado de dispersión y la homogeneidad de varianzas.

## Frescura Química de las Especies

**Tabla N° 3.** Análisis Estadístico de las Características de Frescura Química (mg de N-BV /100g de músculo dorsal) de Jurel y Lorna.

Especie	N*	Promedio	Desviación estándar	CV	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
Jurel	9	28.82	2.30	7.98	27.05	30.59
Lorna	9	29.71	2.28	7.67	27.95	31.46

El nivel de frescura química medida por la determinación de Nitrógeno de Bases Volátiles Totales es uno de los métodos más utilizados para evaluar de la calidad de los productos pesqueros. Es un término general que incluye la medición de algunos compuestos volátiles que se generan como consecuencia de los procesos de deterioro de los productos de la pesca, entre ellos destaca la trimetilamina, dimetilamina, amoníaco y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles.

De acuerdo a lo establecido por el Método Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 95/149/CE. (N°L 97/84–N°L 97/85–N°L 97/86), se considera aceptable para el consumo humano directo pescado con valores hasta de 35 mg de N-BVT/100 g de músculo. Los resultados en Tabla N° 3 y Anexos 5 y 6, indican que en todas las muestras los valores no presentaban diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha= 0.05$ ) y se encontraban por debajo del límite establecido, siendo además concordantes con la calificación de atributos sensoriales.

Los valores de DS y CV aseguran baja dispersión y una condición de especímenes uniforme en ambas especies. Esto resulta de particular importancia si se considera que en un pescado de bajo grado de frescura y cantidades superiores a 35 mg de N-BVT/100 g, gran parte del nitrógeno proteico se transforma en bases volátiles (N no proteico), lo cual afectaría las determinaciones de proteína sobre las cuales se basa el presente estudio (Tabla 3, Anexos 5 y 6).

### Contenido de Proteína Total y Proteína Sarcoplasmática

**Tabla N°4.** Análisis Estadístico del Contenido de Proteína Total de Jurel y Lorna

Especie	N	Promedio	Desviación estándar	CV %	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
<b>Jurel</b>	9	19.90	0.55	2.76	19.48	20.32
<b>Lorna</b>	9	18.28	0.79	4.32	17.67	18.89

(Datos expresados en g de N x factor 6.25 /100 g de músculo dorsal)

La Tabla 4 muestra los valores de proteína total promedio que son cercanos a los referidos para estas especies en las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos (INS,2009), 19.7% y 18.5% y además se encuentran dentro del rango de los valores establecidos por Traverso J. y Avdalov N. (2014), Huss H.H. (1999) e IMARPE-ITP (1996). En ambas especies el valor CV es bajo indicando baja variabilidad. El análisis estadístico descriptivo de estos datos en cada uno de los meses enero, febrero y marzo para ambas especies indica que no existen diferencias estadísticamente significativas a nivel  $\alpha= 0.05$  (ver Anexos 7 y 8).

Respecto al contenido de proteína sarcoplasmática los datos obtenidos en ambas especies son estadísticamente similares entre sí ( $\alpha= 0.05$ ). Al calcular el valor porcentual promedio indicado en la Tabla 5 respecto al total de proteína (Tabla 4) se obtiene 24.87% y 25.60% como porcentaje de fracción sarcoplasmática en jurel y lorna respectivamente (el análisis estadístico descriptivo se presenta en los Anexos 9 y 10).

**Tabla N°5.** Análisis Estadístico del Contenido de Proteína Sarcoplasmática de las especies pesqueras Jurel y Lorna

Especie	N*	Promedio	Desviación estándar	CV %	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
<b>Jurel</b>	9	4.95	0.41	8.28	4.63	5.27
<b>Lorna</b>	9	4.68	0.14	2.99	4.57	4.79

(Datos expresados en g de proteína sarcoplasmática / 100 g de músculo)

El pellet obtenido contenía proteínas de bajo PM (P-BPM) dentro de las cuales se encuentran las PA. Antes de la inoculación de las muestras en los carriles del gel de electroforesis SDS-PAGE se realizó la cuantificación de proteína de acuerdo al método citado (Lowry). Los valores promedio de 3 repeticiones de P-BPM fueron 10.29 mg /100g filete de jurel y 13.78 mg/100g filete de lorna. A partir de estas cantidades para aproximar la cantidad de PA se tomó la distribución de cantidades en las muestras crudas (J0 y L0) de acuerdo a su distribución de bandas (68.02 y 53.19% para jurel y lorna respectivamente). De ello resultan valores de 6.999mg PA/100g en jurel y 7.329 mg PA100/g en lorna.

## EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS

### Contrastación de Hipótesis

$H_0$  = Todos los tratamientos ejercen el mismo efecto sobre las PA de jurel

$$H_0 = u_{1J} = u_{2J} = u_{3J} = u_{4J}$$

$H_1$  = al menos uno de los tratamientos ejerce un efecto diferente

$$H_1 = u_{iJ} \neq u_{jJ}$$

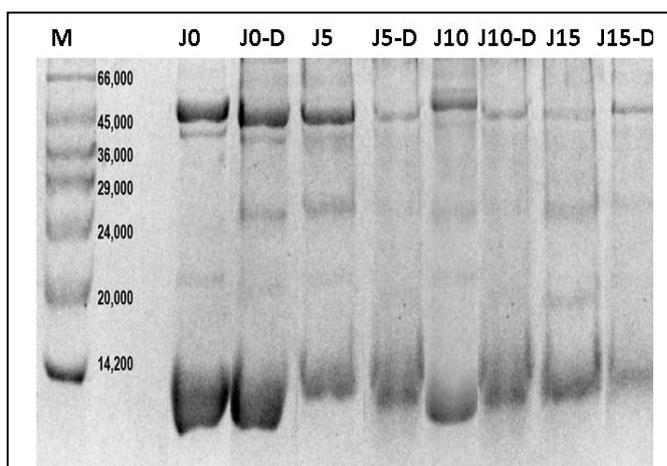
## Electroforésis de Proteínas

Los electroforegramas permiten apreciar el recorrido a través del gel o soporte SDS-PAGE de las proteínas de las especies pesqueras investigadas, que de acuerdo a su PM corresponden a rangos muy bajos dentro de los cuales se encuentran las proteínas alergénicas de interés PA (10.000 y 14.000 kDa) (análisis de regresión se muestran en Anexos 11 y 12) entre las distancias recorridas por cada grupo de proteínas (Rf) y su peso molecular (PM) (tomando como referencia el rango del marcador de PM de 66.000 a 14.200 kDa). Los datos obtenidos del analizador de imágenes permitieron evaluar cualitativa y cuantitativamente las bandas utilizando los valores de PM de las proteínas, su frente de recorrido relativo (Rf), su CR y porcentaje de banda.

El efecto del tiempo de tratamiento térmico a 121° C sobre la estabilidad de las proteínas alergénicas investigadas fue establecido comparando la CR s obtenida para cada caso (tiempo de tratamiento/ digestión en FGS) con las muestras que no fueron tratadas térmicamente ni sometidas a digestión, a las mismas que se les asignó valor 1.

## PROTEINAS DE JUREL

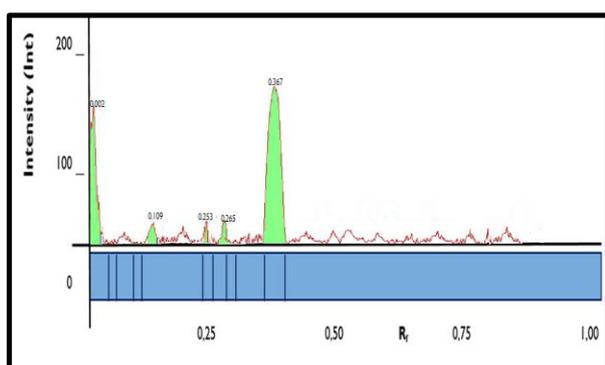
En la Figura 14 se observa ubicación e intensidad de las bandas de proteínas de Jurel (*Trachurus symmetricus murphyi*). Según la codificación establecida corresponden a J0 sin tratamiento



**Figura14.** Electroforésis de proteínas de bajo PM de jurel (*Trachurus symmetricus murphyi*) en geles SDS-PAGE 5% para el gel de apilamiento y 20% para el gel de separación.

térmico; J0D sin tratamiento térmico y sometido a digestión. J5 tratamiento térmico 5 min; J5D tratamiento térmico 5 min y sometido a digestión; J10 tratamiento térmico 10 min; J10D tratamiento térmico 10 min y sometido a digestión; J15 tratamiento térmico 15 min; J15D tratamiento térmico 15 min y sometido a digestión; M es el Marcador

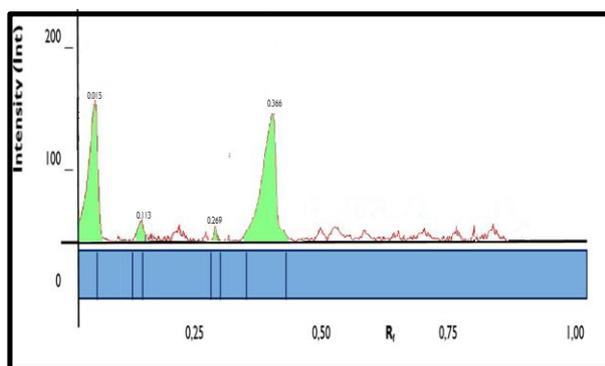
de PM. En todas las muestras la secuencia de bandas indica que las proteínas alergénicas en las muestras de pescado (PA) se sitúan por debajo de 14.000 y que su densidad asociada a su CR es variable ( $y = -0.0085x + 0.4523$  con  $R^2 = 0,9887$ ) (Anexo 11). En Anexo 13 se muestran los análisis estadísticos para establecer diferencias significativas entre los tratamientos aplicados (ANOVA) y en Anexo 15 los análisis estadísticos comparativos correlacionando por pares entre tratamientos sin y con tratamiento en FGS.



N° de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	53.0	0.002	0.38	25.85
2	40.4	0.109	0.06	4.08
3	23.4	0.253	0.01	0.68
4	22.0	0.265	0.02	1.36
5	10.0	0.367	1.00	68.02

**Figura 15.** Músculo de Jurel sin tratamiento térmico ni digestión en FGS (J0)

Al analizar la muestra cruda, J0 (Figura 15) se encontró 5 bandas entre las cuales la última de 10.000 kDa se encuentra en el rango descrito para PA en pescado, es la más densa y representa el 68.02% de las proteínas. Al analizar los resultados de las muestras J0D respecto a J0 se observa la desaparición de la tercera banda de PM 23.400 kDa. (Figura 16)

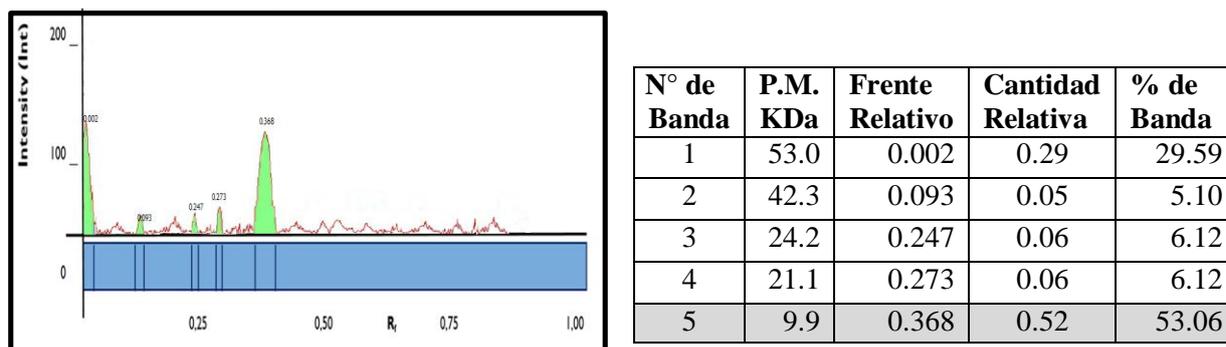


N° de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	51.5	0.015	0.32	25.39
2	39.9	0.113	0.05	3.97
3	21.6	0.269	0.01	0.79
4	10.1	0.366	0.88	69.84

**Figura 16.** Muestras de Jurel sin tratamiento térmico sometidas a digestibilidad (J0D)

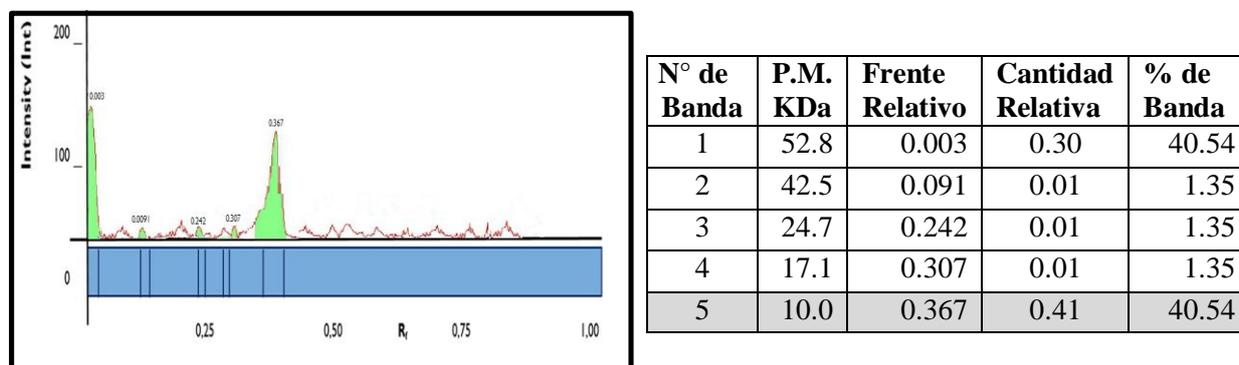
La Figura 17 muestra que la banda de 10.100 kDa presenta una CR de 0.88, lo cual indica se ha reducido al 88% respecto a la muestra cruda que es tomada como referencia en el presente

estudio, aun cuando el valor % de banda (69.84%) es similar al anterior. (Figura 16, Anexo 15). Al comparar la muestra sometida a cocción durante 5 minutos con la muestra cruda J0, se observa que presenta cinco bandas, de ellas las dos primeras muestran ligera diferencia (menores CR y % de banda). La tercera y cuarta banda muestran incrementos notorios, en tanto que la densidad de la última banda (PM 9.900) arroja una CR de 0.52 (Anexo 15).



**Figura 17.** Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 5 minutos (J5)

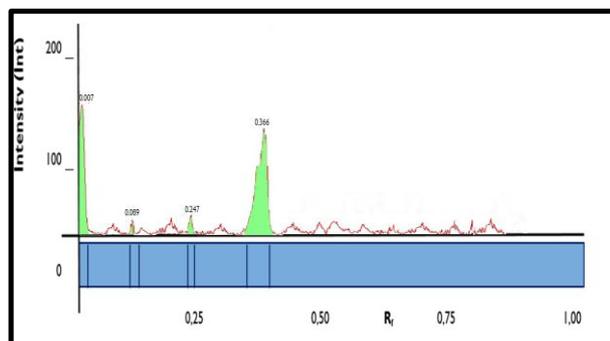
En la Figura 18 se puede observar los resultados de la muestra sometida a 5 minutos de calentamiento y a digestión en FGS. Se observa cinco bandas de proteína, la primera de ellas con mayor PM (52.800 kDa) se mantiene en similar CR respecto a la muestra J5 aunque su % de banda es mayor. En la última banda de 10.000 kDa los valores CR y el % de banda también mostraron ligera reducción a 0.41 y 40.54% respectivamente (Anexo 15).



**Figura 18.** Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 5 minutos y a digestibilidad (J5D)

La acción de tratamiento térmico durante 10 minutos en las proteínas extraídas de jurel indica la reducción notoria de la primera banda (52.4 kDa) y la desaparición de una banda que aparecía

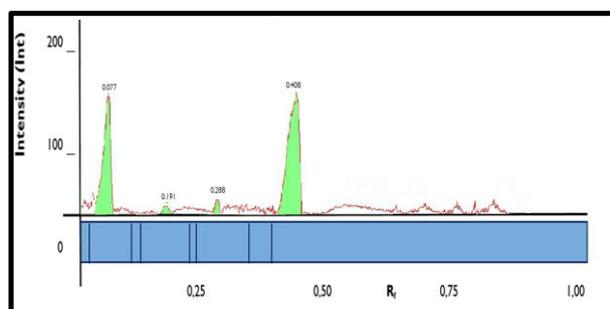
entre extremos de 23.000 y 24.000 kDa y 22.000 a 17.1000 kDa en las anteriores muestras a 0 y 5 minutos de calentamiento. La Figura 19 y Anexo 15 muestran además que la CR en la banda de interés (10.000 kDa) es similar a su valor correspondiente en muestras calentadas por 5 minutos (J5), aumentando su % de banda a 63.75.



Nº de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	52.4	0.007	0.24	30.00
2	42.8	0.089	0.01	1.25
3	24.2	0.247	0.04	5.00
4	10.1	0.366	0.51	63.75

**Figura 19.** Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 10 minutos (J10)

El efecto del FGS en las muestras J10-D puede ser apreciado en la Figura 20, en términos de ausencia de una banda y la permanente presencia de las bandas de mayor PM. Aunque el % de banda es similar a su respectivo en J10 la CR no disminuyó.

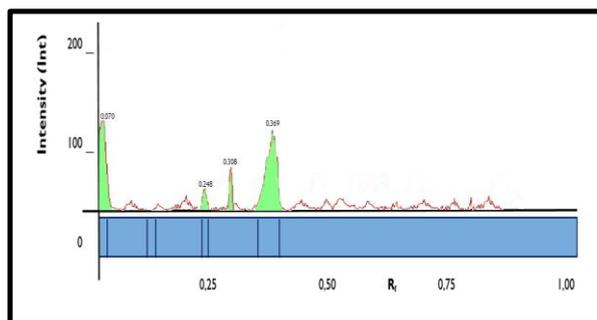


Nº de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	44.2	0.077	0.30	34.48
2	25.2	0.191	0.02	2.29
3	17.0	0.288	0.02	2.29
4	10.2	0.408	0.53	60.92

**Figura 20.** Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 10 minutos y a digestibilidad (J10D).

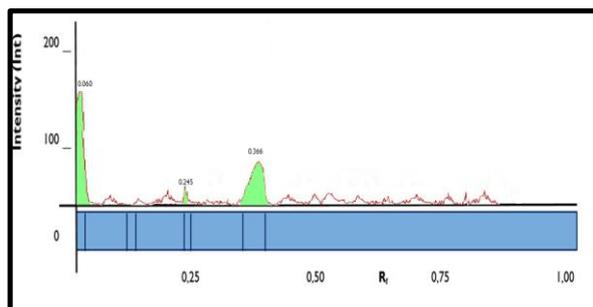
El efecto más drástico observado durante el presente estudio fue el calentamiento durante 15 minutos (J15) y su similar sometido a la acción del FGS (J15D). La CR mostrada en las Figuras 21 y 22 confirman la estabilidad de las proteínas en la primera banda (45.000 kDa y 46.200 kDa respectivamente). El análisis de la Figura 22 demuestra la desaparición de la banda de PM 17.000 kDa que existía en la muestra que no fue sometida a digestión (J15), en relación a las bandas de

interés (9.900 kDa y 10.1 kDa), sus CR disminuyen por acción de la hidrólisis en FGS tanto que las cantidades relativas de la banda de interés en J15 y J15D). El efecto del FGS en las muestras J10-D puede ser apreciado en la Figura 20, en términos de ausencia de una banda y la permanente presencia de las bandas de mayor PM. Aunque el % de banda es similar al respectivo en J10 la CR no disminuyó respectivamente) indica una notoria reducción en la muestra J15-D.



N° de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	45.0	0.070	0.05	10.87
2	24.0	0.248	0.07	15.21
3	17.0	0.308	0.03	6.52
4	9.9	0.369	0.31	67.39

**Figura 21.** Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 15 minutos (J15)



N° de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	46.2	0.060	0.08	38.09
2	24.4	0.245	0.02	9.52
3	10.1	0.366	0.11	52.38

**Figura 22.** Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 15 minutos y a digestibilidad (J15D)

**Tabla N°6.** Comparaciones Múltiples entre todos los Tratamientos aplicados en PA de jurel (antes y después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

HSD Tukey <sup>a</sup>	Tratamientos	N	Estabilidad (Cantidad Relativa) PA en Jurel					
			Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
	J15D	4	,1675					
	J15	4		,3650				
	J5D	4		,4050	,4050			
	J10D	4			,4625	,4625		
	J10	4				,5175		
	J5	4				,5300		
	J0D	4					,9000	
	J0	4						1,0000
	Sig.		1,000	,860	,516	,323	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

El análisis estadístico (ANOVA) aplicado en los resultados de Estabilidad de PA de jurel indica que la aplicación de diferentes tiempos de tratamiento térmico a 121 °C produce diferentes efectos sobre las muestras antes y después de ser sometidos a tratamiento en FGS (Anexo 13). En la Tabla 6 los valores de la prueba Tukey demuestran que el tratamiento J15D resultó ser en promedio, el de mayor efectividad entre todos los aplicados ( $\alpha=0.05$ ); si se toma en cuenta los valores iniciales - al permanecer estable el 16.75% - el tratamiento J15D provocó una reducción de 83.25% de CR de PA respecto al valor inicial (1.00). Sin embargo se debe observar que el tratamiento J15 refleja un considerable efecto de reducción del 63.50% de PA. Los demás tratamientos (excepto los aplicados en muestras crudas, (J0) provocaron reducciones de alrededor el 50%. La hidrólisis gástrica en las muestras crudas (J0D) produce sólo el 10% de reducción. La comparación estadística de los resultados promedio para cada tiempo de calentamiento y su respectivo tratamiento en FGS en todos los casos muestra efecto de la acción hidrolítica (FGS) (Anexo 15. Análisis Estadístico Comparativo por pares).

**Tabla N°7.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en PA de jurel (antes de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey.

HSD Tukey <sup>a</sup>	Estabilidad (Cantidad Relativa) PA jurel	Subconjunto para alfa = 0.05			
		N	1	2	3
J15	4		,3650		
J10	4			,5175	
J5	4			,5300	
J0	4				1,0000
Sig.		1,000	,957		1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Cuando se compara la estabilidad de las PA de jurel sólo ante los diferentes tiempos de la acción térmica (121°C), estadísticamente se presentan diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). La Tabla 7 permite visualizar los grados de significancia, especialmente el tratamiento J15 reduce el 63.50% de CR de PA de jurel, en tanto se observa que la reducción entre los tratamientos térmicos J5 y J10 provoca un efecto de reducción similar estadísticamente. (Anexo 17)

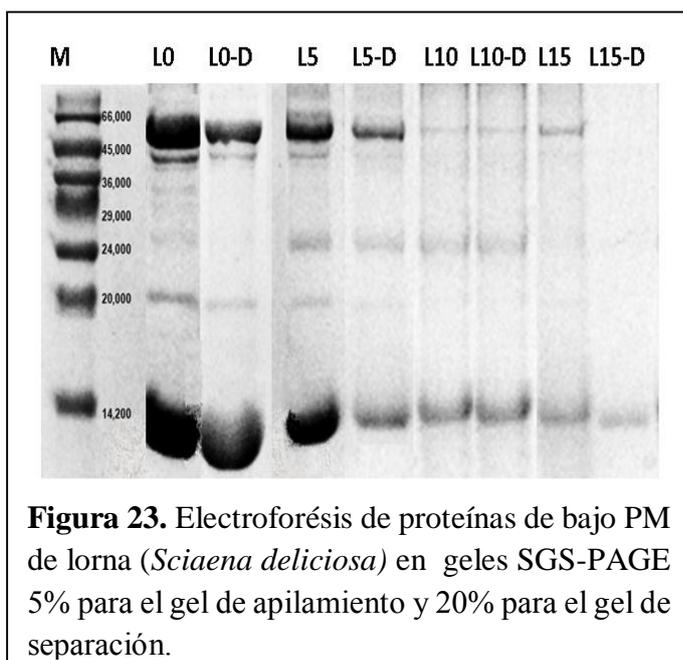
**Tabla N°8.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en PA de jurel (después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

Estabilidad (Cantidad Relativa) PA jurel				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
J15D	4	,1675		
J5D	4		,4050	
J10D	4		,4625	
J0D	4			,9000
Sig.		1,000	,338	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. a.Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.				

Para evaluar el efecto de la digestión en FGS el análisis estadístico (Tabla 8, Anexo 20) permite analizar que la hidrólisis en las muestras presenta un esquema similar al mostrado en la Tabla 19. La hidrólisis en muestras previamente calentadas a 15 minutos (J15D) provoca la mayor reducción de la CR de PA mientras que la hidrólisis en las muestras previamente calentadas durante 5 y 10 minutos (J5 y J10) estadísticamente ejerce un efecto similar en términos de diferencia significativa.

### **PROTEINAS DE LORNA**

El efecto del tiempo de aplicación del tratamiento térmico a 121 °C y de la acción del FGS en proteínas de bajo PM de lorna (*Scianena deliciosa*) se expresa en los resultados del

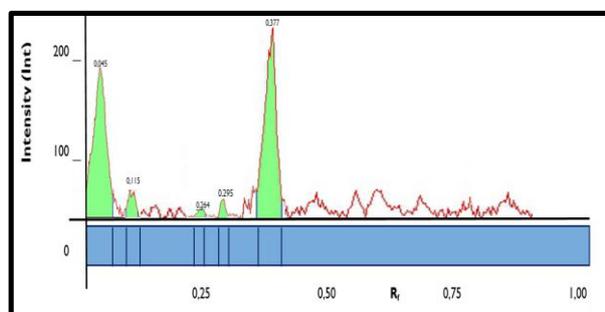


**Figura 23.** Electroforésis de proteínas de bajo PM de lorna (*Sciaena deliciosa*) en geles SGS-PAGE 5% para el gel de apilamiento y 20% para el gel de separación.

electroforegrama mostrado en la Figura 23: L0 sin tratamiento térmico; L0D sin tratamiento térmico y sometido a digestión; M: Marcador de PM; L5 tratamiento térmico 5 min; L5D tratamiento térmico 5 min y sometido a digestión; L10 tratamiento térmico 10 min; L10D tratamiento térmico 10 min y sometido a digestión; L15D tratamiento

térmico 15 min; L15 D tratamiento térmico 15 min y sometido a digestión. M es el Marcador de PM. Valores de Regresión (PM vs Rf) obtenidos fueron  $y = -0.0081x + 0.4571$  con  $R^2 = 0,9974$  (Anexo 12). El análisis estadístico de los resultados obtenidos de cada tratamiento permiten establecer diferencias significativas (Anexo 14), en el anexo 16 se muestra las comparaciones múltiples entre pares de tratamientos sin y con tratamiento en FGS.

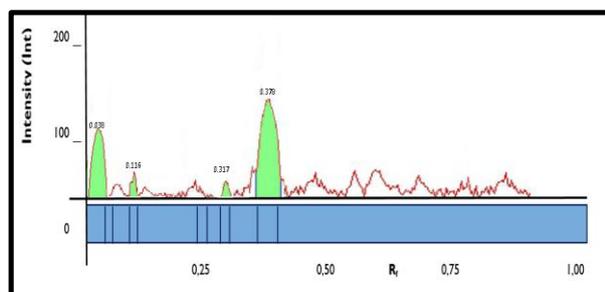
La Figura 24 representa la separación de proteínas de la muestra cruda en cinco bandas (L0). Las mayores cantidades relativas (41.49 y 53.19 % de banda) fueron las correspondientes a las proteínas de mayor PM 51.500 kDa y a las proteínas de interés (10.000 kDa) respectivamente.



Nº de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	51.5	0.045	0.78	41.49
2	42.8	0.115	0.06	3.19
3	24.2	0.264	0.01	0.53
4	20.3	0.295	0.03	1.60
5	10.0	0.377	1.00	53.19

**Figura 24.** Muestras de Lorna sin tratamiento térmico ni sometidas a digestibilidad (L0)

La separación de proteínas de bajo PM en las muestras de Lorna sin tratamiento térmico que fueron sometidas a digestibilidad (L0-D) (Figura 25) a diferencia de la anterior arroja 4 bandas, manteniendo un comportamiento similar al tratamiento inicial L0: las proteínas de mayor (52.400 kDa) y menor PM (10.000 kDa) presentan los mayores contenidos y por tanto los mayores % de Bandas (32.65% y 60% en cada caso).

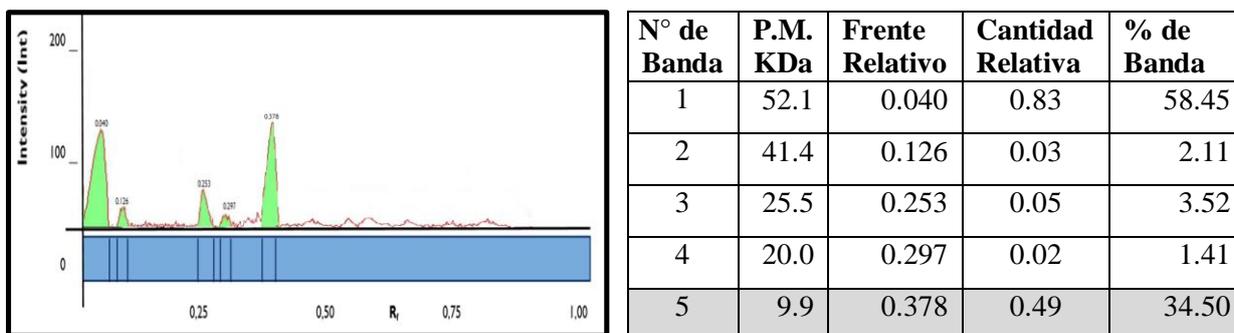


Nº de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	52.4	0.038	0.41	35.65
2	42.6	0.116	0.03	2.61
3	17.5	0.317	0.02	1.73
4	9.9	0.378	0.69	60.00

**Figura 25.** Muestras de Lorna sin tratamiento térmico sometidas a digestibilidad (L0D)

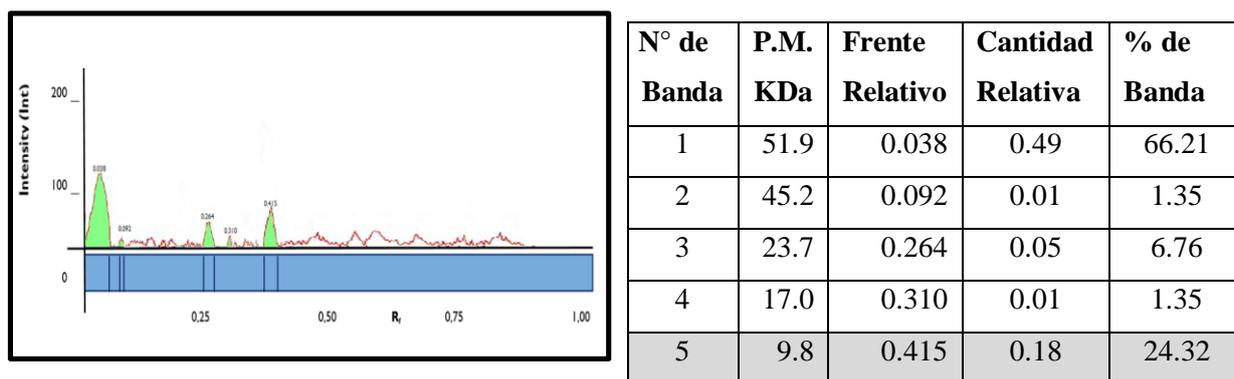
En la Figura 26 se puede apreciar la separación electroforética de 5 bandas en la muestra sometida a 5 minutos de tratamiento térmico y de las cuales se observa similar patron.

Como en el caso anterior- las mayoritarias se encuentran ubicadas en los extremos: la de mayor PM (51.900 kDa) y las proteínas de interés que poseen el menor PM (9.800 kDa)



**Figura 26.** Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 5 minutos (L5)

Cuando se somete a digestión las muestras tratadas por calor durante 5 minutos (L5-D) se observa que se mantiene el número de bandas con mayores cantidades relativas también en las bandas de mayor y menor PM (52.100 kDa y 9.900 kDa). La CR de las bandas de 51.200 kDa respecto a la respectiva en L5 muestra una disminución, en tanto que en la tercera banda (25.500 kDa) y en la banda de las proteínas de interés (PA) se produjo un incremento. (Figura 27).



**Figura 27.** Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 5 minutos y a digestibilidad (L5D)

El calentamiento de las muestras durante 10 minutos (L10) ocasionó la formación de las bandas que se muestran en la Figura 28. Como se puede apreciar, y en comparación a los anteriores tratamientos térmicos, la imagen muestra la reducción de la CR en la banda de mayor PM (52.800

kDa) en tanto que la banda de interés (10.100 kDa) presentó la mayor CR y porcentualmente entre las bandas el mayor valor.

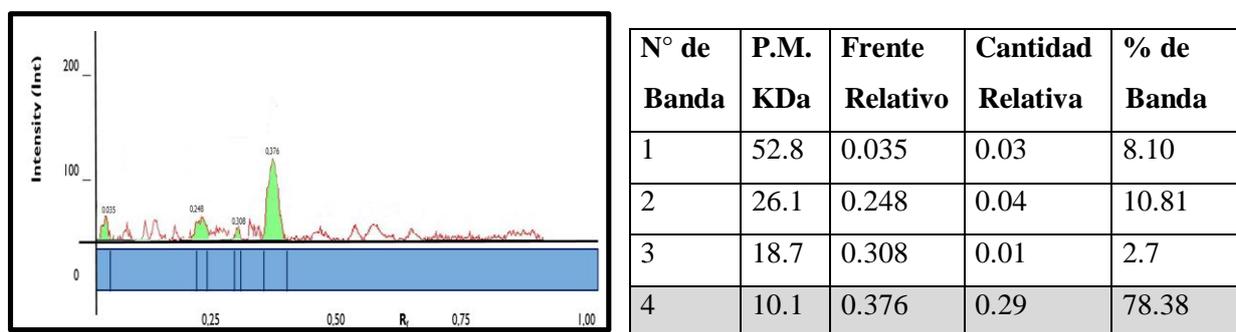


Figura 28. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 10 minutos (L10)

Como resultado de la aplicación de tratamiento térmico a 10 minutos y de digestión en FGS, se mantienen 4 bandas como en el tratamiento anterior, con el mismo patrón, la banda de mayor PM (52.00 kDa) y la de 10.000 kDa presentan cantidades relativas similares a las obtenidas mediante el tratamiento L10. (Figura 29)

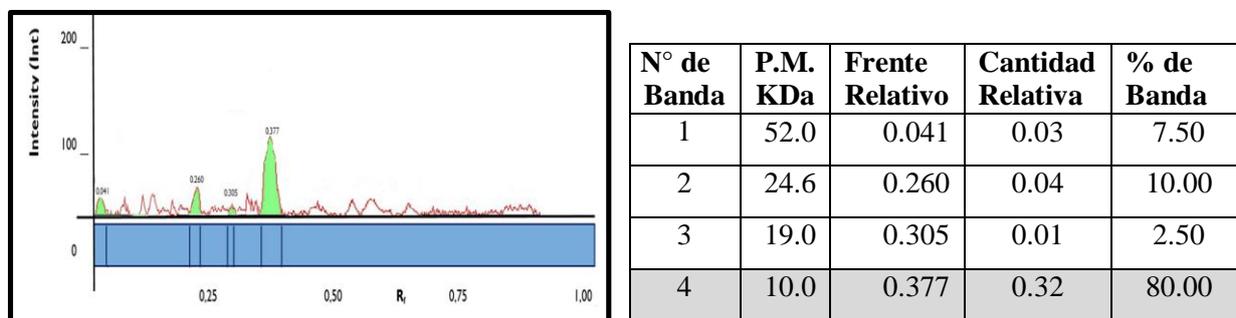
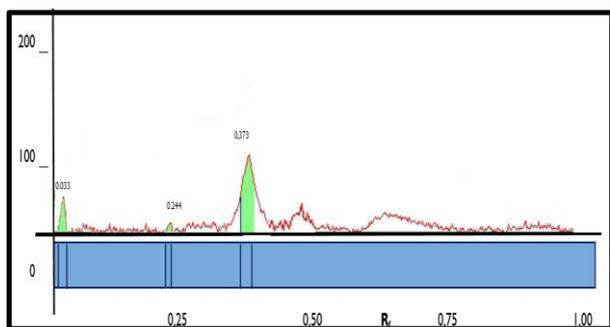


Figura 29. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 10 minutos y a digestibilidad (L10D)

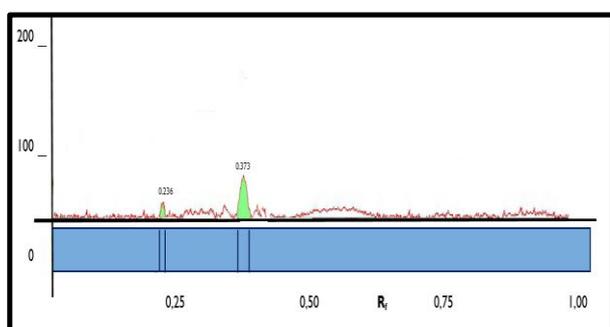
Los resultados obtenidos de la aplicación de tratamiento térmico durante 15 minutos (L15) indican un comportamiento particular, indican la desaparición de dos bandas, permaneciendo la de mayor PM (53.000 kDa) y la de 10.500 kDa. (Figura 30)



N° de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	53.0	0.033	0.07	25.00
2	26.6	0.244	0.01	3.57
3	10.5	0.373	0.20	71.43

**Figura 30.** Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 15 minutos (L15)

La Figura 31 muestra el efecto del tratamiento térmico por 15 minutos y acción gástrica en FGS (L15-D) que han sufrido las proteínas extraídas. Se observa la desaparición de la banda de mayor PM que se encontraba presente en los tratamientos anteriores, tanto en los sometidos o no a la acción gástrica en FGS. Como resultado de este tratamiento sólo han permanecido una banda de 27.600 kDa en mínima cantidad y una banda de 10.500 kDa, sin embargo esta última que es a la que se refiere en el presente estudio como la banda de interés, presenta el menor valor de todos los tratamientos aplicados a las proteínas extraídas de lorna.



N° de Banda	P.M. KDa	Frente Relativo	Cantidad Relativa	% de Banda
1	27.6	0.236	0.01	9.09
2	10.5	0.373	0.10	90.90

**Figura 31.** Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 15 minutos y a digestibilidad (L15D)

Al revisar los resultados de los tratamientos aplicados en lorna se observa que de acuerdo al análisis estadístico descriptivo (Anexo 14) se presentan diferencias estadísticas de elevada significancia ( $\alpha= 0.05$ ). La Tabla 9 muestra que –al igual que lo observado en el caso de jurel-L15D es el tratamiento que ejerce el mayor efecto de reducción de CR de PA (83.0%), sin embargo estadísticamente no presenta diferencias con los efectos provocados por los tratamientos L15, y L5D (reducciones de 79.0 y 72.50% de CR de PA respectivamente). También se observa

en este caso que estadísticamente existe similitud entre los efectos de reducción de PA de lorna por efecto de los calentamientos de 10 y 15 minutos (J15 y J10) y a su vez entre los tratamientos durante 10 minutos antes y después de la hidrólisis.

**Tabla N° 9.** Comparaciones Múltiples entre los Tratamientos aplicados en PA de lorna (antes y después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

HSD Tukey <sup>a</sup>		<b>Estabilidad (Cantidad Relativa)_PA Lorna</b>				
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
L15D	4	,1700				
L15	4	,2100	,2100			
L5D	4	,2750	,2750			
L10	4		,2875			
L10D	4		,3125			
L5	4			,4625		
L0D	4				,7150	
L0	4					1,0000
Sig.		,056	,066	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

El tratamiento L5 presenta un efecto menos intenso pero logra la reducción del 53.75%. La acción de digestión de las muestras crudas (L0) reduce en 28.5% la estabilidad de PA en lorna, valor que casi triplica el obtenido en el correspondiente valor de 10% obtenido en jurel.

**Tabla N° 10.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en PA de lorna (antes de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

HSD Tukey <sup>a</sup>		<b>Estabilidad (Cantidad Relativa) de PA Lorna</b>		
Tiempo_de_calentamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
L15	4	,2100		
L10	4	,2875		
L5	4		,4625	
L0	4			1,0000
Sig.		,088	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

Al realizar las comparaciones por pares entre el efecto de reducción por tiempo de calentamiento y su respectiva hidrólisis en FGS, al igual en que jurel, las PA de lorna también sufren un efecto

en su estabilidad, sin embargo cabe notar que la acción hidrolítica es más intensa en las muestras que fueron sometidas a calor durante 5 y 15 minutos (L5 y L15) (Anexo 16).

Para analizar aisladamente los valores de estabilidad de PA de lorna, obtenidos por efecto de los diferentes tiempos de tratamiento térmico a 121°C, los datos fueron sometidos al análisis estadístico comparativo correspondiente (Tabla 10, Anexo 18). En este caso se observa una relación proporcional entre la duración del tratamiento térmico y los valores de estabilidad de las PA de lorna, los cuales se pueden expresar en porcentajes de reducción. Así se observa que aun cuando estadísticamente la acción térmica de 15 y 10 minutos no es diferente ( $\alpha = 0.05$ ), el mayor tiempo provoca la reducción del 79.0% de CR de PA en comparación al efecto de reducción obtenido al aplicar 10 minutos de tratamiento térmico (71.25%).

**Tabla N° 11.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en PA de lorna (después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

<b>Estabilidad_ (Cantidad Relativa) PA Lorna</b>				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
Tiempo_calentam_lorna	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
L15D	4	,1700		
L5D	4		,2750	
L10D	4		,3125	
L0D	4			,7150
Sig.		1,000	,709	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.				

Al evaluar la acción hidrolítica del FGS en las muestras previamente tratadas con calor, la Tabla 11 permite visualizar que dicha acción siempre es mayor (83%) en las muestras que fueron tratadas térmicamente por más tiempo (L15D) y que la hidrólisis gástrica simulada provoca similar efecto de reducción en las CR de PA (tratamientos L5D y L10D). El análisis estadístico descriptivo se muestra en el Anexo 20).

## **CAPÍTULO V. DISCUSIÓN**

### **Características de las Muestras**

La calificación de frescura sensorial en las muestras de cada especie concuerda con los valores de N-BVT/100 g, -indicador químico de frescura en pescado que mide nitrógeno no proteico procedente de sustancias aminadas y de la descomposición de proteínas-. En relación a los valores de proteína total estos son cercanos a los referidos para estas especies en las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos (INS, 2009) y dentro del rango de los comunicados por Traverso J. y Avdalov N. (2014), Huss H.H. (1999) e IMARPE-ITP (1996).

La fracción proteica sarcoplasmática obtenida en las especies pesqueras representa 24.87% y 25.60% respecto a la cantidad de proteína total, valores menores al referidos por Simoes D., Queiroz M.I, Volpato G. y Queiroz L. (2004) en especies europeas (30.54%) y a los reportados por Hashimoto K., Watabe S. Kono M. and Shiro K. (1979) en músculo oscuro de sardina (34.7, 37.2, 32.8% 29.0, 28.5 y 22.5%). Estas diferencias podrían ser atribuidas a las diferencias biológicas interespecies, distribución de tipos de músculo claro y oscuro (Lee, P.; Nordlee J.; Koppelman S.; Baumert J.; Taylor S. 2012 y Kobayashi A., Tanaka H., Hamada Y., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K. 2006) e inclusive el grado de frescura: los estudios referidos por dichos autores fueron realizados en pescado recién capturado en tanto que los valores en el presente estudio han sido obtenidos en especies pesqueras frescas tal como son ofertadas al consumidor en el mercado mayorista. Las PA constituyen un componente importante en la fracción de proteína sarcoplasmática en músculo esquelético de pescado y como tal comparten propiedades, tales como ser hidrosolubles.

La contrastación de hipótesis y el análisis estadístico descriptivo de las características de frescura sensorial y química así como los contenidos de proteína total, incluyendo la fracción sarcoplasmática, indican que los grupos de unidades muestrales proceden –para cada especie y

por separado- de un mismo grupo o población, lo cual aporta a la validez y representatividad de la muestra en la ejecución del presente trabajo.

### **Cantidades de PA**

Existe un amplio rango de variación en el contenido de PA de las especies de pescado de mayor consumo de hasta 100 veces y que debe ser considerada para diseñar pruebas de enfrentamiento con pacientes alérgicos. Algunos factores influyentes también radican en la metodología de análisis, mediante electroforesis en SDS-PAGE las cantidades de PA referidas son: < 0.5 en caballa, 0.5.- 2 mg en salmon y trucha y 2 mg en bacalao, carpa y arenque, mientras que mediante aplicación de técnica ELISA, Kuehn A., Swoboda I., Arumugam K., Hilger C. and Hentges F., (2014) comunican valores de mg/ g de músculo: < 0.05 en atun, 0.3 – 0.7 en caballa, 1 -2.5 mg en salmon, trucha y bacalao, > 2.5 mg en carpa y arenque.

En relación a las cantidades aproximadas calculadas para PA en las especies del presente estudio, los valores referidos en el Capítulo IV fueron, 6.999mg PA/100g en músculo de jurel y 7.329 mg PA/100g en músculo de lorna. Estos valores se sitúan dentro de los comunicados para otras especies por Griesmeier U., Vasquez-Cortes S., Bublin M., Radauer C., Ma Y., Briza P., Fernandez-Rivas M. & Breiteneder H. (2010) para pez espada 1 mg/100 g músculo, bacalao 20.1 mg/100 g músculo y pez gallo 30 mg/100 g músculo.

Sletten G., Van Do T., Lindvik HI; Egaas E.; and Florvaag E. (2010) estudiaron los efectos del procesamiento industrial en la inmunogenicidad de especies pesqueras de mayor consume en Noruega, concluyendo que los cambios en la alergenicidad guardaban mayor dependencia con el proceso aplicado que con la especie y sus cantidades de PA. En este marco de ideas y para fines prácticos en el presente trabajo se consideró apropiado evaluar el efecto del tiempo de acción térmica en términos de cantidades relativas (CR) de PA.

## **Análisis de Bandas**

Numerosos estudios indican rangos de peso molecular de PA, 10.000 a 14.000 kDa e incluso 15.000 kDa (Beale et al., 2009 citado por Rehbein H. and Lopata L. 2011). Los extractos de jurel y lorna fueron trabajados de acuerdo al protocolo de extracción que recomienda Arif S., Jabeen M., and Hasnain A. (2006) para separar un grupo de polipéptidos dentro de este rango de bajo peso molecular, al respecto Closset J., (1976) demostró que las PA se separan en la fracción de extracción con acetona (entre 55 – 80% de acetona), etapa que fue desarrollada dentro del presente estudio.

La cuantificación densitométrica de las bandas de proteínas en los geles SDS-PAGE realizada para obtener la cantidad relativa (CR) de PA en el presente trabajo se basa en investigaciones llevadas a cabo por Kuehn A., Scheuermann T., Hilger C. and Hengtges F. (2010), quienes utilizaron este criterio en estudios para evaluar la sensibilidad de pacientes alérgicos a las PA. En el presente trabajo se pudo observar en los extractos de ambas especies una banda de alrededor 10.000 kDa (contrastada frente al marcador de peso molecular utilizado), lo cual concuerda con lo observado por Closset J. (1976) en especies de pescado blanco (familia de gádidos) y por Arif S., Jabeen M., and Hasnain A., (2006) en especies pesqueras de bagre asiático (*Channa punctatus*, *channa striatus*, *Channa maruliu*). Vale mencionar que valores de pesos moleculares muy cercanos (11.518, 12.157 y 11.486 kDa) fueron observados por Mohammdi M., Falak R., Mokhtarian K., Khoramizadeh M., Sadroddiny E. and Kardar G. (2016) en especies *Stegastes partitus*, *Gadus morhua callarias* y *Cyprinus carpio*. También Koppelman S., Nordlee J., Lee P., Happe R., Hessing M., Norland R., Manning T., Deschene R., De Jong G., and Taylor S. (2012) refieren trabajos en los cuales refieren a las PA como proteínas acídicas pequeñas que se sitúan entre 10.000 a 14.000 kDa.

En los electroforegramas de los extractos crudos (J0 y L0) fue observado un patrón común de cinco bandas, que presentó cambios en su densidad y en algunos casos mostró la desaparición de algunas de las bandas tal como se aprecia de los diferentes tratamientos de tiempo de tratamiento térmico a 121 °C y de la acción hidrolítica en el FGS. Al analizar los patrones se observa que en los extremos se sitúan bandas de mayor densidad y peso molecular, la primera (entre 51.500 y 53.000 kDa) que se conviene en denominar grupo I y última, de menor peso molecular (9.800 y 10.5 kDa), grupo V. Entre ambas bandas se sitúan otros grupos II, III y IV de proteínas con pesos moleculares de alrededor 40.000, 24.000 y 20.000 kDa respectivamente. (Figuras 14 y 15)

En algunas especies de la familia del lenguado y en bacalao han sido identificadas las proteínas enolasa y creatinquinasa en bandas de pesos moleculares 51.000 y 42.000 kDa respectivamente (Perez Gordo M., Cuesta-Herranz, J., Maroto, A., Cases, B.; Ibáñez, M.; Vivanco, F.; and Pastor-Vargas, C. 2011). Similares resultados han sido obtenidos en muestras de bacalao, salmón y atún, cuyas bandas electroforéticas de 50kDa y 40kD fueron identificadas como beta-enolasas y fructosa-bisfosfato-aldolasas-A respectivamente, y que son enzimas abundantes e importantes involucradas en la glicólisis metabólica y degradación de azúcares durante la producción fisiológica de energía (Kuehn A., Hilger C. Lenhers-Weber C., Codreanu-Morel F., Morisset M., Metz-Favre C., Pauli G., de Blay F., Revets D., Muller C. Vogel L., Vieths S., and Hentges 2013; Liu R., Krishnan HB., Xue W., Liu C. 2011; Nakamura R., Satoh R., Nakahima Y., Kawasaki N., Yamaguchi T., Sawada J. (2009), referidos por Kuehn A., Swoboda I., Arumugam K., Hilger C. and Hentges F. (2014).

Es importante observar la desaparición de bandas de otros grupos de proteína en los electroforegramas. En jurel se observa ligera disminución de la densidad en las bandas del grupo I (51.000 a 53.000kDa) y su hidrólisis ante 15 minutos de acción térmica en polipéptidos de menor peso molecular (45.000 kDa), la hidrólisis en FGS parece ejercer una acción sinérgica al calor. El comportamiento en lorna es similar hasta el calentamiento por 10 minutos (antes y

después de ser tratados en FGS), sin embargo el efecto se muestra más severo a 15 minutos (L15 y L15D), es especialmente notoria la desaparición de las proteínas de este grupo I. El comportamiento de las proteínas de los grupos II y III sugiere permanente hidrólisis y agregación en bandas de valores intermedios. Beale et al., 2009 citado por Rehbein H. and Lopata L. (2011) demostraron en ese tipo de estudios la agregación polimérica de las diversas proteínas, algunas identificada con pesos moleculares de 55.000 kDa.

### **Efecto de los Tiempos de Calentamiento e Hidrólisis en FGS y su Relación con la Alergenicidad de PA**

El efecto de la hidrólisis en FGS para todos los tratamientos (incluyendo en muestras crudas J0 y L0) indica diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) (Anexos 15 y 16) y se considera apropiada su evaluación porque refiere la situación real de ingesta de pescado tal como lo sugieren Bowman C. and Selgrade M. (2008). En el presente estudio la determinación de la estabilidad de la CR de las PA contribuye a estimar su biodisponibilidad en aminoácidos, concluir si son digeribles y en especial su probabilidad para ejercer efectos adversos al ser consumida, lo cual concuerda con lo referido por Bowman C. and Selgrade M. (2008) y Shibahara Y, Uesaka, Y., Wang, J., Yamada S. and Shiomi K. (2013) quienes además observaron que las proteínas estables a la digestión presentan mayor probabilidad de provocar IgE y se asocian a mayor riesgo. Los estudios modernos de alergenidad se basan en la hidrólisis directa del sustrato por pepsina o FGS y algunos en combinación con tripsina y quimotripsina para una degradación más profunda. Actualmente el desarrollo de nuevos péptidos fármacos, requiere de la evaluación de su estabilidad digestiva antes de su administración. (Bowman C. and Selgrade M. 2008)

Cuando se realiza un análisis estadístico detallado comparando resultados de la acción térmica a 5, 10 y 15 minutos se encuentra que las CR se reducen en jurel en valores promedio de 63.50% y en lorna 83% respecto a los iniciales J0 y L0 (Tablas 19 y 21). En todos los casos (antes y

después de la hidrólisis en FGS en ambas especies) los valores obtenidos permiten deducir que la acción hidrolítica ejerció un efecto adicional que puede ser considerado sinérgico al calentamiento (Anexos 17, 18, 19 y 20).

La contrastación de hipótesis y la evaluación estadística indican que existen diferencias altamente significativas ( $\alpha = 0.05$ ) en el efecto de los tiempos de calentamiento (incluyendo en todos el efecto en FGS) la prueba Tukey muestra que el tratamiento de calentamiento por 15 minutos y su posterior hidrólisis en FGS (J15D) ejerce el efecto de mayor reducción de la CR de las PA en ambas especies. Estos resultados muestran gran concordancia con las observaciones de Arif S., and Hasnain A., (2010) quienes refieren la degradación de PA de diversas especies pesqueras como la pérdida de intensidad de las bandas en función del tiempo de calentamiento y con los estudios en esturión referidos por Rehbein L. and. Lopata A. L (2011) quienes informan que grado de estabilidad al calor de las PA determina su identificación y aislamiento.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la desnaturalización provocada en las PA de jurel y lorna por la acción térmica -sumada la hidrólisis gástrica- concuerdan con lo referido por numerosos autores respecto a la reducción de su alergenicidad (entre muchos otros investigadores, Fu T.J., Abbott R., Hatzos C.(2002), Thomas et al, 2004; Goodman, 2005; Sletten G., Egaas E., Lindvik H., Van Do T. and Florvaag E (2005), Bowman (2008), Coura Olivera T.; Lopes S.; Bressan J.,(2013).

En adición, la aplicación de pruebas de digestibilidad in vitro y de la técnica electroforética SDS-PAGE ha demostrado que los alérgenos de bacalao sufren considerable reducción de su alergenicidad cuando se encuentran degradados (Untersmayr E., Poulsen L., Platzer M., Pedersen M., Boltz-Nitulescu G., Stahl Skov P. and Jensen-Jarolim E., 2005), estableciendo la importancia del procesamiento térmico para mejorar la digestibilidad e inocuidad del alimento.

121 °C es una temperatura que se aplica en la elaboración de conservas. Las comparaciones entre efectos de la acción térmica a 15 minutos (Tablas 19 y 22) muestran las mayores reducciones de PA, hasta 63.50% y 79% en jurel y lorna. Estos valores se incrementan por el efecto adicional de la acción gástrica a 83.25% (J15D) y 79% (L15D) (Tablas 20 y 23). En todo caso, lo observado sugiere que el consumo de pescado en conserva podría presentar una alternativa para reducir las probabilidades de provocar alergenicidad en el consumidor. Incluso el calentamiento por 5 y 10 minutos provoca reducción de alrededor 50% en ambas especies. Al respecto Breiteneder and Mills (2005) estiman que en pescado enlatado las PA se reducen las probabilidades de alergenicidad de 100 a 200 veces comparado con la cocción simple, sin que esto signifique que no pueda ocasionar alergia, por cuanto se debe tomar en cuenta la cantidad y frecuencia de consumo. Pascual C., Martín E.M., Crespo JF. (1992) y Harumi K. (2006) referidos por Griesmeier también sugieren que el grado de actividad de los ligandos a IgE podría estar relacionado con la cantidad de consumo.

## CONCLUSIONES

1. El análisis estadístico de los resultados de caracterización física (tamaño), estado de frescura (sensorial y química) así como datos de cuantificación de proteína total y sarcoplasmática en las muestras demuestra su homogeneidad ( $\alpha=0.05$ ) y representatividad poblacional.
2. Los grupos de bandas proteicas correspondientes al rango de PM de PA extraídas del músculo (Arif S.H., Jabeen M. and Hasnain A., 2007) y analizados mediante densitometría de geles (electroforesis SDA-PAGE 12% acrilamida) alcanzaron valores de 6.999mg PA/100g y 7.329 mg PA/100g en lorna. En una primera aproximación, esta cantidad no sería considerada abundante de acuerdo a lo recomendado por la Autoridad Sanitaria de la Unión Europea (EFSA 2004) que refiere 5mg/g como la dosis mínima comunicada como causante de reacciones clínicas; obviamente la cantidad y frecuencia de ingesta son factores que requieren ser tomados en cuenta.
3. El tratamiento térmico aplicado a jurel 5 y 10 minutos ejerció un efecto de reducción de los valores iniciales a 53 y 51.75%, a 15 minutos el efecto fue mayor: 36.50%. En lorna los efectos térmicos mostraron mayor intensidad: a 5 minutos se produjo una reducción a 46.25% mientras que a 10 y 15 minutos se observó que sólo el 21 y 28.75% de los contenidos iniciales de PA permanecían. En todos los casos se observó una relación directamente proporcional entre el tiempo de tratamiento térmico y la permanencia de las bandas en la electroforesis.
4. De la aplicación de hidrólisis en FGS se observó un efecto sinérgico en todos los tratamientos que se sumaba a la antes descrita. En jurel los valores bajaron a 40.5 y 46.25% a los 5 y 10 minutos, a 15 minutos se produjo el mayor efecto de disminución: 16.75%. Similar comportamiento fue observado en lorna: a 5 y 10 minutos: 27.5 y 31.25% respectivamente, en tanto que a 15 minutos sólo el 17% de contenido inicial de bandas de PA permanecía.
5. En general, se observó en las imágenes de geles que las bandas –especialmente las de mayor peso molecular 51.000 a 53.000 kDa- también redujeron su densidad (cantidad) hasta

desaparición en muchos casos debido a los tratamientos más severos (J15, J15D y L15 y L15D), dando lugar a su agregación polimérica y la formación de otras bandas.

6. Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de esterilización a 121°C en conservas de pescado podría representar una alternativa para reducir las cantidades de PA y probabilidad alérgica al provocar la desorganización de sus moléculas .

## **RECOMENDACIONES**

1. La presencia de alérgenos es de máxima relevancia en la inocuidad de alimentos y la protección a la salud de las personas. Existe la necesidad de llenar el vacío de conocimiento sobre estudios epidemiológicos planteados en el ámbito de alérgenos alimentarios en nuestro país. Se recomienda con dicho fin considerar datos epidemiológicos, la incorporación de técnicas directas utilizando suero de individuos alérgicos a este alimento, factores como la cantidad de alérgeno que sensibiliza y provoca episodios alérgicos, la cantidad y frecuencia de alimento consumido así como la reactividad cruzada con otras especies pesqueras que contribuyan para establecer estrategias de diagnóstico.
2. En el ámbito de la seguridad alimentaria y nutrición, usualmente los individuos alérgicos al pescado u otro alimento optan por no consumirlo limitando así la ingesta en proteínas de alto valor biológico de un recurso nacional particularmente abundante. Si se toma en cuenta que los alimentos pesqueros son sometidos a procesos tecnológicos cada vez más diversos que incluyen etapas comunes tales como el corte, lavado o cocción, y que las cantidades de PA conforman la fracción de proteínas sarcoplasmáticas hidrosolubles, sus cantidades o estabilidad podrían ser afectadas. Es por ello importante investigar sobre la estabilidad de las PA en diversos tipos de productos pesqueros así como la sinergia con otros alimentos o las condiciones fisiológicas en el consumidor que podrían influir en la manifestación alérgica.

3. El aporte del presente estudio en el campo del comercio seguro de alimentos pesqueros se refiere al etiquetado preventivo –que se establece actualmente con mayor exigencia- especialmente para individuos alérgicos y en la identificación (autenticación de especies) o como marcadores para detectar residuos de pescado no declarados en alimentos evitando perjuicio económico (sustitución fraudulenta).
4. En relación a los métodos utilizados en el presente estudio, la aplicación de métodos electroforéticos y otros de separación de proteínas ofrecen la ventaja de evitar el uso de animales experimentales y personas. La Susceptibilidad a la Pepsina (digestión en FGS) es una prueba considerada por los expertos de FAO/OMS como el parámetro pertinente para identificar posibles alérgenos y que se utiliza hoy en día para la identificación de alimentos genéticamente modificados, Bowman C. and Selgrade M. (2008) refieren que el desarrollo de nuevos péptidos fármacos se basa en la evaluación de su estabilidad digestiva antes de su administración.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESAN. (2007). Informe del Comité Científico Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias.
- A.O.A.C.0 (1980). Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis. Washington, D.C
- Allen K y Dharmage S. (2010) The role of food allergy in the atopic march. *Clinical et Experimental Allergy* 40, 1439-1441.
- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA). Alergias e intolerancias alimentarias. <http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1352/index.html>. Leído el 12/07/2013.
- Akimov M. and Bezuglov (2012). Methods of Protein Digestive Stability Assay – State of the Art. En: *New Advances in the Basic and Clinical Gastroenterology*. Pp 211 – 232. Edited by Prof. Tomasz Brzozowsky. Intech Europe. University Campus
- Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico* N° 3. N° Referencia AESAN – 2007 – 001. Documento aprobado por el Comité Científico en sesión plenaria de 27 de febrero de 2007.
- Arif S.H.; Hasnain A. (2010). A major cross-reactive fish allergen with exceptional stability: Parvalbumin. *African Journal of Food Science*. Vol. 4 (3) pp 109-114. March 2010.
- Arif, S.; Jabeen, M.; and Hasnain, A. (2007). Biochemical characterization and thermostable capacity of parvalbumins: the major fish-food allergens. *Journal of Food Biochemistry* 31 (2007) 121–137.
- Asp, A y Abril J. (1999). *Procesos de Conservación de Alimentos*. Pp 494. Coedición A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Ayala M., Barriga M., Plácido M., Salas A. (2003). Longitud, peso y composición química proximal de seis peces marinos peruanos, durante enero a noviembre 2002. *Bol. Inv. Ins. Tec. Pes. Perú*. Col 5, dic. 2003
- Bannon G., Jen Fu T., Kimber I. and Hinton D. (2003). Protein Digestibility and Relevance to Allergenicity. *Environmental Health Perspectives*. Vol 111. Number 8. Pp 1122 – 1124. June 2003

- Barriga M., Ayala M., Plácido M y Salas A. (2003) Longitud, peso y composición química proximal de seis peces marinos peruanos, durante noviembre 2000 a noviembre 2001. Bol. Inv. Ins. Tec. Pes. Perú. Col 5, dic. 2003
- Barros A. and Cosme F. (2013). Allergenic Proteins in Foods and Beverages. Food Technol. Biotechnol. 51 (2) 153-158 (2013)
- Ben-Shoshan M., Harrington D., Soller L., Fragapane J., Joseph L., St Pierre Y., Godefroy S., Elliot., Clarke A. (2010). A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada J. Allergy Clin. Immunol. June 2010. (1327 – 1335)
- Besler, M., Steomjart, H., Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. J. Chrom.2001, 756, 207-218.
- Borres M., Ebisawa Mo,& Eigenmann P. (2011) Use or allergen components begins a new era in pediatric allergology. Review Article. Pediatric Allergy and immunology. 22 (2011) 454-461.
- Bowman C and Selgrade M. (2008) Differences in Allergenic Potential of Food Extracts following Oral Exposure in Mice Reflect Differences in Digestibility: Potential App (2013) roaches to Safety Assessment. Toxicological Sciences 102(1), 100–109 (2008)
- Braun A, Kwee L, Labow MA, Alsenz J.(1997). Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. Pharm Res1997;14:1472-8.
- Breitender H and Mills C. (2005). Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. J. Allergy Clin Immunol. Vol 115, Number 1. Pags 15-23.
- Bugajska-Shretter A., Elfman L., Fuchs t., Kapiotis s., Rumpold H., Valenta R., Spitzauer S. (2005). Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE- binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca depletion. Ann Allergy Asthma Immunol. Vol 101. Issue 1, January 1998, Pages 67-74.
- Bugajska-Schretter A., Grote M., Vangelista L., Valent P., Sperr W., Rumpold H., Pastore A., Reichelt R., Spitzauer (2000). Purification, biochemical and immunological characterization of a major food allergen: different immunoglobulin E recognition of the apo- and calcium bound forms of carp parvalbumin. Gut 2000, 46, 46, 5; page 661. ProQuest.

- Carballeda-Sangiao N., Olivares F., Rodriguez-Mahillo A., Careche M., Tejada M., Moneo I. and González-Muñoz M. (2014). *Journal of Food Protection*, Vol. 77, No. 4, 2014, Pages 605–609
- Carreras B. (2005). Cuantificación por Densitometría de la Proteína cry de *Bacillus thuringiensis*. *Gitosanidad*, vol. 9, num.1, marzo, 2005, pp. 43-46. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Cuba. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Sistema de Información Científica
- Carrera Mouriño M., Gallardo A.; Piñeiro J., Cañas C.; Lopez D; Vasquez Cobos D; y Barros L. (2010). Procedimiento para la Identificación de las especies comerciales de la Familia Merlucciidae, elementos necesarios y aplicaciones. Oficina Española de Patentes y Marcas. España. Fecha de Publicación. 16.04.2010. Patente 2336862.
- Carrillo W. (2013). Alergias alimentarias y la Influencia de los Métodos de Procesado. Actualización en Nutrición. Vol 14 – Nº 4 – Diciembre 2013.
- Chatterjee U.; Mondal, G.; Chakraborti, P.; patra H.; and Chatterjee B.P. (2006). Changes in the Allergenicity during Different Preparations of Pomfret, Hilsa, Bhetki and Mackerel Fish as Illustrated by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141:1–10.
- Chichon R., Belloque J., Alonso, E and Lopez-Fandino, R. (2008). Immunoreactivity and digestibility of high-pressure treated whey proteins. *Int. Dairy Journal*. 2008, 18:367-376.
- Ciardello M.A., Tamburrini, M.; Liso, M.; Crescenzo, R.; Rafaiani, Ch.; and Mari, A. (2013) *Food Research International* xxx (2013) xxx–xxx Received 17 October 2012. Received in revised form 28 February 2013. Accepted 8 March 2013.
- Closset J.I. (1976) Parvalbumins of white muscles of Gadida extraction and purification of the parvalbumins of the whiting (*Gadus merlangus* l.), of the coalfish (*G. virens* l.) and of the haddock (*G. aeglefinus* l.). *Comp. Biochem. Physiol*, 1976, Vol. 55B, pp. 531 to 535. Pergamon Press. Printed in Great Britain
- Cochran W.G. and Cox G.M. (1957). *Experimental Designs*. Second Edition. A Wiley International Edition.
- Codex Alimentarius.(2007). Food Labeling. Codex Alimentarius of General Standards for the Labelling of Pre-packaged foods (section 4.2.1.4). Fifth Edition.

- Coura Olivera T.; Lopes S.; Bressan J. (2013) Influences of different thermal processings in milk, bovine meat and frog protein structure. *Nutr Hosp.* 2013; 28(3):896-902
- Covadonga, M. (2006). *Alergias Alimentarias: el enemigo oculto*. Hospitalidad-esdai / julio-diciembre 2005. Pages 61 – 76.
- Culquichicón Z., Tresierra A. Solano A. y Atoche D. (2012). Crecimiento, mortalidad y tasa de explotación de *Sciaena deliciosa* Durante 2001 a 2003 y 2009 a 2012. *Revista Científica de la Facultad de ciencias biológicas. Universidad nacional de Trujillo. Perú. REBIOL* 2012, 32(2):108-117 (julio-diciembre 2012) pp. 108 - 117
- Dahlman-Hoglund A., Renstrom A., Acevedo F., and Andersson E. (2013). Exposure to Parvalbumin allergen and aerosols among herring processing workers. *Ann. Occup. Hyg.*, Vol. 57, No. 8, pp. 1020–1029, 2013
- Davis P.J., Smales C.M., James D.C. (2001). How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 2001; 56 (67): 56-60.
- Decreto Legislativo N° 1062. Decreto Legislativo que aprueba la Ley de Inocuidad de los Alimentos. En: *El Peruano*. Lima, Sábado 28 de junio de 2008. Normas Legales
- De Jongh H.; Lopez C.; Timmerman E.; Nordlee J.; Lee P.; Baumert J.; Hamilton R.; Taylor S. and Koppelman S. (2013). Digestibility and IgE-Binding of Glycosylated Codfish Parvalbumin. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 756789, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/756789>. Leído el 13 de agosto de 2017.
- Diaz-Perales A, Blanco C, Sanchez-Monge R, Varela J, Carrillo T, Salcedo G (2003). Analysis of avocado allergen (Prs a 1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:1002-7
- Dupon, D., Rolet-Ropecaud, O and Muller-Renaud, S. (2004). Determination of the Heat treatment Undergone by Milk by Following the Denaturation of  $\alpha$ -Lactalbumin with a biosensor. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52: 677-681.
- Dirección General de Ordenación e Inspección. Comunidad de Madrid. Edición: Sept.2010.
- El-Gaish S., Ahmadova A., Hadji-Sfaxi I., Elmecherfi K., Bazukyan I., Choiset Y., Rabesona H., Sitohy M., Popov Y., Kuliev A. Mozzi F., Chobert J., and Haertle T. (2011) Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology* 22 (2011) 509-516.

- FAO/OMS (2001). Consulta de Expertos sobre Alergenicidad de los Alimentos obtenidos por medios biotecnológicos llevada a cabo en Roma. 22 – 25 de enero de 2001
- FAO/WHO Codex Alimentarius Commission Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology (FAO/WHO). 2002. Report of the third session of the Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force on Foods derived from Biotechnology, ALINORM 03/34, March 4-8, 2002, [ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/Al03\\_34e.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/Al03_34e.pdf)
- FAO. 2006. FAO and Nutrition Paper 87.
- FAO, 2016. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura. Contribución a la Seguridad Alimentaria y la Nutrición para todos. FAO, 2016 – 15798ES/2/01.17FAO. 2016. Informe de Pesca. The State of world Fisheries and Aquaculture. Contributing to Food Security for Nutrition for All.
- Fernández-García P.; Vallejo-Seco G.; Livacid\_ rojas P. y Tuero-Herrero E. (2014). Vaidez Estructurada para una investigación cuasi-experimental de calidad. Se cumplen 50 años de la presentación en sociedad de los diseños cuasi-experimentales. *Anales de Psicología*, 2014, vol 30, N°2 (mayo), 736-771.
- Ferreira F., Hawranek T., Gruber P., Wopfner N., Mari A.(2004). Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. Review article. (2004) *Allergy* 2004: 59, 243-267.
- Food Reviews International (2001). 17(1), 65–88 (2001). Fish Sauce Products And Manufacturing: A Review
- Food Standards Agency (2013). Food allergy and intolerance. An overview of our research and work.
- Fu T.J., Abbott UR, Hatzos C. (2002). Digestibility of food allergens and non allergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – A comparative study. *J Agric Food Chem.*, 2002, 50: 7154-7160.
- Gajewski K., Hsieh Y. (2009). Monoclonal Antibody specific to a major fish allergen: Parvalbumin. *Journal of Food Protection*, Vol. 72, N° 4, 2009. Pages 818 – 825
- García-Berthou E., Alcaraz C., Benejam L., Benito J. (2009). Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Separata del capítulo 22. Diseño experimental y análisis de datos. Primera edición: abril 2009. ISBN. 978-84-96515-87-1. Edición en español, fundación BBVA 2009. 18p.

- Gomez, E.; Mayorga C; Gomez F.; Blásquez A.; Díaz Perales A.; Blanca M.; Torres M. (2013). Food allergy: management, diagnosis and treatment strategies. *Immunotherapy* (2013) 5(7), 755–768
- Góngora-Meléndez, M.; Sienna-Monge J.; Del Rio-Navarro B; y Avila L. (2010). Aproximación práctica al diagnóstico de la alergia alimentaria. Artículo de revisión. *Bol Med Hosp Infant Mex*. Vol. 67, Septiembre-Octubre 2010
- Griesmeier U., Vasquez-Cortes S., Bublin M., Radauer C., Ma Y., Briza P., Fernandez-Rivas M. & Breiteneder H. (2010). Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy* Volume: 65 Issue: 2 Pages: 191-198
- Hajeb P. and Selamat J. (2012). A contemporary review of Seafood Allergy. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2012) 42:365–385.
- Hanak P., Laknerova I., Svatora M. (2012). Second intron in the protein-coding region of the fish parvalbumin gene – a promising platform for polymerase chain reaction-based discrimination of fish meat of various species. *Journal fo Food and Nutrition Research*. Vol 51, 2012, N° 2, pp. 81-88.
- Hashimoto K., Watabe S. Kono M. and Shiro K. (1979) Muscle Protein Composition of Sardine and Mackerel. *Bull. of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 45 (11) 1435-1441
- Hansen T., Bindsley-Jensen C., Skov P., Poulsen L. (1996). Codfish allergy in Adults: Ige Cross-reactivity among fish species. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. Vol 78, Issue 2, Pages 187-194.
- Herman R., Store N., and Yong Gao. (2006). Digestion Assays in Allergenicity Assessment of Transgenic Proteins. Review. *Environmental Health Perspectives*. Volume 114, Number 8, pp 1154-1157. August 2006.
- Hidalgo, E.; Del Río B., Sierra J. (2009) Factores de riesgo de alergia alimentaria. *Rev Alergia Mex* 2009; 56(5): 158-164
- Hildebrandt S., Garber E. (2010). Effects of processing on detection and quantification of the parvalbumin gene in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Chemistry* 119 (2010). 75-80.
- Holt C, Sawyer L. (1993). Caseins as rheomorphic proteins: interpretation of the primary and secondary structures of alpha S1-beta- and kappacaseins. *J Chem Soc Farad Trans* 1993; 89:2683-92

- <http://snp.org.pe/wp/?p=1728> Leído: 27 de mayo 2013. [www.madrid.org](http://www.madrid.org). Leído el 03 de julio de 2013.
- <http://www.produce.gob.pe/index.php/estadistica/desembarque> Leído: 27 de junio 2013
- Huss H.H. (1999). El pescado fresco: Su calidad y cambios de su calidad. FAO Documento Técnico de Pesca 348. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Ministerio de Pesca. Dinamarca. Reimpresión 1999.
- IMARPE-ITP.(1996).Compendio Biológico Tecnológico de las principales especies hidrobiológicas comerciales del Perú. Inst. del Mar del Perú e Inst. Tec. Pesq. Del Perú. Callao, 144 p.
- Instituto del Mar del Perú. IMARPE. Tallas Mínimas y Porcentaje de Tolerancia Máxima de Juveniles de Recursos Hidrobiológicos. [http://www.imarpe.pe/imarpe/tallas\\_minimas/tallas\\_minimas.php](http://www.imarpe.pe/imarpe/tallas_minimas/tallas_minimas.php). Leído: el 14 de febrero de 2015.
- Instituto Nacional de Salud. (2009). Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. 8ª Edición. Publicación aprobada con RJ. N° 121-2008-OPD/INS
- Ivanciuc O, Mathura V, Midoro-Horiuti T, Braun W, Goldblum RM, Schein CH. (2003). Detecting potential IgE-reactive sites on food proteins using a sequence and structure database, SDAP-Food. *J Agric Food Chem*2003; 51:4830-7.
- Jenkins J., Breiteneder H., Mills C. (2007). Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*2007; Vol., 120, Number 6. Pp 1399-1405.
- Jimenez A., Ibáñez M., Fernández L., Alonso E., Laso (2001) *M.Alergol Inmunol Clin* 2001;16 (Extraordinario Núm. 2):203-270
- Jimenez-Saiz R. (2012). Digestibilidad, Alergenicidad in vitro y efecto inmunomodulador de proteínas de huevo procesado. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Física Aplicada. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM). Madrid
- Johansson S., Wold A., and Sandberg A. (2011) Low breast milk levels of long-chain n-3 fatty acids in allergic women despite frequent fish intake. *Clinical et Experimentalallergy*, 41, 505-515.

- Jongh H., Lopez C., Timmerman E., Nordlee J., Lee P.W., Baumert J., Hamilton R., Taylor S. and Koppelman S. (2013). Digestibility and IgE-Binding of Glycosylated Codfish Parvalbumin. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 756789, 10 pages
- Kanagawa Y., Matsumoto S., Koike S. and Imamura T. (2009) Association analysis of food allergens. *Pediatr Allergy Immunol* 2009: 20: 347-352.
- Kanamori, M.; Tanaka, H.; Hamada, Y.; Nagashima Y. and Shiomi, K. (2011). New extraction method suitable for immunoblotting analysis of fish allergens. *Eur Food Res Technol* (2011) 233:991–997.
- Kelso J., Jones R., Yunginger J. (2010) Monospecific allergy to swordfish. 2010. Vol 77, Issue 3, pages 227-228.
- Kenna, G. and Evans, M. (2000). Digestibility of proteins in simulated gastric fluid. *Toxicologist*. 2000, 54: 141.
- Kobayashi A., Tanaka H., Hamada Y., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K. (2006). Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 2006: 61: 357-363.
- Koppelman S., Nordlee J., Lee P., Happe R., Helsing M., Norland R., Manning T., Deschene R., De Jong G., and Taylor S. (2012). Parvalbumin in fish skin-derived gelatin: is there a risk for fish allergic consumers?. *Food Additives & Contaminants: Part A*. Vol 29, N° 9, September 2012, 1347-1355.
- Kuehn A., Swoboda I., Arumugam K., Hilger C. and Hentges F. (2014). Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Frontiers in immunology*. April 2014, Vol 5. Article 179.
- Kuehn A., Hilger C., Lenhers-Weber C., Codreanu-Morel F., Morisset M., Metz-Favre C., Pauli G., de Blay F., Revets D., Muller C., Vogel L., Vieths S., and Hentges (2013) Identification of enolases and aldolases as important fish allergens in cod, salmon and tuna: component resolved diagnosis using parvalbumin and new allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, 43, 811-822.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage. *Rev. Nature*, 227. Pp. 680-685 (1970)
- Larraín M.A., Vinagre J., Pérez L.M. (2001). Comparación de Procedimientos de Extracción de Proteínas aplicados a la identificación de cuatro especies chilenas de pescado usando

- electroforesis (Page-SDS). *Alimentos*. Vol. 24, N° 2. Sociedad Chilena de Tecnología de Alimentos.
- Lee, P.; Nordlee J.; Koppelman S.; Baumert J.; Taylor S. (2012) Measuring parvalbumin levels in fish muscle tissue: Relevance of muscle locations and storage conditions. *Food Chemistry* 135 (2012) 502–507
- Lehrer S.B., Ibanez M.D., McCants M.L., Daul C.B., Morgan J.E. (1990). Characterization of water-soluble shrimp allergens released during boiling. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:1005-13.
- López Pérez, G., Morfín B.M., Huerta López J., López López, J., Rivera Pérez, J.L., López Medina, L., Mejía Covarrubias, F., Aguilar, G., Vargas F. (2010). Factores de riesgo relacionados con enfermedades alérgicas en la Ciudad de México. *Revista Alergia México Volumen 57, Núm. 1, enero-febrero, 2010.*
- Lowry O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 265-275.
- Mavroudi A., Xinias I. (2011). Review Article. Dietary interventions for primary allergy prevention in infants. *Hippokratia* 2011.15, 3: 216-222
- Ministerio de la Producción. (2015) Boletín Estadístico Pesquero. Dirección de Estudios y Derechos Económicos Pesquero y Acuícolas. Noviembre 2014. 66 pags. <http://www.produce.gob.pe/images/stories/Repositorio/boletines2014/11/pesca.pdf> Leído: 09 de Junio de 2015.
- Ministerio De Salud Chile (2010). Subsecretaria De Salud Pública. Define Lista de Alérgenos Alimentarios que deben rotularse conforme al Artículo 107 Letra H Del Reglamento Sanitario De Los Alimentos. (Resolución N° 427 exenta). Publicada en el Diario Oficial de 03.07.10.
- Mohammdi M., Falak R., Mokhtarian K., Khoramizadeh M., Sadroddiny E. and Kardar G. (2016). Identification and Characterization of Main Allergic Proteins in Cooked Wolf Herring Fish. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* October 2016: 15 (5) 363-371.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickman, M., Bottrill, R and Mills N. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal.* 2005, 272: 341-352.

- Nuño-Gutierrez B., Celis de la Rosa A., Unikel-santocini C. (2009). Prevalencia y factores asociados a las conductas alimentarias de riesgo en adolescentes escolares de Guadalajara según sexo. *Revista de Investigación Clínica*. Vol 61, Num 4. Julio-agosto 2009. Pp 286-293.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota informativa INFOSAN N° 3/2006 – alergias Alimentarias.
- Pascual C., Reche M., Fiador A., Valbuena T., Cuevas T. y Esteban M. (2008). Fish allergy in childhood. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2008; 19; 573-579
- Pedraza M., Rodriguez A., (2004). Bases inmunológicas y moleculares de la alergenicidad. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. Vol 13, Num 1. Enero – Abril 2004. pp 5-10
- Peroni D., Bonomo B., Casarotto S., Bonner A. y Piacentini G. (2012). How changes in nutrition have influenced the development of allergic diseases in childhood. *Italian Journal of Pediatrics* 2012, 38: 22
- Perez-Gordo., M.; Cuesta-Herranz, J., Maroto, A., Cases, B.; Ibáñez, M.; Vivanco, F.; and Pastor-Vargas, C. (2011). Identification of sole parvalbumin as a major allergen: study of crossreactivity between parvalbumins in a Spanish fish-allergic population. *Clinical & Experimental Allergy*, 41, 750–758.
- Perú 21. (2015). <http://peru21.pe/mundo/gaston-acurio-promueve-campana-salvar-oceanos-y-alimentar-al-mundo-2214508>. Leído el 15 de abril de 2015.
- Prescott S., Nowak-Wegrzyn A. (2011). Strategies to prevent or reduce allergic disease. *Ann. Nutr Metab* 2011; (suppl 1): 28-42.
- Ramel A., Parra D., Martinez J., Kiely M y Thorsdottir I., (2009). Effects of seafood consumption and weight loss on fasting leptin and ghrelin concentrations in overweight and obese European young adults. *Eur.J.Nutr.* (2009) 48:107-114.
- Rehbein H., Lopata A. (2011). Presence of parvalbumin in different tissues of three sturgeon species (*Acipenser baeri*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*) *J. Appl. Ichthyol.* 27(219-225). Blackwell Verlag, Berlin. ISSN 075-8659
- Ring, J., Brockow, H. Behrendt. (2004). Adverse reactions to foods, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 756 (2011) 3–10. Y 7. H.A. Sampson, Update on food allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 113 (2004) 805–819

- Rodriguez-Ortiz, P.; Muñoz-Mendoza, D.; Arias-Cruz, A., González-Díaz, S., Herrera-Castro, D.; y Vidaurri-Ojeda, A. (2009). Características epidemiológicas de pacientes con alergia a alimentos atendidos en el Centro Regional de Alergias e Inmunología Clínica de Monterrey. Artículo Original. *Revista Alergia México* 2009; 56(6):185-91.
- Salas A., Ayala M., Albrecht M. (2003). Cuantificación de ácidos grasos omega 3 en aceite crudo de pescado producido en el Perú durante los años 1996 a 2000. *Bol. Inv. Ins. Tec. Pes. Perú*. Col 5, dic. 2003.
- Sanchez-Monge R, Blanco C, Perales AD, Collada C, Carrillo T, Aragoncillo C, Salcedo G. (2000). Class 1 chitinases, the panallergens responsible for the latex-fruit syndrome, are induced by ethylene treatment and inactivated by heating. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 190–195.
- Saulo A. A. (2008) Food Allergies – what you need to know. *Food Safety and Technology* . Sept 2008. FST 31
- Scheurer S, Lauer I, Foetisch K, Moncin MSM, Retzek M, Hartz C, Enrique E, Lidholm J, Cistero-Bahima A, Vieths S. (2004). Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 900–907.
- Shibahara Y, Uesaka, Y., Wang, J., Yamada S. and Shiomi K. (2013). A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fish protein in processed foods. *Food Chemistry* 136 (2013) 675–681
- Schnappinger M., Sausenthaler S. Linseisen J., Hauner H. Heinrich J. (2009). Fish consumption, allergic sensitization and allergic diseases in adults. *Annals of Nutrition and Metabolism* (2009) 54:67-64
- Shravani S. (2012) Food allergens and food Safety: a global perspective with respect to Codex Alimentarius
- Schutte L, Stoyanov S, Hammer G, Steinhart H, and Paschke A. (2010). In Vitro Determination of the Allergenic Potential of EggWhite in Processed Meat. *Journal of Allergy* Volume 2010, Article ID 238573, 5 pages. Hindawi Publishing Corporation.
- Sicherer S. (2004). Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:-159-65.

- Simoes D., Queiroz M.I, Volpato G. y Queiroz L. (2004). Desodorización de la base proteica de pescado (BPP) con ácido fosfórico. *Cienc.Tecnol.Aliment. Campinas*, 24 (1): 023-026, jan-mar. 2004
- Sioen, I. (2007). Importance of seafood as nutrient source in the diet of Belgian adolescents. *Journal of Human Nutrition & Dietetics*. Dec2007, Vol. 20 Issue 6, p580-589. 10p. 4 Charts
- Sletten G., Van Do T., Lindvik HI; Egaas E.; and Florvaag E. (2010) Effects of Industrial Processing on the Immunogenicity of Commonly Ingested Fish Species. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151:223–236
- Sletten G., Egaas E., Lindvik H., Van Do T. and Florvaag E (2005). *Molecular Immunology*. Vol 42, Issue 3, February 2005. Pages 345-353.
- Somkuti J., Smeller L. (2013). High pressure effects on allergen food proteins. *Biophysical Chemistry* 183 (2013) 19-29.
- Soler-Rivas C., Wichers H. (2001). Impact of biochemical and physical procedures on food allergen stability. *Allergy* 2001;56: Suppl. 67:52-55.
- Sotos Prieto M., Guillen M, Sorli J, Asensio E., Gillem Sáiz P, González J y Corella D. Consumo de carne y pescado en población mediterránea española de edad avanzada y alto riesgo cardiovascular. (2011) *Nutr.Hosp.* 2011; 26(5): 1033-1040.
- Sterzik V., Drendel V., Will M., and Bohnert M. (2012). Suicide of a man with known allergy to fish protein by ingesting tinned fish. *Forensic Science International* 221(2012)e4–e6.
- Sugita K., Kabashima K., Nakashima K. and Tokura Y. (2007). Oral allergy syndrome caused by raw fish in a Japanese sushi bar worker. *Contact Dermatitis*. Volume 56, Issue 6, pages 369–370, June 2007
- Sun M.; Liang Ch.; Gao H.; Lin, Ch.; and Deng M. (2009). Detection of Parvalbumin, a Common Fish Allergen Gene in Food, by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of AOAC International* vol. 92, Nº. 1, 2009.
- Tacon A. and Metlan M. (2009). Fishing for Feed or Fishing for Food. Increasing Global competition for Small Pelagic Forage Fish. *Ambio*; Sep 2009, 38, 6 biology Database pg. 294.

- Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H and Sawada, J. (2003). Comparative estudy of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol.Pharmacol. Bull.* 2003, 26: 969-973.
- Taylor L., Lehrer B. (1966). Principles and characteristics of food allergens. Critical review in *Food Science and Nutrition.* 1996, 36: S165-S186.
- The EFSA Journal (2004) 32, 1-197. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes (Request N° EFSA-Q-2003-016). (Adopted on 19 February 2004).
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Estdaile, D.J.(2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 2004, 39, 87-98
- Thompson MJ, Eisenberg D.(1999) Transproteomic evidence of a loop deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J Mol Biol* 1999; 290:595-604
- Tomida Perez Mitsuko.(2008). Impacto del Sistema General de Preferencias sobre los Productos Agroindustriales y Pesqueros exportados por el Perú a Japón (1996 – 2005). Trabajo premiado con el segundo puesto en el IV concurso de Investigación Juan Abugattás, convocado en el 2007 por la Red Peruana para Estudios del Asia Pacífico (Redap). *Cuad. Difus.* 13 (24), jun. 2008
- Tomotake H., Yamazaki, R. and Yamato M. (2012). An autoclave treatment reduces the solubility and antigenicity of an allergenic protein found in buckwheat flour. *JournalofFoodProtection*, Vol.75, No.6, 2012, Pages1172–1175
- Torres Borrego, J.; Martinez J. y Tejero García J. (2003). Reactividad cruzada entre pescados y mariscos. *Allergol et Immunopathol* 2003;31(3):146-51.
- Ugwu S., Apte S. (2004) *Pharmaceutical Technology.* March 2004. Pp 86-108
- Untersmayr E., Poulsen L., Platzer M., Pedersen M., Boltz-Nitulescu G., Stahl Skov P. and Jensen-Jarolim E. (2005). The effects of gastric digestion on codfish allergenicity. *J Allergy Clin Immunol.* February 2005. Pp 377 – 382.
- Untersmayr, E.; Vestergaard, H.; Malling HJ.; Boltz-Nitulescu, G.; Scheiner O.; Stahl P., Jensen-Jarolim E. and Poulsen L. (2007). Incomplete digestion of codfish represents a risk factor for anaphylaxis in patients with allergy. (*J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:711-7.)

- Untersmayr, E. and Jensen-Jarolim E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:1301-8
- USAID (Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional) Programa REDESA. (2006). Redes Sostenibles para la Seguridad Alimentaria. Alcances para la Producción de Trucha en jaulas artesanales. Huancané-Puno. USAID. Septiembre 2006.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Adamczyk, M., and Szatkowska, U. 2011. Marine and farmed fish in the Polish market: Comparison of the nutritional value. *Food Chem.* 126: 78-84.
- Van Do T., Elsayed S., Florvaag El, Hordvik I. Endresen C., 2005. Allergy to fish parvalbumins: Studies on the crossreactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J. Allergy Clin. Immunol.* Vol 116, Number 6. Pp1314 – 1320.
- Van Ree R. (2002). Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. *Biochem Soc Trans* 2002; 30:910-3.
- Vildoso A.; Vélez J.; Chirichigno N.; Chirinos A. (1998). Diversidad de los peces marinos del Perú. URI: <http://biblioimarpe.imarpe.gob.pe:8080/handle/123456789/984>
- Waegeneers N. et al (2013). Predicted dietary intake of selenium by the general adult population in Belgium. *Food Additives and Contaminants: Part jA*, 2013. Vol 30, No 2, 278-285
- Wild L, Lehrer S. (2005). Fish and Shellfish Allergy. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2005, 5: 74-79.
- Yamada s., Nolte H., and Zychlinsky E. (1999). Identification and characterization of alergens in two species of tuna fish. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. April 1999 vol 82, Issue 4, Pages 395 – 400
- Zubeldia M., Baeza M., Jauregui I., Senent C. (2012). Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA. Fundación BBVA, Fundación SEAIC. España.

## ANEXOS

### FICHA TÉCNICA DE LOS INSTRUMENTOS A UTILIZAR

#### 1. Análisis Descriptivo de las Características Físicas (Tamaño en cm) de las especies pesqueras Jurel y Lorna

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%	
	N	Promedio	Desviación estándar	CV	Límite Inferior	Límite Superior
Jurel						
Lorna						

#### 2. Análisis Descriptivo de las Características Sensoriales de las especies pesqueras Jurel y Lorna

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%	
	N	Promedio	Desviación estándar	CV	Límite Inferior	Límite Superior
Jurel						
Lorna						

**3. Análisis Descriptivo de las Características de Frescura Química de las especies pesqueras Jurel y Lorna**

**(Datos expresados en mg de N de bases volátiles /100 g de músculo dorsal)**

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%	
	N	Media	Desviación estándar	CV	Límite Inferior	Límite Superior
<b>Jurel</b>						
<b>Lorna</b>						

**Método Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 95/149/CE. (NºL 97/84–NºL 97/85–NºL 97/86)**

**4. Análisis Descriptivo del Contenido de Proteína Total de las especies pesqueras Jurel y Lorna**

**(Datos expresados en g de proteína / 100 g músculo dorsal)**

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%	
	N	Media	Desviación estándar	CV	Límite Inferior	Límite Superior
<b>Jurel</b>						
<b>Lorna</b>						

**5. Análisis Descriptivo del Contenido de Proteína Sarcoplasmática de las especies pesqueras Jurel y Lorna**

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%	
	N	Media	Desviación estándar	CV	Límite Inferior	Límite Superior
<b>Jurel:</b>  <b>ST</b>						
<b>Lorna</b>  <b>ST</b>						

ST = Sarcoplasmática total, datos expresados en g proteína /100 g proteína total

**6. Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas de las especies pesqueras Jurel y Lorna**

**(Datos expresados en mg/g músculo dorsal)**

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%			
	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	Mínimo	Máximo
Jurel								
Lorna								

**7. Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas Digeribles de las especies pesqueras Jurel y Lorna**

**(Datos expresados en mg/g músculo dorsal)**

Especie					Intervalo de confianza para la media al 95%			
	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	Mínimo	Máximo
Jurel								
Lorna								

**8. Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas de Jurel, sometidas a tratamiento térmico (\*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro(\*\*)**

**(Datos expresados en mg/g músculo dorsal)**

					Intervalo de confianza para la media al 95%			
	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	Mínimo	Máximo
<b>T<sub>0</sub></b>								
<b>T<sub>5</sub></b>								
<b>T<sub>10</sub></b>								
<b>T<sub>15</sub></b>								
<b>Total</b>								

(\*)T<sub>0</sub> =Sin Tratamiento térmico a 121 °C, con hidrólisis enzimática; T<sub>5</sub> = 5 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática; T<sub>10</sub> = 10 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática, T<sub>15</sub>= 15 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática

(\*\*) Hidrólisis en Fluido Gástrico simulado y 37 °C

**9. Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas de Lorna, sometidas a tratamiento térmico (\*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro(\*\*)**

**(Datos expresados en mg/g músculo dorsal)**

					Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior		
<b>T<sub>0</sub></b>								
<b>T<sub>5</sub></b>								
<b>T<sub>10</sub></b>								
<b>T<sub>15</sub></b>								
<b>Total</b>								

(\*)T<sub>0</sub> =Sin Tratamiento térmico a 121 °C, con hidrólisis enzimática; T<sub>5</sub> = 5 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática; T<sub>10</sub> = 10 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática, T<sub>15</sub>= 15 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática

(\*\*) Hidrólisis en Fluido Gástrico simulado y 37 °C

**10. Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas Digeribles de Jurel, sometidas a tratamiento térmico (\*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro (\*\*)**

**(Datos expresados en mg/g músculo dorsal)**

					Intervalo de confianza para la media al 95%			
	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	Mínimo	Máximo
<b>T<sub>0</sub></b>								
<b>T<sub>5</sub></b>								
<b>T<sub>10</sub></b>								
<b>T<sub>15</sub></b>								
<b>Total</b>								

(\*)T<sub>0</sub> =Sin Tratamiento térmico a 121 °C, con hidrólisis enzimática; T<sub>5</sub> = 5 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática; T<sub>10</sub> = 10 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática, T<sub>15</sub>= 15 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática

(\*\*) Hidrólisis en Fluido Gástrico simulado y 37 °C

**11. Análisis Descriptivo del Contenido de Parvalbúminas Digeribles de Lorna, sometidas a tratamiento térmico (\*) y posterior hidrólisis enzimática in vitro (\*\*)**

**(Datos expresados en mg/g músculo dorsal)**

					Intervalo de confianza para la media al 95%			
	N	Media	Desviación estándar	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior	Mínimo	Máximo
<b>T<sub>0</sub></b>								
<b>T<sub>5</sub></b>								
<b>T<sub>10</sub></b>								
<b>T<sub>15</sub></b>								
<b>Total</b>								

(\*) **T<sub>0</sub>** = Sin Tratamiento térmico a 121 °C, con hidrólisis enzimática; **T<sub>5</sub>** = 5 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática; **T<sub>10</sub>** = 10 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática; **T<sub>15</sub>** = 15 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática

(\*\*) Hidrólisis en Fluido Gástrico simulado y 37 °C

**12. Análisis Estadístico de Valores de diferencias de Estabilidad de PA antes y después de los tratamientos.**

**Jurel y lorna**

Especie	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite Inferior	Límite Superior		
Jurel								
Lorna								

**13. Análisis Estadístico de Valores de diferencias de digestibilidad entre PA antes y después de los tratamientos).**

**Jurel y Lorna**

	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio	F	Significancia
Intergrupos					
Intragrupos					
Total					

### 13. Resumen de variables y Análisis de Varianza (ANOVA) para Jurel.

JUREL:	ANOVA	p	Valoración de la prueba- S / NS*
Variación de tamaño		< 0. 05	
Variación de calificación sensorial			
Variación de calificación de frescura química			
Contenido de Proteína Total			
Contenido de Proteína Sarcoplasmática			
Contenido de PA <sup>(1)</sup>			
Contenido de PA Digeribles <sup>(1)</sup>			
Contenido de PA T <sub>0</sub>			
Contenido de PA T <sub>5</sub>			
Contenido de PA T <sub>10</sub>			
Contenido de PA T <sub>15</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>0</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>5</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>10</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>15</sub>			

(\*) Significativa/No significativa. (1) En muestras crudas

T<sub>0</sub> =Sin Tratamiento térmico a 121 °C, con hidrólisis enzimática; T<sub>5</sub> = 5 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática;  
T<sub>10</sub> = 10 minutos 121 °C y posterior hidrólisis enzimática, T<sub>15</sub>= 15 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática

#### 14. Resumen de variables y Análisis de Varianza (ANOVA) para Lorna.

JUREL:	ANOVA	p	Valoración de la prueba- S / NS*
Variación de tamaño		< 0. 05	
Variación de calificación sensorial			
Variación de calificación de frescura química			
Contenido de Proteína Total			
Contenido de Proteína Sarcoplasmática			
Contenido de PA <sup>(1)</sup>			
Contenido de PA Digeribles <sup>(1)</sup>			
Contenido de PA T <sub>0</sub>			
Contenido de PA T <sub>5</sub>			
Contenido de PA T <sub>10</sub>			
Contenido de PA T <sub>15</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>0</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>5</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>10</sub>			
Contenido de PA Digeribles T <sub>15</sub>			

(\*) Significativa/No significativa. (1) En muestras crudas

T<sub>0</sub> =Sin Tratamiento térmico a 121 °C, con hidrólisis enzimática; T<sub>5</sub> = 5 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática; T<sub>10</sub> = 10 minutos 121 °C y posterior hidrólisis enzimática, T<sub>15</sub>= 15 minutos a 121 °C y posterior hidrólisis enzimática.

## DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

### **Alérgenos Alimentarios**

La descripción del perfil alergénico de un alimento involucra la identificación de todas las moléculas potencialmente alergénicas que este contiene y que representan un número finito de proteínas, y los componentes restantes del proteoma de la fuente alergénica carecen de las características que ocasionan la activación del sistema inmune llevando a la reacción alérgica.

Una fuente alergénica puede contener más de un alérgeno. Algunas proteínas que parecían no alergénicas con algunos sujetos fueron reconocidos como alergénicos en una mayor población o en sujetos seleccionados en base a diferentes criterios. Por ejemplo, el alérgeno del kiwi apareció como no alergénico en sujetos que mostraban reacciones severas por su ingestión, sin embargo, esta proteína fue identificada como alérgeno cuando se evaluó en sujetos que reaccionaban alérgicamente con el polen de abejas. Se observa que sujetos alérgicos muestran patrones individuales de sensibilidad a moléculas alergénicas. (Ciardello M. et al 2013)

### **Alergia Alimentaria**

Constituye un tipo de reacción adversa a los alimentos, con una respuesta anormal atribuida a la ingesta, contacto o inhalación de un alimento (o sus derivados) o de un aditivo alimentario, que tiene su origen en un mecanismo inmunológico. Las reacciones adversas a los alimentos, alergias e intolerancias alimentarias, constituyen un problema de salud emergente. La incidencia de estas patologías presenta un aumento en los últimos años. La prevalencia de las alergias alimentarias se sitúa aproximadamente en el 1-3% de la población adulta y el 4-6% de la infantil. (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. 2004). El diagnóstico de la alergia alimentaria todavía es un ejercicio clínico que depende de una historia cuidadosa, de la determinación específica de IgE, pruebas de parche, una apropiada dieta de exclusión y la realización de reto cegado. (Góngora-Meléndez M. et al. 2010)

### **Anafilaxia**

Un choque anafiláctico es una reacción alérgica sistémica severa en todo el organismo, con peligro de muerte. Puede presentarse a los pocos minutos de la exposición al alimento. El tratamiento médico es indispensable. Puede ser ocasionada por medicamentos, picaduras de insectos, latex y alimentos. En el caso de individuos alérgicos, basta muy poco del alimento alergénico para causar la muerte. El cacahuete es uno de los alimentos capaces de provocar un choque anafiláctico. Junto con otras sustancias que se liberan dentro del torrente sanguíneo, las histaminas causan dilatación de los vasos e inflamación de los tejidos. La anafilaxia se caracteriza por: una caída súbita de la presión sanguínea, pérdida de la conciencia y arritmia cardiaca. Quien la sufre puede morir de un paro cardiaco a menos que inmediatamente se le administre adrenalina

para abrir los pulmones, ya que puede haber una obstrucción de las vías respiratorias. En quienes padecen asma y alguna alergia alimentaria, se incrementa el riesgo de sufrir un choque anafiláctico. (Covadonga, 2005)

### **Análisis de Frescura de pescado: N-BVT**

La determinación de bases totales es uno de los métodos más utilizados para evaluar la calidad de los productos pesqueros. N-BVT significa nitrógeno de bases volátiles totales, que son las que se generan como consecuencia de los procesos de deterioro de los productos pesqueros, tales como la trimetilamina, dimetilamina, amoníaco y otros compuestos nitrogenados básicos volátiles. Es una prueba muy importante considerando que el pescado recién capturado es un alimento altamente deseado por su valor nutritivo, sin embargo muy susceptible al deterioro.

### **Análisis Sensorial de Pescado**

Disciplina científica que es empleada para describir, medir, analizar e interpretar características de los alimentos. Presenta la ventaja de ser un método rápido y práctico. En el pescado se refiere principalmente a la apariencia y condición de frescura o al grado de deterioro que este ha sufrido. Puede involucrar aspectos de elementos extraños. Los atributos evaluados son olor, apariencia, color, textura, sabor. El pescado muy fresco presenta intensidad suave de atributos de olor y sabor.

### **Autoridad Sanitaria**

La Autoridad Sanitaria de un país está encargada de fiscalizar y sancionar disposiciones del Código Sanitario y de normativas que hayan sido dispuestas para asegurar la salud de los consumidores mediante el establecimiento de prácticas seguras de inocuidad y de facilitación del comercio de alimentos. La mayoría de autoridades sanitarias en el mundo se rigen por lo recomendado por Codex Alimentarius.

**Capacidad alergénica propia de cada alimento.** No bien definida, en probable relación con su contenido proteico, proteínas con peso molecular entre 10 y 100 kDa, presencia de epitopos secuenciales termoestables, presencia de inhibidores de proteasas (p.e., ovomucoide en la clara de huevo), etc.

### **Codex Alimentarius**

Es el Código Internacional de Alimentos. Una colección mundialmente reconocida de estándares, códigos de prácticas, guías y recomendaciones relativas a la protección de la inocuidad de alimentos. Se establece bajo el objetivo de la protección del consumidor y la facilitación del comercio. Oficialmente establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de Alimentación y Agricultura (FAO), reconocido por la Organización

Mundial de Comercio como referencia internacional para la resolución de conflictos o disputas concernientes a la inocuidad alimentaria. (FAO, 2010)

### **Electroforésis SDS-PAGE**

En un estudio de caracterización bioquímica y determinación de la termoestabilidad de las parvalbúminas, como uno de los principales alérgenos en productos pesqueros, estas moléculas fueron purificadas, caracterizadas y utilizadas para diferenciar su termoestabilidad. Para dicho fin fueron utilizados sistemas modificados de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), con dicha técnica se pudo determinar el peso molecular de estas proteínas. Adicionalmente fue aplicado isoelectroenfoque para establecer los perfiles electroforéticos. El estudio demostró la relevancia de la capacidad de termoestabilidad de estas proteínas. (Arif S. et al 2007)

### **Epítopo**

Un epítopo es también llamado “Determinante Antigénico” y constituye la porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente a secuencia a la cual se unen los anticuerpos –receptores de las células B o células T en estado soluble-. Este epítopo es la parte específica del antígeno que es reconocida por a zona de reconocimiento del antígeno. A su vez, cada antígeno viene determinado por sus epítopos.

### **Fluido Gástrico Simulado**

Es un fluido que simula las condiciones de “jugo gástrico” y que es utilizado a fin de estimar el efecto provocado sobre un alimento luego de la ingestión. Las pruebas en FGS son comparables al proceso de hidrólisis enzimática en el aparato digestivo y permiten evaluar la digestibilidad del alimento. El uso actual de la resistencia a la pepsina desarrollada en FGS es utilizado en el árbol de decisiones –aunque aún no de manera absoluta, ya que no todas las proteínas estables son capaces de inducir sensibilización alérgica- para la evaluación de alergenicidad potencial de proteínas. (Comité de Consulta de Expertos en Alergenicidad de Alimentos derivados de la Biotecnología de la FAO/OMS, 2001)

### **Incidencia y Prevalencia**

Ambas son medidas de frecuencia en Epidemiología. La Incidencia es la frecuencia de aparición de casos nuevos de un trastorno en un periodo de tiempo (puede ser tomado como número de nuevos casos). Se conoce la incidencia acumulada o el número de individuos que enferman durante el periodo de observación en relación al número de individuos libres de la enfermedad al comienzo del estudio.

La prevalencia es la proporción de individuos de una población que presentan un determinado trastorno en un momento dado, se mide relacionando el número de eventos presentados respecto al número de individuos totales.

### **Inocuidad**

La inocuidad alimentaria se refiere a las condiciones y prácticas que preservan la calidad de los alimentos para prevenir la contaminación y las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos (ETAs). Las ETAs son transmitidas por el consumo de los alimentos continúan siendo uno de los problemas más urgentes en Estados Unidos. De hecho, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDCs, por sus siglas en inglés) estima que 1 de 6 personas (48 millones) en los Estados Unidos se enferma, 128,000 son hospitalizadas y 3,000 mueren cada año a causa de enfermedades transmitidas por los alimentos. El Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos (FSIS, por sus siglas en inglés) del USDA educa a los consumidores acerca de la importancia del manejo seguro de los alimentos, y les guía para cómo reducir los riesgos asociados con tales enfermedades. En el campo de la inocuidad también se protege la salud de individuos sensibles a alérgenos, para lo cual se ha establecido el rotulado o etiquetado de alimentos.

**Otras sensibilizaciones no alimentarias asociadas.** Es frecuente la asociación de sensibilización a alimentos vegetales (frutas y hortalizas, principalmente) con sensibilizaciones a pólenes, pero no a otros neuroalérgenos, como los dermatofagoides. En estos casos se observa cómo, en general, la edad de comienzo de la sensibilización está más en relación con la edad de mayor frecuencia de aparición de polinosis que con la introducción de estos alimentos en la dieta. Estos hechos indican que la alergenicidad cruzada, demostrada entre varias especies de vegetales y pólenes puede ser un factor favorecedor de sensibilización a alimentos cuando un individuo está sensibilizado a pólenes, o viceversa. (AESAN, 2007).

### **Parvalbúminas**

Las parvalbúminas son pequeñas proteínas musculares que se ligan a calcio, con un peso de 12 kDa y conteniendo de 108 a 109 residuos de aminoácidos. Estas proteínas están presentes en grandes cantidades en el músculo blanco de vertebrados menores y en menores cantidades en el músculo de vertebrados mayores. Tienen función tampón o amortiguadora y posiblemente participan en los procesos de relajación del músculo. Su alergenicidad es enormemente reducida por el agotamiento de calcio. **(Kobayashi et al, 2006).**

Las parvalbúminas son los principales alérgenos para individuos que sufren de hipersensibilidad mediada por IgE a productos pesqueros. **(Perez-Gordo et al. 2011)**

### **Proteína de Alto Valor Biológico**

Una proteína de alto valor biológico es una proteína completa, significa que contiene todos los aminoácidos esenciales en elevadas cantidades. Es muy importante la provisión de proteínas de alto valor biológico por su requerimiento para construir otras proteínas. Un ejemplo de alimento de bajo valor biológico es el caso de los cereales, porque son deficientes en lisina (la contienen en muy poca cantidad). Entre las proteínas de mayor valor biológico se tiene las de origen animal: lácteos, huevo, carne y pescado

### **Reactividad Cruzada**

Se entiende por reactividad cruzada al reconocimiento de distintos antígenos por un mismo anticuerpo Ig E demostrable en el laboratorio mediante pruebas in vivo e in vitro. Ello se traduce clínicamente en alergia asociada a antígenos homólogos de distintas especies, normalmente relacionadas filogenéticamente;

de este modo, se estima que los alérgicos a un tipo de pescado presentan un riesgo de reacción a un segundo tipo del 50 %, mientras que para los alérgicos a un tipo de crustáceos es del 75%. Por otro lado, existen pacientes alérgicos a una clase de pescado o marisco que toleran otras especies o no reaccionan durante la provocación oral, indicando que la reactividad cruzada en las pruebas in vivo e in vitro son de relevancia clínica limitada, por lo que hablaríamos de sensibilizaciones asociadas más que alergias asociadas. **(Torres B. et al 2012)**

### **Riesgo Alimentario**

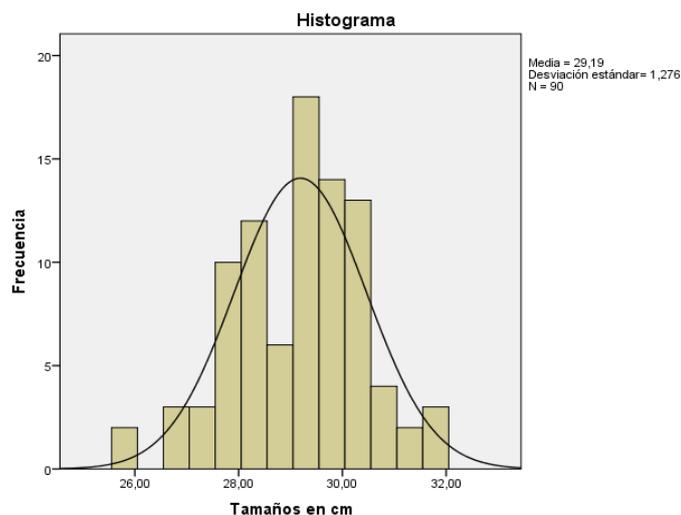
Existen factores favorecedores de la sensibilización en la alergia alimentaria mediada por IgE. No están precisados los factores que pueden favorecer la aparición de reacciones alérgicas no inmediatas a alimentos, no producidas por mecanismo dependiente de IgE. Muchas de ellas son de patogenia compleja, en las que se involucran también mecanismos de autoinmunidad. En algunos casos de enteropatías del lactante es posible una relación entre su aparición y el antecedente de un inicio precoz de una lactancia artificial o episodios de gastroenteritis agudas.

### **Tratamiento térmico de alimentos**

Se denomina así a la pasteurización, esterilización, cocción, tindalización, etc. La aplicación de algún tipo de tratamiento térmico a un alimento tiene como finalidad la destrucción de la carga microbiana que ocasione el deterioro en su calidad física, química o biológica, o que origine algún tipo de perjuicio en la salud del consumidor. También es aplicado para hacer palatable el alimento y para inactivar o eliminar agentes que comprometan su inocuidad. El calentamiento bajo diversas modalidades (pasteurización, esterilización, cocción) provoca desorden de las estructuras proteicas – pudiendo ocasionar su pérdida de alergenidad entre otros. La intensidad del tratamiento térmico se calcula en base a sus valores de tiempo y temperatura.

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

### ANEXO 1. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de tamaño (cm) de Jurel

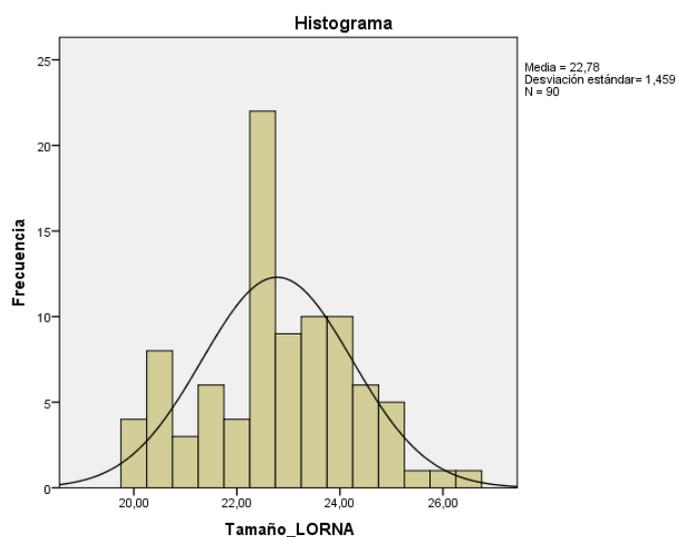


Descriptivos								
Tamaños JUREL								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	30	28,8633	1,16722	,21310	28,4275	29,2992	27,00	31,90
2	30	29,5267	1,44960	,26466	28,9854	30,0680	25,80	31,80
3	30	29,1800	1,14271	,20863	28,7533	29,6067	25,80	31,80
Total	90	29,1900	1,27606	,13451	28,9227	29,4573	25,80	31,90

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Tamaños en cm JUREL			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,662	2	87	,518

ANOVA					
Tamaños en cm					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6,605	2	3,302	2,077	,131
Dentro de grupos	138,316	87	1,590		
Total	144,921	89			

## ANEXO 2. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de tamaño (cm) de Lorna



<b>Descriptivos</b>								
Tamaño_LORNA								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	30	23,2400	1,36952	,25004	22,7286	23,7514	20,10	25,20
2	30	22,7667	1,50936	,27557	22,2031	23,3303	20,10	26,40
3	30	22,3333	1,39860	,25535	21,8111	22,8556	20,00	25,60
Total	90	22,7800	1,45927	,15382	22,4744	23,0856	20,00	26,40

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>			
Tamaño en cm_LORNA			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,011	2	87	,989

<b>ANOVA</b>					
Tamaño_LORNA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	12,339	2	6,169	3,029	,053
Dentro de grupos	177,185	87	2,037		
Total	189,524	89			

### ANEXO 3. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Evaluación Sensorial en Jurel

Descriptivos								
Frescura Jurel								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	30	4,1833	,24507	,04474	4,0918	4,2748	4,00	4,50
2	30	4,2167	,25200	,04601	4,1226	4,3108	4,00	4,50
3	30	4,2333	,25371	,04632	4,1386	4,3281	4,00	4,50
Total	90	4,2111	,24834	,02618	4,1591	4,2631	4,00	4,50

Prueba de homogeneidad de varianzas			
frescura			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,231	2	87	,297

ANOVA					
frescura					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,039	2	,019	,310	,734
Dentro de grupos	5,450	87	,063		
Total	5,489	89			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: frescura						
HSD Tukey						
(I) meses	(J) meses	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,03333	,06462	,864	-,1874	,1208
	3	-,05000	,06462	,720	-,2041	,1041
2	1	,03333	,06462	,864	-,1208	,1874
	3	-,01667	,06462	,964	-,1708	,1374
3	1	,05000	,06462	,720	-,1041	,2041
	2	,01667	,06462	,964	-,1374	,1708

## Subconjuntos homogéneos

<b>Análisis Sensorial</b>		
HSD Tukey <sup>a</sup>		
Subconjunto para alfa = 0.05		
meses	N	1
1	30	4,1833
2	30	4,2167
3	30	4,2333
Sig.		,720

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 30,000.

## ANEXO 4. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Evaluación Sensorial en Lorna

<b>Descriptivos</b>								
Frescura Lorna								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	30	4,2167	,25200	,04601	4,1226	4,3108	4,00	4,50
2	30	4,3000	,24914	,04549	4,2070	4,3930	4,00	4,50
3	30	4,1833	,24507	,04474	4,0918	4,2748	4,00	4,50
Total	90	4,2333	,25084	,02644	4,1808	4,2859	4,00	4,50

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>				
frescura				
Estadístico de	gl1	gl2	Sig.	
Levene				
,512	2	87	,601	

<b>ANOVA</b>					
frescura					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,217	2	,108	1,751	,180
Dentro de grupos	5,383	87	,062		
Total	5,600	89			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Analisis_sensorial						
HSD Tukey						
(I) Meses	(J) Meses	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,0833	,0642	,400	-,236	,070
	3	,0333	,0642	,862	-,120	,186
2	1	,0833	,0642	,400	-,070	,236
	3	,1167	,0642	,170	-,036	,270
3	1	-,0333	,0642	,862	-,186	,120
	2	-,1167	,0642	,170	-,270	,036

### Subconjuntos homogéneos

Analisis_sensorial		
HSD Tukey <sup>a</sup>		
Subconjunto para alfa = 0.05		
Meses	N	1
3	30	4,183
1	30	4,217
2	30	4,300
Sig.		,170

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 30,000.

### ANEXO 5. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Frescura Química (mg BVN/100g) en Jurel.

Descriptivos									
BVN_jurel									
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
1	3	30,5000	1,04403	,60277	27,9065	33,0935	29,80	31,70	
2	3	29,6667	1,98578	1,14649	24,7337	34,5996	27,50	31,40	
3	3	26,3000	1,15326	,66583	23,4352	29,1648	25,10	27,40	
Total	9	28,8222	2,30205	,76735	27,0527	30,5917	25,10	31,70	

Prueba de homogeneidad de varianzas				
BVN_jurel				
Estadístico de				
Levene	gl1	gl2	Sig.	
,948	2	6	,439	

ANOVA					
BVN_jurel					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	29,669	2	14,834	6,994	,027
Dentro de grupos	12,727	6	2,121		
Total	42,396	8			

**ANEXO 6. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Frescura Química (mg BVN/100g) en Lorna.**

Descriptivos								
BVN_lorna								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	28,3000	3,36006	1,93993	19,9531	36,6469	24,80	31,50
2	3	31,0000	1,00000	,57735	28,5159	33,4841	30,00	32,00
3	3	29,8333	1,75594	1,01379	25,4713	34,1953	28,00	31,50
Tota l	9	29,7111	2,28443	,76148	27,9551	31,4671	24,80	32,00

Prueba de homogeneidad de varianzas				
BVN_lorna				
Estadístico de				
Levene	gl1	gl2	Sig.	
1,508	2	6	,295	

ANOVA					
BVN_lorna					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,002	2	5,501	1,074	,399
Dentro de grupos	30,747	6	5,124		
Total	41,749	8			

**ANEXO 7. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Contenido de Proteína  
(g /100g) en Jurel.**

<b>Descriptivos</b>									
Proteinas_Jurel									
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
1	3	19,4867	,85541	,49387	17,3617	21,6116	18,50	20,02	
2	3	20,1000	,18083	,10440	19,6508	20,5492	19,91	20,27	
3	3	20,1300	,23516	,13577	19,5458	20,7142	19,97	20,40	
Total	9	19,9056	,55118	,18373	19,4819	20,3292	18,50	20,40	

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>				
Proteinas_Jurel				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
7,850	2	6	,021	

<b>ANOVA</b>					
Proteinas_Jurel					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,791	2	,395	1,447	,307
Dentro de grupos	1,639	6	,273		
Total	2,430	8			

<b>Pruebas robustas de igualdad de medias</b>				
Proteinas_Jurel				
Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.	
Welch	,667	2	3,544	,568
a. F distribuida de forma asintótica				

**ANEXO 8. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Proteína Total (g /100g) en Lorna.**

<b>Descriptivos</b>									
Proteinas_Lorna									
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
1	3	18,2500	,25060	,14468	17,6275	18,8725	18,01	18,51	
2	3	18,1800	1,33525	,77091	14,8630	21,4970	16,86	19,53	
3	3	18,4267	,78034	,45053	16,4882	20,3651	17,66	19,22	
Total	9	18,2856	,79106	,26369	17,6775	18,8936	16,86	19,53	

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>				
Proteinas_Lorna				
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.	
1,533	2	6	,290	

<b>ANOVA</b>					
Proteinas_Lorna					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,097	2	,048	,059	,943
Dentro de grupos	4,909	6	,818		
Total	5,006	8			

<b>Pruebas robustas de igualdad de medias</b>				
Proteinas_Lorna				
Estadístico <sup>a</sup>	gl1	gl2	Sig.	
Welch	,062	2	2,995	,941
a. F distribuida de forma asintótica				

**ANEXO 9. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Proteína Sarcoplasmática (g /100g) en Jurel.**

Descriptivos								
Prot_Sarco_jurel								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	5,1000	,30000	,17321	4,3548	5,8452	4,80	5,40
2	3	5,2533	,37005	,21365	4,3341	6,1726	4,88	5,62
3	3	4,5133	,12055	,06960	4,2139	4,8128	4,40	4,64
Total	9	4,9556	,41806	,13935	4,6342	5,2769	4,40	5,62

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Prot_Sarco_jurel			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,022	2	6	,979

ANOVA					
Prot_Sarco_jurel					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,756	2	,378	4,315	,069
Dentro de grupos	,526	6	,088		
Total	1,282	8			

**ANEXO 10. Análisis Estadístico Descriptivo para los datos de Proteína Sarcoplasmática (g /100g) en Lorna.**

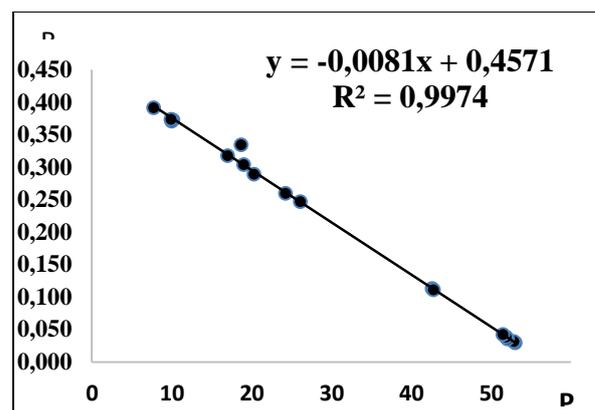
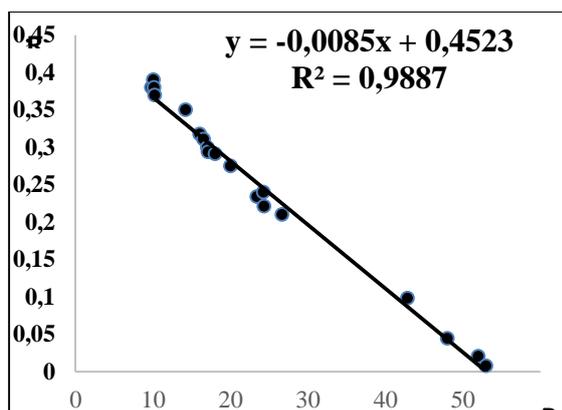
Descriptivos								
Prot_Sarco_lorna								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	4,6633	,18230	,10525	4,2105	5,1162	4,50	4,86
2	3	4,6433	,16289	,09404	4,2387	5,0480	4,53	4,83
3	3	4,7600	,09539	,05508	4,5230	4,9970	4,67	4,86
Total	9	4,6889	,14190	,04730	4,5798	4,7980	4,50	4,86

Prueba de homogeneidad de varianzas				
Prot_Sarco_lorna				
Estadístico de				
Levene	gl1	gl2	Sig.	
,857	2	6	,470	

ANOVA					
Prot_Sarco_lorna					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,023	2	,012	,509	,625
Dentro de grupos	,138	6	,023		
Total	,161	8			

**ANEXO 11. Ecuación de Regresión para los valores de Peso Molecular en proteínas de bajo peso molecular de jurel y la distancia recorrida (frente relativo recorrido).**

**ANEXO 12. Ecuación de Regresión para los valores de Peso Molecular en proteínas de bajo peso molecular de lorna y la distancia recorrida (frente relativo recorrido).**



**ANEXO 13. Análisis Estadístico Descriptivo ANOVA: Estabilidad de PA de jurel ante los tratamientos (tiempo de calentamiento + hidrólisis FGS)**

<b>ANOVA</b>					
Estabilidad PA jurel					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,141	7	,306	180,716	,000
Dentro de grupos	,041	24	,002		
Total	2,182	31			

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: Cantidad Relativa PA en jurel						
HSD Tukey						
Tiempo de Trat. Térmico	(J) Tiempo de Tratamiento Térmico	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
J0	J0D	,10000*	,02909	,038	,0036	,1964
	J5	,47000*	,02909	,000	,3736	,5664
	J5D	,59500*	,02909	,000	,4986	,6914
	J10	,48250*	,02909	,000	,3861	,5789
	J10D	,53750*	,02909	,000	,4411	,6339
	J15	,63500*	,02909	,000	,5386	,7314
	J15D	,83250*	,02909	,000	,7361	,9289
J0D	J0	-,10000*	,02909	,038	-,1964	-,0036
	J5	,37000*	,02909	,000	,2736	,4664
	J5D	,49500*	,02909	,000	,3986	,5914
	J10	,38250*	,02909	,000	,2861	,4789
	J10D	,43750*	,02909	,000	,3411	,5339
	J15	,53500*	,02909	,000	,4386	,6314
	J15D	,73250*	,02909	,000	,6361	,8289
J5	J0	-,47000*	,02909	,000	-,5664	-,3736
	J0D	-,37000*	,02909	,000	-,4664	-,2736
	J5D	,12500*	,02909	,005	,0286	,2214
	J10	,01250	,02909	1,000	-,0839	,1089
	J10D	,06750	,02909	,323	-,0289	,1639
	J15	,16500*	,02909	,000	,0686	,2614
	J15D	,36250*	,02909	,000	,2661	,4589
J5D	J0	-,59500*	,02909	,000	-,6914	-,4986
	J0D	-,49500*	,02909	,000	-,5914	-,3986
	J5	-,12500*	,02909	,005	-,2214	-,0286
	J10	-,11250*	,02909	,014	-,2089	-,0161
	J10D	-,05750	,02909	,516	-,1539	,0389
	J15	,04000	,02909	,860	-,0564	,1364
	J15D	,23750*	,02909	,000	,1411	,3339
J10	J0	-,48250*	,02909	,000	-,5789	-,3861
	J0D	-,38250*	,02909	,000	-,4789	-,2861
	J5	-,01250	,02909	1,000	-,1089	,0839

	J5D	,11250*	,02909	,014	,0161	,2089
	J10D	,05500	,02909	,570	-,0414	,1514
	J15	,15250*	,02909	,001	,0561	,2489
	J15D	,35000*	,02909	,000	,2536	,4464
J10D	J0	-,53750*	,02909	,000	-,6339	-,4411
	J0D	-,43750*	,02909	,000	-,5339	-,3411
	J5	-,06750	,02909	,323	-,1639	,0289
	J5D	,05750	,02909	,516	-,0389	,1539
	J10	-,05500	,02909	,570	-,1514	,0414
	J15	,09750*	,02909	,046	,0011	,1939
	J15D	,29500*	,02909	,000	,1986	,3914
J15	J0	-,63500*	,02909	,000	-,7314	-,5386
	J0D	-,53500*	,02909	,000	-,6314	-,4386
	J5	-,16500*	,02909	,000	-,2614	-,0686
	J5D	-,04000	,02909	,860	-,1364	,0564
	J10	-,15250*	,02909	,001	-,2489	-,0561
	J10D	-,09750*	,02909	,046	-,1939	-,0011
	J15D	,19750*	,02909	,000	,1011	,2939
J15D	J0	-,83250*	,02909	,000	-,9289	-,7361
	J0D	-,73250*	,02909	,000	-,8289	-,6361
	J5	-,36250*	,02909	,000	-,4589	-,2661
	J5D	-,23750*	,02909	,000	-,3339	-,1411
	J10	-,35000*	,02909	,000	-,4464	-,2536
	J10D	-,29500*	,02909	,000	-,3914	-,1986
	J15	-,19750*	,02909	,000	-,2939	-,1011

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Cant_Rel_PA_jurel							
HSD Tukey <sup>a</sup>							
Subconjunto para alfa = 0.05							
Tratam_jurel	N	1	2	3	4	5	6
J15D	4	,1675					
J15	4		,3650				
J5D	4		,4050	,4050			
J10D	4			,4625	,4625		
J10	4				,5175		
J5	4				,5300		
J0D	4					,9000	
J0	4						1,0000
Sig.		1,000	,860	,516	,323	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

**ANEXO 14. Análisis Estadístico Descriptivo ANOVA: Estabilidad de PA de lorna ante los tratamientos (tiempo de calentamiento + hidrólisis FGS)**

<b>ANOVA</b>					
Estabilidad_PA_lorna					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,325	7	,332	160,006	,000
Dentro de grupos	,050	24	,002		
Total	2,375	31			

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: Estabilidad_PA_lorna						
HSD Tukey						
(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
L0	L0D	,28500*	,03222	,000	,1783	,3917
	L5	,53750*	,03222	,000	,4308	,6442
	L5D	,72500*	,03222	,000	,6183	,8317
	L10	,71250*	,03222	,000	,6058	,8192
	L10D	,68750*	,03222	,000	,5808	,7942
	L15	,79000*	,03222	,000	,6833	,8967
	L15D	,83000*	,03222	,000	,7233	,9367
L0D	1,00	-,28500*	,03222	,000	-,3917	-,1783
	L5	,25250*	,03222	,000	,1458	,3592
	L5D	,44000*	,03222	,000	,3333	,5467
	L10	,42750*	,03222	,000	,3208	,5342
	L10D	,40250*	,03222	,000	,2958	,5092
	L15	,50500*	,03222	,000	,3983	,6117
	L15D	,54500*	,03222	,000	,4383	,6517
L5	1,00	-,53750*	,03222	,000	-,6442	-,4308
	L0D	-,25250*	,03222	,000	-,3592	-,1458
	L5D	,18750*	,03222	,000	,0808	,2942
	L10	,17500*	,03222	,000	,0683	,2817
	L10D	,15000*	,03222	,002	,0433	,2567
	L15	,25250*	,03222	,000	,1458	,3592
	L15D	,29250*	,03222	,000	,1858	,3992
L5D	1,00	-,72500*	,03222	,000	-,8317	-,6183
	L0D	-,44000*	,03222	,000	-,5467	-,3333
	L5	-,18750*	,03222	,000	-,2942	-,0808
	L10	-,01250	,03222	1,000	-,1192	,0942
	L10D	-,03750	,03222	,935	-,1442	,0692
	L15	,06500	,03222	,492	-,0417	,1717
	L15D	,10500	,03222	,056	-,0017	,2117
L10	1,00	-,71250*	,03222	,000	-,8192	-,6058
	L0D	-,42750*	,03222	,000	-,5342	-,3208
	L5	-,17500*	,03222	,000	-,2817	-,0683

	L5D	,01250	,03222	1,000	-,0942	,1192
	L10D	-,02500	,03222	,993	-,1317	,0817
	L15	,07750	,03222	,283	-,0292	,1842
	L15D	,11750*	,03222	,024	,0108	,2242
L10D	1,00	-,68750*	,03222	,000	-,7942	-,5808
	L0D	-,40250*	,03222	,000	-,5092	-,2958
	L10	-,15000*	,03222	,002	-,2567	-,0433
	L5D	,03750	,03222	,935	-,0692	,1442
	L10	,02500	,03222	,993	-,0817	,1317
	L15	,10250	,03222	,066	-,0042	,2092
	L15D	,14250*	,03222	,004	,0358	,2492
L15	1,00	-,79000*	,03222	,000	-,8967	-,6833
	L0D	-,50500*	,03222	,000	-,6117	-,3983
	L5	-,25250*	,03222	,000	-,3592	-,1458
	L5D	-,06500	,03222	,492	-,1717	,0417
	L10	-,07750	,03222	,283	-,1842	,0292
	L10D	-,10250	,03222	,066	-,2092	,0042
	L15D	,04000	,03222	,911	-,0667	,1467
L15D	1,00	-,83000*	,03222	,000	-,9367	-,7233
	L0D	-,54500*	,03222	,000	-,6517	-,4383
	L5	-,29250*	,03222	,000	-,3992	-,1858
	L5D	-,10500	,03222	,056	-,2117	,0017
	L10	-,11750*	,03222	,024	-,2242	-,0108
	L10D	-,14250*	,03222	,004	-,2492	-,0358
	L15D	-,04000	,03222	,911	-,1467	,0667

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Cant_Rel_PA_lorna						
HSD Tukey <sup>a</sup>						
Tratam_lorna	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
L15D	4	,1700				
L15	4	,2100	,2100			
L5D	4	,2750	,2750			
L10	4		,2875			
L10D	4		,3125			
L5	4			,4625		
L0D	4				,7150	
L0	4					1,0000
Sig.		,056	,066	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

**ANEXO 15. Análisis Estadístico Comparativo por pares: Estabilidad de PA de jurel, antes y después de hidrólisis en FGS**

**Tratamientos J0 y J0-D**

<b>Estadísticas de muestras emparejadas</b>					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratamiento 0min	1,5000	8	,53452	,18898
	Cant_Rel_PA	,9500	8	,05529	,01955

<b>Correlaciones de muestras emparejadas</b>				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Tratamiento & Cant_Rel_PA	8	-,967	,000

<b>Prueba de muestras emparejadas</b>									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratamiento - 0min	,55000	,58814	,20794	,05830	1,04170	2,645	7	,033
	Cant_Rel_PA								

**Tratamientos J5 y J5-D**

<b>Estadísticas de muestras emparejadas</b>					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratami_5min	1,5000	8	,53452	,18898
	Cant_Rel_PA	,4675	8	,07996	,02827

<b>Correlaciones de muestras emparejadas</b>				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Tratami_5min & Cant_Rel_PA	8	-,836	,010

Prueba de muestras emparejadas									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratami_5min - Cant_Rel_PA	1,03250	,60294	,21317	,52843	1,53657	4,844	7	,002

### Tratamientos J10 y J10D

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratam_10min	1,5000	8	,53452	,18898

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Tratami_10min & Cant_Rel_PA	8	-,836	,010

### Tratamientos J15 y J15D

Prueba de muestras emparejadas									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratam_10min - Cant_Rel_PA	1,0100	,56543	,19991	,53729	1,48271	5,052	7	,001

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratamiento_15min	1,5000	8	,53452	,18898
	Cant_Relat_PA	,2663	8	,11451	,04049

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Tratamiento_15min & Cant_Relat_PA	8	-,922	,001

Prueba de muestras emparejadas									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratamiento_15min - Cant_Relat_PA	1,2337 5	,64163	,22685	,69734	1,77016	5,439	7	,001

**ANEXO 16. Análisis Estadístico Comparativo por pares: Estabilidad de PA de lorna, antes y después de hidrólisis en FGS**

**Tratamientos L0 y L0-D**

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratamiento	1,5000	8	,53452	,18898
	Cant_Relat_L0	,8575	8	,15425	,05454

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Tratamiento & Cant_Relat_L0	8	-,988	,000

Prueba de muestras emparejadas									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig.
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratamiento - Cant_Relat_L0	,64250	,68729	,24299	,06791	1,21709	2,644	7	,033

### Tratamientos L5 y L5-D

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratamiento	1,5000	8	,53452	,18898
	Cantid_Relat_L5	,3688	8	,11432	,04042

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratamiento	1,5000	8	,53452	,18898
	Cantid_Relat_L5	,3688	8	,11432	,04042

Prueba de muestras emparejadas									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratamiento - Cantid_Relat_L5	1,13125	,63712	,22526	,59860	1,66390	5,022	7	,002

### Tratamientos L10 y L10-D

Estadísticas de muestras emparejadas					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Par 1	Tratamiento	1,5000	8	,53452	,18898
	Cant_Relat_L10	,3000	8	,04690	,01658

Correlaciones de muestras emparejadas				
		N	Correlación	Sig.
Par 1	Tratamiento & Cant_Relat_L10	8	,285	,494

<b>Prueba de muestras emparejadas</b>									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratamiento - Cant_Relat_L10	1,2000	,52310	,18494	,76268	1,63732	6,489	7	,000

### Tratamientos L15 y L15-D

<b>Estadísticas de muestras emparejadas</b>					
		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
	Cantid_Relat_PA	,1900	8	,04408	,01558

<b>Correlaciones de muestras emparejadas</b>				
		N	Correlación	Sig.

<b>Prueba de muestras emparejadas</b>									
Diferencias emparejadas									
		Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	Tratamiento - Cantid_Relat_PA	1,3100	,55724	,19701	,84414	1,77586	6,649	7	,000

**ANEXO 17. Análisis Estadístico Comparativo: Estabilidad de PA de jurel ante efecto de Tratamiento Térmico**

<b>ANOVA</b>					
Estabilidad_PA_jurel					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,908	3	,303	242,422	,000
Dentro de grupos	,015	12	,001		
Total	,923	15			

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: Estabilidad_PA_jurel						
HSD Tukey						
(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
Tiempo_de_calentamiento	Tiempo_de_calentamiento				Límite inferior	Límite superior
0 min	5 min	,47000*	,02498	,000	,3958	,5442
	10 min	,48250*	,02498	,000	,4083	,5567
	15 min	,63500*	,02498	,000	,5608	,7092
5 min	0 min	-,47000*	,02498	,000	-,5442	-,3958
	10 min	,01250	,02498	,957	-,0617	,0867
	15 min	,16500*	,02498	,000	,0908	,2392
10 min	0 min	-,48250*	,02498	,000	-,5567	-,4083
	5 min	-,01250	,02498	,957	-,0867	,0617
	15 min	,15250*	,02498	,000	,0783	,2267
15 min	0 min	-,63500*	,02498	,000	-,7092	-,5608
	5 min	-,16500*	,02498	,000	-,2392	-,0908
	10 min	-,15250*	,02498	,000	-,2267	-,0783

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

<b>Estabilidad_PA_jurel</b>				
HSD Tukey <sup>a</sup>		Subconjunto para alfa = 0.05		
Tiempo_de_Calentamiento	N	1	2	3
J15	4	,3650		
J10	4		,5175	
J5	4		,5300	
J0	4			1,0000
Sig.		1,000	,957	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

**ANEXO 18. Análisis Estadístico Comparativo: Estabilidad de PA de lorna ante el efecto de Tratamiento Térmico**

<b>ANOVA</b>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Estabilidad_PA_lorna					
Entre grupos	1,521	3	,507	293,214	,000
Dentro de grupos	,021	12	,002		
Total	1,542	15			

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: Estabilidad_PA_lorna						
HSD Tukey						
(I) Tiempo_de_calentamiento	(J) Tiempo_de_calentamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
o min	5 min	,53750*	,02940	,000	,4502	,6248
	10 min	,71250*	,02940	,000	,6252	,7998
	15 min	,79000*	,02940	,000	,7027	,8773
5 min	o min	-,53750*	,02940	,000	-,6248	-,4502
	10 min	,17500*	,02940	,000	,0877	,2623
	15 min	,25250*	,02940	,000	,1652	,3398
10 min	o min	-,71250*	,02940	,000	-,7998	-,6252
	5 min	-,17500*	,02940	,000	-,2623	-,0877
	15 min	,07750	,02940	,088	-,0098	,1648
15 min	o min	-,79000*	,02940	,000	-,8773	-,7027
	5 min	-,25250*	,02940	,000	-,3398	-,1652
	10 min	-,07750	,02940	,088	-,1648	,0098

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

<b>Estabilidad de PA lorna ante TT</b>				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
L15	4	,2100		
L10	4	,2875		
L5	4		,4625	
L0	4			1,0000
Sig.		,088	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

**ANEXO 19. Análisis Estadístico Comparativo: Estabilidad de PA en jurel ante la acción de hidrólisis (FGS) sobre muestras tratadas térmicamente**

ANOVA					
TT y Digestión	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,120	3	,373	174,616	,000
Dentro de grupos	,026	12	,002		
Total	1,145	15			

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: TT y Digestión						
HSD Tukey						
Tratamientos jurel	(J) Tratamientos jurel	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0min+digestion	5min+digestion	,49500*	,03269	,000	,3979	,5921
	10min+digestion	,43750*	,03269	,000	,3404	,5346
	15min+digestion	,73250*	,03269	,000	,6354	,8296
5min+digestion	0min+digestion	-,49500*	,03269	,000	-,5921	-,3979
	10min+digestion	-,05750	,03269	,338	-,1546	,0396
	15min+digestion	,23750*	,03269	,000	,1404	,3346
10min+digestion	0min+digestion	-,43750*	,03269	,000	-,5346	-,3404
	5min+digestion	,05750	,03269	,338	-,0396	,1546
	15min+digestion	,29500*	,03269	,000	,1979	,3921
15min+digestion	0min+digestion	-,73250*	,03269	,000	-,8296	-,6354
	5min+digestion	-,23750*	,03269	,000	-,3346	-,1404
	10min+digestion	-,29500*	,03269	,000	-,3921	-,1979

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Estabilidad PA jurel				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
Tiempo_calentam_jurel	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
J15	4	,1675		
J5	4		,4050	
J10	4		,4625	
J0	4			,9000
Sig.		1,000	,338	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

**ANEXO 20. Análisis Estadístico Comparativo: Estabilidad de PA en lorna ante la acción de hidrólisis (FGS) sobre muestras tratadas térmicamente**

ANOVA					
TT_y_digestion_lorna					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,685	3	,228	94,290	,000
Dentro de grupos	,029	12	,002		
Total	,714	15			

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: TT_y_digestion_lorna							
HSD Tukey							
(I) Tratamiento_lorna	(J) Tratamiento_lorna	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
0min+digestion	5min+digestion	,44000*	,03481	,000	,3367	,5433	
	10min+digestion	,40250*	,03481	,000	,2992	,5058	
	15min+digestion	,54500*	,03481	,000	,4417	,6483	
5min+digestion	0min+digestion	-,44000*	,03481	,000	-,5433	-,3367	
	10min+digestion	-,03750	,03481	,709	-,1408	,0658	
	15min+digestion	,10500*	,03481	,046	,0017	,2083	
10min+digestion	0min+digestion	-,40250*	,03481	,000	-,5058	-,2992	
	5min+digestion	,03750	,03481	,709	-,0658	,1408	
	15min+digestion	,14250*	,03481	,007	,0392	,2458	
15min+digestion	0min+digestion	-,54500*	,03481	,000	-,6483	-,4417	
	5min+digestion	-,10500*	,03481	,046	-,2083	-,0017	
	10min+digestion	-,14250*	,03481	,007	-,2458	-,0392	

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Estabilidad PA lorna ante TT y FGS				
HSD Tukey <sup>a</sup>				
Tiempo_calentam_lorna	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
L15	4	,1700		
L5	4		,2750	
L10	4		,3125	
L0	4			,7150
Sig.		1,000	,709	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Prueba Cutánea de Prick Test. Zubeldia M., Baeza M., Jauregui I., Senent C. (2012).
- Figura 2. Mecanismo de Desarrollo de Alergia (Elaboración propia, referencia imagen <https://www.google.com.pe/search?q=imagen+de+IgE&tbm=vista> el 13 agosto 2017).
- Figura 3. Parvalbúmina de bacalao. M: marcador de peso molecular, Cod: extracto PA bacalao.
- Figura 4. Perfiles de proteína en extractos de pescado pomfret (a), hilsa (b), bhetki (c) y caballa (d) separados en geles de 10% SDS-PAGE, bandas teñidas con Azul de Coomassie. M: marcador de peso molecular, R: extracto crudo, B: extracto cocido, F: extracto frito. (Chatterjee et al, 2006).
- Figura 5. Árbol de Decisiones FAO/OMS 2000. Evaluación del potencial alergénico de los alimentos derivados de cultivos modificados genéticamente. (Anexo 3. Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Enero 2001).
- Figura 6. Árbol de Decisiones FAO/OMS 2001. (Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos.)
- Figura 7. Representación Gráfica del Diseño Experimental del Estudio
- Figura 8. Descripción de la conformación de las Unidades de Muestreo.
- Figura 9. Representación Gráfica de las Curvas Estándar (Albúmina Bovina) para las determinaciones de Proteína Sarcoplasmática en las muestras de jurel y lorna (enero, febrero y marzo 2017)
- Figura 10. Protocolo seguido para la extracción de PA a partir de las muestras de músculo dorsal de jurel y de lorna.
- Figura 11. Pellets sometidos a tratamiento térmico 121°C a diferentes tiempos, J1: 5 minutos, J2: 10 minutos, J3: 15 minutos; L1: 5 minutos, L2: 10 minutos, L3: 15 minutos. Los pellets J y L no fueron sometidos a tratamiento térmico.
- Figura 12. Geles SDS-PAGE dentro de la cámara de electroforesis en los cuales se observa el desplazamiento de las proteínas (frente de corrida) puede ser visible gracias a la coloración que imprime el colorante azul de bromofenol
- Figura 13. Microcentrífuga Eppendorf® Minispin® and MiniSpin Plus personal microcentrifuge MiniSpin Plus with Blackline Rotor.
- Figura 14. Electroforesis de proteínas de bajo peso molecular en geles SDS-PAGE 5% para el gel de apilamiento y 20% para el gel de separación.
- Figura 15. Músculo de Jurel sin tratamiento térmico ni digestión en FGS (J-0)
- Figura 16. Muestras de Jurel sin tratamiento térmico sometidas a digestibilidad (J-0D)
- Figura 17. Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 5 minutos (J-5)
- Figura 18. Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 5 minutos y a digestibilidad (J-5D)
- Figura 19. Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 10 minutos (J-10)
- Figura 20. Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 10 minutos y a digestibilidad (J-10D)

Figura 21. Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 15 min (J-15)

Figura 22. Muestras de Jurel sometidas a 121°C durante 15 min y a digestibilidad (J-15D)

Figura 23. Electroforésis de proteínas de bajo peso molecular en geles SGS-PAGE 5% para el gel de apilamiento y 20% para el gel de separación.

Figura 24. Muestras de Lorna sin tratamiento térmico ni sometidas a digestibilidad (L-0)

Figura 25. Muestras de Lorna sin tratamiento térmico sometidas a digestibilidad (L-0 D)

Figura 26. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 5 min (L-5)

Figura 27. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 5 min y a digestibilidad (L5D)

Figura 28. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 10 min (L-10)

Figura 29. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 10 min y a digestión en FGS (L-10D)

Figura 30. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 15 min (L-15)

Figura 31. Muestras de Lorna sometidas a 121°C durante 15 min y a digestión en FGS (L-15D)

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Análisis Estadístico de las Características Físicas (Tamaño en cm) de Jurel y Lorna.

**Tabla 2.** Análisis Estadístico de las Características Sensoriales de Jurel y Lorna.

**Tabla 3.** Análisis Estadístico de las Características de Frescura Química (mg de N de bases volátiles /100 g de músculo dorsal) de Jurel y Lorna.

**Tabla 4.** Análisis Estadístico del Contenido de Proteína Total de Jurel y Lorna

**Tabla 5.** Análisis Estadístico del Contenido de Proteína Sarcoplasmática de Jurel y Lorna.

**Tabla 6.** Comparaciones Múltiples entre los Tratamientos aplicados en jurel (antes y después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

**Tabla 7.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en jurel (antes de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

**Tabla 8.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en jurel (después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

**Tabla 9.** Comparaciones Múltiples entre los Tratamientos aplicados en lorna (antes y después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

**Tabla 10.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en lorna (antes ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey

**Tabla 11.** Comparaciones entre los Tratamientos aplicados en lorna (después de ser sometidos a hidrólisis en FGS) Prueba Tukey