

**IDENTIFICACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS
(HAP), EN TRUCHA ARCO IRIS Y SU EFECTO GENOTOXICO, CULTIVADA EN
MUTISCUA-NORTE DE SANTANDER**

JAVIER EDUARDO NAVIA GARCIA

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA
2020**

**IDENTIFICACION DE HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS
(HAP), EN TRUCHA ARCO IRIS Y SU EFECTO GENOTOXICO, CULTIVADA EN
MUTISCUA-NORTE DE SANTANDER**

JAVIER EDUARDO NAVIA GARCIA

**Director
IVAN MELENDEZ GELVEZ
ALFONSO QUIJANO PARRA**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
PAMPLONA
2020**

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su gran ejemplo de superación, por su incondicional apoyo perfectamente en todo y demás amigos quienes de una u otra manera aportaron en la motivación para la conclusión del presente proyecto

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Iván Meléndez Gélvez por compartir su valioso conocimiento. Quien, con su sabiduría, y metodología me supo encaminar hacia la feliz culminación de este proyecto de investigación.

Al Doctor Alfonso Quijano Parra, por impulsar y apoyar la idea original de desarrollar este tipo de investigación, sin su apoyo, dedicación y asesoría, este trabajo no se llevaría a feliz término, por supuesto a Dios por permitir que el conocimiento sea fuente de bendiciones para el hombre y ayudar en el desarrollo de mejores estilos de vida que favorezcan el bienestar general.

RESUMEN

Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos (HAP) son compuestos reconocidos por la IARC como cancerígenos, se forman principalmente por la combustión incompleta de la materia orgánica. El Comité Mixto de la FAO/ OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2005) y el Grupo de Expertos de Contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) han determinado que 16 HAP son indiscutiblemente genotóxicos y carcinógenos para las personas. Además, los hidrocarburos Policíclicos aromáticos son compuestos orgánicos persistentes, la mayoría de estos son cancerígenos y tóxicos para los organismos vivos, en especial pueden bioacumularse en tejidos grasos de organismos acuáticos, y mantenerse en sedimentos del lecho acuático o ser movilizados por partículas suspendidas en el agua, llegando así a incorporarse a los peces del ecosistema. Bajo este contexto la acumulación de contaminantes en el pescado es cada vez más preocupante debido a los problemas de seguridad alimentaria y los riesgos potenciales para la salud humana, sumado al tipo de procesamiento del alimento llegando a tener una influencia significativa en los niveles de HAP presentes en este tipo de matrices alimentarias. El presente estudio se llevó a cabo en el municipio de Pamplona, las muestras fueron recolectadas en las empresas trucheras de la región de Mutiscua, en la vereda Tapagua, y fueron procesadas y analizadas en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de Pamplona. Los análisis se realizaron mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de llama de ionización FID, además las muestras de trucha fueron sometidas a tres tratamientos de cocción: en agua, fritura en aceite de oliva y fritura aceite de canola y girasol, y se aplicó el ensayo Cometa para establecer el potencial de genotoxicidad. Esta investigación permitió determinar la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como: acenaftileno, acenafteno, fluoranteno, pireno, benzo(a) antraceno, benzo(a)pireno y benzo (g) perileno; una vez se verificó la presencia de estos compuestos, se pudo establecer el grado de genotoxicidad desde según el porcentaje de ADN en la cola: 0 cuando no había daño (< 5 %); 1 cuando este era bajo (5-20%); 2 cuando era moderado (20-40%); 3 elevado (40-80%), y 4, extremo (> 80%), se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados y las variables longitud y altura del cometa que evidencian el grado de genotoxicidad.

Palabras Claves: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos, Trucha arco iris, Cromatografía, Genotoxicidad.

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) are compounds recognized by the IARC as carcinogens, they are mainly formed by the incomplete combustion of organic matter. The Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2005) and the Group of Contaminant Experts of the European Food Safety Authority (EFSA, 2008) have determined that 16 PAHs are indisputably genotoxic and carcinogenic to people. In addition, polycyclic aromatic hydrocarbons are persistent organic compounds, most of these are carcinogenic and toxic to living organisms, especially they can bioaccumulate in fatty tissues of aquatic organisms, and remain in sediments of the waterbed or be mobilized by particles suspended in the water, thus becoming incorporated into the fish of the ecosystem. Under this context, the accumulation of contaminants in fish is increasingly worrying due to food safety problems and potential risks to human health, added to the type of food processing, having a significant influence on the levels of PAH present in this type of food matrices. The present study was carried out in the municipality of Pamplona, the samples were collected in the trout companies of the Mutiscua region, in the Tapagua village, and were processed and analyzed in the Quality Control Laboratory of the University of Pamplona. The analyzes were performed using the gas chromatography technique with FID ionization flame detector, in addition the trout samples were subjected to three cooking treatments: in water, frying in olive oil and frying canola and sunflower oil, and He applied the Comet test to establish the potential for genotoxicity. This investigation allowed to determine the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons such as: acenaphthylene, acenaphthene, fluorantene, pyrene, benzo (a) anthracene, benzo (a) pyrene and benzo (g) perylene; Once the presence of these compounds was verified, the degree of genotoxicity could be established based on the percentage of DNA in the tail: 0 when there was no damage (<5%); 1 when it was low (5-20%); 2 when it was moderate (20-40%); 3 high (40-80%), and 4, extreme (> 80%), statistically significant differences were established between the treatments applied and the variables length and height of the comet that show the degree of genotoxicity.

Key Words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Rainbow Trout, Chromatography, Genotoxicity.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	5
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	8
3.1 Trucha arco iris.....	9
3.1.1 Hábitat y Biología.	10
3.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos	13
3.2.1 Mecanismos de formación de HAPs en alimentos.....	20
3.2.2 Sistemas de Fritura.....	22
3.2.3 Fritura discontinua	24
3.2.4 El proceso de fritura desde el punto de vista Toxicológico.	26
3.2.5 Mecanismo de acción del receptor de hidrocarburos que induce carcinogenicidad ...	28
3.3 Prueba de genotoxicidad en trucha arcoiris	31
3.3.1 Ensayo Cometa.....	31
3.3.2 Principio y método del ensayo	32
3.3.3 Análisis e interpretación del ensayo cometa	34
3.3.4 Relación de la presencia de HAP y el efecto genotóxico	36
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo general.....	40
4.2 Objetivos específicos.....	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1 Muestreo.....	41
5.1.1 Sitio de Muestreo.....	42
5.1.3 Toma de muestras.....	42
5.1.4 Detección de la actividad genotóxica	46

6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
7. RESULTADOS Y ANALISIS	50
8. CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

Lista de ilustraciones

<i>Ilustración 1.</i> Trucha arcoíris.....	10
<i>Ilustración 2.</i> Ciclo de Producción de trucha.....	12
Ilustración 3. Formas estructurales de los hidrocarburos.....	19
Ilustración 4. Poli cíclicos Aromáticos (PAHs)	30
Ilustración 5. Cola cometa.....	32
Ilustración 7 Imágenes del daño inducido en linfocitos humanos en muestras de extracto de trucha arcoíris, cultivada municipio de Mutiscua. (N.S).	64

Lista de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica de la Trucha Arcoíris.....	9
Tabla 2 Requerimientos para la producción de Trucha	13
Tabla 3 <i>Dieciséis hidrocarburos</i>	16
Tabla 4 Composición (%) ácidos grasos mayoritarios de los aceites más utilizados en fritura	23
Tabla 5. Especificaciones básicas para el aceite de fritura	24
Tabla 6 Principales grupos de compuestos formados en los aceites y grasas de fritura ...	26
Tabla 7 Formación de compuestos tóxicos a partir del proceso de fritura.....	27
Tabla 8. <i>Arreglo matricial para el diseño factorial</i>	48
Tabla 9. Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en trucha arcoíris.....	51
Tabla 10 Identificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	53
Tabla 11. Resultados de promedios de daño inducido en el ADN.....	55
Tabla 12 <i>Rango de Genotoxicidad</i>	57
Tabla 13. Resultados de ANOVA.....	59
Tabla 14. Resultados de comparaciones múltiples extractos de trucha arco iris sometidos a cocción en agua, crudo, aceite de girasol más canola.....	59

Lista de graficas

Grafica 1. Cromatograma correspondiente al extracto de trucha cruda M3-1	50
Grafica 2. Cromatograma correspondiente al extracto de trucha cocida M1-03	51
Grafica 3. Cromatograma frita en aceite de girasol + canola M3-43.....	51
Grafica 4. Medias daño genotóxico- Longitud y Altura del Cometa.....	58
Grafica 5. Comparación de medias entre Longitud y Altura del Cometa.....	61

Lista de anexos

Anexo A. Cromatograma Muestra de Trucha Cruda- Navia, (2017).....	77
Anexo B. Cromatograma Muestra de Trucha Cocida- Navia, (2017).....	77
Anexo C. Cromatograma Muestra de Trucha Cruda- Navia, (2017)	77
Anexo D. Cromatograma Muestra de Trucha frita en Aceite de Oliva.....	78
Anexo E. Cromatograma Muestras Trucha Cocida Fuente: - Navia, (2017).....	79
Anexo F. Cromatograma Muestra de Trucha frita en aceite girasol + canola.....	79
Anexo G. Información del Patrón Primario Restek	80
Anexo H. Cromatograma Patrón Estándar de los 18 PHAs (Restek EPA Method 8310 PAH Mix).....	82
Anexo I. Áreas bajo la curva, para diferentes concentraciones de patrón secundario	83
Anexo J. Curva de Calibración del NAP.....	84
Anexo K. Curva de Calibración del 1MNAP.....	85
Anexo L. Curva de Calibración del 2MNAP	86
Anexo M. Curva de Calibración del ACY	86
Anexo N. Curva de Calibración del ACE	87
Anexo O. Curva de Calibración del FLU.....	87
Anexo P. Curva de Calibración del PHE	88
Anexo Q. Curva de Calibración del ANT.....	88
Anexo R. Curva de Calibración del FLA.....	89
Anexo S. Curva de Calibración del PYR	89
Anexo T. Curva de Calibración del B(A)A.....	90
Anexo U. Curva de Calibración del CRI.....	90
Anexo V. Curva de Calibración de la mezcla B(B)F/B(K)F	91
Anexo W. Curva de Calibración del B(A)P.....	91
Anexo X. Curva de Calibración de la mezcla IND/D(AH)A.....	92
Anexo Y. Tiempos de retención de los patrones de los PHAs a diferentes concentraciones.....	92
Anexo Z. Constantes de la ecuación de línea recta y coeficiente de correlación curva de calibración	93
.....	
Anexo AA. Tiempos de retención promedio de los PHAs.....	94

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, se ha venido investigando la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), en diferentes matrices, tales como aire, suelo, agua entre otras; sin embargo, en los últimos 5 años la presencia de estos compuestos en alimentos ha cobrado cierta relevancia, pero no con la profundidad que esta requiere, por tratarse de un concepto integral, que involucre la seguridad e inocuidad alimentaria. Los HAPs, se forman principalmente por procesos pirolíticos, especialmente la combustión incompleta de materia orgánica a través de procedimientos naturales y antropogénicos, como incendios forestales, procesamiento de carbón, petróleo crudo, tráfico de vehículos, calefacción residencial, generación de energía industrial, cocinar, fumar y así entre otras actividades de la vida diaria. (Tamakawa, 2018).

En lo que corresponde al marco normativo, a nivel mundial existen organizaciones que han regulado y establecido rangos permisibles asociados a la presencia de HAPs en alimentos. El parlamento europeo establece junto con la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) dieciséis HAP, que han sido seleccionados como sustancias prioritarias para el monitoreo ambiental. Estos HAP incluyen: Antraceno, Benzo(a) antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo (b)fluoranteno, Benzo(e)pireno, Benzo(ghi) perileno, Benzo (j)fluoranteno, Benzo (k) fluoranteno, criseno, Dibenzo(ah)antraceno, Dibenzo (ah) pireno, Fluoranteno, Indeno(1,2,3)pireno, Naftaleno, Fenantreno y Pireno. (Regulation (EC). Estos HAP fueron seleccionados con base a su clasificación por tener "probables" o "posible" propiedades carcinogénicas para los humanos (Environmental Health Criteria (EHC) Genova-Italia1998)

En este sentido, la Agencia Internacional para la investigación del cáncer (IARC, 2003), describe en algunas monografías que la mayoría de los estudios para evaluar el potencial carcinogénico de los HAP fueron realizados por exposición dérmica, subcutánea o por inhalación. Sólo hay un número limitado de estudios que trataron sobre la administración oral. (Tamakawa, 2018); como el cáncer a menudo está relacionado con el daño en el ADN, es importante evaluar la genotoxicidad de estos compuestos químicos para estimar el potencial carcinogénico como lo describe (Quijano y Meléndez, 2011). Para evaluar la genotoxicidad de los químicos, se han desarrollado una variedad de pruebas a corto plazo entre ellos, el ensayo cometa siendo una prueba bien conocida (EPA, 1993). Se adelantará análisis a una matriz de alimentos, que en este caso es la trucha arcoíris, para poder establecer dentro de la inocuidad del producto si es causal de enfermedad el consumo de este alimento.

De acuerdo a lo anterior las técnicas de la analítica moderna permiten realizar mediciones altamente sensibles para la detección de HAPs en la atmósfera, en sedimentos, en agua., en suelo y en alimentos (Bayram y Müezzinoğlu, 1996); Guillen y Sopelana 2004). Así mismo, las técnicas disponibles para evidenciar la genotoxicidad, se encuentra el ensayo cometa, el cual se considera una herramienta ideal en estudios toxicológicos (Kuroda, Jain, Tezuka, & Kada, 1992; Avishai, Rabinowitz, Moiseeva, & Rinkevich, 2002; Collins, 2004). Se destaca por su rapidez, sencillez, sensibilidad y de bajo costo para la detección y el análisis de roturas en el ADN en las células individuales (Brendler, Hartmann, Pfuhler, & Speit, 2005).

(Tateno, 1998) examinó los HAP producidos a partir de verduras asadas, utilizando, pequeños pimientos dulces, pimiento verde, calabaza, berenjena, cebolla galesa, cebolla, maíz,

papas dulces, papas, hongos shiitake, hongos shimeji y hongos matsutake donde se detectaron mayores cantidades de HAP carcinogénicos después de asar las verduras. (Zohair, 2006) informó el efecto de diferentes oxidantes para eliminar los HAP de zanahorias naturalmente contaminadas. Una solución de hojas de col fueron los más eficientes en eliminar los HAP, seguido de una solución de H₂O₂ y KMnO₄. Así mismo, (Turkdogan et al, 2003). mostró el papel carcinogénico de los alimentos tradicionales horneados o cocidos con aceite en el este de Turquía (región de Van), debido a los altos niveles de B [a] P y B [a] A. Dependiendo del tipo de procesamiento y de preparación en muestras de alimentos (asar, freír, cocer) como carne a la brasa o los alimentos asados, puede contener niveles extremadamente altos de HAP, incluidos los representantes cancerígenos tales como: benzo [a] pireno (B [a] P;) (Lodovici et al. 1995).

Finalmente, la importancia en la presente investigación es establecer la presencia de hidrocarburos aromáticos en alimentos de alto consumo en la zona de influencia, como es la trucha arcoíris y los riesgos asociados a la ingesta, como lo describe Yaging et al, 2018, quienes investigaron la detección de HAPs en un lapso de tiempo de 20 años, y establecieron que pueden migrar del medio ambiente a los cultivos y alimentos, tales como aceites, frutas y verduras, mariscos, alimentos ahumados y productos de panadería (Hong et al., 2016; Silva, Torres, Almeida, y Sampaio, 2018; Wang et al., 2018). Así mismo, concluyeron que los procesos de producción de alimentos, especialmente aquellos que utilizan altas temperaturas, como hornear, fumar, freír y asar, aumenta la probabilidad que se generen y acumulen grandes cantidades de HAP. Incluso, aceites y grasas, como el aceite de oliva han sido objeto de investigaciones, la mayoría de los HAP son altamente lipófilos, lo que conduce a la presencia generalizada de HAP en diversos aceites vegetales. Adicionalmente, entre los aceites contaminados con HAP, los aceites comestibles, suscita gran preocupación debido al alto nivel de HAP en aceite de orujo de

oliva; pero la ingesta diaria de estos compuestos si determina la presencia de carcinogenicidad, por lo tanto el objetivo de esta investigación fue Identificar los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), en trucha arco iris cruda y sometida a fritura y el efecto genotóxico producido, la cual fue cultivada en la zona de Mutiscua departamento Norte de Santander

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

¿Existen HAP en extractos de trucha arco iris cruda y sometida a cocción, y si estos podrán inducir algún tipo de daño genotóxico en células humanas?

Los problemas generados por inocuidad de los alimentos, evidencian un incremento en las enfermedades de origen alimentario en las últimas tres décadas, la trucha variedad arcoíris se ha considerado como un producto de alto riesgo y no es la excepción de este tipo de brotes y enfermedades. El crecimiento del comercio pesquero internacional evidenció un incremento en las últimas tres décadas, la exportación se incrementó de 8000 millones de dólares en 1976 a 102500 millones de dólares en 2010 (FAO, 2012). El pescado destinado para el consumo humano es comercializado principalmente en las presentaciones: fresco o refrigerado (46,9 %), seguido del pescado congelado (29,3 %), elaborado o en conserva (14,0 %) y curado (9,8 %) (FAO, 2012).

Dentro del contexto nacional son solo tres o cuatro empresas, las cuales han logrado normalizar la producción con calidad constante. Salvo pocas excepciones, los proyectos están siendo ejecutados sin cumplir las normas de calidad exigidas en los mercados internacionales (España, 2012). En esta perspectiva la falta de compromiso al no cumplir la normatividad para la exportación de trucha, genera un alto riesgo para Colombia, pues estos productores no son conscientes de los alcances, generando el cierre de la frontera comercial. (España, 2012).

A nivel regional la producción de trucha arcoíris se da principalmente en el municipio de Mutiscua, la cual es de aproximadamente 25 toneladas /mes, convirtiéndose en el mayor productor de trucha del departamento, generando 40 empleos directos y 100 empleos indirectos. (Colombia, Norte de Santander).

Consecuentemente la contaminación del agua puede ser un serio problema para la salud humana y un riesgo para el ecosistema acuático. A nivel mundial se ha determinado que las aguas de los ríos contaminados presentan propiedades genotóxicas (Ohe et al., 2003), debido a compuestos tales como las aminas heterocíclicas (AHs) (Ohe, 1997), formadas en las partes quemadas de carnes fritas y asadas, que pueden llegar al agua a través de la orina y heces fecales (Ushiyama et al., 1991; Sousa et al., 1995); los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) formados por la combustión incompleta del material orgánico (Marston *et al* 2001; Yang *et al* 2003), entre otros desechos (Kleinsasser *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2001).

Estos últimos los HAP's son compuestos orgánicos persistentes, la mayoría de estos son cancerígenos y tóxicos para los seres vivos, en especial pueden bioacumularse en tejidos grasos de organismos acuáticos, y mantenerse en sedimentos del lecho acuático o ser movilizados por partículas suspendidas en el agua, llegando así a incorporarse a los peces del ecosistema (Mastandrea *et al.*, 2005).

En cuanto a las especies de peces sometidos a la acuicultura, la mayoría de los datos toxicológicos proceden de peces silvestres y se centran principalmente en peces de agua dulce, pero muy poco se sabe de otras especies cultivadas. La dorada (*Sparus aurata L.*), es la especie

de espáridos económicamente más importante cultivada a lo largo de las costas del Mediterráneo, y se ha demostrado una especie muy sensible a la aguda exposición de benzo(a)pireno. En un estudio preliminar realizado por (Navia *et. al.* 2013), en trucha arcoíris producida en Mutiscua, se detectó benzo(a)pireno el cual es un hidrocarburo policíclico aromático considerado cancerígeno y contaminante prioritario según la (USEPA) y la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC).

En este sentido, podemos distinguir el proceso de fritura en profundidad; el cual es uno de los más antiguos de preparación de alimentos, donde se usan las grasas y aceites como medio de transferencia de calor (Badui *et al.*,2006). El producto frito absorbe una elevada cantidad de la grasa que constituye el medio de fritura, y acumula una cierta proporción de compuestos de alteración. Dichos compuestos, por encima de ciertas concentraciones, pueden afectar la calidad del alimento y utilizados de forma persistente, generan sustancias tóxicas con presumible potencial carcinógeno (Soriano *et al.*, 2002).

Los hallazgos encontrados a partir de este ensayo, permitirán establecer cuáles son los factores de riesgo asociados a la cría de la trucha arcoíris, a la detección de HAP en la zona de crianza y así establecer la seguridad alimentaria asociada al consumo de este alimento de alto valor nutricional, relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, considerando que es un producto de gran demanda en el departamento de Norte de Santander, y en otros lugares de la geografía colombiana.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Como lo contempla la Constitución política de Colombia en su artículo 44 el cual establece el derecho a la alimentación equilibrada como un derecho fundamental de los niños y, en cuanto a la oferta y la producción agrícola, los artículos 64, 65 y 66 de la Constitución establecen los deberes del Estado en esta materia. Dentro de estos deberes esta formulado en el Plan Nacional de Desarrollo 2006-2010 reconocer la importancia de formular una política de seguridad alimentaria y nutricional como una de las estrategias para lograr la garantía de los derechos fundamentales, económicos y sociales; el fortalecimiento del capital humano, de las condiciones regionales de desarrollo y paz, de la institucionalidad del Estado y la reducción de la pobreza. Así, prevé acciones estratégicas enmarcadas en la promoción social y el manejo social del riesgo (MSR) CONPES 113 de 2007.

Como se ha señalado, la seguridad alimentaria como política del estado es una prioridad para establecer el desarrollo de las comunidades y de la inocuidad de los productos alimenticios a ser consumidos de manera efectiva.

El decreto 3075 de 1997 contempla la definición de alimento de mayor riesgo en salud pública: “Alimento que, en razón a sus características de composición especialmente en sus contenidos de nutrientes, (Aw) actividad acuosa y pH, favorece el crecimiento microbiano y por consiguiente, cualquier deficiencia en su proceso, manipulación, conservación, transporte, distribución y comercialización, puede ocasionar trastornos a la salud del consumidor” Decreto

3075 de 1997. Según esta definición la trucha arcoíris está enmarcada dentro de todas las características de este concepto por lo que se explica las condiciones generales de este producto.

3.1 Trucha arco iris

La trucha arco iris tiene una distribución amplia que va desde Alaska hasta la Patagonia en sur América, en el cuadro 1 se observa la clasificación taxonómica. Se introdujo en aguas de todos los continentes excepto la Antártica, algunas con fines recreacionales y otras para la acuicultura, esta distribución permitió el desarrollo de varios linajes o cepas locales domesticadas

Tabla 1

Clasificación taxonómica de la Trucha Arcoíris

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Pisces
Clase	Osteichthyes
Subclase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Genero	Onchorhynchus
Especie	Mykiss
Nombre Científico	<i>Onchorhynchus mykiss</i>
Nombre Común	Trucha arco iris

Fuente: Padrón *et. al.*, 2010

3.1.1 Rasgos Biológicos.

Cuerpo de forma alargada, fusiforme con 60-66 vértebras, 3-4 espinas dorsales, 10-12 rayos dorsales blandos, 3-4 espinas anales, 8-12 rayos anales blandos, 19 rayos caudales.

Aleta adiposa presente, usualmente con borde negro. Sin tubérculos nupciales, pero ocurren cambios menores en la cabeza, boca y color de los machos desovantes.

Coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella. Lomo, costados, cabeza y aletas cubiertas con pequeños puntos negros. La coloración varía con el hábitat, tamaño, y condición sexual. Tendencia de los residentes en corrientes y de los desovantes a ser más oscuros con color más intenso, mientras que los residentes de lagos son más brillantes y más plateados.

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es.



*Ilustración 1. Trucha arcoíris
Padrón et. al., (2010)*

3.1.1 Hábitat y Biología.

Según la FAO (2013), en su programa de información de especies acuáticas manifiesta que la trucha arco iris es un pez resistente y fácil de desovar, de crecimiento rápido, tolerante a una amplia gama de ambientes y manipulaciones; los alevines grandes (que usualmente comen zooplancton) pueden ser iniciados fácilmente en la alimentación con una dieta artificial. La trucha arco iris es capaz de ocupar muchos hábitats diferentes, que abarcan desde un ciclo de

vida anádromo (que vive en el océano, pero desova en ríos y corrientes con fondos de grava, flujos rápidos y bien oxigenados) hasta habitar de manera permanente en lagos. La cepa o linaje anádromo es conocida por su crecimiento rápido, alcanzando 7-10 kg dentro de 3 años, mientras que la cepa de agua dulce sólo puede alcanzar 4.5 kg en el mismo lapso. La especie puede soportar amplias gamas de variación de temperatura (0-27 °C), pero el desove y crecimiento ocurren en una gama más estrecha (9-14 °C).

La temperatura óptima del agua para el cultivo de trucha arco iris está por debajo de 21 °C. Como resultado, la temperatura y disponibilidad de alimento influyen el crecimiento y la maduración, haciendo que la edad de madurez varíe; aunque por lo general es 3-4 años.

Asimismo, el Departamento de pesca y Agricultura de la FAO (2013), argumenta que las hembras son capaces de producir hasta 2000 huevos/kg de peso corporal. Los huevos son de diámetros relativamente grandes (3-7 mm). La mayoría de los peces desova sólo una vez, en primavera (enero-mayo), aunque la crianza selectiva y el ajuste del fotoperiodo ha producido cepas de criadero que pueden madurar más temprano y desovar todo el año. La selección de características superiores también se logra por entrecruzamiento, aumentando las tasas de crecimiento, resistencia a las enfermedades, fecundidad y mejorando la calidad y sabor de la carne. La manipulación genética de los cromosomas sexuales del embrión produce hembras triploide estériles, evitando así la mandíbula 'ganchuda' que no agrada al cliente y asegurando que los individuos introducidos/escapados no puedan reproducirse.

Las truchas no desovarán naturalmente en sistemas de cultivo; de modo que los juveniles deben ser obtenidos ya sea por desove artificial en un hatchery o por recolección de huevos de

poblaciones silvestres. Las larvas están bien desarrolladas al momento de la eclosión. En la naturaleza, las truchas adultas se alimentan de insectos acuáticos y terrestres, moluscos, crustáceos, huevos de peces y otros peces pequeños, pero el alimento más importante son los camarones de agua dulce, que contienen los pigmentos carotenoides responsables del color rosado-naranja en la carne. En acuicultura, la inclusión en los alimentos de los pigmentos sintéticos astaxantina y cantaxantina causa que se produzca esta coloración rosada (cuando sea deseada).

La trucha arco iris en su ambiente natural, es un pez que habita espacios acuáticos con aguas no contaminadas y cristalinas, con cauces que presentan marcados desniveles topográficos que originan rápidos, saltos y cascadas que son muy comunes en los ríos de alta montaña, son estos rápidos con una pronunciada velocidad de corriente y suelo pedregoso los más frecuentados por las truchas.

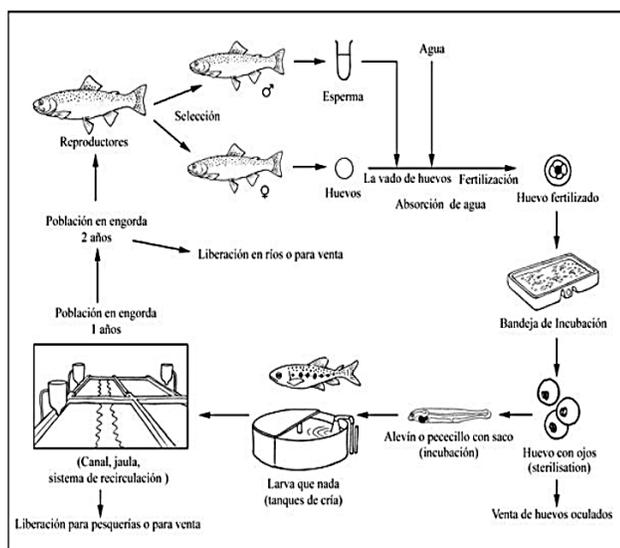


Ilustración 2. Ciclo de Producción de trucha.
Programa de información de especies acuáticas, (2013)

La práctica más común para el cultivo de trucha es el monocultivo, sus requerimientos se exponen en el cuadro 2, para hacer más atractiva económicamente la operación es preciso utilizar los sistemas intensivos. Un sitio potencial para la producción comercial de trucha debe tener un suministro de agua de alta calidad durante todo el año (sin aireación - 1 l/min/kg de trucha sin aireación o 5 l/seg/tonelada de trucha con aireación), que satisfaga un número de criterios:(Según Programa de información de especies acuáticas de la FAO (2013)

Tabla 2

Requerimientos para la producción de Trucha

O2 disuelto:	Cerca de la saturación.
CO2:	<2.0 ppm.
Temperatura:	12-21°C.
pH:	6.5-8.5.
Alcalinidad (como CaCO3):	10-400 mg/litro.
Manganeso:	<0.01 mg/litro.
Hierro	<1.0 mg/litro.
Zinc:	<0.05 mg/litro.
Cobre:	<0,006 mg/litro en agua blanda o <0.3 mg/litro en agua dura.

Nota: Tomado del Programa de información de especies acuáticas, (2013)

3.2 Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), representan un subgrupo de la clase de compuestos aromáticos policíclicos (PAC) que contienen dos o más anillos fusionados, en una configuración lineal o angular que se han denominado benzo aromáticos (Tamakawa,2018).

La mayoría de los estudios para evaluar el potencial carcinogénico de los HAP se realizaron mediante exposición dérmica, subcutánea o por inhalación. Sólo hay un número limitado de estudios que trataron sobre la administración oral. (Culp et al, 1998); *Cuando se administran en la dieta, los HAPs producen tumores en el tracto gastrointestinal, hígado, pulmones y glándulas mamarias de ratones y ratas (Tamakawa,2018), adicionalmente cuando se administró por sonda, B [a] P Benzo a pireno, indujo tumores benignos y malignos de estómago de ratones y hámster, y tumores mamarios en ratas hembras. (Culp et al, 1998)*

Uno de los primeros estudios adelantados y dados a conocer a la comunidad científica se adelantó en Turkia, donde (Turkdogan et al; 2001) establecieron presencia de Benzo(a)pireno y Benzo(a) antraceno en alimentos cocidos, y revelaron, que los alimentos tradicionales, que se hornean o cocinan con estiércol o aceite de combustible, están altamente contaminados por HAP considerándose un actor de riesgo en esta región.

Así mismo, (Emerole, 1980) informó que la presencia de HAP en alimentos ahumados podría ser un factor alto que contribuye al cáncer de estómago estudio adelantado en algunas comunidades nigerianas. En estudios similares, (Bally, 1958), (Thorsteinsson, 1969) y (Thorsteinsson y Thordanson, 1968) demostraron la relación entre la presencia de niveles altos de HAP en el pescado ahumado islandés y la prevalencia de cáncer estómago en esta zona geográfica. (Roth et al 1998) estudió el caso en Linxian, Chin, informaron que los altos niveles de HAP presentes en los alimentos podrían contribuir a la incidencia elevada de cáncer esofágico en la región.

El gobierno de Cataluña, en el año 2008 a través de su sistema de salud, emitió un estudio relacionado con contaminantes químicos y su presencia en la dieta total de Cataluña; argumentando que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) constituyen una amplia clase de sustancias, que se componen de dos o más anillos aromáticos fusionados. Se forman principalmente por la combustión incompleta de la materia orgánica y en diversos procesos industriales. Las personas están expuestas por diferentes vías. Mientras que para los no fumadores la principal vía de exposición es el consumo de alimentos, para los fumadores la contribución del humo de tabaco es muy importante. La presencia de HAP en los alimentos se debe a una contaminación ambiental o bien a una contaminación originada por los tratamientos térmicos a los que se somete el alimento durante su elaboración.

Se han identificado cerca de 100 HAP potencialmente cancerígenos. El Comité Mixto de la FAO/ OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2005) y el Grupo de Expertos de Contaminantes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008) han determinado que 16 HAP son indiscutiblemente genotóxicos y carcinógenos para las personas. No obstante, solamente se ha demostrado que ocho (HAP8) tienen capacidad cancerígena vía oral. Para el resto, se desconoce si son cancerígenos a través de los alimentos. La EFSA ha determinado que estos HAP8 son el mejor indicador de presencia y toxicidad de los HAP en los alimentos. También se puede utilizar como indicador cuatro (HAP4) de estos ocho sin afectar apenas la evaluación del riesgo, o bien, dos (HAP2), con pérdida de información sobre la presencia de HAP en los alimentos (EFSA, 2008).

Salvo del benzo(a)pireno, existen pocos datos toxicocinéticos de los HAP. En los mamíferos, la absorción del benzo(a)pireno varía entre un 12% y un 99% dependiendo de la especie y de la dosis de ingesta. En general, los HAP de bajo peso molecular se absorben más que los de gran peso molecular. Una vez absorbidos, se distribuyen por casi todos los órganos y son capaces de atravesar la barrera placentaria. No se bioacumulan, ya que los mamíferos los pueden metabolizar por diferentes vías y los metabolitos se eliminan por la orina. Así mismo, los metabolitos son muy reactivos y están implicados en los mecanismos mutagénicos y carcinógenos de los HAP. (Sistema de salud de Cataluña, 2008).

Tabla 3

Dieciséis hidrocarburos

Naftaleno	Acenaftileno	Acenafteno	Fluoreno
Fenantreno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno
Benzo(a)ant raceno*	Criseno*	Benzo(b)fluor anteno*	Benzo(k)fluor anteno*
Benzo(a)pire no*	Dibenzo(a,h)an traceno*	Benzo(g,h,i)p erileno*	Indeno(1,2,3- c,d)pireno*

Nota: Tomado de la EFSA Journal, (2008)

La Solubilidad de muchas sustancias orgánicas a baja temperatura reduce la bioconcentración de HAP en los peces. Se reduce la velocidad de eliminación de los PAHs en los peces de agua fría contribuyen a aumentar la bioconcentración y la reducción de la solubilidad en agua. Un peso corporal alto puede causar un impacto perjudicial, la reparación es más lenta y larga potencialmente además la probabilidad de dañar metabolitos intermedios parece ser probable en peces obtenidos en clima frío en comparación con los peces de aguas templadas. (Skadsheim, Et.al 2009).

Según Journal EFSA, 2008 en la última década los HAP fueron evaluados por el Programa Internacional sobre Seguridad Química (IPCS), el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF) y por el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) . El SCF concluyó que 15 HAP , a saber, el benzo [a] antraceno, benzo [b] fluoranteno , benzo [j] fluoranteno , benzo [k] fluoranteno , benzo [ghi] perileno , benzo [a] pireno , criseno , ciclopenta [cd] pireno , dibenzo [a, h] antraceno, dibenzo [a, e] pireno, dibenzo [a, h] pireno, dibenzo [a, i] pireno, dibenzo [a, l] pireno, indeno [1,2,3-cd] pireno y 5 - metilcriseno muestran clara evidencia de mutagenicidad / genotoxicidad en células somáticas de animales de experimentación in vivo y con la excepción de benzo [ghi] perileno que también ha demostrado claros efectos cancerígenos en varios tipos de bioensayos. Por lo tanto, el SCF argumentó que estos compuestos pueden ser considerados como potencialmente genotóxicos y carcinogénicos para los seres humanos y por lo tanto, representan un grupo prioritario para la evaluación del riesgo de los efectos nocivos a largo plazo y efectos tras la ingesta de HAP.

El SCF sugiere utilizar el benzo [a] pireno como marcador de presencia y el efecto de HAP cancerígenos en los alimentos, basados en exámenes de perfiles de HAP en los alimentos y en la evaluación de un estudio de carcinogenicidad de dos mezclas de alquitrán en ratones.

Fang Et.al (1993) caracterizaron e identificaron en aire la vía de contaminación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, en Taiwan por otro lado el panel de la EFSA sobre Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM) revisó los datos sobre la presencia y sobre todo la toxicología de los HAP. Como no hay nuevos datos toxicológicos que podrían ser identificados dando lugar a la inclusión de otros compuestos en la lista de prioridad de los HAP,

el Panel CONTAM decidió cubrir 15 PAHs identificados por SCF en 2002 y, además el benzo [c] fluoreno como sugiere el JECFA en 2005 en el presente dictamen. Los 16 compuestos se muestran en la Tabla 1 junto con su peso molecular, número CAS y estructura. se prestó especial atención a los ocho HAP cancerígeno y genotóxico que se mide en las mezclas de carbón bituminosas utilizadas en los estudios de carcinogenicidad, que proporciona la base de la evaluación de riesgos del JECFA y SCF. Estos ocho HAP están subrayados en el cuadro 5.

Tamakawa et al 2018, describe los HAPs como estructuras planas como se muestra en la ilustración 3 se presentan como un cristal pálido o amarillo verdoso, blanco o incoloro y posee un olor débil y aromático. Entre ellos, algunos HAP como B [a] A, DB [ai] Pe In [cd] P muestran una fluorescencia que va del amarillo verdoso al azul brillante a marrón A temperatura ambiente, la mayoría de los HAP suelen ser sólidos, son altamente hidrófobos y muy solubles en disolventes orgánicos. La solubilidad de los HAP en el agua es inversamente proporcional a la cantidad de anillos aromáticos que contiene.

A continuación, se muestran las fórmulas estructurales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que presentan la posibilidad de mayor daño en humanos así como la incidencia elevada de exposición que tienen los seres humanos a estos compuestos.

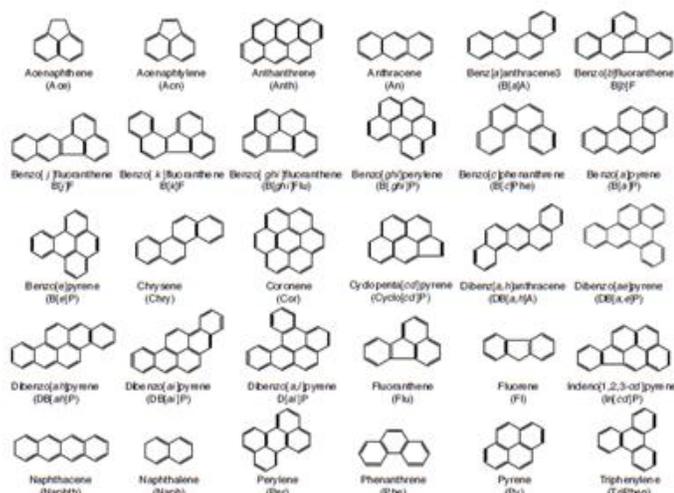


Ilustración 3. Formas estructurales de los hidrocarburos.
Tomado del libro *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume 51-2015

En la superficie cerosa de las verduras y frutas los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) son capaces de concentrarse, por su elevada masa molecular ocurre por absorción superficial y llegando a contaminar la superficie, esto sucede debido a las precipitaciones atmosférica (Larsson,1986). Los HAPs también puede contaminar los alimentos durante el ahumado industrial, esto sucede durante los procesos de calentamiento y secado en que los productos de la combustión están en contacto directo con alimentos, por otra parte, Giacalone et.al (2004) y Culotta *Et.al* (2006) establecieron las vías y distribuciones de los HAP en sedimentos de la costa marina de Messina-Italia, además investigaron que en los sedimentos del lago Stagnone se presenta contaminación. Por otra parte, los aceites vegetales (incluidos los aceites de semillas y los aceites de orujo de oliva) con PAHs durante los procesos tecnológicos como el secado al fuego directo, donde la combustión productos pueden entrar en contacto con el cereal, semillas de aceite o el aceite Según (EFSA Journal, 2008).

Los HAPs también se forman como resultado de ciertos métodos de preparación de alimentos en casa, tales como asar a la parrilla, tostado y el tabaquismo. Las altas concentraciones de HAP se han reportado en carbón de leña, alimentos a la parrilla / barbacoa (como carnes grasas y productos de carne a la parrilla bajo prolongada y severa condiciones), en los alimentos ahumados por técnicas tradicionales (pescado, en particular), y en los mejillones y otros mariscos de aguas contaminadas (EFSA Journal, 2008). Los alimentos ahumados y asados pueden contribuir significativamente a la ingesta de HAP si tales alimentos son una gran parte de la dieta habitual.

La presencia de HAP en el café también se ha informado y se ha sospechado que se debe bien a una contaminación de los granos de café verde durante la etapa de secado o una formación endógena en los granos de café durante el proceso de tostado (EFSA Journal, 2008).

3.2.1 Mecanismos de formación de HAPs en alimentos.

La presencia de HAP en diferentes productos alimenticios, se ha centrado en sus metodologías de cocción. (Ledesma et al., 2014; Orecchio et al., 2009) informan que el procesamiento, el envasado y los procesos térmicos como secado, ahumado, horneado, asado, asado a la parrilla, fritura, etc. contribuyen significativamente en la formación de HAP.

Los radicales libres generados durante la combustión de alimentos a alta temperatura se someten a recombinación, para formar HAP ligeros seguidos de HAP pesados, que se mueven a los compartimientos de cadenas alimenticias hidrófobas, que finalmente se retienen en alimentos ricos en grasa. (Luzardo et al., 2013).

Los productos ahumados generalmente se preparan a escala industrial, mientras que la carne a la barbacoa, es otra fuente de exposición a los HAP, se prepara principalmente a nivel doméstico y, por lo tanto, es mucho más difícil de controlar. Dependiendo de los hábitos alimenticios, carnes sometidas a la brasa, podrían contribuir significativamente a la exposición general a los HAP (Duedahl-Olesen et al., 2015). Es necesario tener en cuenta, algunos parámetros, como el tipo de barbacoa (carbón vegetal, gas, eléctrico), la distancia entre la fuente de calor y la carne, el tipo de producto cárnico cocido, el uso de bandejas de barbacoa y el tiempo de exposición, lo cual influye en el contenido de HAP de los alimentos preparados (Rose et al., 2015; Lee et al., 2016; Viegas et al., 2012; Gorji et al., 2016).

En síntesis, el tipo de procesamiento de alimentos puede tener una influencia significativa en los niveles de HAP en los productos alimenticios. La sustitución creciente de los procesos tradicionales de sabor ahumado por el humo líquido en países industrializados, sin duda ha dado lugar a una disminución de los niveles de HAP en los alimentos ahumados comercialmente. Por otro lado, una serie de investigaciones, especialmente sobre diversas prácticas asado a la barbacoa han demostrado que ciertas prácticas de cocina en casa pueden conducir la aparición de niveles de HAP que son más de una mayor magnitud en comparación con las concentraciones de HAP en los alimentos preparados con prácticas adecuadas. Por lo tanto, para una reducción de la formación de HAP y en consecuencia, para la reducción de la exposición a estos compuestos parece ser posible para ciertas casas que utilizan prácticas de cocina adecuadas, según (EFSA Journal, 2008).

La acumulación de contaminantes en el pescado es cada vez más preocupante debido a los problemas de seguridad alimentaria y los riesgos potenciales para la salud humana. Storelli et.al (2013). Así mismo La presencia de HAPs de origen pirogénico y petrógeno en los suelos se explica por la dispersión de contaminantes en los alrededores de la fuente contaminante, como lo describe Salinas et.al (2011) en un análisis global del comportamiento de contaminantes orgánicos. Además, junto con Salinas, Cooke et.al (1988) describe el progreso de los hidrocarburos en una década y como los suelos condensan y tienden a acumular un gran número de contaminantes orgánicos a través de cada descarga atmosférica.

3.2.2 Sistemas de Fritura.

Fritura continua.

Se trata de un proceso de fritura con una producción altamente automatizada, que permite trabajar con incorporación continua de materia prima a freír y de aceite, para mantener constantes las condiciones del proceso.

Este tipo de fritura origina grandes volúmenes de producto, que se generan en un equipo moderno en un corto periodo de tiempo. De esta forma, el margen de error es pequeño, por lo que se deben establecer criterios idóneos para la calidad de los aceites que se compran, los cuales deben controlarse para cada lote de entrega antes de aceptarlos para ser usados en la fritura. Esta situación se puede originar debido a precursores de oxidación posiblemente generados en el aceite como resultado del proceso de fritura.

En general, la selección del aceite y grasa de fritura está muy determinada por su precio y disponibilidad, así como por sus características tecnológicas. Una amplia variedad de aceites y grasas refinadas son utilizados como medio de fritura el cual se muestra en la tabla 4, donde los aceites mayoritariamente monoinsaturados son los más utilizados, ya que presentan ventajas respecto a las grasas saturadas o parcialmente hidrogenadas por cuestiones relacionadas con la salud, y también respecto a los aceites poliinsaturados, por cuestiones de estabilidad y calidad sensorial (Sakurai *Et. al.*, 2003; Kristott, 2002; Brinkman, 2000; Stevenson *Et. al.*, 1984). El uso de mezclas de aceites es una posibilidad real para conseguir una mayor flexibilidad en la disponibilidad de los mismos.

Tabla 4 *Composición (%) ácidos grasos mayoritarios de los aceites más utilizados en fritura*

	Aceite de oliva	Aceite de girasol	Aceite de soja	Aceite de maíz	Aceite de algodón	Aceite de colza	Aceite de cacahuete	Aceite de coco	Palmiste	Aceite de palma	Oleína de palma
C8:0								7,6	4,75		
C10:0								5,75	3,80		
C12:0								44,9	44,80		0,3
C14:0					1,18		0,23	17,15	15,25	0,96	1,05
C16:0	10,66	5,95	9,60	10,25	22,00	4,05	9,85	8,60	8,10	41,55	40,55
C16:1	1,23	0,50	0,50	0,50	0,940	0,60				0,50	0,20
C18:0	2,40	4,30	3,50	2,15	3,60	1,45	3,05	2,60	2,40	4,75	4,25
C18:1n-9	72,35	20,50	20,40	28,45	17,75	58,55	53,65	6,70	13,80	37,05	41,85
C18:2n-6	8,05	62,65	54,20	52,25	48,80	19,70	21,55	1,65	2,40	10,10	11,55
C18:3n-3	0,85	0,50	7,70	0,93	0,74	9,15				0,50	0,35
C20:0	0,41	0,39	0,50	0,50		0,49	2,40			0,50	0,4
C20:1						4,45	1,40				
C22:0							2,90				
C22:1						0,53					
C24						0,60	1,40				

Nota: *. C8:0 (ácido caprílico), C10:0 (Ácido cáprico), C12:0 (Ácido láurico), C14:0 (Ácido mirístico), C16:0 (Ácido palmítico), C16:1 (ácido palmitoleico), C18:0 (Ácido esteárico), C18:1n-9 (ácido oleico), C18:2n-3 (ácido linoleico), C18:3n-3 (ácido linolénico), C20:0 (Ácido araquídico), C20:1 (ácido eicosenoico), C22:0 (Ácido behénico), C22:1n-9 (ácido erúxico), C24:0 (Ácido lignocérico).

Tomado de Suaterna, (2008)

Los aceites para fritura deben ser frescos y sujetos a criterios de calidad, como los que se recogen en el tabla 5. Independientemente de la naturaleza del aceite o grasa usada en el proceso,

su calidad puede tener una gran influencia en la calidad del producto frito y en la estabilidad del aceite a elevadas temperatura (Dobarganes *Et. al.*, 2002).

Tabla 5.

Especificaciones básicas para el aceite de fritura

Tipo	Grasas y Aceites
Color	(unidades Lovibond rojo) 2,0 máx., claro Ninguno
Gusto	Ninguno
Flavor (sabor)	0,1 % máx.
Ácidos grasos libres	1-2 meqO ₂ /Kg
Índice de peróxidos	200-220 °C mín.
Punto de humo	0,05-0,1 % máx.
Humedad	2-3 % máx.
Ácido linoleico	

Nota: Tomado de Dobarganes *Et. al.*, (2002)

3.2.3 Fritura discontinua

Los procedimientos de fritura discontinua pueden subdividirse en dos, en sartén o en freidora. Las características del proceso son radicalmente diferentes, debido a que las condiciones lo son también (aireación, relación masa producto/masa aceite, tiempo y superficie de contacto, etc.). Sin embargo, el proceso de fritura discontinua más representativo en la industria y en la restauración es la freidora de cuba estática. Las cubas son fabricadas en acero inoxidable y el aceite es calentado directamente por medio de una resistencia eléctrica que se encuentra situada en el interior del recipiente y que está controlada termostáticamente. La temperatura del aceite normalmente queda reflejada en una pantalla y se puede controlar mediante un termómetro de inmersión manual, de forma periódica.

Así mismo la circulación del aceite es ascendente, por convección, pero es ayudada por las propias turbulencias de la ebullición y el movimiento periódico de la cesta donde se encuentra el producto frito. La temperatura usual depende del producto a freír y suele oscilar entre 165-190 °C. Se evita el uso de cobre o latón en la freidora o en cualquier equipamiento para reducir la degradación acelerada por catálisis. La freidora no debe ser sobrecargada con producto, ni el tiempo de fritura debe sobrepasar el conveniente, porque ello puede afectar la calidad del producto de forma adversa. La proporción 6:1 entre masa de aceite y producto es la más usualmente utilizada.

Por lo tanto el uso de tapas metálicas para cubrir la superficie del aceite caliente reduce la incorporación de oxígeno en frituras que exijan intervalos largos. Los posos pueden originar oscurecimiento del aceite, desarrollo de sabor desagradable, exceso de humo, etc. y, por ello, el aceite debe ser filtrado periódicamente (Morton y Chidley, 1988). El criterio utilizado para desechar el aceite de la freidora es normalmente de tipo observacional, basado en la excesiva formación de humo, en el progresivo desarrollo de espuma persistente e indeseable, y en el oscurecimiento del color del aceite. No obstante, en este sistema discontinuo es aún mucho más necesaria la aplicación de un control basado en parámetros analíticos de alteración química. Recordemos que la legislación española establece un valor límite máximo del 25% para el total de compuestos polares formados (BOE, 1989).

Las diferencias de la freidora respecto a la sartén, como sistema de fritura discontinua, son su mejor regulación de la temperatura y la menor relación superficie/volumen de grasa, y sus

inconvenientes se centran en la utilización de gran cantidad de aceite, el calentamiento reiterado de un mismo aceite a elevada temperatura, y la existencia de una baja velocidad de reposición con aceite fresco (Pérez-Camino *Et. al.*, 1987).

Alteraciones en el aceite durante el proceso de fritura.

La fritura es un proceso de naturaleza muy compleja, en la que se ven implicadas numerosas reacciones que afectan a los componentes de la materia grasa que se utiliza como medio de fritura (Gertz, 2000; Orthoefer *Et. al.*, 1996; Fedeli, 1988), tanto los componentes mayoritarios (TG), como los componentes del insaponificable (esteroles, tocoferoles, carotenos, etc.). A partir de tres agentes (agua, oxígeno y temperatura elevada), que actúan favoreciendo diversas reacciones, los componentes de los aceites sometidos a fritura experimentan diversas alteraciones tal como se resume en la tabla 6:

Tabla 6 *Principales grupos de compuestos formados en los aceites y grasas de fritura*

Tipo de alteración	Agente causante	Compuestos nuevos resultantes
Hidrolítica	Humedad	Ácidos grasos libres Diacilgliceroles
Oxidativa	Aire	Monoacilgliceroles Monómeros oxidados (TG) Dímeros y polímeros oxidados (TG)
Térmica	Temperatura	Compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, hidrocarburos, etc.) Óxidos de esteroles Dímeros y polímeros no polares (TG) Monómeros cíclicos (TG) Isómeros <i>trans</i> (TG) y de posición

Nota: Tomado de Dobarganes *Et. al.* (2002)

3.2.4 El proceso de fritura desde el punto de vista Toxicológico.

El proceso de fritura origina un sinnúmero de compuestos, muchos de ellos nocivos para la salud humana. Dentro de estos compuestos podemos hallar inhibidores enzimáticos, destructores de vitaminas, productos de oxidación lipídica, irritantes gastrointestinales y/o mutágenos potenciales. (De La Cruz, 2008) (Véase tabla 7)

Tabla 7

Formación de compuestos tóxicos a partir del proceso de fritura

Compuesto	Descripción
Formación de compuestos volátiles tóxicos y no tóxicos	<p>Se han identificado más de 220 productos de descomposición volátiles. En algunos casos confieren el aroma y el sabor al aceite alterado (hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, etc.).</p> <p>Estos compuestos son productos de descomposición del ácido linoléico principalmente. Podemos mencionar sustancias como: el buteno, 1,3-butadieno, acetaldehído, pentano, pentanal, n-hexano, acroleína, propanol, n-hexeno, benceno, tolueno, hidrocarburos, metil vinyl cetona, propanona y otros; siendo la mayoría tóxicos y afectando en primera instancia al cocinero y en segunda instancia al consumidor.</p> <p>➤ Un factor determinante es la temperatura de calentamiento</p> <p><i>Acción Tóxica</i> Problemas dermatológicos, irritación del sistema respiratorio, (edema pulmonar, irritación de las vías respiratorias, faringitis); irritación gástrica intestinal, y hasta afecciones del SNC, (mareos, vértigo, dolor de cabeza).</p>
Formación de Compuestos no Volátiles tóxicos y no Tóxicos	<p>Durante la formación de estos compuestos se presentan:</p> <p>Compuestos Polares. Estos compuestos se forman durante el proceso de oxidación térmica de los aceites comestibles.</p> <p>Polímeros. Estos compuestos formados por la unión de diversas moléculas complejas, que se forma por procesos de polimerización térmica u oxidativa.</p> <p><i>Acción Tóxica.</i> La toxicidad ocasionada por estos compuestos se produce debido al consumo excesivo de los aceites comestibles alterados por recalentamiento teniendo como consecuencia daños al organismo como irritación gástrica duodenal, diarreas, úlceras, daños hepáticos como hepatomegalia y la alteración de la actividad enzimática.</p>

<p>Formación de Sustancias Cancerígenas</p>	<p>Dentro de las sustancias cancerígenas detectadas en el aceite de fritura tenemos a algunos peróxidos, derivados oxidados de colesterol (proveniente principalmente del alimento que se fríe), algunas aminas heterocíclicas (provenientes de la interacción alimento – aceite) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, aunque la presencia de estos últimos compuestos aún está en discusión.</p> <p>El tipo de cáncer que originan depende de su acción metabólica ya que algunos actúan como radicales libres (peróxidos) mientras que otros necesitan una activación enzimática (hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas y derivados del colesterol), para manifestar su acción cancerígena. Entre los órganos más afectados por estas sustancias están el estómago, colon, hígado, riñones y mama.</p> <p>Sustancias cancerígenas detectados en los vapores que emiten las grasa de fritura tenemos principalmente al 1,3 butadieno, benceno (cancerígeno humano); acroleína (mutagénico); acetaldehído, formaldehído; y algunas aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (dibenzo(a,h)antraceno y benzo(a)pireno) y derivados nitro – hidrocarburos aromático – policíclicos que provienen del aceite de fritura que ha sufrido de elevadas temperaturas durante la operación de fritura.</p> <p>La formación de estas sustancias se debe principalmente al aceite utilizado en la fritura y al tipo de proceso de fritura que se sigue; es por ello que parece razonable concluir que la ingesta moderada de alimentos fritos no representa un riesgo significativo para la salud cuando se utilizan aceites de buena calidad y se sigue una práctica adecuada de fritura</p>
--	--

Nota: Tomado de La Cruz *Et. al.*, (2008)

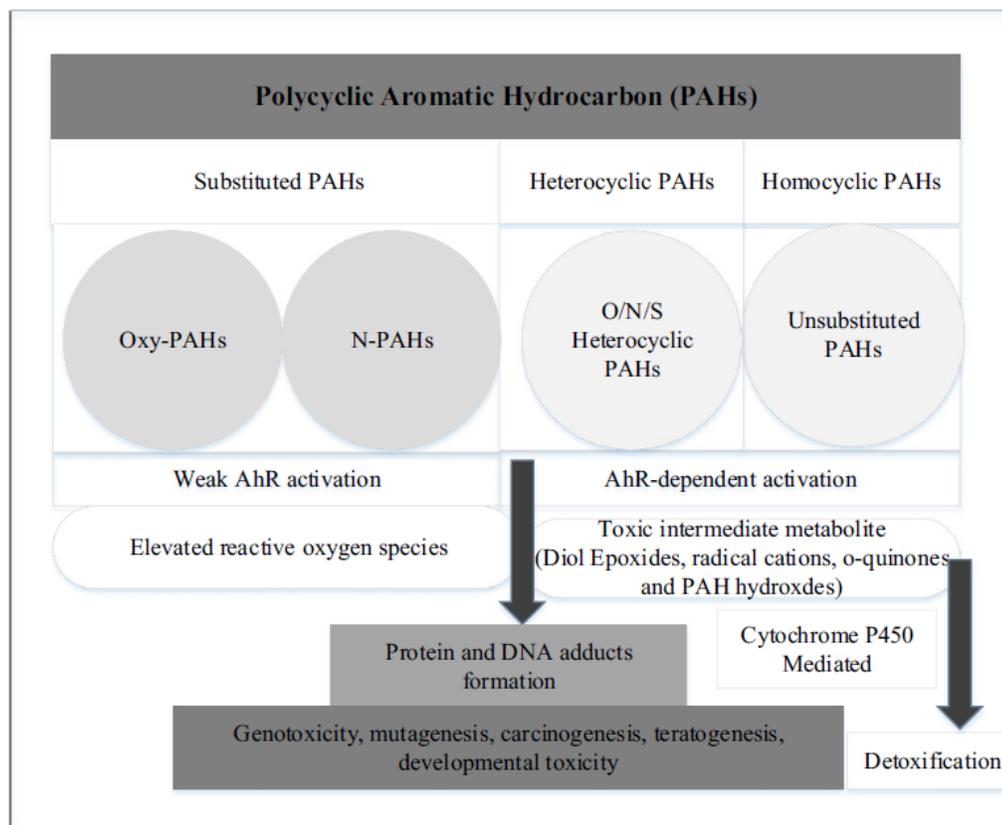
3.2.5 Mecanismo de acción del receptor de hidrocarburos que induce carcinogenicidad

Los efectos carcinogénicos, asociados a la presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos dentro del cual se encuentra el benzo a pireno (b[a]p) considerado como carcinógeno, debido que los metabolitos derivados de su biotransformación, como el benzo [a]pireno diol epóxido (b[a]pDE), tienen propiedades mutagénicas y carcinogénicas, los cuales pueden ser explicados, en términos generales, por dos mecanismos como lo establece (Vasquez-Gomez et al; 2016): la vía genómica y la vía no genómica. La primera consiste en la inducción de genes que codifican enzimas que participan en la bioactivación del b[a]p. Por ejemplo, en

presencia de b[a]p la enzima citocromo P450 1A1 (CYP1A1) produce dioles epóxidos del b[a]p que son capaces de reaccionar con el ADN produciendo lesiones premutagénicas.

De esta manera este mecanismo explica las observaciones de Vogelstein et al; 2013 en donde células tumorales de pulmón presentan diez veces más mutaciones que otros tipos de tumores. El segundo mecanismo tiene que ver con la participación del AhR en la estimulación, promoción y progresión de tumores, mediante la alteración de las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y del sistema inmune. Es probable que estos efectos estén mediados por la intercomunicación de la vía genómica y la no genómica (Vasquez-Gomez et al; 2016)

Acorde con lo expuesto por (Hahn, 2002), la habilidad del AhR de unir xenobióticos y mediar una respuesta adaptativa que involucra la inducción de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, puede ser una función exclusiva de los vertebrados debido a que en los invertebrados el AhR no es capaz de unir xenobióticos.



*Ilustración 4. Poli cíclicos Aromáticos (PAHs)
dowu et al (2019)*

El mecanismo de activación de la toxicidad de N-PAHs sigue el proceso de activación AhR arrojando como resultado daño en el ADN, formación de aductos de ADN, cambios en la expresión de genes y proteínas, alternancia del ciclo celular, aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno y pro inflamación. (Andersson et al., 2009; Park and Park, 2009). Sin embargo, las NPAHs pueden formar aductos de ADN unidos covalentemente a través, de la oxidación en anillo o vías de reducción nitro (Watt et al., 2007), mientras que los HAP homocíclicos utilizan una vía única de activación oxidativa hepática. La habilidad para producir aductos de ADN covalentemente unidos, a través de estas dos vías hace que los N-PAH sean carcinógenos más potentes que los HAP homocíclicos (Deng y Chan, 2017).

3.3 Prueba de genotoxicidad en trucha arcoiris

3.3.1 Ensayo Cometa.

La prueba del cometa, también conocida como electroforesis Alcalina de Células Individuales (SCG: Single Cell Gel Electrophoresis Assay), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos. El daño es representado por un aumento de fragmentos del ADN que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma característica similar a la cola de un cometa; estos fragmentos son generados por rompimientos del ADN. El ensayo del cometa sobre condiciones alcalinas, fue introducido por Singh y colaboradores en 1988, es útil para la detección rápida de rompimientos de cadenas simples de DNA y de lesiones sitios lábiles al álcali, entrecruzamientos del ADN (crosslinking) y en sitios de reparación del ADN por escisión en células "in vivo" e "in vitro" en muestras celulares muy pequeñas.

La siguiente ilustración muestra el daño estructural del ADN generado por los plaguicidas que desestructura sus moléculas, llamado ensayo cola de cometa.

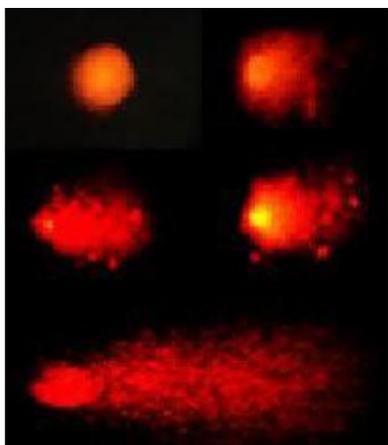


Ilustración 5. Cola cometa
Aiassa, Et.al., (2011)

Este ensayo ha sufrido varias modificaciones, pero los principios básicos descansan sobre lo neutro y lo alcalino. La versión alcalina introducida por Singh et al. (1988) es la más comúnmente adoptada porque es más sensible que la versión neutral y puede detectar sitios álcali-lábiles (ALS). (Anderson et al. 1998; Rojas et al. 1999; Tice et al. 2000). Sin embargo, la selección de qué método utilizar en ambientes acuáticos depende en gran medida del tipo y el grado de información requerida en el estudio. El ensayo cometa presenta características tales como sensibilidad, versatilidad, rapidez y economía que se puede aplicar en estudios de genotoxicidad, biomonitorización humana y epidemiología molecular (Collins, 2004)

3.3.2 Principio y método del ensayo

El ensayo Cometa se desarrolla en sangre total y en sus componentes de forma aislada tal como lo describe (Rodríguez-Rey et al; 2016): en eritrocitos, linfocitos o neutrófilos. En las preparaciones a partir de cultivo, la inducción del daño del ADN puede lograrse por la acción

enzimática de la tripsina o por el raspado de las células, maceración o homogenización. Todos los procedimientos deben ser comparados con controles.

Una vez que se obtiene la suspensión celular esta es embebida en metil agarosa al 1 % y montada en una lámina. En el pasado estas láminas eran preparada en placas precubiertas con agarosa y entonces se aplicaba otra capa de agarosa como un sándwich de células entre el agar. En la actualidad se utilizan las láminas especializadas para el cometa con barreras hidrofóbicas que contiene agarosa dentro de pozos. La suspensión células/agarosa es añadida de forma directa al pozo, lo que reduce el tiempo de preparación. La agarosa entonces enfriada y solidificada es sometida a una solución que contiene alta concentración de sales y detergente a pH 10. El objetivo de esta solución de lisis es dañar las membranas

(Gil et al: 2017) describen el principio básico del ensayo cometa y como se fundamenta en la capacidad de migración, en presencia de un campo eléctrico, de los fragmentos de ADN dañados con carga negativa a través de un gel de agarosa hacia el ánodo o polo positivo (Gunasekarana et al., 2015). La imagen, obtenida en el microscopio de fluorescencia, se asimila a un cometa con la intensidad de la cola dependiente de la frecuencia y magnitud de las roturas producidas en la hebra de ADN, hecho que será indicativo de la genotoxicidad de la sustancia estudiada (Azqueta et al., 2014)

A continuación, se describe el método descrito por (Rey et al; 2016), las etapas básicas para desarrollar el método alcalino:

- Extracción de suspensión celular, preparación de láminas para observación en el microscopio.
- Rompimiento celular con tratamiento enzimático(opcional)
- Electroforesis alcalina, neutralización y tinción del ADN para la visualización del cometa

3.3.3 Análisis e interpretación del ensayo cometa

El principio básico del ensayo alcalino descrito por (Lagroye., et al 2004), se fundamenta en la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis bajo voltaje (30 Volts/cm) luego, al ser observada la célula al microscopio (por fluorescencia o por tinción con plata del material nuclear), presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza (región nuclear) y cola (formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo) por lo que este ensayo es también conocido como ensayo Cometa, debido al patrón de migración del ADN que se produce en las células dañadas.

La interpretación del cometa varía en la literatura reportada. La puntuación visual se obtiene por categorización del cometa en cinco clases (0-4), casi todos los ADN con cola y reportado en unidades arbitrarias. Esto también puede ser interpretado reportándose la proporción de células con daño (cola del cometa), midiéndose la extensión de la migración del ADN como radio longitud /ancho con las células que no exhiben migración como grado 1. En los últimos años se han diseñado software para el análisis de las imágenes los cuales producen varios tipos de puntos de medición.

(Olive; et al 2005) describe el momento del cometa y se define como el producto del porcentaje del ADN en el cometa (intensidad) y la media de la distancia entre la cabeza y la posición de la cola. Este parámetro se toma en cuanto el tamaño de los fragmentos (longitud de la cola) y el número de fragmentos (intensidad de la cola).

La detección de la migración del ADN alterado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del des enrollamiento de la hebra de ADN, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis propuestos por (Collins et al; 2009)

El ensayo Cometa según (Hartmman et al; 2003, Vindas et al; 2004) presenta múltiples ventajas entre las que se destacan:

- La demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN.
- Rápida realización (resultados en pocos días).
- Análisis de los datos a nivel de células individuales.
- Requiere un pequeño tamaño de muestra (pocas células).
- Flexibilidad y bajo costo.
- Aplicable a cualquier población de células eucariotas.

Los HAP son lipofílicos en la naturaleza y por lo general se acumulan en los tejidos grasos de los organismos, y como tal se produce a partir de los tejidos grasos de los peces durante el ahumado a temperaturas más altas. La formación de HAP se sabe que se produce a

través de pirólisis de grasa a temperaturas superiores a 200 ° C, y es muy estimulada a temperaturas superiores a 700 ° C (Essumang et.al., 2012).

3.3.4 Relación de la presencia de HAP y el efecto genotóxico

Este estudio aporta una nueva visión de lo ya expuesto en (Mitchelmore y Chipman., 1998) quienes señalaron el compuesto de acción directa que genera los procesos genotóxicos, que incluye H₂O₂, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y 3-cloro-4- (diclorometil) -5-hidroxi-2 (5H) -furanona (MX) capaz de producir roturas, de la cadena de ADN en hepatocitos o células sanguíneas; aislados de truchas arco iris, así como también en células de la glándula digestiva y células branquiales del mejillón, y en células de la sangre del subfilum de los tunicados.

Por ejemplo, la línea celular de hepatoma de pescado también indica su capacidad para detectar roturas de la cadena de ADN inducidas por la acción de agentes de forma indirecta, por ejemplo, benzo [a] pireno y 1-nitropireno. La producción de roturas de la cadena de ADN también se detectó cuando Hepatocitos de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) expuestos in vitro a extractos orgánicos del sitio contaminado con HAP (Devaux et al. 1998).

A su vez, (Pruski y Dixon., 2002) presentaron un estudio que demuestra un efecto genotóxico del Cadmio Cd a las células branquiales de Mejillón, sin embargo, este estudio reveló que la pre-exposición a bajas concentraciones de Cd fue encontrado para mejorar la genotoxicidad de otros mutágenos.

Adicionalmente, (Tiano., et al 2000) demostró el efecto de las organotinas, como el cloruro de tributilo (TBTC1), el cloruro de dibutilestaño (DBTC1) y el cloruro de monobutilestaño (MTBCL) para producir roturas de hebra de ADN en eritrocitos nucleados en trucha. Este estudio in vitro presentó que TBTC1 muestra un marcado efecto genotóxico; mientras que el efecto genotóxico fue menos pronunciado, para DBTC1 y estuvo completamente ausente para MBTC1. Esta tendencia está acorde, con la evidencia, de que la toxicidad de organotinas está determinada por el número y la naturaleza de orgánicos sustituyentes en (Sn^{4+}); curiosamente, esta investigación empleó diferentes parámetros, como la longitud de la cola, la intensidad de la cola y el momento de cola del cometa, para medir el nivel de roturas de la cadena de ADN. Los resultados de esta investigación revelaron que la longitud de la cola era un parámetro menos sensible para detectar roturas de hebra de ADN que otras.

De acuerdo con el experimento sobre células de ovario de hámster chino. (CHO-KI) (Kent et al. 1995), demostraron que la longitud de la cola aumentó linealmente con la dosis, pero alcanzó una meseta a dosis más altas. Por otro lado, el momento de la cola también aumentó linealmente con la dosis, pero con una dosis mayor que el rango de la longitud de la cola y no tenía tendencia a la meseta.

La cadena de ADN se rompe, en células de riñón de peces dorados (*Carasius auratus*) expuestos a choque térmico analizados in vitro por (Anitha et al., 2000). Las temperaturas utilizadas fueron 34, 36 y 38 °C respectivamente. Los resultados arrojaron que el choque térmico, causó la inducción de micronúcleo en las tres temperaturas analizadas. El choque térmico también inhibe la proliferación de células a 38 °C y causaron mutaciones en los

cromosomas de la metafase a 34 y 36 °C. El ensayo del cometa demostró que una sola hebra se rompe a las tres temperaturas.

Los HAP han atraído más atención debido a su potencial cancerígeno. Desde entonces, los aceites comestibles y los alimentos asados son el alimento consumido diariamente, se debe determinar el nivel de HAP. El objetivo del trabajo realizado por (Dost., et.al 2012) fue optimizar un método analítico que se podría utilizar en la mayoría de los laboratorios de análisis para la determinación y la investigación de los niveles de los HAP en aceites y alimentos asados y estudiar el efecto de la barbacoa y en el aumento de la formación de HAP durante el proceso de cocción. Se desarrolló, un método HPLC con detección UV-Vis para la determinación de PAHs nueve (tres se han señalado como carcinógenos genotóxicos tanto por SCF y el JECFA y seis por otros Estados miembros (EFSA, 2008); fluoreno, el fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo [b] fluoreno, benz [a] antraceno, benzo [k] fluoranteno y benzo [a] pireno en los aceites y los alimentos asados. El método fue validado mediante el cálculo de rango lineal, coeficiente de determinación, precisión, repetibilidad, los límites de detección y límites de cuantificación. El método propuesto se aplicó con éxito para la determinación de PAHs en aceite, muestras de alimentos crudos y asados.

Aunque el mecanismo exacto de la formación de HAP en los alimentos a la parrilla/ ahumado no se conoce con precisión, en general se considera que existen al menos tres mecanismos posibles. (Alomiraha *Et.al.*, 2011) El primer mecanismo es la pirólisis de la materia orgánica, tales como grasa, proteínas y carbohidratos a temperaturas superiores a 200 ° C, y se ve favorecida la formación de HAP en un intervalo de temperatura de 500-900 °C. Se ha

demostrado que las mayores concentraciones de PAHs que surjan de la pirólisis de grasa. El segundo mecanismo es el rendimiento del contacto directo de los lípidos goteo a intenso calor directamente sobre la llama. Esta condición puede generar volátil HAP que a su vez se adhiere a la superficie del alimento a medida que aumenta humo (Comisión Europea Comité Científico sobre Alimentos, 2002. El tercer mecanismo es la combustión incompleta del carbón de leña que puede generar HAP que se pone sobre la superficie de la comida). (Alomiraha *Et.al.*, 2011)

La presencia de HAP, está vinculada al tipo de fuente de calor, a la duración al azar en la parrilla, a la geometría de la parrilla y uso de salsas de marinado, así como también el contenido de grasa en la formación de HAP y el predominio de la no-HAP cancerígenos en muestras de alimentos analizados. (Alomiraha *Et.al.*, 2011)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), en trucha arco iris cruda sometida a fritura y su efecto genotóxico, cultivada en Mutiscua, Norte de Santander

4.2 Objetivos específicos

- Determinar los hidrocarburos policíclicos aromáticos en piel y músculo en trucha arcoíris cruda, en fritura y cocción producida en el municipio de Mutiscua.
- Evaluar el efecto genotóxico inducido por trucha sometida a procesos de fritura y cocción en profundidad.
- Comparar estadísticamente el efecto genotóxico de extractos de trucha cruda, sometida a proceso de fritura en profundidad y cocción

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el municipio de Pamplona, las muestras fueron recolectadas en las empresas trucheras de la región de Mutiscua, en la vereda Tapagua, procesadas y analizadas en el Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad de Pamplona

5.1 Muestreo

Como lo describe (Otzen, *Et al* 2017) la muestra puede ser obtenida de dos tipos: probabilística y no probabilística. Las técnicas de muestreo probabilísticas, permiten conocer la probabilidad que cada individuo a estudio tiene de ser incluido en la muestra a través de una selección al azar. En cambio, en las técnicas de muestreo de tipo no probabilísticas, la selección de los sujetos a estudio dependerá de ciertas características, criterios, etc. que él (los) investigador (es) considere (n) en ese momento.

Para esta investigación se estableció una técnica de muestreo no probabilístico de carácter intencional, donde se seleccionaron los casos característicos de una población limitando la muestra sólo a estos casos. Utilizaron unos escenarios en las que la población es muy variable y la muestra es muy pequeña, tal como lo describe (Otzen et al 2017) en su artículo técnicas de muestreo sobre una población a estudio, que para este caso es la Trucha arcoíris producida en el municipio de Mutiscua

Se tomaron 12 truchas con un peso promedio de 900 g, procedentes de 10 estanques diferentes ubicados en la vereda Tapagua del municipio de Mutiscua- Norte de Santander. Una vez recolectadas se procedió a retirar las vísceras, posteriormente se fraccionó para tomar 150 g de la respectiva muestra (piel y músculo).

5.1.1 Sitio de Muestreo.

Se realizó el muestreo de los estanques de producción en el municipio de Mutiscua, Norte de Santander, (Longitud Oeste 71° 45' 02", Latitud Norte 07° 18' 07a una altitud de 2600 msnm).

Los sitios de muestreo estaban ubicados junto al casco urbano del municipio de Mutiscua dentro del área geográfica de la vereda Tapagua, la cual es un sector agrícola donde cultivan principalmente hortalizas, la cual cuenta con una pendiente pronunciada que finaliza en una de las márgenes de la quebrada La Plata que abastece con el recurso hídrico los estanques de los sitios de producción.

5.1.3 Toma de muestras.

5.1.3.1 Criterios de Muestreo.

La selección se efectuó considerando que existen en total 10 granjas truchícolas en la región, que produce trucha arcoíris. Para efectos de la presente investigación las muestras fueron recolectadas en seis estanques productores de trucha de acuerdo al cronograma establecido, teniendo en cuenta características de producción homogéneas tales como: el suministro de concentrado (marca comercial), el abastecimiento de los estanques a partir de la quebrada La Plata y el volumen de producción.

La cantidad de muestra a recolectar fueron unidades de trucha arco iris con las siguientes características: peso: 900 gramos, longitud de 25-30 cm, empacadas de polietileno transparente

deshuesadas y evisceradas, se procedió a fraccionar y tomar una muestra de 150 gramos entre piel y musculo, las cuales se sometieron a diferentes tratamientos de cocción: cruda, cocción en agua a punto de ebullición por 10 minutos, fritura en aceite de girasol, más canola, fritura en aceite de oliva.

Las muestras se clasificaron acorde a tres puntos de muestreo establecidos: M1 Y M3 muestras recolectadas en zona intermedia del recorrido de la Quebrada La Plata, M2 y M4 muestras de trucha recolectadas al inicio del recorrido de la zona de crianza de trucha arcoíris y M5 y M6 muestras recolectadas al final del recorrido de crianza de este salmónido.

5.1.3.2 Proceso de fritura en profundidad (TRUCHA ARCOÍRIS).

Se sometieron las muestras de trucha a dos procesos de cocción según metodología utilizada por (Stołyhwo, *Et.al.* 2005)¹, esto en cuanto al proceso de fritura

Se tomaron 150 grs (2 réplicas) de muestra con las siguientes características con: trucha deshuesada, se colocó en sartén para aplicar el proceso de fritura en profundidad con dos tipos de aceites de origen vegetal (aceite de oliva y aceite de maíz).

1. Disponer en plancha de calentamiento Marca FRAMO Geratetechnik M21/1 un sartén, con aceite comercial N°1 en proporción 1:6 con la muestra a analizar (trucha deshuesada eviscerada) a 160°C y 180 °C durante 5 minutos. Obtener piel y músculo de la muestra

¹ "Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review". Food Chemistry.

sometida a fritura en profundidad y proceder a preparación muestra para el análisis por cromatografía. Este mismo procedimiento se realizará con el aceite comercial N° 2.

Una vez sometidas las muestras a los procesos de cocción se asignó el factor denominado “Estado de la trucha”, el cual contempla cuatro niveles del factor o tratamientos (“Cocida”, “Cruda”, “Cocida1”, “FrituraP”) lo cual corresponde a cocida en agua a 150 °C por 3-5 minutos, Cruda sin ningún tratamiento, Cocida 1 muestra sometida a cocción en agua y FrituraP que corresponde a muestra sometida a fritura en profundidad con una mezcla de aceite girasol + canola.

Todas las muestras, una vez sometidas a los tratamientos térmicos fueron maceradas con diclorometano como se describe a continuación.

5.1.3.3 Extracción de la materia orgánica de trucha arcoíris por ultrasonido

Con el fin de extraer los compuestos presentes en las diferentes muestras de trucha, se procedió a realizar una extracción con ultrasonido. En resumen: Se tomaron 150 g de piel y músculo de trucha, se maceró en un vaso de precipitado con 20 ml diclorometano y luego se llevó a ultrasonido (Branson 1510, modelo 1510R-MT) por 15 min a 23°C. Se repitió la extracción hasta completar 200 ml del solvente. Según (Quijano y Meléndez 2011)².

5.1.3.4 Concentración de la materia orgánica.

² QUIJANO, P. ALFONSO y MELÉNDEZ IVAN. Genotoxicidad del aire de Cúcuta-Colombia por HAPs extraídos con diferentes solventes. Universidad de Pamplona, Pamplona-Colombia, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química. 2011.

Una vez obtenido el extracto (200 ml), se concentró en un evaporador rotatorio de vacío, Heidolph modelo Laborota 400-1, a la temperatura de ebullición del solvente a 150 rpm; hasta aproximadamente 10 ml. Posteriormente el extracto se transfirió a dos viales, cada uno de 5ml. El extracto global se utilizó para la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) por Cromatografía de Gases y para el ensayo genotóxico respectivamente.

Las muestras de HAP se secaron con Na_2SO_4 , con el fin de eliminar el agua residual y preparar la muestra para el análisis cromatográfico. Se guardaron en frasco ámbar, manteniéndolas refrigeradas a 4 °C. Según (Quijano y Melendez, 2011)³.

5.1.3.5 Detección de hidrocarburos aromáticos policíclicos (hap)

Para identificar los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) presentes en la Trucha Arcoíris (musculo y vísceras) extraídas con Diclorometano, se utilizó un equipo de Cromatografía de Gases marca Agilent Technologies 6890A Plus Series II Hewlet-Packard Plus con detector FID (Flame Ionization Detector). La columna que se utilizó fue Agilent DB-EUPAH 20m de longitud, 0.18mm de diámetro, 0.25 μm de diámetro interno (5% phenyl methylpolysiloxane). Para la identificación de los HAPs se utilizó el patrón de 16 hidrocarburos de Restek (catalogo # 31841 EPA Method 8310 PAH Mixture). La identificación cualitativa de los HAP presentes en el extracto global se realizó de acuerdo a las siguientes condiciones: detector FID a 320°C Mezcla (mL/min): Aire 400 – H₂ 30 – N₂ 45. Se inyectará 1 μl , modo splitless a 320°C. Temperatura inicial 45°C por 0.8 min y se incrementó de la siguiente manera: 45°C/min hasta 200°C, 2,50°C/min hasta 225°C, 3°C/min hasta 266°C, 5°C/min hasta 300°C,

³ QUIJANO, P. ALFONSO y MELÉNDEZ IVAN. Genotoxicidad del aire de Cúcuta-Colombia por HAPs extraídos con diferentes solventes. Universidad de Pamplona, Pamplona-Colombia, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química. 2011

10°C/min hasta 320°C durante 4,50min. El Tiempo de análisis por muestra 41.21 min. Gas de arrastre Helio, flujo 20 mL/min. Temperatura del inyector 250 °C. Según (Quijano Et.al., 2011)⁴ (Véase tabla 1)

5.1.4 Detección de la actividad genotóxica

5.1.4.1 Detección del daño del DNA por el Ensayo Cometa.

Para detectar el daño o la ruptura del ADN se utilizó el ensayo cometa en microgel de agarosa. Se siguió la metodología propuesta por (Singh, McCoy, Tice, & Schneider, 1998) y modificada por (Pandurangi, Petras, Ralph, & Vrzoc, 1995)

Se trataron alrededor de 40.000 células o linfocitos con (100 µL) de extracto de trucha procedente del proceso de extracción y concentración de la materia orgánica descrito , se incubó por un periodo de 1 hora a 37°C, Posteriormente se tomaron 20µL de suspensión celular para resuspender con 80µL de agarosa de bajo punto 31 de fusión (Sigma) 0,5% a 37°C y se depositó sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 1%. La suspensión celular se cubrió con cubreobjetos y se refrigeró a 4°C por 6 minutos. Luego se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión, se volvió a cubrir con un cubreobjetos se refrigeraron a 4°C por otros 6 minutos. Después de la solidificación, las placas se sumergieron 1h en solución de lisis, luego, las placas se lavaron con PBS y se sumergieron en una cámara de electroforesis horizontal

con un buffer pH>13, la cual se incubó por 30 minutos a 4°C, luego se realizó el corrido electroforético a 25V y 300 mA por 30 minutos.

Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con un buffer neutralizante, luego se tiñeron con 50 µl de Bromuro de etidio (0.02mg/mL). Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Olimpus Cx41) equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se realizaron tres experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 300 células. Como control negativo se utilizó, el DMSO al 1%, que fue el solvente en el cual se diluyeron las muestras. La ocurrencia de daño en el ADN se determinó mediante el uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5) basado en las siguientes mediciones: longitud total del cometa, diámetro de la cabeza (µm), %DNA en cabeza, longitud de la cola µm, %DNA en cola.

6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar el efecto genotóxico de extractos de trucha cruda sometidas a un proceso de fritura en profundidad y cocción, se aplicaron métodos estadísticos descriptivos e inferenciales. En concordancia con los objetivos, los resultados obtenidos se presentan a través de tablas y gráficas que permitan ver el comportamiento de la variable dependiente (Grado de genotoxicidad), bajo el factor denominado “Estado de la trucha”, el cual contempla cuatro niveles del factor o tratamientos (“Cocida”, “Cruda”, Cocida1”, FrituraP). De manera complementaria también se observó la variación en la genotoxicidad en cuatro puntos de muestreo: M1-03; M3-01; M3.2; M3.4 y por longitud y altitud del cometa (V_{cometa} = Variables del cometa). El método estadístico aplicado fue el ANOVA y el software donde se

corrieron los datos fue el SPSS versión 14. De manera general se puede representar matricialmente este contexto.

Tabla 8.

Arreglo matricial para el diseño factorial

		FACTOR I: ESTADO TRUCHA			
FACTO R B: PUNTOS DE MUESTREO		Cocida	Cruda	Cocida1	FrituraP
	M1-03	Y_{11}		Y_{ba}
	M3-01	Y_{21}
	M3.2		Y_{b2}
	M3.4
		Y_{3n}	

El modelo para el diseño de dos factores de efectos fijos (fijo las condiciones de los tratamientos) está dado por:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : Representa las mediciones de la variable nivel de genotoxicidad bajo los factores i, j

μ : Representa la media global

τ_i : Representa el efecto de la i -ésimo estado de la trucha en el nivel de genotoxicidad

β_j : Representa la variación en el j -ésimo punto de muestreo

ε_{ij} : Es el error experimental $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

En general el contraste de hipótesis a probar es verificar si el efecto de n -ésimo nivel de los tratamientos causa o no diferencias en la variable dependiente o nivel genotoxicidad.

Simbólicamente se denota de la manera siguiente:

$$H_0: \mu_{Cocida} = \mu_{Cruda} = \mu_{Cocinada1} = \mu_{FrituraP}$$

$$H_1: \mu_{Cocida} \neq \mu_{Cruda} \neq \mu_{Cocinada1} \neq \mu_{FrituraP}$$

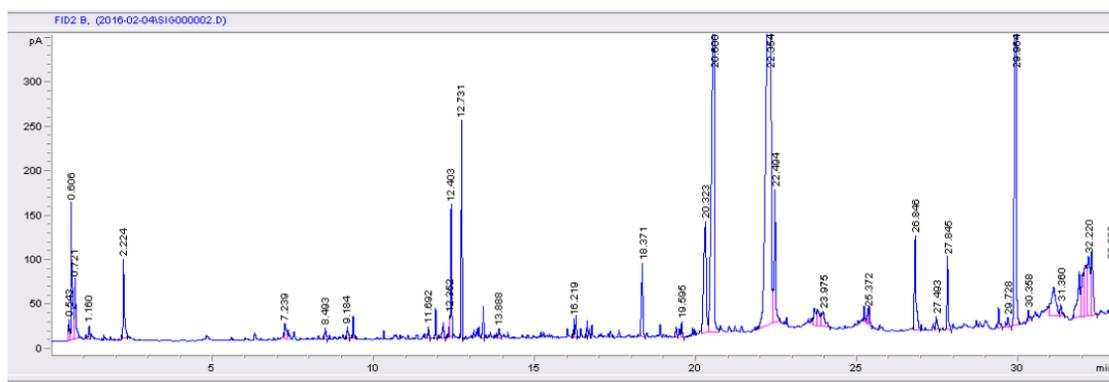
En concordancia con la normatividad, y de una manera más amplia en la parte metodológica el protocolo del experimento, se dejaron escritas las condiciones del experimento y se muestra evidencia de ello. Igualmente, de los controles y las mediciones realizadas en diferentes momentos durante el transcurso del mismo. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software estadístico SPSS- versión académica. El nivel de significancia fijado antes del experimento fue el 5% y nivel de confianza de 95%. Se verificaron los supuestos para la validación del método estadístico, aclarando que, en el análisis de varianza, la estadística F puede ser más robusta ante varianzas desiguales siempre y cuando los tamaños de la muestra de los tratamientos sean iguales. (Canavos, pág.,417).

7. RESULTADOS Y ANALISIS

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en la investigación y en concordancia con los objetivos de la misma, se presenta en primer lugar cada objetivo y su resultado. En la tabla 9, los resultados de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos encontrados en las muestras analizadas.

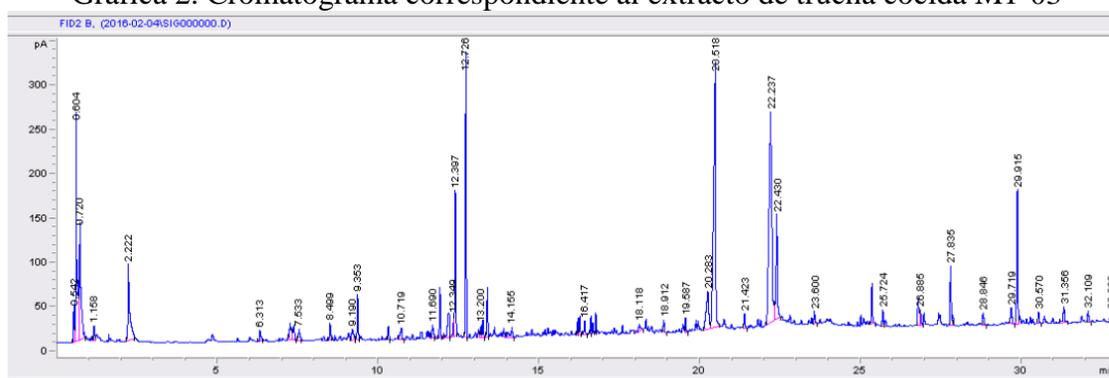
Los cromatogramas obtenidos, nos sirven como referencia cualitativa para la comparación de cada uno de ellos, se obtuvieron los resultados de HAP de las muestras de trucha arcoíris analizadas en laboratorio, facilitando la identificación de los mismos presentes en la trucha, en la siguiente tabla se resume los resultados:

Grafica 1. Cromatograma correspondiente al extracto de trucha cruda M3-1



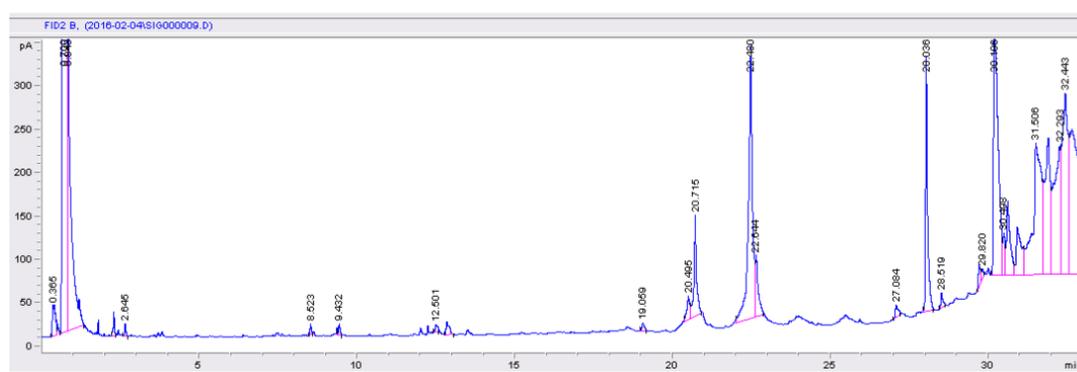
Fuente: Navia; 2018

Grafica 2. Cromatograma correspondiente al extracto de trucha cocida M1-03



Fuente: Navia; 2018

Grafica 3. Cromatograma frita en aceite de girasol + canola M3-43



Fuente: Navia; 2018

Tabla 9.

Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en trucha arcoíris

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	TRUCHA CRUDA (Piel y Músculo)				TRUCHA COCIDA (Piel y Músculo)					
	M1	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5	M6
1. naphthalene										
2. acenaphthylene		X	X		X	X	X	X	X	X

3. acenaphthene	X	X		X	X	X	X	X	X
4. fluorene		X							X
5. phenanthrene									X
6. anthracene	X								X
7. fluoranthene	X	X	X		X	X	X	X	X
8. pyrene	X	X	X		X	X	X	X	X
9. benzo(a)anthracene		X			X	X	X	X	X
10. chrysene					X	X	X	X	X
11. benzo(b)fluoranthene				X					
12. benzo(k)fluoranthene				X					
13. benzo(a)pyrene	X	X	X		X		X	X	X
14. indeno(1,2,3-cd)pyrene									
15. dibenzo(a,h)anthracene									
16. benzo(ghi)perylene	X	X			X		X	X	

Nota: M1 Y M3: Trucheras ubicadas en la zona intermedia donde realizan operaciones de beneficio en la quebrada la Plata. M2 y M4: Trucheras ubicadas en la zona inicial donde realizan operaciones de beneficio en la quebrada la Plata. M5 y M6: Trucheras ubicadas en la zona final donde realizan operaciones de beneficio en la quebrada la Plata. En la columna Trucha Cruda no se reporta presencia de Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos en M2

Navia (2017)

La anterior tabla corresponde a los resultados obtenidos del analisis cromatografico aplicado a las muestras tomadas en la zona de muestreo que esta ubicada en la quebrada la plata del municipio de Mutiscua, se puede establecer la presencia y/o ausencia de los 16 hidrocarburos aromaticos policiclicos establecidos como posibles o probables contaminantes prioritarios definidos por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, se deduce de la tabla que todos los sitios de muestreo evidencian presencia de estos compuestos volátiles que están asociados a carcinogenicidad y teratogenicidad.

Se infiere de la tabla 10, que se presentan, en mayor proporción la presencia de los siguientes compuestos: acenaftileno, acenafteno, fluoranteno, pireno, benzo(a)pireno y benzo(ghi)perileno.

Tabla 10

Identificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

<i>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos</i>	ESTADO DE LA TRUCHA									
	TRUCHA FRITA EN ACEITE DE OLIVA(Piel y Músculo)				TRUCHA FRITA EN ACEITE GIRASOL/CANOLA (Piel y Músculo)					
	M 1	M 2	M 4	M 5	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6
1. <i>naphthalene</i>										
2. <i>acenaphthylene</i>		X	X	X	X					
3. <i>acenaphthene</i>		X	X	X	X					
4. <i>fluorene</i>					X					
5. <i>phenanthrene</i>										
6. <i>anthracene</i>										
7. <i>fluoranthene</i>					X					
8. <i>pyrene</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9. <i>benzo(a)anthracene</i>	X	X	X	X	X			X	X	X
10. <i>chrysene</i>			X					X		
11. <i>benzo(b)fluoranthene</i>								X		
12. <i>benzo(k)fluoranthene</i>					X			X		
13. <i>benzo(a)pyrene</i>	X	X	X	X	X			X	X	X
14. <i>indeno(1,2,3-cd)pyrene</i>										
15. <i>dibenzo(a,h)anthracene</i>										
16. <i>benzo(ghi)perylene</i>	X				X		X		X	X

Nota: M1 Y M3: Trucheras ubicadas en la zona intermedia donde realizan operaciones de beneficio en la quebrada la Plata.M2 y M4: Trucheras ubicadas en la zona inicial donde realizan operaciones de beneficio en la quebrada la Plata.M5 y M6: Trucheras ubicadas en la zona final donde realizan operaciones de beneficio en la quebrada la Plata.En la columna Trucha Frita en aceite de Oliva no se reporta presencia de Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos en los puntos M3 y M6.

Mientras que las muestras de la tabla 8, de trucha sometida a fritura (aceite de oliva; mezcla de aceite de girasol + canola) en la tabla 2 se observa la presencia acenaftileno, pireno, benzo(a)pireno y benzo(g)perileno.

Se deduce de la información anterior, que los picos de mayor predominancia y de señal más fuerte en las muestras fueron los correspondientes pireno, benzo(a)pireno y benzo(a)antraceno. Lo que podría significar que son los de mayor concentración en dichas muestras. Por otro lado, siguiendo el orden de predominancia también encontramos el acenaftileno y acenafteno. Las muestras de trucha frita en mezcla de aceite de canola y girasol presentaron menos presencia de picos de los compuestos en estudio, tal como lo manifiesta Hussein *et. al* 2016, dos de las características generales de los HAP son: alto derretimiento y puntos de ebullición (por lo tanto, son sólidos), baja presión de vapor, y muy baja solubilidad acuosa entre otras. Las últimas dos características tienden a disminuir al aumentar el peso molecular, o viceversa, aumenta la resistencia a la oxidación y la reducción.

De acuerdo al análisis cromatográfico se encontró que los picos de mayor predominancia y de señal más fuerte en las muestras analizadas fueron los correspondientes a los hidrocarburos pireno y benzo(a)anthracene, Lo que podría significar que son los de mayor concentración en dichas muestras. Autores como Hussein *et. al* 2016, afirman que, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes ambientales generados principalmente durante la combustión incompleta de materiales orgánicos (por ejemplo, carbón, petróleo, gasolina, y madera).

Asimismo, teniendo en cuenta el orden de presencia de HAPs también se detectó acenaphthylene y acenaphthene en las muestras de trucha sometida a fritura, en mezcla de aceite de canola y girasol las cuales presentaron menor presencia de picos de los compuestos en estudio; similar a los estudios adelantados por Hussein *et. al 2016*, quien describen, que los HAP son compuestos muy solubles en solventes orgánicos porque son altamente lipofílicos, también manifiestan sensibilidad a la luz, resistencia al calor, conductividad; capacidad de emisión, resistencia a la corrosión y acción fisiológica. Cabe resaltar, que la formación de los HAPs en los alimentos, depende del contenido de grasa del alimento, el tiempo de cocción y la temperatura de calentamiento todos estos factores reportados por estudios adelantados por Tamakawa et al, 2018.

En la tabla 11 se muestra el promedio del daño genotóxico inducido por extractos de trucha arcoíris cruda y sometida a cocción en agua, fritura en mezcla de aceite de girasol con canola

Tabla 11.

Resultados de promedios de daño inducido en el ADN

	Longitud del cometa	Altura del cometa	Área del cometa	Diámetro en la cabeza	Longitud cola
CONTROL NEGATIVO	49,03	41,34	1830,37	44,743	4,65
CONTROL POSITIVO	164,52	44,22	7398,23	44,22	120,32
M1-03	93,51	44,50	4361,51	44,50	49,20
M3-1	87,06	43,82	3878,38	43,82	43,23
M3-2	87,38	43,06	3819,36	50,54	36,92
M3-4	80,41	44,27	3643,40	44,27	36,18

Nota: Clasificación de las Muestras: M1.03 Trucha cocida recolectada en punto intermedio, M3.1 Trucha Cruda recolectada en punto intermedio, M3.2 Trucha cocida recolectada en punto intermedio y M3.4 Trucha Frita en Aceite Girasol+ canola recolectada en punto intermedio control negativo se utilizó DMSO 1%. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrogeno H2O2 100 µM control.

Navia (2017)

En la tabla se observa las muestras recolectadas en la zona intermedia, además se muestra cada una de los parámetros establecidos en la prueba denominada ensayo cometa, para el análisis desarrollado en esta investigación se seleccionaron la longitud y la altura del cometa, en la longitud se observa como el control negativo supera casi tres veces el control positivo, en ese mismo sentido se observa como los parámetros presentan similitud en cada una de los resultados descritos en la presente tabla, para verificar donde se encontraban las diferencias en las muestras se procedió a realizar análisis detallado estadístico, utilizando el software SPSS versión 14 estudiantil.

Para un mejor entendimiento de los resultados, en este estudio establecimos varias categorías de daño así: : categoría 0 (sin daño), cuando el daño no supera el diámetro de la cabeza; categoría 1 (daño bajo), cuando el daño supera una vez el diámetro de la cabeza; categoría 2 (daño moderado), cuando el daño supera 1,5 veces el diámetro de la cabeza; categoría 3 (daño elevado), cuando el daño supera dos veces el diámetro de la cabeza; categoría 4 (daño extremo), cuando el daño supera más de dos veces el diámetro de la cabeza. Siendo para las muestras M1-3, M3-1, M3-2 y M3-4 una categoría del daño de 3 (elevado), tal como se evidencia en la tabla 12

Tabla 12

Rango de Genotoxicidad

Tratamiento	Categoría de Daño	Escala
Control Negativo	0	No había daño
Control Positivo	4	Extremo
M1-03	3	Elevado
M3-1	3	Elevado
M3-2	3	Elevado
M3-4	3	Elevado

Nota: Clasificación de las Muestras: M1.03 Trucha cocida, M3.1 Trucha Cruda, M3.2 Trucha cocida y M3.4 Trucha Frita en Aceite Girasol+ canola

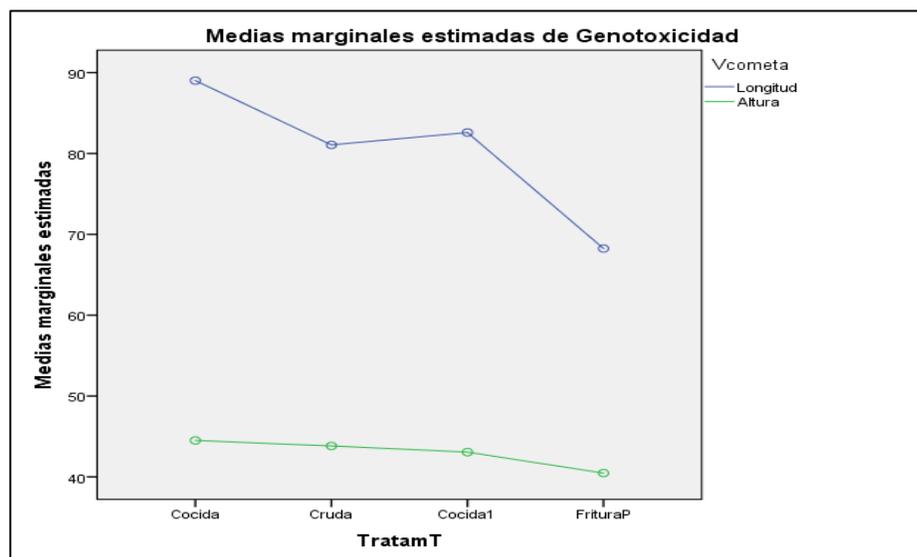
Fuente: Navia, (2018)

Como se puede observar en la tabla 12, se establece la categoría del daño genotóxico presentado en cada una de las muestras analizadas, lo cual infiere que el daño ocasionado corresponde a la escala comprendida entre los valores de 3 elevado (40-80%), y 4, extremo (> 80%), siendo para las muestras M1-3, M3-1, M3-2 y M3-4 una categoría del daño de 3 (elevado).

Las células tratadas con DMSO 1%, muestran un daño espontáneo, de 49.03 μm de longitud (tabla 9); de igual manera, las células tratadas con H_2O_2 100 μM llegan a un valor de 164,52 μm , casi superando el triple en longitud del cometa al control negativo. Como se puede evidenciar en la longitud y la altura del cometa, al ser comparados los resultados de las muestras que fueron sometidas a cocción en agua, y muestra que no recibió ningún tratamiento térmico (cruda) presentan daño elevado, sin embargo, la muestra sometida a fritura en aceite de girasol más canola, en cuanto al daño en longitud del cometa es menor comparado con las otras tres muestras

analizadas si presenta daño. Para determinar el efecto de los factores en el nivel de daño genotóxico se aplicó un análisis de varianza de dos factores.

Grafica 4. *Medias daño genotóxico- Longitud y Altura del Cometa*



Nota: Clasificación de las Muestras: M1.03 Trucha cocida, M3.1 Trucha Cruda, M3.2 Trucha cocida y M3.4 Trucha Frita en Aceite Girasol+ canola y todas fueron tomadas en dos puntos intermedios del recorrido de la Quebrada la Plata-Mutiscua

En la gráfica 4 se observa la comparación entre la longitud y la altura del cometa. Tanto como la longitud y la altura del cometa se ven disminuida en la muestra sometida a fritura en aceite de oliva y canola, los dos aspectos presentan disminución; las muestras que fueron sometidas a cocción en agua y cruda presentan daño en el ADN y los resultados son similares, aunque se puede establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), tal como se muestra en los resultados de ANOVA, en la siguiente tabla:

Tabla 13.

*Resultados de ANOVA***ANOVA**

Genotoxicidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	25161,765	3	8387,255	8,593	,000
Dentro de grupos	1444511,671	1480	976,021		
Total	1469673,436	1483			

Fuente: Navia; (2020)

Como se observan diferencias en el nivel de genotoxicidad, se hizo necesario aplicar una prueba de comparaciones múltiples para establecer dónde están dichas diferencias. Para este caso se aplicó la de Tukey.

Tabla 14.

Resultados de comparaciones múltiples extractos de trucha arco iris sometidos a cocción en agua, crudo, aceite de girasol más canola

Variable dependiente: Genotoxicidad							
HSD Tukey							
(I) TratamT	(J) TratamT	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
Cocida	Cruda	4,32	1,783	,074	-,27	8,90	
	Cocida1	3,93	1,750	,111	-,57	8,43	
	FrituraP	12,40*	1,954	,000	7,37	17,43	
Cruda	Cocida	-4,32	1,783	,074	-8,90	,27	
	Cocida1	-,38	1,711	,996	-4,78	4,02	
	FrituraP	8,08*	1,920	,000	3,15	13,02	
Cocida1	Cocida	-3,93	1,750	,111	-8,43	,57	
	Cruda	,38	1,711	,996	-4,02	4,78	
	FrituraP	8,47*	1,888	,000	3,61	13,32	

Fritur P Cocida	-12,40*	1,954	,000	-	-7,37
				17,43	
Cruda	-8,08*	1,920	,000	-	-3,15
				13,02	
Cocida1	-8,47*	1,888	,000	-	-3,61
				13,32	

Nota: Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = 609,545.

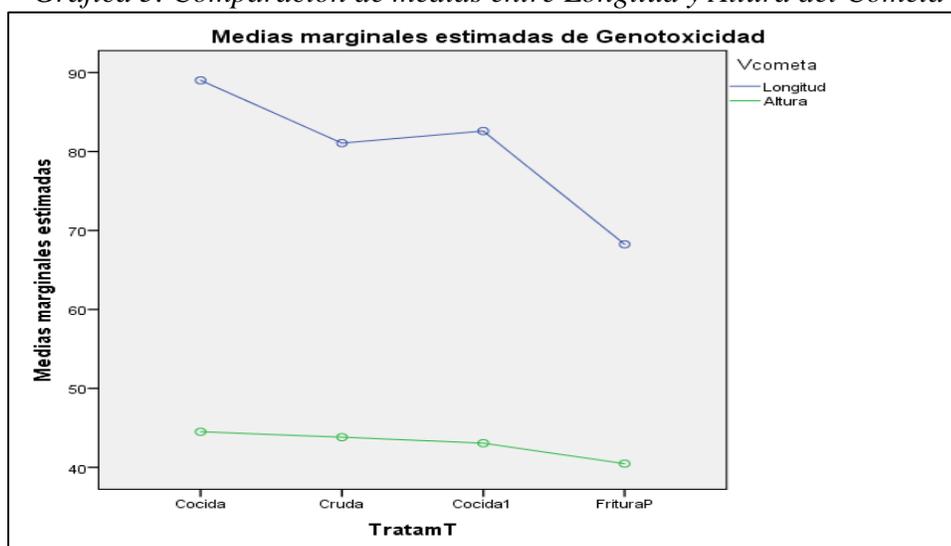
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Fuente: Navia; (2020)

En la tabla 14 se puede observar que hay diferencias significativas en la genotoxicidad de la muestra sometida a fritura con aceite de girasol más canola comparada con las demás muestras que fueron sometidas a cocción en agua y a ningún tipo de tratamiento (cruda).

Como se puede observar en la tabla 10, se establece la categoría del daño genotóxico presentado en cada una de las muestras analizadas, lo cual infiere que el daño ocasionado corresponde a la escala comprendida entre los valores de 3 elevado (40-80%), y 4, extremo (> 80%), siendo para las muestras M1-3, M3-1, M3-2 y M3-4 una categoría del daño de 3 (elevado).

Grafica 5. Comparación de medias entre Longitud y Altura del Cometa



Nota: Clasificación de las Muestras: M1.03 Trucha cocida, M3.1 Trucha Cruda, M3.2 Trucha cocida y M3.4 Trucha Frita en Aceite Girasol+ canola y todas fueron tomadas en dos puntos intermedios del recorrido de la Quebrada la Plata-Mutiscua.

Fuente: Navia; (2020)

En la gráfica 5, tanto la medias en Longitud como en altura del cometa, se reduce la genotoxicidad en la muestra sometida a fritura con aceite de girasol más canola, esta gráfica permite visualizar las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, además de ser complemento de la tabla de comparaciones múltiples entre las muestras analizadas. Para el caso de las muestras procesadas con cocción en aceite de oliva el resultado es negativo, esto se debe al bajo punto de fusión de este tipo de aceite como lo describe Suaterna et al 2018.

Según los resultados alcanzados, se observó un incremento en el daño genotóxico, el cual varía según los tratamientos aplicados, existe un incremento de lesiones en el ADN, lo que infiere a presencia de alteraciones genéticas a nivel celular, como se observa en estudios realizados por Zelinkova et al 2018; en este sentido, se debe tener en cuenta, que en alimentos de origen animal como carne, pescado y otros alimentos de mar, los parámetros como depósitos de

lípidos o tejidos, estructura y textura del cuerpo, piel o tejidos de exoesqueleto, se ven afectados por un indicador importante: la bioconcentración en estudios realizados por Singh et al 2015. Como consecuencia de este factor, se utiliza la biomonitorización de la contaminación por HAP. Accidentes como el de la plataforma Deepwater Horizon en el Golfo de México, o el hundimiento del petrolero Prestige cerca de la costa española provocó, en consecuencia, la prohibición temporal de la recolección de moluscos bivalvos, como las ostras y otros mariscos. Sin embargo, los estudios mostraron que el contenido inicialmente de HAP de los mejillones volvió rápidamente a los niveles de fondo (Óscar et al., 2006; Gohlke et al., 2011)

Por otra parte, la presencia de HAP en diferentes productos alimenticios y sus efectos genotóxicos y mutagénicos, se han centrado en los métodos de cocción; es así que el procesamiento, envasado, procesos térmicos como secado, horneado, asar y freír, contribuyen significativamente en la formación de HAP (Ledesma et al., 2014; Orecchio et al., 2009), además de los radicales libres generados durante la combustión de alimentos, a altas temperaturas recombinaciones para formar HAP ligeros seguidos de HAP pesados, que se mueven a compartimentos de cadena alimentaria hidrófobos, finalmente retenidos en alimentos ricos en grasa(Luzardo et al., 2013). Los resultados obtenidos al someter la trucha a cocción, permiten evidenciar la presencia de HAP; y que los extractos obtenidos muestran que la genotoxicidad está en un rango medio, lo que se puede inferir de estudios adelantados por (Schwerdtle et al 2010) quien afirma, que los efectos genotóxicos, de algunos HAP, se han demostrado tanto en roedores como en pruebas in vitro; utilizando líneas celulares de mamíferos (incluidas las humanas). Adicionalmente la mayoría de los HAP no son genotóxicos por sí mismos, y deben

metabolizarse a sus epóxidos de diol, que luego reaccionan con el ADN para inducir daño en el ADN.

Los resultados obtenidos en el ensayo cometa, siendo un rango medio y alto de genotoxicidad, se asocia a la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos, tal como se observa en los cromatogramas presentados en los anexos del presente trabajo, y en la presencia de los siguientes HAPs: acenaftileno, acenafteno, fluoranteno, pireno, benzo(a)pireno y benzo(g)perileno y en las muestras de trucha sometida a fritura acenaftileno, pireno, benzo(a)pireno y benzo(g)perileno. Tal como lo describe (Langana et al 2018), el medio acuático y la dieta es una de las rutas más importantes de exposición al contaminante común B [a] P (Benzo a pireno). Estudios previos han demostrado su presencia en la dieta y tejido de numerosos organismos.

Además de su biotransformación por organismos inferiores y su posterior transferencia de la cadena alimentaria. Los estudios también han confirmado la captación activa y metabolismo de este compuesto a través de la dieta de los peces, vertebrados y mamíferos. Por otra parte, los animales expuestos a altos niveles de ciertos HAP durante largos periodos en estudios de laboratorio desarrollan cáncer de pulmón por inhalación, cáncer de estómago por ingerir HAP en alimentos y cáncer de piel por contacto con la piel descrito por (Thamaraiselvan et al 2015). Adicionalmente describen que el BaP (Benzo a pireno) es el HAP más común que causa cáncer en animales, y este compuesto es notable por ser el primer carcinógeno químico descubierto. Según la evidencia disponible, tanto la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como la US EPA (1984) quienes clasificaron varios HAP como carcinógenos para los animales y

algunas mezclas ricas en HAP como carcinogénicas para los humanos. La EPA ha clasificado los siguientes siete compuestos de HAP como probables carcinógenos humanos: benz (a) antraceno, BaP, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, criseno, dibenz (ah) antraceno e indeno (1,2,3-cd) pireno.

Los extractos de trucha que fueron sometidos a análisis de cromatografía de gases y ensayo cometa, procedentes de las piscícolas del municipio de Mutiscua y que se comercializan en la región, inducen actividad genotóxica en linfocitos humanos, lo cual podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta, teniendo en cuenta la relación que existe entre daño genotóxico y aparición de enfermedades tales como el cáncer. Como lo describe el (CONPES 113, 2007) la disponibilidad suficiente y estable de alimentos, el acceso y el consumo oportuno y permanente de los mismos en cantidad, calidad e inocuidad por parte de todas las personas, bajo condiciones que permitan su adecuada utilización biológica, para llevar una vida saludable y activa son los aspectos que pretende la seguridad alimentaria.

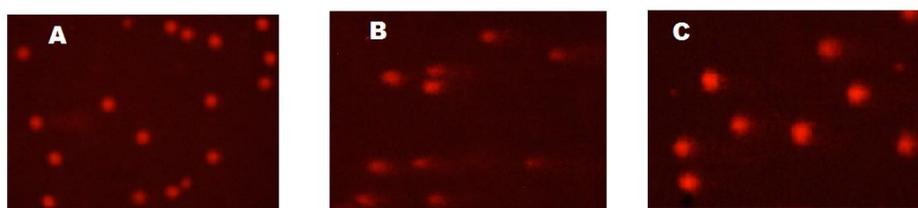


Ilustración 6 Imágenes del daño inducido en linfocitos humanos en muestras de extracto de trucha arcoíris, cultivada municipio de Mutiscua. (N.S).
Navia, (2018)

A: DMSO 1%, **B:** H₂O₂ 100 μM, **C:** 100 μl,. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de fluorescencia Olympus Cx41 equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, objetivo 10 x)

8. CONCLUSIONES

- El análisis cromatográfico realizado a las muestras de trucha arcoíris recolectadas arrojó la presencia de los siguientes hidrocarburos: acenaftileno, acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, antraceno, Fluoranteno, pireno benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)Fluoranteno,, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno
- Los parámetros usados para determinar daño en los linfocitos humanos (longitud cometa, diámetro cabeza, %DNA cabeza, longitud cola, %DNA cola, momento de cola, momento Olive), establece una medición confiable del daño causado por los extractos de trucha cruda y sometida a procesos de cocción.
- Las muestras de trucha arcoíris sometida a procesos de fritura en profundidad, utilizando mezcla de aceite comercial de girasol + canola presentan mayor daño genotóxico en linfocitos comparado con las muestras que no fueran sometidas a procesos similares y de cocción

BIBLIOGRAFÍA

AIASSA, Delia, *Et.al.* Los plaguicidas su relación con la salud humana y ambiental en la provincia de Córdoba. EN: Revista Experiencia Médica [en línea] Vol 27 N2 -(2009) <<http://www.reduas.fcm.unc.edu.ar/los-plaguicidas-su-relacion-con-la-salud-humana-y-ambiental-en-la-provincia-de-cordoba/>> [citado en 4 de noviembre de 2013]

A LUCH, W M Baird. Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Comprehensive Toxicology (Third Edition), Volume 7, 2018, Pages 87-153

ALCALDIA DE MUTISCUA. Norte de Santander-Nuestro Municipio. [en línea]. <http://www.mutiscua-nortedesantander.gov.co/informacion_general.shtml> [citado en 14 de octubre de 2013]

ALOMIRAH, H., *Et.al.*, Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. Food Control, 2011. 22(12): p. 2028-2035.

ALTINOK, I., E. CAPKIN, and H. BORAN, Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2012. 102(1): p. 61-67.

AVISHAI, N., RABINOWITZ, C., MOISEEVA, E., & RINKEVICH, B. (2002). Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. (Vol. 518:). Mutat. Res. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063064>

BADUI DS. Química de los alimentos. 3era ed. Editorial Prentice Hall. México, 2006. p. 213-273, 327-345.

BANAEE, M., A. SUREDA, A. R. MIRVAGHEFI and K. AHMADI (2011). "Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Pesticide Biochemistry and Physiology. 2011. 99(1): 1-6.

BARRERO NIÑO, Fernando Yezid. Determinación del nivel de exposición a plaguicidas por consumo de agua de pozo y la relación con los posibles efectos en la salud de la población residente en la vereda chorrillos del sector rural de suba. Universidad Nacional de Colombia. 2010

BAYRAM, A.; MUEZZINOGLU, A. In Environmental Xenobiotics; Richardson, M., Ed.; Francis & Taylor: London, 1996;pp 333–354.

BRENDLER, S. S., HARTMANN, A., PFUHLER, S., & SPEIT, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing *Mutagenesis*. (Vols. 13-30). Obtenido de <https://academic.oup.com/mutage/article/20/4/245/1069223/The-in-vivo-comet-assay-use-and-status-in>

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO. Real Decreto 142/2002, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (BOE, 44 de 20.2.2002). 2002.

BRINKMANN, B. Quality criteria of industrial frying oils and fats. *Eur.J.Lipid Sci.Technol.* 2000. p.102:539-541.

CARLSON, E.A., Li, Y.y Zelikoff, J.T.,. Benzo[a]pyrene-induced immuno-toxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicol.* 2004a. *Appl. Pharmacol.* 201:40–52.

CELL CULTURE MANUAL . (2008-2009). Sigma Life Science. 3, 230-231

COLOMBIA. DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN. CONPES 113 (27, marzo, 2007) Política nacional de seguridad alimentaria y nutricional (PSAN).Bogotá D.C. :El Departamento, 2007.48p.

COLLINS, A. (2004). The comet assay for DNA damage and repair *Mol. Biotechnol.* (Vol. 12.)

COLOMBIA. ASAMBLEA NACIONAL CONSTITUYENTE DE COLOMBIA. Constitución Política De Colombia 1991. Artículos 64, 65 y 66. Bogotá D.C. 1991. 139p

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Decreto 3075 (23, diciembre, 1997). Por la cual se reglamenta parcialmente la Ley 9 de 1979 y se dictan otras disposiciones. Bogotá D.C. El Ministerio, 1997. p. 58

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Sistemas de información de precios y mercados para la producción acuícola y pesquera, 2009. No.13 Vol. 5 26 de Mar. Al 1 de Abr. 2009.

COLOMBIA. GOBERNACIÓN DE NORTE DE SANTANDER. Instituto Departamental de salud de Norte de Santander. Disponible en www.ids.gov.co

COMMISSION REGULATION (EC), No 466/2001 of 4 February 2005. *Off.J.Eur.Union* L034 2005. p. 3-5.

COOKE, M. y Denis, A.J. "Polynuclear aromatic hydrocarbons: a decade of progress. Battelle, Columbus, OH. 1988.

COUCH, J.A. y Harchbarger, J.C., "Effects of carcinogenic agents on aquatic animals: an environmental and experimental review". *Environ. Carcinogenesis*. 1985. 3:63–105.

CULOTTA, L., De Stefano, C., Gianguzza, A., Mannino, M.R. y Orecchio, S. "The PAH composition of surface sediments from Stagnone coastal lagoon, Marsala (Italy), 2006. *Mar. Chem.* 99:117–127.

CULOTTA, L., Gianguzza, A. y Orecchio, S. "Leaves of *Nerium oleander* L. as bioaccumulators of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the air of Palermo (Italy). Extraction. GC–MS analysis, distribution, sources, *Polycyclic Aromat*". 2005. *Compd.* 25 :327–344.

DAVILA, D.R., Davis, D.P., Campbell, K., Cambier, J.C., Zigmond, L.A. y Burchiel, S.W., 1995. Role of alterations in Ca(2+)-associated signaling pathways in the immunotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Toxicol. Environ. Health* 45: 101–126.

DIKILITAS, M., KOCYIGI, A., & YIGIT, F. A. (2009). Molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(14), 3118–3127

DE LA CRUZ RODRÍGUEZ, Eduard Ruber; HUAMAN GUTIÉRREZ, Juan Orlando. Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4- benzopireno en aceites comestibles alterados por recalentamiento. 2008.

DOBARGANES, M.C. Ultrasonic assessment of oil quality during frying. *J. Agric. Food Chem.* 2002. p. 50 (16):4531-4536

ESSUMANG, D. K., D. K. DODOO and J. K. ADJEL. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in smoke-cured fish products." *Journal of Food Composition and Analysis*. 2012. 27(2): 128-138.

EQANI, S. A.-M.-A.-S., R. N. MALIK, A., CINCINELLI, G. ZHANG, A. MOHAMMAD, A., QADIR, A. RASHID, H. BOKHARI, K. C. JONES and A. KATSOYIANNIS (2013). "Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: The case of River Chenab." *Science of The Total Environment* 450–451. 2013. (0): 83-91.

ESPAÑA VILLAREAL, Juan David. "Análisis de la situación actual y planteamiento de soluciones para los productores artesanales de pescado" Universidad Militar Nueva Granada. 2012.

EUROPEAN COMMISSION. Health and Consumer Protection Directorate-General, Scientific Committee on Food, 2002. Opinion of the science committee on food on the risk to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons occurrence in food, SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final, 2002

FAISAL, M.y Huggett, R.J. 1993. Effects of aromatic hydrocarbons on the lymphocyte mitogenic responses in spot (*Leiostomus xanthurus*). *Mar. Environ. Res.* 35:121–124.

Fang,G.C.,Chang,C.N,Wu,Y.S.,Fu,P.P.C.,Yang,I.L.yChen,M.H.2004.

FILLION, L.; HENRY, CJK. Nutrient losses and gains during frying: a review. *Inter J Food Scien Nutr.* 1998. p. 49:157-268

FRENZILLI, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi,C.y Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour. *Mutat. Res.* 552:187–195.

GENERALITAT DE CATALUNYA. Salut. [en línea].<<http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir1593/edt2008pdf/edt2008es-cap4.pdf>> [citado en 29 de noviembre de 2013]

GERTZ, C. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. *Eur.J. Lipid Sci. Technol.* 2000. p.102, (8,9):566-572.

GIACALONE, A.,Gianguzza, A., Mannino,M.R., Orecchio, S y Piazzese, D. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of marine coastal lagoons in Messina,Italy: extraction and GC/MS analysis, distribution and sources, *Polycyclic Aromat. Compd.* 2004. 24 :135–149.

GUILLEN, M. D.; SOPELANA, P. J. *Food Prot.* 2004, 67, 1904–1913

GOBERNACION DE NORTE DE SANTANDER. Noticias y Actualidad. Gobernación acompaña los productores de trucha. [en línea]. <<http://www.nortedesantander.gov.co/noticia.php?id=6313>> [citado en 18 de octubre de 2013]

GOZGIT,J.M.,Nestor,K.M.,Fasco,M.J., Pentecost,B.T y Arcaro,V.2009. Differential action of polycyclic aromatic hydrocarbons on endogenous estrogen-responsive genes andona transfected estrogen-responsive reporter inMCF-7cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196:58–67

GROVERMANN, C., SCHREINEMACHERS, P., BERGER , T. "Quantifying pesticide overuse from farmer and societal points of view: An application to Thailand." *Crop Protection.* 2013. 53(0): 161-168.

HANSEN, J.D., Landis, E.D.y Phillips, R.B.2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*102:6919–6924.

HARDIN, J.A., Hinoshita, F. y Sherr, D.H., Mechanisms by which benzo[a]pyrene, an environmental carcinogen, suppresses B cell lym-phopoiesis. *Toxicol. 1992. Appl. Pharmacol.* 117:155–164.

HINOSHITA, F., Hardin, J.A.y Sherr, D.H., Fluoranthene induces pro-grammed cell death and alters growth of immature B cell populations in bone marrow cultures. 1992. *Toxicology* 73, 203–218.

HUSSEIN I. ABDEL-SHAFY A*, MONA S.M. MANSOUR B. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian Petroleum Research Institute. *Egyptian Journal of Petroleum.* (2016) 25, 107–123

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). “Some nonheterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures”. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010. p. 92:773.

IARC, Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Heterocyclic Compounds, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man, Vol. 13),2014.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). “Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene”. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2002. p. 82:367.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). “Polycyclic Aromatic Compounds. Part I Chemicals, Environment and Experimental Data, IARC. Monographs on the Evaluation of carcinogen Risk of chemicals to humans”. vol.32, International Agency for Research on Cancer :453. 1983.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. .Documentación-Manual de instrucciones para la toma, preservación y transportes para la toma de muestras de agua de consumo humano para análisis de laboratorio. [en línea]. <<http://www.ins.gov.co/sivicap/Documentacion/Manual%20instrucciones%20toma,%20preservaci%C3%B3n%20y%20transporte%20de%20muestras%20agua.pdf>>[citado en 2 de noviembre de 2013]

KAP-SOON,N.,Do-Youn,L., Cha,J.H.,Joo,W.A.,Lee,E y Chan-Wha, K.2004. Protein biomarkers in the plasma of workers occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Proteomics* 4 :3505–3513.

KARUNARATNE, S.H.P.P., Et.al., Insecticide resistance and, efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Sri Lanka. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013. 107(1): p. 98-105.

KLOSTERMANN, S. A new analytical procedure to differentiate virgin or non-refined from refined vegetable fats and oils. *Eur.J. Lipid Sci. Technol.* 2000. p. 102:329-336.

KOUREAS, M., TSAKALOF, A., TSATSAKIS, A. and HADJICHRISTODOULOU, C. "Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes." *Toxicology Letters* 210(2), 2012. p. 155-168.

KURODA, Y., JAIN, A., TEZUKA, H., & KADA, T. (1992;). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. (Vol. 267). *Mutat. Res*

KRISTOTT, J. Performance of high-oleic oils during frying in comparison with palm olein. *Britannia Food Ingredients Ltd.* 2002. p. 1-17

LEDESMA, E., RENDUELES, M., & DÍAZ, M. (2016). Benzo (a) pyrene penetration on a smoked meat product during smoking time, *Food Additives & Contaminants_*: Part A,31 (10), 1688-1698

LUZARDO, O. P., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, Á., QUESADA-TACORONTE, Y., RUIZ- SUÁREZ, N., ALMEIDA-GONZÁLEZ, M., HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A., ZUMBADO, M. & BOADA, L. D. (2013). Influence of the method of production of eggs on the daily intake of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine contaminants: An independent study in the Canary Islands (Spain). *Food and Chemical Toxicology*, 60, 455–462.

LEME, D.M., Et.al., Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow® kit (Litron) assay. *Chemosphere*, 2012. 86(5): p. 512-520.

LODOVICI, M.; DOLARA, P.; CASALINI, C.; CIAPPELLANO, S.; TESTOLIN, G. *Food Addit. Contam.* 1995, 12, 703–713.

MALISZEWSKA-KORDYBACH,B. y Smreczak, B. “Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination”, *Environ. Intern.* 2003. p. 28 :719–728.

MASTANDREA, C.; CHICHIZOLA, C.; LUDUENA, B.; SANCHEZ, H.; ALVAREZ, H.; GUITIERREZ, A.,. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005. p. 39, 27-36.

MELÉNDEZ, G. I., MARTÍNEZ, M. M., & QUIJANO, P. A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2,5 en . *Iatreia*, 4(25), 347-356.

MENDOZA H., David.” Estudio sobre la acuicultura de la trucha a nivel mundial, el desenvolvimiento de la importación de ovas, la tendencia de la producción nacional y su comercialización. Lima-Perú 2011. Dirección general de acuicultura del despacho viceministerial de pesquería - ministerio de la producción. 2011

MINISTERIO DE AGRICULTURA DE BOLIVIA. Manual de diagnóstico, tratamiento y prevención de intoxicaciones agudas por plaguicidas. Proyecto plaguicidas Bolivia. La Paz Bolivia. 2008.

MINISTERIO DE PESQUERIA. Dirección Regional de Pesquería Tacna ”Capacitación en Manejo, Conservación cultivo, procesamiento y comercialización de trucha” Peru-Ragash 2009.

MORTON, I.D., CHIDLEY, J.E. Methods and equipment in frying en *Frying of Food: Principles, Changes, New Approaches* (Varela, G., Bender, A.E., Morton I.D. Eds.). Ellis Horwood Ltd., Chichester, UK. 1988. p. 377

MUDZINSKI, S.P. 1993. “Effects of benzo[a]pyrene on concanavalin A-stimulated human peripheral blood mononuclear cells in vitro: inhibition of proliferation but no effect on parameters related to the G1 phase of the cell cycle”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 119: 166–174.

NIGRO, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S.y Regoli, F., 2002. “Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the *Anguilla anguilla*. Mar”. *Environ. Res.* 54: 517–520.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Departamento de pesca y agricultura. [en línea] <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es> [citado en 30 de octubre de 2013]

ORTHOEFER, F.T., COOPER, D.S. Evaluation of used frying oil en *Deep frying. Chemistry Nutrition and Practical Applications* (Perkins, E.G., Erickson, M.D. Eds.). AOCS Press, Champaign, IL.1996.

PADRÓN MAÍZ, Asunción Rafael (2010), Lacruz Valero Leida, Piñero Briceño Daniela Elementos Prácticos para la cría de truchas en Venezuela. *Mundo Pecuário*, VI, Nº 2. 2010. p. 157-168.

PANSERI, S., CATALANO, A., GIORGI A., ARIOLI, F., PROCOPIO, A., BRITTI, D., . and CHIESA, L. M. "Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources." *Food Control*. 2014. 38(0): 150-156.

PANTZARIS, T.P. Palm oil in frying en Frying of food (Boskou, D., Elmadfa, I. Eds.). Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA. 1999.

PASTORE, Anna Selene, Santacroce, Maria Pia, Narracci, Marcella, Cavallo, Rosa Anna, Acquaviva, Maria Immacolata, Casalino, Elisabetta, Colamonaco, Michele and Crescenzo, Giuseppe. "Genotoxic damage of benzo[a]pyrene in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) hepatocytes: Harmful effects of chronic exposure" *Marine Environmental Research*. 2014.

PEREZ-CAMINO, M.C. Analytical methods for heated fats. III. Evolution of fatty acids and influence of their position in the triglyceride molecule. *Grasas y Aceites*. 1985. p. 36 (3):186-192.

PHILIPS, D.H.. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet". *Mutat. Res.* 433(1-2):139-147. 1999.

POKORNY, J. Changes of nutrients at frying temperatures en Frying of food (Boskou, D., Elmadfa, I. Eds.). Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA. 1999.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN FOOD. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2007-136) Adopted on 9 June 2008. *The EFSA Journal*. 2008. 724, 1-114.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN FOOD-SCIENTIFIC Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. Available on-line on 13/04/2014 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/724.htm>

QUIJANO, P. ALFONSO y MELÉNDEZ IVAN. Genotoxicidad del aire de Cúcuta-Colombia por HAPs extraídos con diferentes solventes. Universidad de Pamplona, Pamplona-Colombia, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química. 2011

RAMALHOSA, M. J., PAÍGA, P., MORAIS, S., RAMOS, S., DELERUE-MATOS, C. and OLIVEIRA, M. B. P. P. "Polycyclic aromatic hydrocarbon levels in three pelagic fish species from Atlantic Ocean: Inter-specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks." *Food and Chemical Toxicology*. 2012. 50(2): 162-167.

Regulation (EC) No 2065/2003 of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 on smoke flavourings used or intended for use in or on foods.

REYNAUD, S.y Deschaux, P. "The effects of 3-methylcholanthrene on lymphocyte proliferation in the common carp (*Cyprinus carpio*L.)". *Tox-icology*. 2005. p. 211: 156-164.

- ROSELL, J.B. Industrial frying process. *Grasas y Aceites*. 1998. p. 49 (3-4):282-295.
- SAGUY I, DANA D. Integrated approach to deep fat frying: engineering, nutrition, health and consumer aspects. *J Food Engin*. 2003. p. 56:143-52.
- SAKURAI, H., YOSHIHASHI, T., NGUYEN, H.T.T., POKORNY, J. A new generation of frying oils. *Czech J. Food Sci*. 2003. p. 21 (4):145-151.
- SALINAS MARTÍNEZ, Rebeca Isabel, Estimación de riesgo en salud por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos y DDT residual en población infantil del estado de Chiapas, universidad San Luis Potosí,. 2011.
- SANDOVAL VILLASANA, Ana María. Disponible en: <http://www.inecc.gob.mx/>, consultado 5 de noviembre de 2013.
- SEMINARIO INTERNACIONAL DE MEDIO AMBIENTE. (4: 2013: Pamplona) Poster del IV Seminario Internacional de Medio Ambiente. Pamplona: Universidad de Pamplona, Facultad de ingenierías y Arquitectura. 2013.
- SHIBAMOTO, T. "Chromatographic Analysis of Environmental and Food Toxicants". Marcel Dekker, INC., New York, 1998.
- SISTEMA DE SALUD. GOBIERNO DE CATALUÑA. Contaminantes químicos y su presencia en la dieta total de Cataluña. 2008.
- SKADSHEIM, A., SANNI, S., PINTURIER, L., MOLTU, U.-E., BUFFAGNI, M. and BRACCO, L. "Assessing and monitoring local and long-range-transported hydrocarbons as potential stressors to fish stocks." *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. 2009 56(21–22): 2037-2043
- SORIANO, J.M., MOLTO, J.C., MAÑEZ, J. Hazard analysis and critical points in deep-fat frying. *Eur. J. Lipid Sci.Technol*. 2002. p.104, 174-177.
- SOUCI, S.W., FACHMANN, W., KRAUT, H. *Food Composition and Nutrition Tables*. Medpharm, Stuttgart, Germany. 1994.
- SRISAPOOME, P., Ohira, T.,Hirono, I.y Aoki, T.2004. "Genes of the constant regions of functional immunoglobulin heavy chain of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*". *Immunogenetics* 56:292–300.
- STOŁYHWO, A. AND Z.E. SIKORSKI, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review". *Food Chemistry*, 2005. 91(2): p. 303-311

STORELLI, M.M., et. al., Risk characterization for polycyclic aromatic hydrocarbons and toxic metals associated with fish consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013. 31(1): p. 115-119.

SUATERNA HURTADO, Adriana Cecilia. La fritura de los alimentos: pérdida y ganancia de nutrientes en los alimentos fritos. *Escuela de Nutrición y Dietética de la Universidad de Antioquia*. Medellín. Colombia p. 77-88 (2018)

SINGH LOCHAN, VARSHNEY JAY G. AGARWAL TRIPTI. *FOOD CHEMISTRY 2015* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons' Formation and Occurrence in Processed Food.

T SCHWERDTLE, F EBERT, C THUY, C RICHTER, LH MULLENDERS, A HARTWIG Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair *Chem Res Toxicol*, 23 (2) (2010), pp. 432-442

THAMARAISELVAN RENGARAJANAB PERAMAIYAN RAJENDRANB NATARAJAN NANDAKUMARC BOOPATHY LOKESHKUMARD PALANISWAMI RAJENDRANE IKUO NISHIGAKIBAsian Pacific Journal of Tropical Biomedicine Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer Volume 5, Issue 3, March 2015, Pages 182-189

TAMAKAWA KATSUMI, *Comprehensive Toxicology (Third Edition) Capitulo 7 Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* Volume 7, 2018, Pages 87-153

T. Thorsteinsson, *Cancer*, 23 (1969) 455.

T. Thorsteinsson and G. Thordanson, *Cancer*, 21 (1968) 390.

TROSSERO, C., CAFFARENA, G., HURE, E., RIZZOTTO, M. Detección de mutagenicidad en Compuestos N-nitroso con el test de Ames 2006. *Revistas Acta Farmacéutica Bonaerense* Vol. 25 N 01.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. Pesticides [en línea]. <<http://www.epa.gov/pesticides/safety/healthcare/>> [citado en 2 de noviembre de 2013]

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA).1986. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. *Federal Register*, 51(185), pp. 33992–34003.EPA/630/R–00/004, Washington, DC.

U. S. E. P. A., Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, EPA/600/R-93/089, July 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA).1984. Polynuclear Hydrocarbons, vol 10.US-EPA,Washington,DC.1984

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO (UNRC). Departamento de Ciencias Naturales. FCEFQyN- Departamento de Clínica Animal. FAV- UNRC. Departamento de Ciencias Jurídicas. FCH- UNRC. CONICET © 2010 – Revista Experiencia Médica Vol 27 N2 -2009 – Hospital Privado – Centro Médico de Córdoba

WEEKS, B.A., Warinner, J.E., Mathews, E.S., Wishkovsky, A., 1990. Effects of toxicant on certain functions of the lymphoreticular system of fish. *Patho. Mar. Sci.* 32, 369–374.

WEYTS, F.A., Verburg-van Kemenade, B.M., Flik, G., Lambert, J.G. y Wende-laar Bonga, S.E. 1997. “Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes”. *Brain Behav. Immun.* 11:95–105.

60

WHITE, K.L., Lysy, H.H. y Holsapple, M.P. 1985. “Immunosuppression by poly-cyclic aromatic hydrocarbons: a structure activity relationship in B6C3F1 and DBA/2 mice”. *Immunopharmacology* 9:155–164.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1998. Environmental Health Criteria 202: Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.

YAMAGUCHI, K., Near, R., Shneider, A., Cui, H., Ju, S. T. y Sherr, D. H. 1996. “Fluoranthene-induced apoptosis in murine T cell hybridomas is independent of the aromatic hydrocarbon receptor”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139:144–152.

YANG, R., WANG, Y., LI, A., ZHANG, Q., JING, C., WANG, T., WANG, P., and JIANG, G. "Organochlorine pesticides and PCBs in fish from lakes of the Tibetan Plateau and the implications." *Environmental Pollution*. 2010. 158(6): 2310-2316.

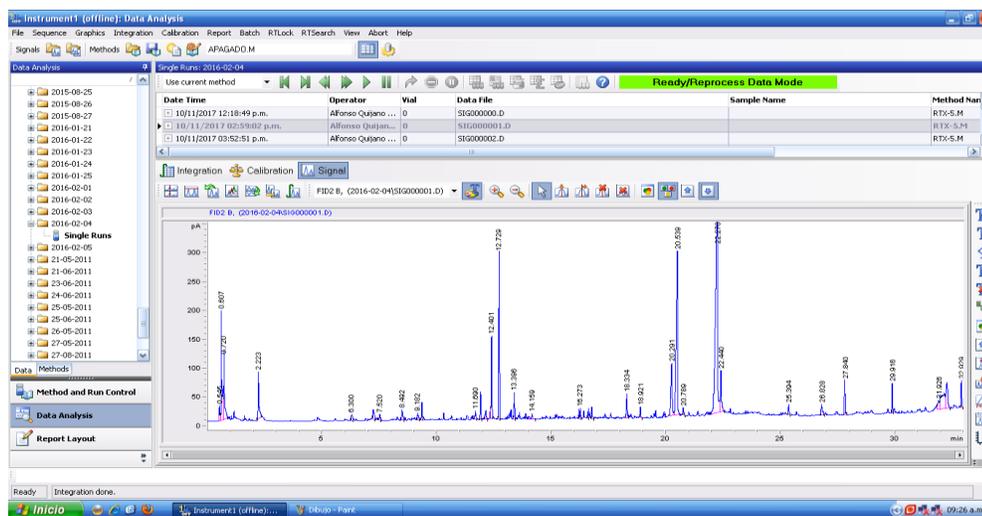
ZELIKOFF, J.T. 1998. “Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals” *Toxicology* 129: 63–71

ZELINKOVA ZUZANA, WENZL THOMAS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food and Feed Reference Module in Food Science 2018

Z. REHANA, A. MALIK, M. AHMAD, Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticide pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P.), India, *Mutat. Res.* 343 (1995) 137–144.

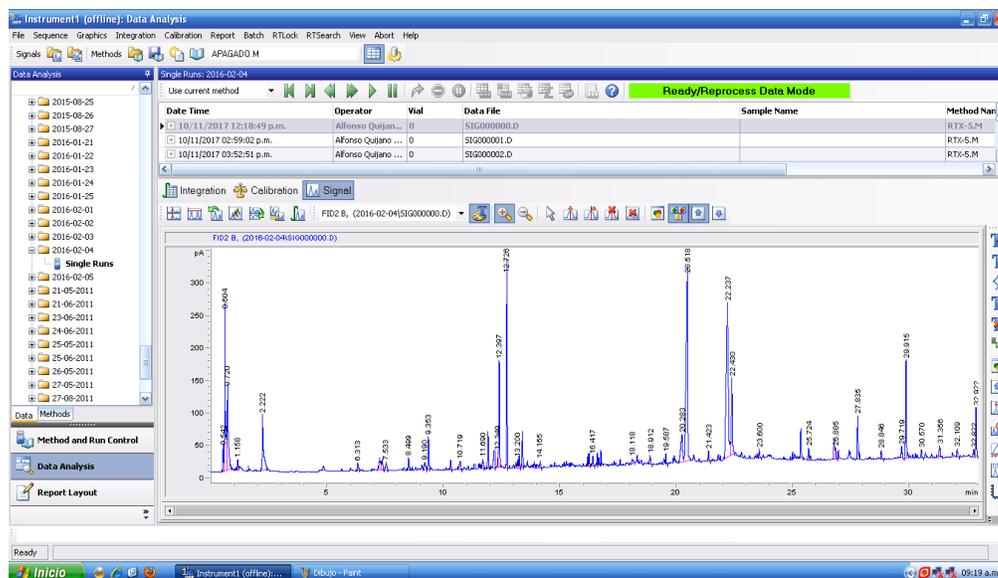
ANEXOS

Anexo A. Cromatograma Muestra de Trucha Cruda- Navia, (2017)



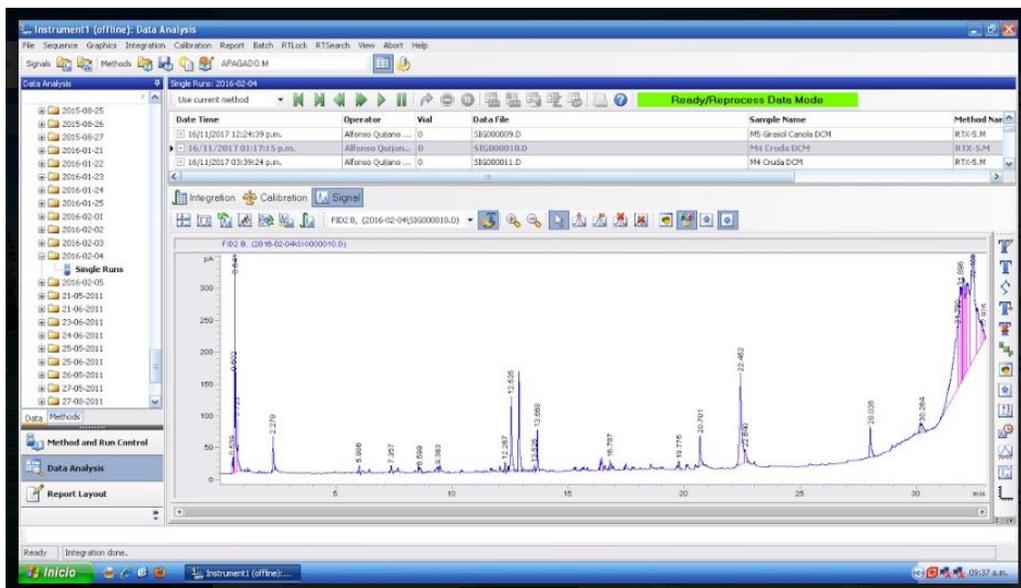
Fuente: - Navia, (2017)

Anexo B. Cromatograma Muestra de Trucha Cocida- Navia, (2017)



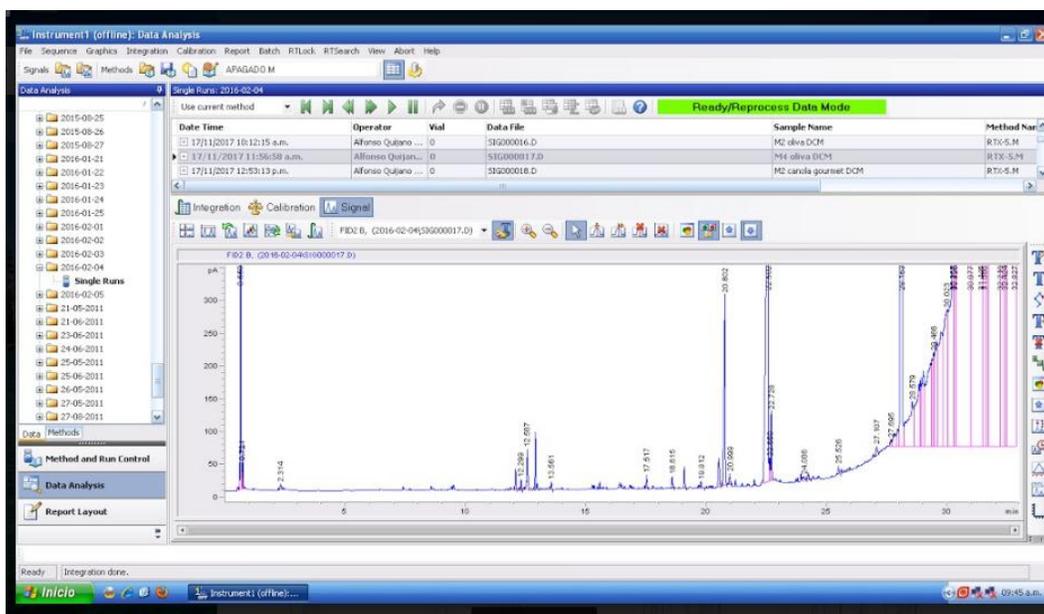
Fuente: - Navia, (2017)

Anexo C. Cromatograma Muestra de Trucha Cruda- Navia, (2017)



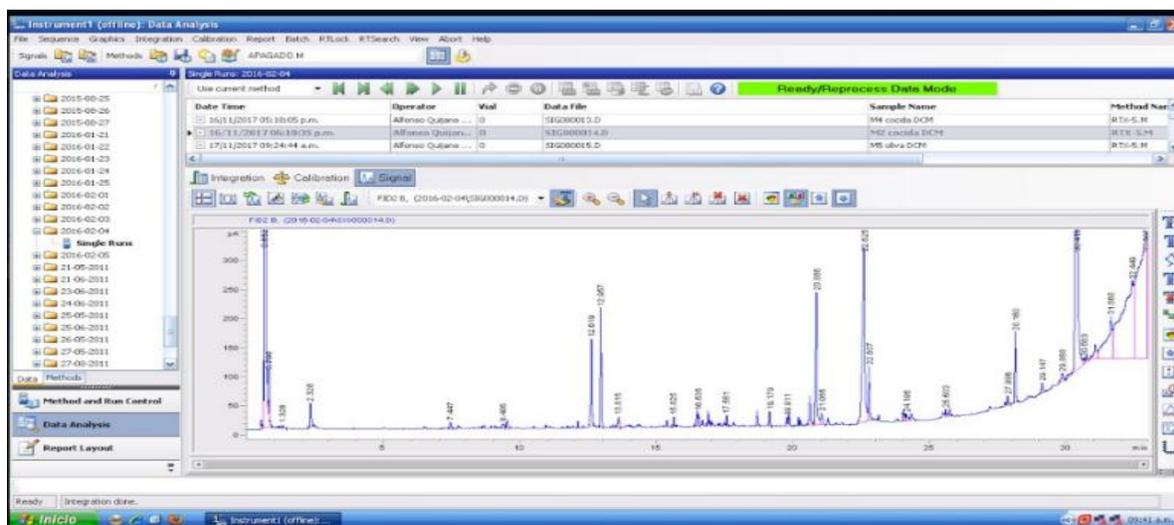
Fuente: - Navia, (2017)

Anexo D. Cromatograma Muestra de Trucha frita en Aceite de Oliva



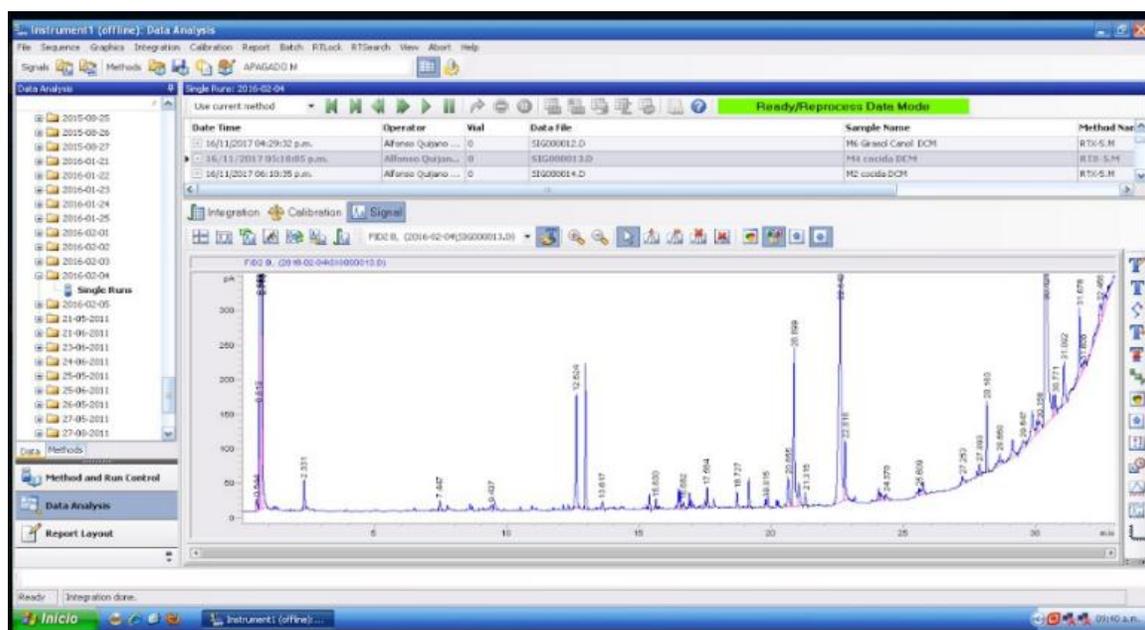
Fuente: - Navia, (2017)

Anexo E. Cromatograma Muestras Trucha Cocida Fuente: - Navia, (2017)



Fuente: - Navia, (2017)

Anexo F. Cromatograma Muestra de Trucha frita en aceite girasol + canola



Fuente: - Navia, (2017)

Anexo G. Información del Patrón Primario Restek

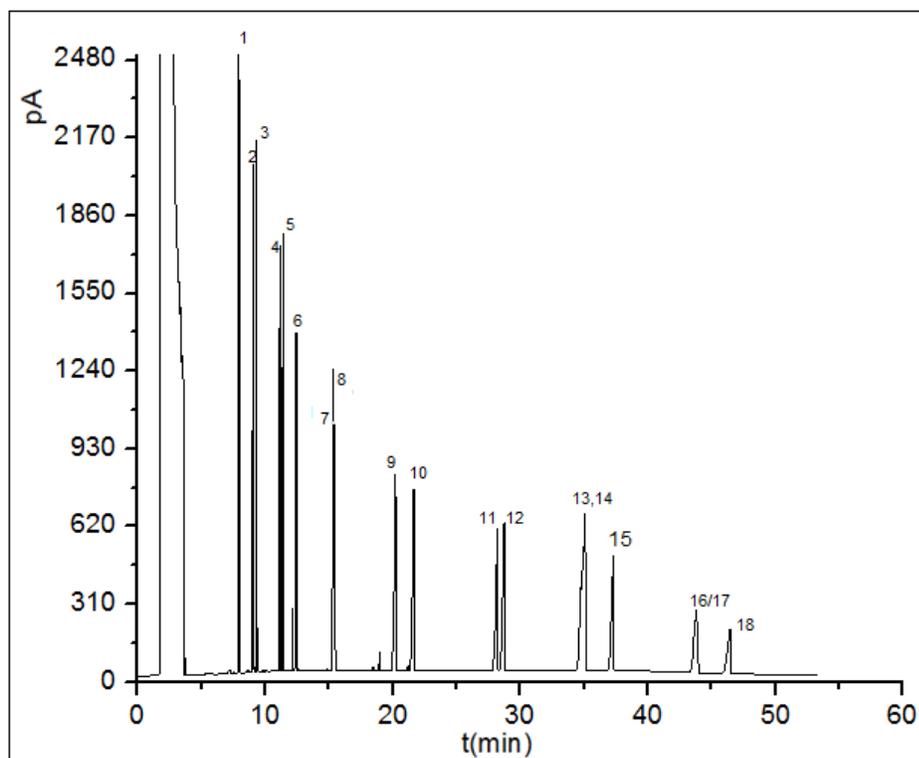
Marca		Restek
Nombre		EPA Method 8310 PAH Mix.
Abreviatura	PHA	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
NAP	Naftaleno	2000
1MNAP	1-Metilnaftaleno	2000
2MNAP	2- Metilnaftaleno	2000
ACY	Acenaptileno	2000
ACE	Acenapteno	2000
FLU	Fluoreno	2000
PHE	Fenantreno	2000
ANT	Antraceno	2000
FLA	Fluoranteno	2000
PYR	Pireno	2000
B(A)A	Benzo (a) antraceno	2000
CRI	Criseno	2000
B(B)F	Benzo (b) fluoranteno	2000
B(K)F	Benzo (k) fluoranteno	2000
B(A)P	Benzo (a) pireno	2000
IND	Indeno(1,2,3 -cd) pireno	2000
D(AH)A	Dibenzo (a,h) antraceno	2000
B(GHI)P	Benzo (ghi) perileno	2000

Curva de Calibración

La curva de calibración, es elaborada con el fin de confirmar que las condiciones seleccionadas para el proceso de Cromatografía son idóneas. Además, proporciona una ecuación del área bajo la curva en función de la concentración del compuesto de interés, y brinda los tiempos de retención de dichos compuestos en la columna utilizada a las mismas condiciones de análisis.

Para tener un patrón de referencia confiable en la construcción de la curva de calibración, es necesario utilizar un patrón que este certificado y que contenga los 18 PHAs. El patrón certificado utilizado es de marca RESTEK (figura 22) sus características se presentan en la tabla ANEXO G. Cabe mencionar que se utiliza este patrón debido a que contiene los 18 HAPs en la misma concentración.

Anexo H. Cromatograma del Patrón Estándar de los 18 PHAs (Restek EPA Method 8310 PAH Mix)

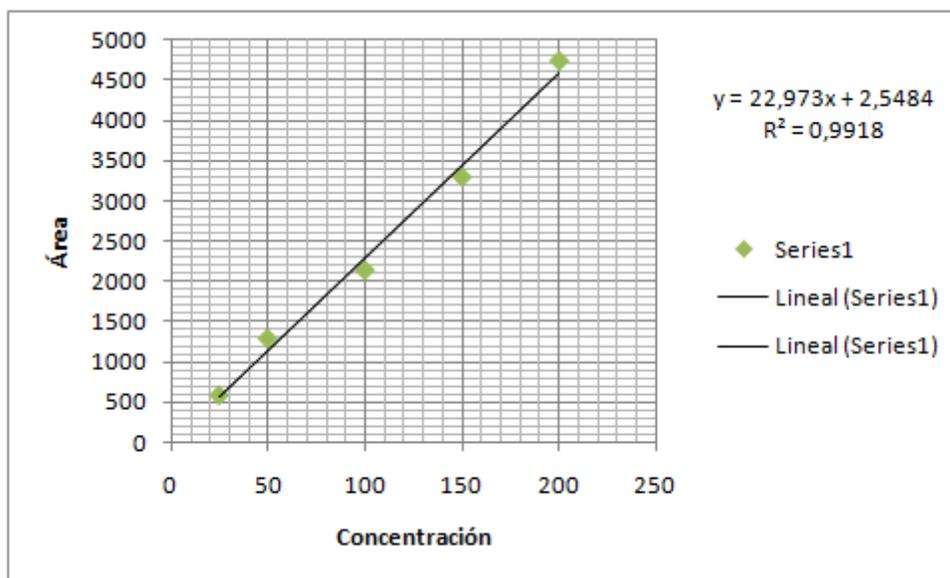
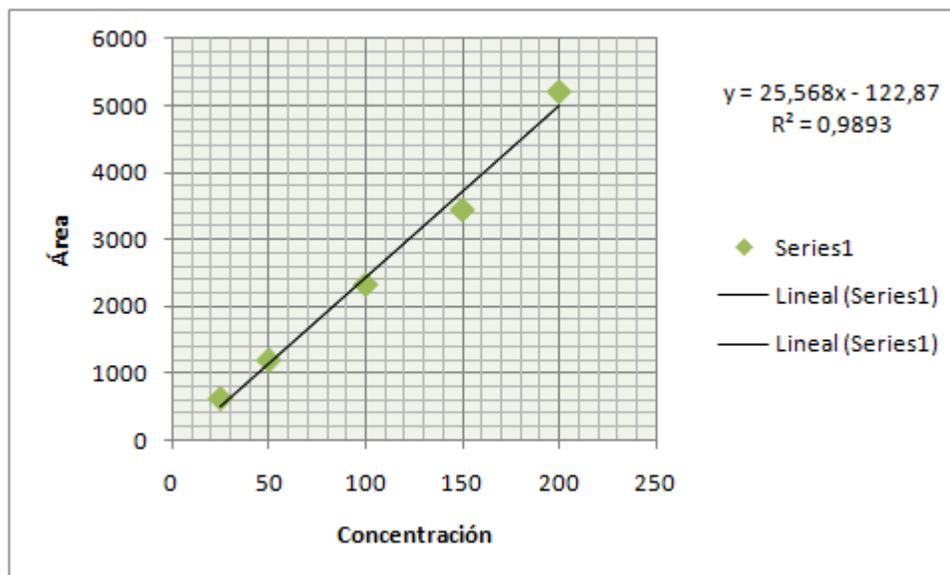


A partir de este patrón se construyó la curva de calibración a diferentes concentraciones, dentro de los rangos esperados. La curva de calibración se generó a cinco concentraciones: 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm y 200 ppm. Los patrones preparados para la curva se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones de la tabla 4; en base a las áreas reportadas para los patrones por el equipo (los resultados se presentan en la tabla 7). También se realizó un ajuste lineal a las 5 concentraciones utilizadas.

Anexo I. Áreas bajo la curva, para diferentes concentraciones de patrón secundario

PHA	Patrón				
	25ppm	50ppm	100ppm	150ppm	200ppm
NAP	617,96	1195, 31	2328,14	3448,89	5218,57
1MNAP	586,13	1294,08	2142,36	3302,7	4748,54
2MNAP	579,31	1286,47	2298,37	3437,15	5175,63
ACY	655,34	1684,36	2743,25	4034,87	5654,44
ACE	605,29	1217,43	2331,44	3340,63	4964,53
FLU	539,22	1171,48	2256,75	3579,31	5149,23
PHE	448,06	990,98	1557,18	2444,12	3472,53
ANT	324,16	636,00	953,18	1349,64	1661,41
FLA	604,131	1294,19	2286,44	3451,21	5122,14
PYR	605,28	1187,17	2129,73	3724,67	5174,98
B(A)A	130,573	672,97	1368,03	2661,25	4130,63
CRI	109,84	521,98	1353,2	2554,71	3425,23
B(B)F/ B(K)F	101,37	564,35	1176,88	2191,36	3189,48
B(A)P	435,62	638,049	1317,17	2211,93	3042,34
IND/ D(AH)A	51,23	151,29	518,1	1001,28	1365,01
B(GHI)P	38,46	384,89	696,3	1419,787	1932,68

Anexo J. Curva de Calibración del NAP

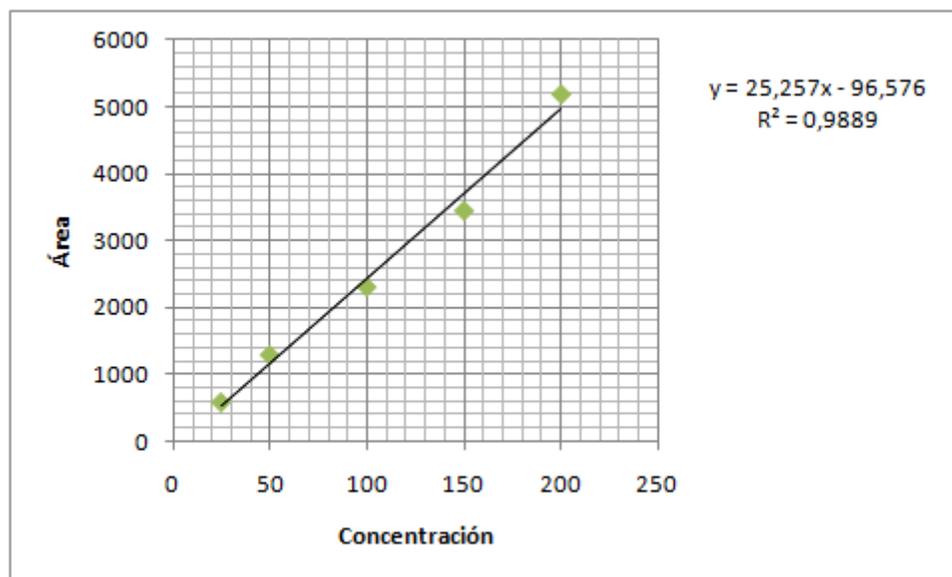


En los anexos J se muestran las curvas de calibración, para los 18 PHAs utilizados, además de los factores de correlación, pendiente y punto de corte utilizados en la calibración del equipo.

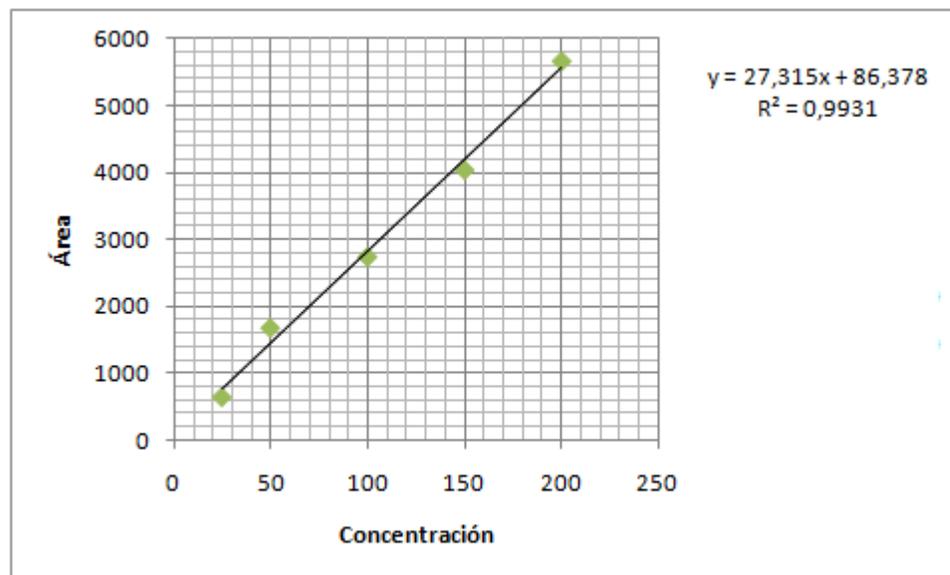
En el Anexo I se observan las áreas bajo la curva para las diferentes concentraciones de patrón

utilizados, y en la tabla 8 los tiempos de retención de cada uno de los PHAs para cada uno de los patrones secundarios.

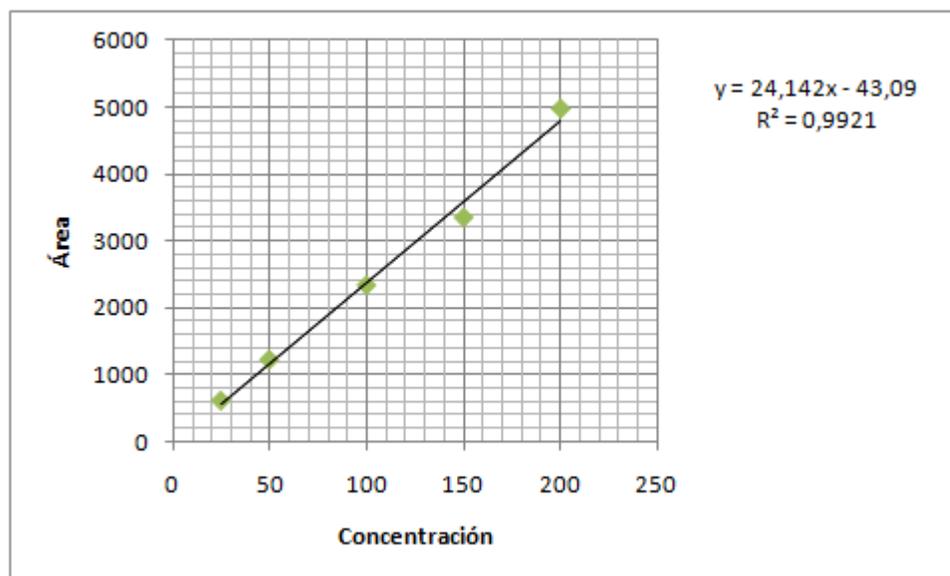
Anexo K. Curva de Calibración del 1MNAP



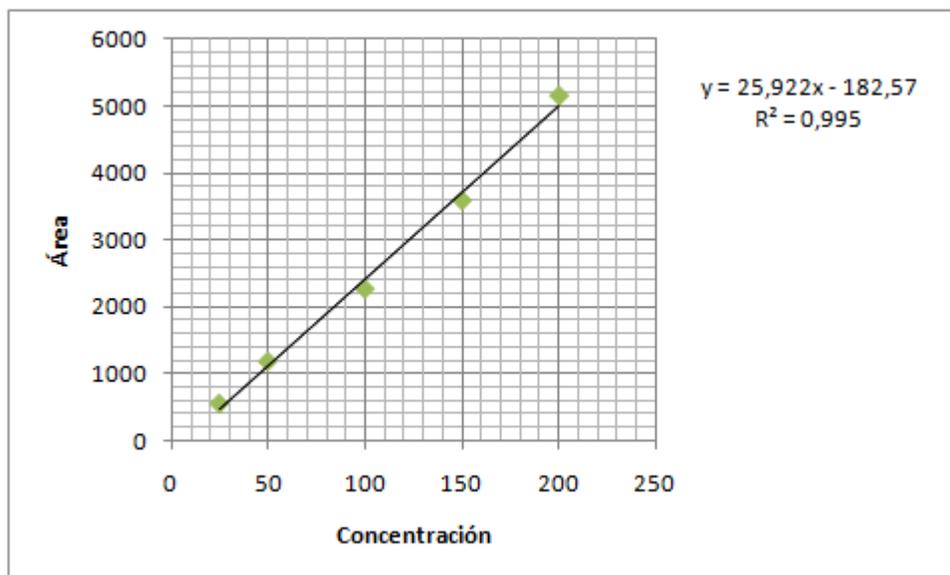
Anexo L. Curva de Calibración del 2MNAP



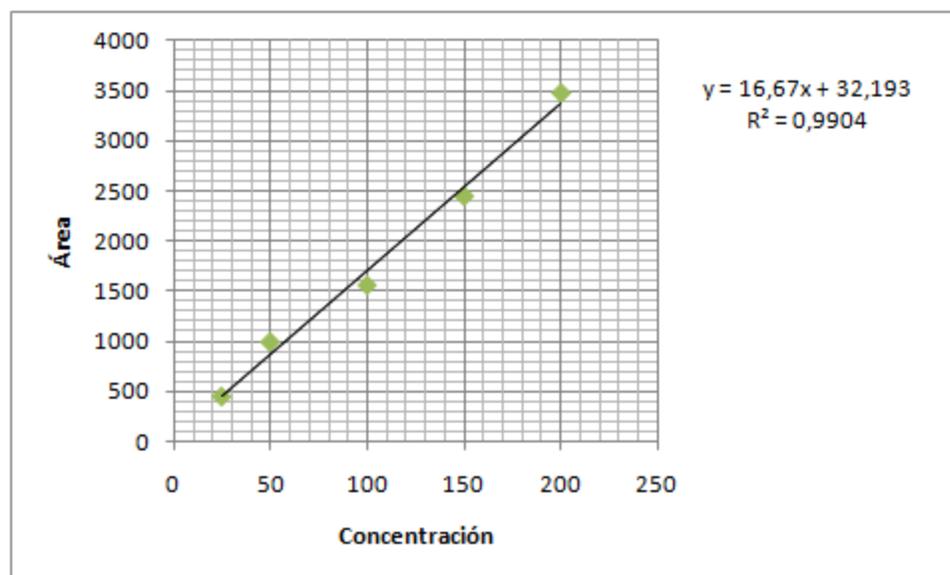
Anexo M. Curva de Calibración del ACY



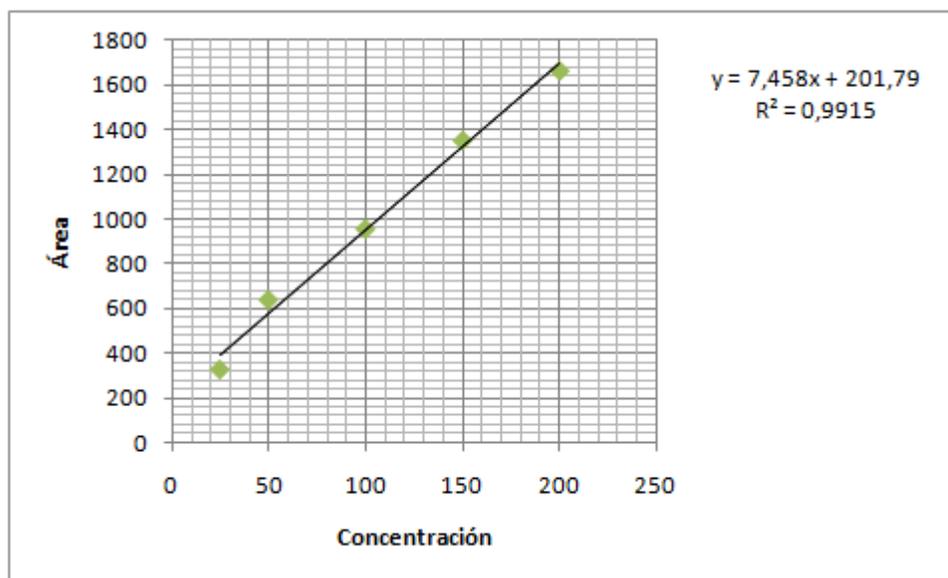
Anexo N. Curva de Calibración del ACE



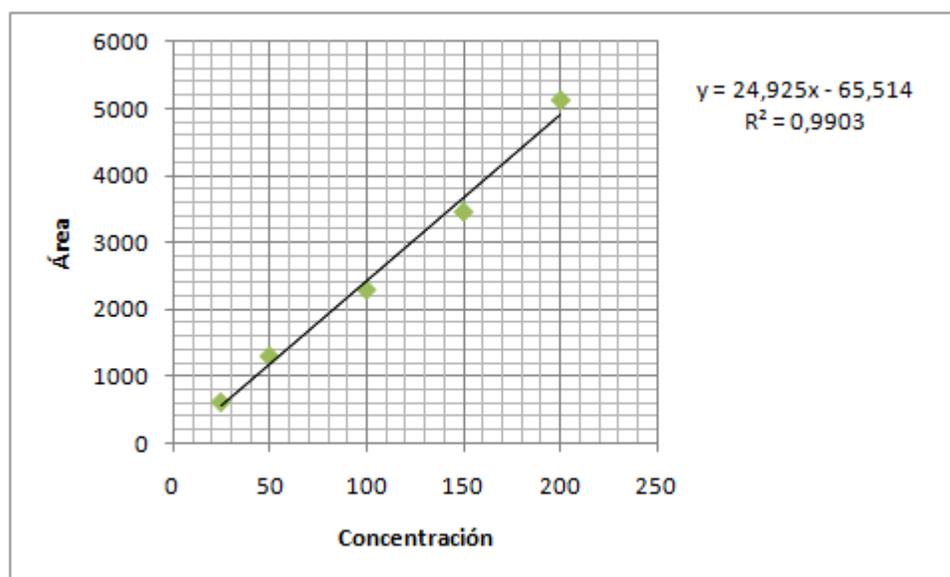
Anexo O. Curva de Calibración del FLU



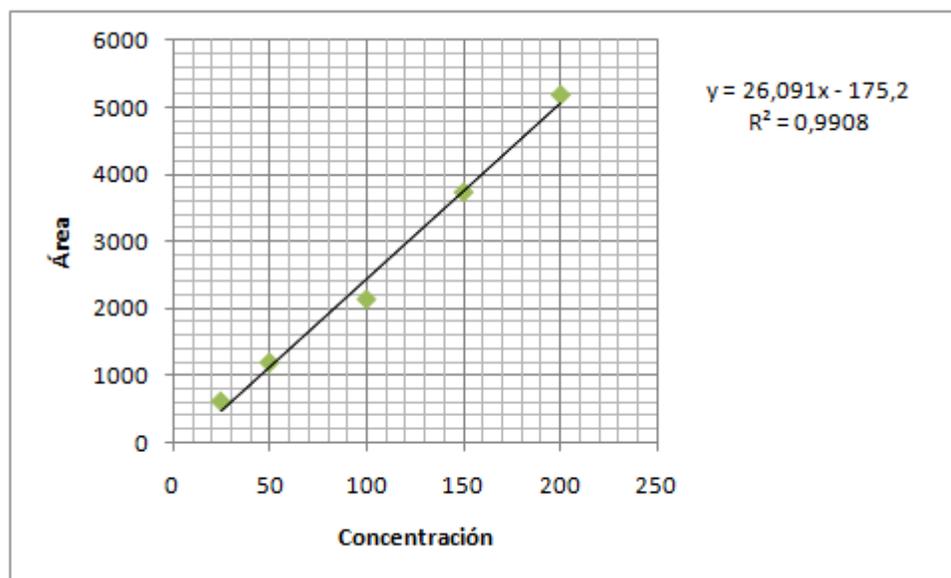
Anexo P. Curva de Calibración del PHE



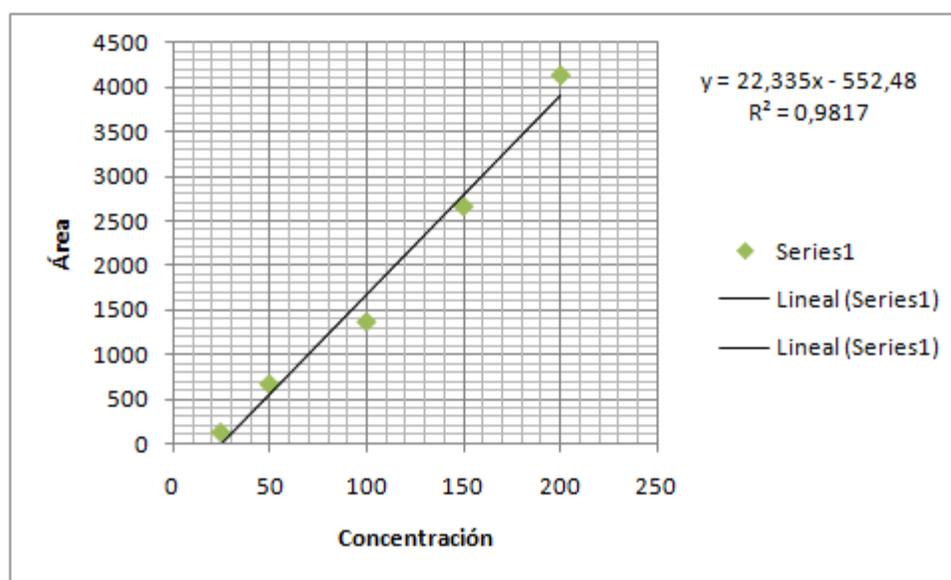
Anexo Q. Curva de Calibración del ANT



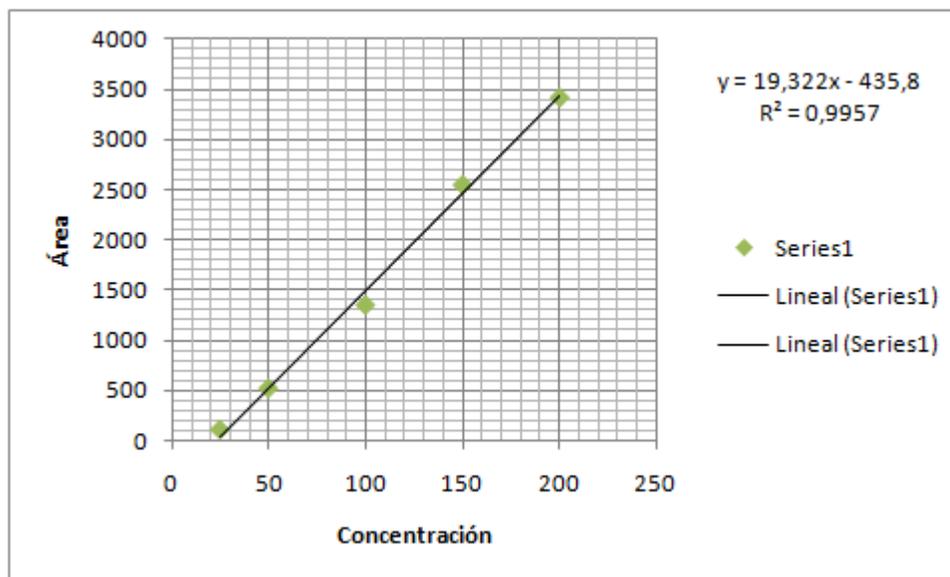
Anexo R. Curva de Calibración del FLA



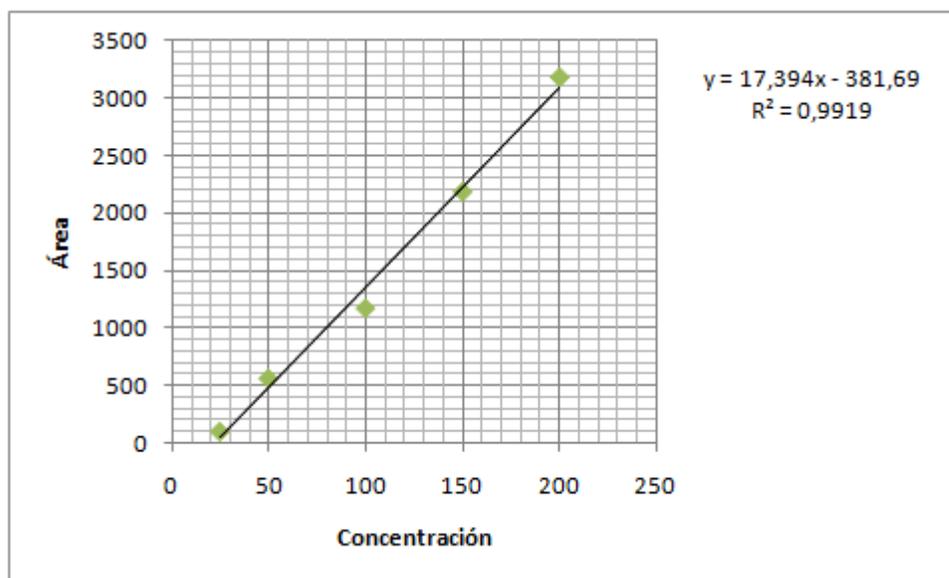
Anexo S. Curva de Calibración del PYR



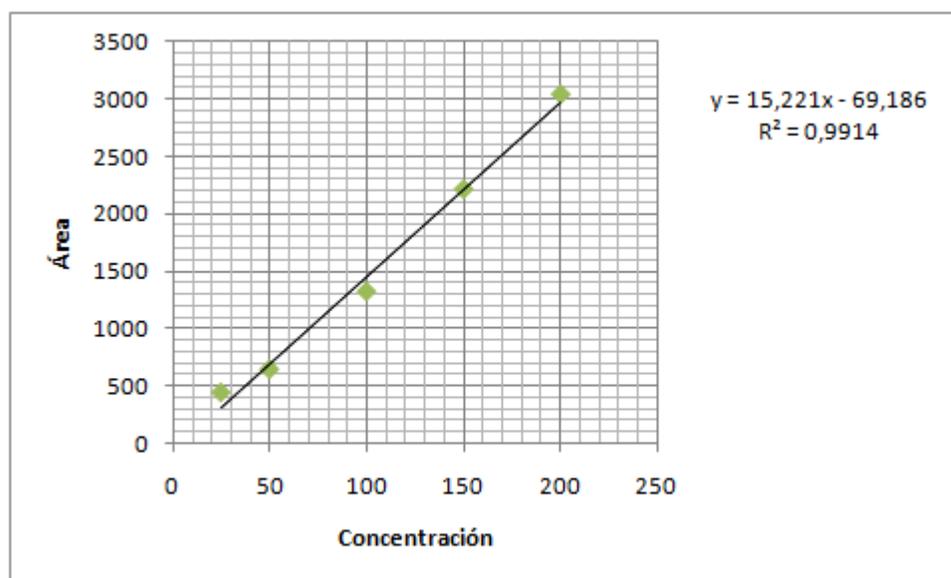
Anexo T. Curva de Calibración del B(A)A



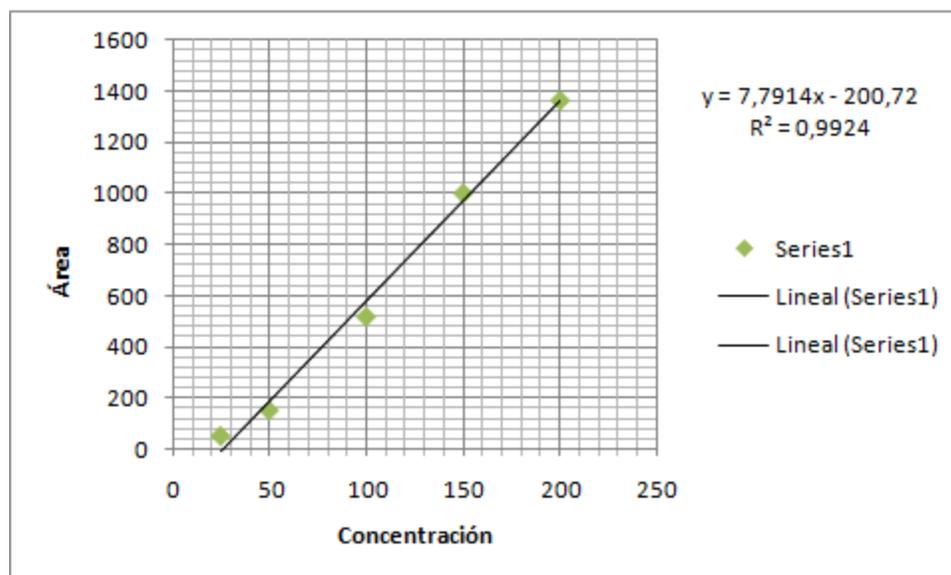
Anexo U. Curva de Calibración del CRI



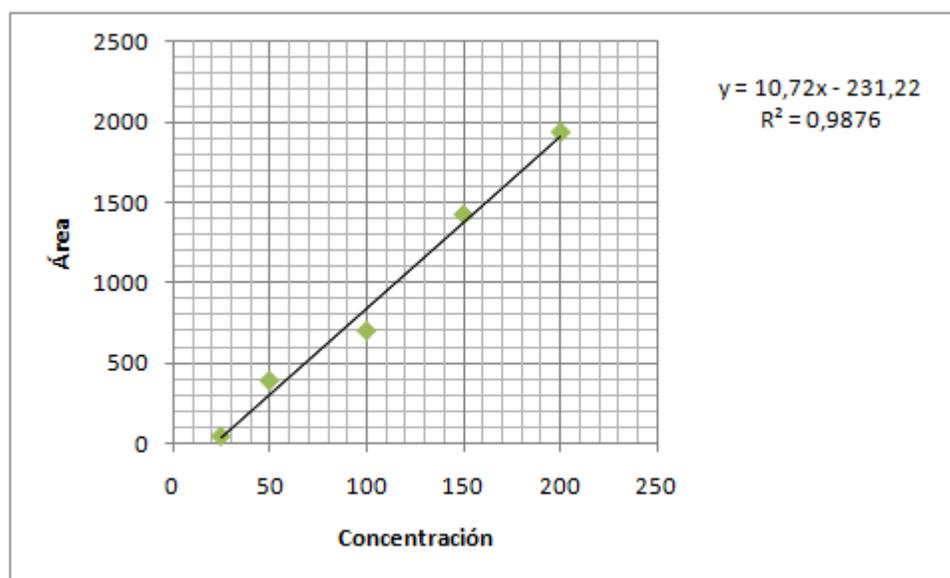
Anexo V. Curva de Calibración de la mezcla B(B)F/B(K)F



Anexo W. Curva de Calibración del B(A)P



Anexo X. Curva de Calibración de la mezcla IND/D(AH)A



ANEXO Y. Curva de Calibración del B(GHI)P

Anexo Y. Tiempos de retención de los patrones de los PHAs a diferentes concentraciones

PHA	Tiempos de Retención (min)					Promedio
	25ppm	50ppm	100ppm	150ppm	200ppm	
Naftaleno	7,897	7,897	7,908	7,080	7,906	7,737
1-Metil-Naftaleno	8,998	9,001	9,009	9,009	9,012	9,005
2-Metil-Naftaleno	9,295	9,303	9,304	9,304	9,327	7,506
Acenaftileno	11,099	11,107	11,109	11,110	11,113	11,107
Acenafteno	11,339	11,346	11,350	11,351	11,347	11,346
Fluoreno	12,370	12,379	12,348	12,383	12,335	12,363
Fenantreno	15,265	15,279	15,276	15,293	15,323	15,287

Antraceno	15,362	15,379	15,387	15,344	15,423	15,379
FLuoranteno	20,054	20,074	20,076	20,107	20,159	20,094
Pireno	21,468	21,498	21,511	21,525	21,589	21,518
Benzo(a) antraceno	27,946	27,986	28,020	28,043	28,094	23,017
Criseno	28,447	28,492	28,523	28,536	28,605	28,520
Benzo(b,k) fluoranteno	34,578	34,630	34,667	34,473	35,187	34,707
Benzo(a)pireno	38,359	36,968	37,043	37,074	37,144	37,317
Indeno-Dibenzo (b) antraceno	43,299	43,403	43,422	43,453	43,507	43,416
Benzo (ghi)perileno	45,921	45,700	45,998	46,102	46,208	45,985

Como se puede observar en la tabla 9, la relación entre la concentración de cada uno de los PHAs y el área reportada por el cromatógrafo es lineal, con coeficientes de correlación cercanos a 1. De esta manera puede asegurarse entonces que el sistema cromatográfico y el procedimiento utilizado es eficiente para el análisis de los PHAs.

Anexo Z. Constantes de la ecuación de línea recta y coeficiente de correlación curva de calibración

PHA	Abreviatura	M	b	R ²
Naftaleno	NAP	25,568	-122,87	0,9893
1-Metilnaftaleno	1MNAP	22,973	2,5484	0,9918
2-Metilnaftaleno	2MNAP	25,257	-96,576	0,9889
Acenaptileno	ACY	27,315	86,378	0,9931
Acenafteno	ACE	24,142	-43,09	0,9921

Fluoreno	FLU	25,922	-182,57	0,995
Fenantreno	PHE	16,67	32,193	0,990
Antraceno	ANT	7,458	201,79	0,9915
Fluoranteno	FLA	24,925	-65,514	0,9903
Pireno	PYR	26,091	-175,2	0,9908
Benzo(a)antraceno	B(A)A	22,335	-552,48	0,9817
Criseno	CRI	19,322	-435,8	0,9957
Benzo(b)fluoranteno	B(B)F	17,394	-381,69	0,9919
Benzo(k)fluoranteno	B(K)F			
Benzo(a)pireno	B(A)P	15,221	-69,186	0,9914
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IND	7,7914	-200,72	0,9924
Dibenzo(ah)antraceno	D(AH)A			
Benzo(ghi)perileno	B(GHI)P	10,72	-231,22	0,9876

El anexo AB muestra el tiempo promedio de retención de los cada uno de 16 HAPs. La información sobre los tiempos de retención de cada uno de los PHAs se presenta en el anexo AB

Anexo AA. Tiempos de retención promedio de los PHAs

Naftaleno	Tiempos de Retención Promedio
1-Metil-Naftaleno	7,737
2-Metil-Naftaleno	9,005
Acenaftileno	7,506
Acenafteno	11,107
Fluoreno	11,346

Fenantreno	12,363
Antraceno	15,287
FLuoranteno	15,379
Pireno	20,094
Benzo(a) antraceno	21,518
Criseno	23,017
Benzo(b,k) fluoranteno	28,520
Benzo(a)pireno	34,707
Indeno-Dibenzo (b) antraceno	37,317
Benzo (ghi)perileno	43,416
Naftaleno	45,985