



INFORME FINAL

Proyecto FIPA 2021-40

Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el Servicio

Septiembre 2023

INFORME FINAL

PROYECTO FIPA 2021-40

EVALUACIÓN DE LA CADENA PRODUCTIVA DEL SALMÓN PARA IDENTIFICAR POTENCIALES FUENTES Y FACTORES DE RIESGO QUE PUEDAN RESULTAR EN LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS POR EL SERVICIO

AUTORES:

FUNCIÓN	AUTOR	TEMA
DIRECTORA	JAVIERA CONEJO KELLY	GESTIÓN DIRECTIVA DEL PROYECTO, SUPERVISIÓN DE CORRECTO DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS.
INVESTIGADORES	JURIJ WACYK	SUPERVISIÓN DE TOMA DE MUESTRA, INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y ENTREGA DE RECOMENDACIONES.
	ALDO MADDALENO	VALIDACIÓN DE METODOLOGÍA ANALÍTICA, INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.
	MATÍAS MATURANA	EXTRACCIÓN DE ÍTEMS DE ENSAYO Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO MEDIANTE HPLC-MS/MS.
	EKATERINA POKRANT	INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.
CONSULTORES EXTERNOS	CERES BCA	CARACTERIZACIÓN DE LA CADENA, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELIGROS, EVALUACIÓN DE VÍAS DE CONTAMINACIÓN, EVALUACIÓN DE RIESGO, DESCRIPCIÓN DE NORMATIVA



FECHA: SEPTIEMBRE 13, 2023

TABLA DE CONTENIDOS

1	RESUMEN EJECUTIVO	10
2	ANTECEDENTES	12
3	OBJETIVOS.....	14
3.1	<i>Objetivo general</i>	<i>14</i>
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	<i>14</i>
4	OBJETIVO ESPECIFICO 1	15
4.1	<i>Metodología.....</i>	<i>15</i>
4.1.1	Caracterización de la cadena de producción.....	15
4.1.2	Identificación y caracterización de los Peligros.....	15
4.1.3	Impacto o daño para la salud humana de los peligros	15
4.1.4	Identificación de las vías de contaminación y factores de riesgo	15
4.1.5	Taller de expertos.....	16
4.2	<i>Resultados</i>	<i>16</i>
4.2.1	Caracterización de la cadena de proceso	16
4.2.2	Identificación y caracterización de los Peligros.....	19
4.2.3	Impacto o daño para la salud humana	22
4.2.4	Identificación de las vías de contaminación y factores de riesgo	23
4.2.5	Taller de expertos.....	37
4.3	<i>Conclusiones parciales Objetivo Específico 1.....</i>	<i>39</i>
5	OBJETIVO ESPECÍFICO 2	41
5.1	<i>Metodología</i>	<i>41</i>
5.1.1	Descripción de la normativa nacional e internacional	41
5.1.2	Descripción de insumos utilizados para alimentación de salmones	41
5.1.3	Descripción de residuos de sustancias no autorizadas	41
5.1.4	Análisis de insumos utilizados para la alimentación de salmones	41
5.1.5	Caracterización y estimación del riesgo	42
5.1.6	Evaluación incertidumbres asociadas a la estimación de riesgos	42
5.1.7	Metodología de toma y análisis de muestra	43
5.2	<i>Resultados</i>	<i>43</i>
5.2.1	Descripción de la normativa nacional e internacional	43
5.2.2	Descripción de insumos utilizados para alimentación de salmones	49
5.2.3	Descripción de residuos de sustancias no autorizadas	50
5.2.4	Análisis de insumos utilizados para la alimentación de salmones	51
5.2.5	Caracterización y estimación del riesgo	52
5.2.6	Evaluación incertidumbres asociadas a la estimación de riesgos	57
5.3	<i>Conclusiones parciales Objetivo Específico 2.....</i>	<i>57</i>
6	OBJETIVO ESPECÍFICO 3	59
6.1	<i>Metodología.....</i>	<i>59</i>

6.1.1	Validación del método analítico para los colorantes; Verde Malaquita (VM), cristal Violeta (CV), y sus metabolitos respectivos en piensos para salmónidos.	59
6.1.2	Resumen de la metodología analítica	59
6.1.3	Requisitos técnicos para implementación	59
6.1.4	Equipamiento	61
6.1.5	Reactivos y soluciones utilizadas para la extracción y análisis	61
6.1.6	Estándares analíticos certificados	62
6.1.7	Procedimiento de extracción	63
6.1.8	Configuración de parámetros de análisis instrumental HPLC-MS/MS 3q	64
6.1.9	Criterios de confirmación analítica	65
6.1.10	Parámetros de validación obtenido mediante HPLC-MS/MS 3Q para las diferentes matrices de estudio	66
6.2	Resultados	66
6.2.1	Método validado: Método Analítico mediante HPLC-MS/MS 3Q para las diferentes matrices de estudio.	66
6.2.2	Análisis de las muestras para la búsqueda activa de los colorantes mencionados obtenidas desde las plantas de piensos.....	70
6.2.3	Evaluación de los resultados de laboratorio obtenidos sobre residuos de sustancias no autorizadas en los piensos.....	74
6.3	Conclusiones parciales Objetivo Específico 3	77
7	CONCLUSIONES	79
8	RECOMENDACIONES	80
8.1	Medidas de Control	80
8.1.1	Medidas auto control de la Industria del salmón.....	80
8.1.2	Medidas de control para la Autoridad	80
8.1.3	Medidas de control Establecimientos Elaboradores.....	81
8.2	Medidas de Monitoreo	81
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
10	ANEXOS	87
10.1	<i>Anexo 1: Presentación Contaminantes Taller de Expertos</i>	87
10.2	<i>Anexo 2: Presentación Resultados Preliminares Evaluación de Riesgos Taller de Expertos</i>	91
10.3	<i>Anexo 3: Evidencias de la realización del Taller de Expertos</i>	95
10.4	<i>Anexo 4: Sistema de control Unión Europea</i>	96
10.5	<i>Anexo 5: Detalle de resultados de parámetros validados en piensos para salmónes</i>	100
10.6	<i>Anexo 6: Detalle de resultados de parámetros validados para harinas de subproductos y Hemoglobina.</i>	112
10.7	<i>Anexo 7. Gráficos de positividad de acuerdo al tipo de muestra según contaminante y grafico de positividad según planta.</i>	124
10.8	<i>Anexo 8. Carta Gantt del proyecto</i>	127
10.9	<i>Anexo 9. Personal participante del proyecto, certificado de actividades realizadas y actas de reuniones de trabajo.</i>	129
10.10	<i>Anexo 10. Taller Final</i>	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características físico-químicas del compuesto Cristal Violeta (elaboración propia).....	20
Tabla 2. Características físico-químicas del compuesto Leuco Cristal Violeta (elaboración propia).....	20
Tabla 3. Características físico-químicas del compuesto Verde Malaquita (elaboración propia).....	21
Tabla 4. Características físico-químicas del compuesto Leuco Verde Malaquita (elaboración propia).....	21
Tabla 5. Caso 1: Concentraciones bajas en ingredientes (elaboración propia).....	32
Tabla 6. Caso 2: Concentraciones medias en ingredientes (elaboración propia).	34
Tabla 7. Caso 3: Concentraciones altas en ingredientes (elaboración propia).	35
Tabla 8. Lista de expertos participantes del Taller.....	37
Tabla 9. Lista de profesionales participantes del Taller.	38
Tabla 10. Escala de evidencia.....	43
Tabla 11. Normativa Nacional Cristal Violeta y Verde Malaquita (Elaboración propia).....	46
Tabla 12. Normativa Internacional Cristal Violeta y Verde Malaquita (Elaboración propia).....	47
Tabla 13. Descripción de principales insumos utilizados para alimentación de salmones (Elaboración propia).....	49
Tabla 14. Resultado del análisis realizado de insumos utilizados para la alimentación de salmones (Elaboración propia).....	51
Tabla 15. Priorización de eventos de riesgo de contaminación por CV/LCV O VM/LVM en la fabricación de piensos.	53
Tabla 16. Priorización de eventos de riesgo de contaminación por CV/LCV O VM/LVM en la cadena de salmón.	54
Tabla 17. Priorización de eventos de riesgo de contaminación por CV/LCV O VM/LVM en la toma de muestra.....	56
Tabla 18. Candidatos toma de muestra según etapa.....	57
Tabla 19. Parámetros eléctricos de fuente de ionización para selección de masas.	64
Tabla 20. Parámetros de ionización de fuente.....	64
Tabla 21. Gradiente de flujos utilizada para separación cromatográfica.....	65
Tabla 22. Tolerancia máxima establecida para intensidad relativa de fragmentación.....	66

Tabla 23. Parámetros analíticos obtenidos para alimento para Peces.	67
Tabla 24. Parámetros analíticos obtenidos para Harinas de Origen animal.	67
Tabla 25. Parámetros analíticos obtenidos para Hemoglobina.	68
Tabla 26. Resultados de análisis para la identificación de contaminantes en alimento completo e ingredientes.	70
Tabla 27. Resumen de los criterios de confirmación de muestras en ensayo.	73
Tabla 28. Concentraciones de contaminantes VM, LVM, CV y LCV en muestras de dieta final e ingredientes positivos.	74
Tabla 29. Muestras de alimento completo positivas a contaminantes y sus respectivos ingredientes positivos a la presencia de contaminante.	76
Tabla 30. Tiempo de retención.	100
Tabla 31. Límite de detección y cuantificación Verde Malaquita en piensos.	100
Tabla 32. Limite detección y cuantificación Leuco Verde Malaquita en piensos.	101
Tabla 33. Limite detección y cuantificación Cristal Violeta en piensos.	102
Tabla 34. Limite detección y cuantificación Leuco Cristal Violeta en piensos.	103
Tabla 35. Linealidad metodología analítica y análisis de pendientes obtenidas en piensos.	104
Tabla 36. Precisión Metodología analítica Verde Malaquita en piensos.	108
Tabla 37. Precisión Metodología analítica Leuco Verde Malaquita en piensos.	108
Tabla 38. Precisión Metodología analítica Cristal Violeta piensos.	109
Tabla 39. Precisión Metodología analítica Leuco Cristal Violeta en piensos.	109
Tabla 40. Recuperación Verde Malaquita en piensos.	110
Tabla 41. Recuperación Leuco Verde Malaquita en piensos.	110
Tabla 42. Recuperación Cristal Violeta en piensos.	111
Tabla 43. Recuperación Leuco Cristal Violeta en piensos.	111
Tabla 44. Límite de detección y cuantificación Verde Malaquita Harinas.	112
Tabla 45. Límite de detección y cuantificación Leuco Verde Malaquita Harinas.	112
Tabla 46. Límite de detección y cuantificación Cristal Violeta Harina.	113
Tabla 47. Límite de detección y cuantificación Leuco Cristal Violeta Harinas.	113
Tabla 48. Linealidad metodología analítica y análisis de pendientes obtenidas para harinas de subproductos.	114
Tabla 49. Límite de detección y cuantificación Verde Malaquita Hemoglobina.	118
Tabla 50. Límite de detección y cuantificación Leuco Verde Malaquita Hemoglobina.	118
Tabla 51. Límite de detección y cuantificación Cristal Violeta Hemoglobina.	119

Tabla 52. Límite de detección y cuantificación Leuco Cristal Violeta Hemoglobina119

Tabla 53. Linealidad metodología analítica y análisis de pendientes obtenidas para hemoglobina.120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de posibles vías de contaminación en la cadena del salmón (elaboración propia).	24
Figura 2. Diagrama de fuentes potenciales de riesgo de introducción de los peligros (elaboración propia).	25
Figura 3. Modelo tricompartmental de la cinética de contaminantes (Berntssen et al., 2018).	30
Figura 4. Concentraciones de LCV y LVM simuladas por modelo matemático-computacional(Berntssen et al., 2018).	32
Figura 5. Concentraciones simuladas de LCV y LVM en modelo matemático considerando las concentraciones de piensos en el Caso 1 (adaptado de Berntssen et al., 2018 y datos propios).	33
Figura 6 a y b. Concentraciones simuladas de LCV y LVM en modelo matemático considerando las concentraciones de piensos en el Caso 2 (adaptado de Berntssen et al., 2018 y datos propios).	35
Figura 7 a y b. Concentraciones simuladas de LCV y LVM en modelo matemático considerando las concentraciones de piensos en el Caso 3 (adaptado de Berntssen et al., 2018 y datos propios).	36
Figura 8. (a.1.) cromatograma de VM (329.4/313.2) representativo de inyección de estándar certificado; (a.2.) cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo); (b.1.) cromatograma de LVM (331.4/239.3) representativo de inyección de estándar certificado; (b.2.) cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo); (c.1.) cromatograma de CV (372.5/356.3) representativo de inyección de estándar certificado; (c.2.) cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo); (d.1.) cromatograma de LCV (374.6/358.3) representativo de inyección de estándar certificado; (d.2.) cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo).	69
Figura 9. Porcentajes de muestras positivas a los contaminantes Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita y Leuco Cristal Malaquita respecto a las 59 muestras.	73
Figura 10. (a.1.) cromatograma de VM (329.4/313.2) representativo de inyección de estándar certificado; (a.2.) cromatograma de VM (329.4/313.2) detectado en muestra ID E087-1651; (b.1.) cromatograma de LVM (331.4/239.3) representativo de inyección de estándar certificado; (b.2.) cromatograma de LVM (331.4/239.3) detectado en muestra ID E069-8679; (c.1.) cromatograma de CV (372.5/356.3) representativo de inyección de estándar certificado; (c.2.) cromatograma de CV (372.5/356.3) detectado en muestra ID E073-888; (d.1.) cromatograma de LCV (374.6/358.3) representativo de inyección de estándar certificado; (d.2.) cromatograma de LCV (374.6/358.3) detectado en muestra ID E069-8679.	77

Figura 11. Porcentaje del tipo muestras positivas a Cristal Violeta y Leuco Cristal
Violeta.124

Figura 12. Porcentaje del tipo muestras positivas a Verde Malaquita y Leuco
Verde Malaquita.125

Figura 13. Gráfico que muestra porcentaje de positividad según planta
muestreada.126

1 RESUMEN EJECUTIVO

Dentro de las sustancias no autorizadas con prohibición de uso en todos los sistemas de producción animal, incluida toda la cadena productiva del salmón, están los colorantes Verde Malaquita, Cristal Violeta y sus formas reducidas leuco-Verde Malaquita y leuco-Cristal Violeta respectivamente. Considerando que estos colorantes son potencialmente tóxicos para la población humana, las organizaciones internacionales han concluido que no existe un nivel seguro de residuos de estos colorantes y sus metabolitos en los alimentos, que representen un riesgo aceptable para los consumidores. Por esta razón, las autoridades competentes deberían prevenir la presencia de sus residuos en los alimentos, incluidos los de origen animal.

En Chile, a nivel de la salmonicultura, existe el Programa Oficial de Control de Residuos de Productos Farmacéuticos, Sustancias Prohibidas, Sustancias No Autorizadas y Contaminantes en músculo de salmón con piel y proporciones naturales cuando corresponda. En todas las muestras oficiales analizadas por el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, durante el período 2019-2021 no se ha detectado la presencia de Verde Malaquita, Cristal Violeta y sus formas reducidas (metabolitos). Sin embargo, entre los años 2019 al 2021, el Servicio Veterinario de la Federación Rusa ha notificado 25 detecciones de estos colorantes en músculo de salmón de origen nacional.

Producto de lo anterior, la autoridad ha considerado necesario efectuar una evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas (Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita y sus formas reducidas) en músculo de salmón.

A objeto de dar cumplimiento a lo anterior, se realizó una evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas en músculo de salmón. Se caracterizaron las etapas de agua dulce, agua de mar, procesamiento, comercialización y la fabricación de alimento. De la misma forma, se caracterizaron los peligros junto con los daños potenciales que podrían tener para la salud humana. Se identificaron como principales vías de contaminación de la cadena los desinfectantes y antisépticos, envases y tintas, agua, piensos e insumos. Para validar estas vías de ingreso se realizó un taller de expertos con participantes de la academia, industria, laboratorios y del sector público. En este taller se concluyó que los insumos en general y de origen animal en particular, que componen los piensos representan el mayor riesgo para la introducción de los peligros a la cadena productiva de salmón.

En el ámbito nacional, la normativa correspondiente a la autorización, certificación y fiscalización de los establecimientos pesqueros incumbe al Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). En el caso de la normativa correspondiente a la alimentación animal y sus límites máximos, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) es la autoridad competente. Por otra parte, la regulación concerniente a los límites máximos en alimentos de consumo humano corresponde al Ministerio de Salud. Al respecto, Chile tiene una de las normas más estrictas del mundo, ya que la actual legislación del país clasifica a los colorantes triarilmetanos como no permitidos, lo que implica que no deben ser detectados en las muestras analizadas. En el ámbito internacional, existen numerosos países que establecen la prohibición de uso de colorantes con Verde Malaquita y Cristal Violeta en producción de peces, definiendo valores referenciales de residuos cada vez más bajos.

Para la evaluación de riesgo, se utilizó una metodología para elaborar un score de riesgo de las distintas vías de ingreso de los peligros analizados en las diferentes etapas de la cadena productiva.

Esta evaluación identificó como de mayor riesgo las materias primas y piensos contaminado en las etapas de agua dulce y agua de mar, además del etiquetado con tinta que contenga estos contaminantes en el proceso de toma de muestra y análisis de laboratorio.

Se realizó un levantamiento de la situación de contaminación en piensos para peces con sustancias no autorizadas. Para esto se tomaron muestras de insumos y piensos de empresas productora de piensos. Estas muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Los resultados obtenidos mostraron que la contaminación con CV y VM de los subproductos de origen animal, pueden conllevar a la presencia de residuos en la dieta final. Esto es posible incluso considerando el factor de dilución de estos sub productos debido a la incorporación de otros ingredientes durante la formulación del pienso.

A partir de los resultados obtenido en la investigación, se proponen medidas de monitoreo y control para evitar la presencia de residuos de sustancias no autorizadas en alimentos para peces, mediante el monitoreo de los ingredientes de origen animal, como harinas de plumas y subproductos, dado que resultaron ser estos el principal factor de riesgo para la presencia de estas sustancias no autorizadas en los alimentos destinados a la alimentación de peces.

2 ANTECEDENTES

Dentro de las sustancias no autorizadas, con prohibición de uso en todos los sistemas de producción animal incluida toda la cadena productiva del salmón, están los colorantes Verde Malaquita (VM), Cristal Violeta (CV) (violeta de genciana) y sus formas reducidas leuco-Verde Malaquita (LVM) y leuco-Cristal Violeta (LCV) respectivamente. En estudios realizados en roedores se ha demostrado que estos colorantes son potencialmente tóxicos para el ser humano, teniendo efectos genotóxicos (perjudiciales para el ADN) y carcinógenos, induciendo principalmente tumores en la tiroides y el hígado (Sudova et al, 2007; The National Food Institute, 2007).

El Codex Alimentarius, señala que de acuerdo a las evaluaciones de riesgo del JEFCA (Comité de expertos en contaminantes de la FAO/OMS) realizadas el año 2008 para Verde Malaquita y el año 2013 para Cristal Violeta, no existe un nivel seguro de residuos de estos colorantes y sus metabolitos en los alimentos que representen un riesgo aceptable para los consumidores. Por esta razón, las autoridades competentes deberían prevenir la presencia de residuos de verde de malaquita en los alimentos, incluidos los de origen animal (CODEX ALIMENTARIUS, CX/MRL 2018).

En este contexto, a nivel nacional, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), autoridad competente en el ámbito de la inocuidad de los productos de la pesca y acuicultura destinados a la exportación, estableció un Programa Oficial de Control de Residuos de Productos Farmacéuticos, Sustancias Prohibidas, Sustancias No Autorizadas y Contaminante en músculo de salmón con piel y proporciones naturales cuando corresponda, con el fin de verificar el cumplimiento de los requisitos establecidos (SERNAPESCA, 2022).

Los muestreos oficiales del programa antes señalado, son analizados en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La frecuencia de muestreo para sustancias no autorizadas es de una vez al año para los centros de cultivo con peces en etapa de reproducción, alevinaje y/o smoltificación (pisciculturas, centros de río y lago, y centros de smoltificación en estuario), y de un muestreo durante la etapa de engorda en los centros de cultivo en mar.

En cada muestreo se toman 7 muestras a las cuales se les realiza los siguientes análisis: dos son destinadas para Verde Malaquita y Cristal Violeta, incluidas sus formas reducidas; una para los metabolitos de nitrofuranos; una para cloranfenicol; una para nitroimidazoles; dos para esteroides y estilbenos. Para determinar cuándo un resultado es desfavorable, se considera la presencia de ambos analitos, es decir, Cristal Violeta (CV) + Leuco Cristal Violeta (LCV), o bien, la sola presencia de Leuco Cristal Violeta (LCV). Esto aplica de la misma forma para verde de malaquita (VM) y leuco verde de malaquita (LVM).

En todas las muestras oficiales analizadas por el laboratorio FARMAVET durante el período 2019-2021 (n=2394) no se detectó la presencia de Verde Malaquita, Cristal Violeta y sus formas reducidas (metabolitos). El Límite de detección (LD) del método analítico utilizado fue de 0,1 ppb y el Límite de Cuantificación (LC) de 0,2 ppb. Sin embargo, entre los años 2019 al 2021, el Servicio Veterinario de la Federación Rusa UEE), Rosselkhoznadzor (RIAL, 2021) ha notificado 25 detecciones de estos colorantes en músculo de salmón de origen nacional.

Estos hallazgos, más otras detecciones de oxitetraciclina, tuvieron un impacto importante en la comercialización de carne de salmón nacional con ese mercado.

Producto de lo anterior, se ha visto necesario realizar una evaluación integral de la cadena productiva del salmón, determinando eventuales fuentes de contaminación de estas sustancias en

las distintas etapas, esto es a nivel de establecimientos elaboradores de alimento de peces, centros de cultivo y establecimientos de proceso. En una primea etapa, se ha planteado el presente estudio con el fin de realizar una evaluación general de la cadena del salmón, analizando los puntos críticos de mayor riesgo en cuanto a una eventual contaminación con estos colorantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Efectuar una evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas (Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita) en músculo de salmón.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Evaluar la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas en músculo de salmón.
- b) Identificar insumos de riesgo para la presencia de residuos de sustancias no autorizadas en piensos para peces.
- c) Realizar un levantamiento de la situación de contaminación en piensos para peces con sustancias no autorizadas.

4 OBJETIVO ESPECIFICO 1

4.1 Metodología

4.1.1 Caracterización de la cadena de producción

Caracterización general de toda la cadena de producción de Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), desde la elaboración de piensos, producción de peces, faena y procesamiento. Para su elaboración, se revisaron documentos y publicaciones científicas que detallan los procedimientos de cada una de las etapas de la cadena de producción, indicando su objetivo y características principales.

4.1.2 Identificación y caracterización de los Peligros

Evaluación de los peligros considerando sus propiedades químicas, fisicoquímicas, toxicológicas, vías de absorción, su degradación metabólica, metabolitos generados, tiempos de eliminación y posibles fuentes de contaminación. Para su elaboración, se revisaron las versiones actualizadas del “National Center for Biotechnology Information”, que elabora fichas técnicas de cada compuesto conocido en base a publicaciones científicas y es utilizado mundialmente como base para elaborar fichas de compuestos químicos. La información obtenida fue organizada en formato de tabla para entregar las características físico-químicas de cada compuesto.

4.1.3 Impacto o daño para la salud humana de los peligros

Evaluación de los impactos para la salud humana de CV, VM y sus variantes metabolizadas de acuerdo a las evidencias de toxicidad, mutagenicidad, capacidad de efectos cancerígenos, entre otros. Se realizó una revisión exhaustiva de artículos científicos relacionados con los efectos físicos de los compuestos para posteriormente listar los efectos de cada uno de ellos en distintos organismos.

4.1.4 Identificación de las vías de contaminación y factores de riesgo

Identificación de las vías y los factores de riesgos que pudiesen estar asociados a la ocurrencia de un evento no deseado, en este caso la contaminación de insumos, piensos o carne de salmón, así como en la exposición de los peces a los peligros. La información presentada fue levantada a través de una revisión documental de literatura científica, interpretación de las características físico-químicas de los compuestos analizados y de opiniones de informantes expertos calificados.

Se realizó, de forma complementaria, un ejercicio de simulación de la acumulación de los contaminantes evaluados en el organismo de *Salmón del Atlántico* de acuerdo al estudio realizado por Berntssen *et al.*, 2018. En primer lugar, se examinaron las dietas utilizadas en dicho estudio y las curvas de acumulación obtenidas del modelo matemático propuesto. Luego, de acuerdo a la formulación de dietas reales entregadas durante toda la cadena de proceso de producción detallada anteriormente, se propusieron tres casos hipotéticos de ingredientes contaminados con concentraciones bajas, medias y altas de CV o VM, calculando para cada una la concentración media de dichos contaminantes. Finalmente, las concentraciones de cada dieta simulada fueron

comparadas por las dietas entregadas en el estudio de Berntssen *et al.*, 2018 y extrapoladas a las curvas de acumulación publicadas en dicho estudio de acuerdo a su modelo matemático.

4.1.5 Taller de expertos

Taller remoto con expertos calificados del ámbito nacional. Con el objetivo de discutir las fuentes y factores de riesgo para la presencia de sustancias no autorizadas en músculo de salmón y validar los resultados preliminares del Proyecto.

4.2 Resultados

4.2.1 Caracterización de la cadena de proceso

Se inicia el proceso desde el desove y fertilización de las ovas por parte de los reproductores, hasta que el pez es cosechado, procesado y comercializado. Para cada una de las etapas, se destacan las principales características y acciones, dando a conocer los puntos relevantes para el objetivo del presente informe.

4.2.1.1 *Ciclo productivo del salmón*

El ciclo productivo de los salmónidos se divide en dos grandes etapas, la etapa de agua dulce y la etapa de agua de mar. La primera tiene como objetivo producir el Smolt (pez joven adaptado a vivir en el agua de mar) y el objetivo de la segunda etapa es originar salmones para faena.

4.2.1.1.1 Agua dulce

La fase de agua dulce se realiza habitualmente en pisciculturas, donde se reproducen y crían los peces en piscinas hasta que estén preparados para trasladarse y vivir en agua de mar. Este proceso dura entre 10 a 12 meses. Las pisciculturas se ubican en tierra, generalmente en torno a fuentes de agua dulce.

a. Fertilización

El ciclo comienza por la fertilización de los huevos de la hembra con el espermatozoide de uno o más machos, para obtener una ova fertilizada. Las ovas pueden originar de reproductores nacionales o pueden ser importadas, este último caso permite mantener la oferta durante todo el año. Durante esta etapa, los programas genéticos son muy importantes para satisfacer las necesidades fisiológicas durante todo el ciclo productivo (ABC-Salmonicultura chilena, 2018).

b. Incubación

El período de incubación suele durar entre 2 a 2,5 meses dependiendo de la especie, el Salmón del Atlántico incuba por aproximadamente 510 grados/día (64 días a 8°C aprox.) (Olson & Criddle, 2008). Durante esta etapa se pueden observar importantes transformaciones que dependen principalmente de la temperatura, luminosidad, homogeneización y oxígeno del medio. La primera transformación es una etapa muy delicada en la que se debe limitar la manipulación y corresponde al paso de conversión de la ova fertilizada a una ova embrionada. Posteriormente, se lleva a cabo la eclosión que es el momento en que se produce la ruptura del huevo, para que subsecuentemente el alevín (cría recién salida del huevo) pueda nadar junto a su saco vitelino. La última transformación,

sucede cuando se absorbe completamente el saco vitelino y el alevín está capacitado para su primera etapa de alimentación.

c. Alevinaje

Cuando el alevín comienza a recibir su pienso y alcanza entre los 3 a 5 gramos se le denomina Salmón Fry. Esto tarda aproximadamente 290 grados/día (36 días a 8°C aprox.) para el Salmón del Atlántico. Posteriormente, los alevines continúan su alimentación con dietas balanceadas, ricas en proteínas, lípidos y carbohidratos. El alevín crece hasta convertirse en salmón juvenil distinguiéndose por unas manchas laterales llamadas “parr” (ABC-Salmonicultura chilena, 2018).

d. Esmoltificación

En esta etapa el salmón juvenil experimenta una serie de transformaciones fisiológicas, morfológicas y de comportamiento. Además, se produce la osmorregulación, es decir, desarrollan la capacidad de regular activamente la presión osmótica de su cuerpo manteniendo la homeostasis de los líquidos del organismo. Esta habilidad fisiológica es muy significativa y determinante para su posterior ingreso a la fase de mar. Esta etapa puede distinguirse físicamente porque desaparecen sus marcas parr y cambia su color. Durante esta fase los peces se alimentan con dietas balanceadas en base a proteínas, lípidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales.

Cuando el “smolt” alcanza un peso aproximado entre los 120 y 150 gramos en el Salmón del Atlántico y se encuentra en la estación óptima del año, puede ingresar al agua de mar para comenzar la etapa de engorda. El traspaso hacia las etapas de agua de mar puede ocurrir de dos maneras:

- a. Recepción directa: Los smolt van directamente al mar, produciéndose una selección natural al morir los más débiles. Este tipo de recepción minimiza los costos ya que se requiere menor infraestructura y disminuye el estrés por manejo, sin embargo, aumenta la mortalidad por shock salino, para smolt de buena calidad, esta mortalidad es mínima.
- b. Recepción con acondicionamiento: En este caso, los smolt se ubican en estanques de agua dulce oxigenada incorporándoles lentamente agua de mar, esto puede tardar hasta 4 días para que exista un 100 % de agua de mar.

4.2.1.1.2 Agua de mar

Dependiendo de la especie, y de distintas variables genéticas, productivas, sanitarias y ambientales, el proceso puede durar de 10 a 24 meses. La duración promedio del período de engorda del Salmón del Atlántico es 15 meses. Dada la extensa duración de este proceso (lo que conlleva un mayor riesgo), y al aumento en el valor que presenta el activo biológico, esta etapa es considerada la de mayor valor agregado al proceso productivo, y es, por lo tanto, la que generalmente centra la mayor parte de la atención.

a. Engorda

Durante la engorda, los peces son alimentadas a base de pellets con dietas balanceadas dependiendo de la especie, centro de cultivo y condición. En general, el período de engorda lleva entre 12 a 18 meses para el Salmón del Atlántico. Se manejan densidades de entre 6 a 8 kg/m³, aumentando a de 9 a 10 kg/m³ antes de la cosecha. En esta fase los salmones son alimentados con pellet o extruidos secos con una humedad del 8 al 9% y se alimentan usualmente dos veces al día.

b. Cosecha

La alimentación se debe suspender por 48 horas antes de la cosecha, con el fin de disminuir el porcentaje de lípidos y el contenido gastrointestinal. En cuanto a las dietas medicadas, estas no se deben administrar desde 42 días antes de la cosecha, para evitar residuos de los medicamentos en el producto final (Urrutia, 2016).

Cuando el salmón alcanza su peso determinado, comienza el período de cosecha. Los pesos óptimos de cosecha son entre 4,5 a 5 Kg para el Salmón del Atlántico (ABC-Salmonicultura chilena, 2018).

Durante la cosecha, los peces son separados por tamaño y son trasladados en barcos de transportes apropiadamente equipados llamados “wellboats” que permiten llegar con los peces vivos hasta la misma planta faenadora. Para esto, existen dos tipos principales de cosecha:

- a. Cosecha tradicional: los salmones son llevados a balsas de cosecha, donde son anestesiados con CO₂, posteriormente son sacados con gancho, y luego se les cortan las branquias para el desangrado.
- b. Cosecha mecanizada: en este caso los animales son extraídos directamente de las balsas por medio de bombas especializadas con parte del agua, luego pasan por un secador y posteriormente se procede a cortar las branquias para su desangrado y sacrificio.

Luego del corte de branquias, los peces son ubicados en estanques de desangrado por no más de 30 minutos. Los estanques tienen una mezcla de agua y hielo para mantener la cadena de frío y evitar que superen los 4°C. Luego viene el proceso de eviscerado y almacenaje en bandejas o bins para su traslado a los centros de acopio, procesamiento primario o comercialización directa (Urrutia, 2016).

4.2.1.2 *Procesamiento*

Luego de la cosecha, los salmones son llevados a la planta de procesamiento primario donde ocurre la faena de los animales. En primer lugar, se remueven las vísceras, las cuales se convierten en subproductos que son vendidos a compradores locales. También, en la planta se clasifican los pescados según su peso, cuando son productos finales estos son empacados para el despacho al cliente, y los productos intermedios son enviados en recipientes con hielo a la planta de procesamiento secundario.

Las plantas de procesamiento secundario se encargan de procesar la materia prima ya eviscerada para producir descabezados, filetes, porciones y bloques de salmón. También tiene la capacidad para pelar, descamar, desespinar y recortar grasa según lo especifique el producto. Cada uno de estos productos tienen rendimientos distintos con respecto a la materia prima original, y, a su vez, costos de proceso distinto. Los subproductos pueden derivarse para hacer otros bloques, tiras de carne y grasa, raspado de carne, harina y aceite.

Finalmente, los productos son empaquetados y almacenados. Los empaques constan de un empaque primario y uno secundario. Los primarios, son aquellos que están en contacto directo con el producto y los secundarios están en contacto con el empaque primario. Estos pueden ser bolsas o láminas plásticas simples o al vacío como empaques primarios y cajas de cartón o polietileno expandido como empaques secundarios (Thomas, 2015).

4.2.1.3 Comercialización

La comercialización del salmón chileno ocurre a nivel mundial. La exportación representa (año 2022) más del 70% de lo producido y los principales destinos de exportación son Estados Unidos, Japón y Brasil. Además, durante los últimos años se han incorporado los mercados de China y el Sudeste Asiático. Los productos son distribuidos vía terrestre, marítima y aérea. Una de las principales dificultades es la mantención de la cadena de frío, lo que significa mayores costos y complicaciones operacionales para los productos frescos, debido a brechas de tiempo más cortas que los congelados.

4.2.1.4 Fabricación de piensos

Las materias primas utilizadas en el proceso de fabricación de piensos para salmónidos son muy diversas en cuanto a su origen (animal, vegetal o mineral) y procedencia (decenas de países).

El proceso de fabricación de piensos para salmones considera de manera general las siguientes etapas secuenciales: mezcla, acondicionador, extrusor, secador, aceitado y enfriado.

La primera etapa ocurre en el mezclador donde los macro y micro ingredientes son mezclados en una gran tolva. Consecutivamente, la mezcla pasa al acondicionador donde recibe agua y vapor de agua a 90°C, por aproximadamente 3 minutos pasando posteriormente a la etapa de extrusión. Durante la etapa de extrusión ocurre el amasado de la mezcla. Al final de este proceso, la mezcla pasa por un molde que le entrega la forma característica al pellet. Posteriormente, viene la etapa de secado, en la cual se asegura de que la humedad final del producto se encuentre en torno al 5%. Luego, ocurre la etapa de aceitado, en la cual ingresa aceite a los poros internos del pellet. Por último, la etapa de enfriado que deja al pellet con una temperatura final de 10°C (Parejas, 2020).

4.2.2 Identificación y caracterización de los Peligros

Cristal Violeta (CV), Verde Malaquita (VM) y sus compuestos metabolizados Leuco Cristal Violeta (LCV) y Leuco Verde Malaquita (LVM) son compuestos químicos con un triple anillo bencénico que les proporciona una gran estabilidad a lo largo del tiempo. CV y VM son comúnmente clasificados como pigmentos o colorantes fanales (Gessner & Mayer, 2000; Schmidt, 2019). Estos pigmentos, dadas sus características físico-químicas, son utilizados ampliamente en numerosos procesos, tales como la tinción de telas de alto contenido orgánico, elaboración de pinturas y tintas de impresión, lápices y plumones, pigmentos para manualidades y cosméticos, entre otros. Adicionalmente, CV y VM son implementados en técnicas de laboratorio y diagnóstico como tinción celular y de tejidos, así como estudios analíticos. Históricamente, estos compuestos (aunque principalmente CV) han sido utilizados como agentes desinfectantes, aunque este uso está descontinuado por las propiedades toxicológicas que pueden presentar.

A continuación, se presentan las propiedades físico-químicas estos peligros como contaminantes potenciales de productos relacionados a la salmonicultura, de acuerdo a la información existente en bibliografía científica y a las fichas técnicas oficiales publicadas en el “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”, plataforma mundialmente utilizada como referencia para la caracterización de compuestos químicos. Adicionalmente, se listan los principales efectos toxicológicos y peligros biológicos asociados a dichos contaminantes de acuerdo a publicaciones científicas y recomendaciones de centros médicos internacionales.

4.2.2.1 *Cristal Violeta***Tabla 1. Características físico-químicas del compuesto Cristal Violeta (elaboración propia).**

Ítems	Descripción
Nombre Común	Cristal Violeta
Nominación Química	Metil Violeta
Otros nombres	Gentian Violet B Pentamethyl pararosaniline chloride
Fórmula	$C_{25}H_{30}ClN_3$
Masa Molecular	407.98
Presentación Común	Polvo Solución acuosa
Propiedades Organolépticas	Polvo verde a verde muy oscuro. Violeta oscuro en solución.
Solubilidad	4000 mg/L a 25°C, <i>agua</i> 10 – 50 g/L a 27°C, pH 3.07, <i>agua</i> Soluble en etanol Soluble en cloroformo
Punto de ebullición	631.92 °C
Punto de melting	205 – 215 °C (descomposición) 198 °C (sin descomposición)
Estabilidad y reactividad	Estable bajo condiciones normales Sensible a luz Incompatible con agentes oxidantes fuertes, agentes reductores y ácidos fuertes
Clasificación toxicológica	Corrosivo Irritante Peligro para la salud Peligro medioambiental

4.2.2.2 *Leuco Cristal Violeta***Tabla 2. Características físico-químicas del compuesto Leuco Cristal Violeta (elaboración propia).**

Ítems	Descripción
Nombre Común	Leuco Cristal Violeta
Nominación Química	Leuco Metil Violeta
Otros nombres	Leuco Gentian Violet Crystal violet leucobase
Fórmula	$C_{25}H_{31}N_3$
Masa Molecular	373.53
Presentación Común	Polvo
Propiedades Organolépticas	Polvo blanco o ligeramente violeta
Solubilidad	1.3 mg/L a 20°C, <i>agua</i> 600 mg/L en etanol
Punto de ebullición	Descomposición a 227.8 antes de alcanzar ebullición
Punto de melting	176.8 °C
Estabilidad y reactividad	Estable a condiciones normales

Ítems	Descripción
	Sensible a luz Sensible a aire Descomposición termal puede generar óxidos de nitrógeno y carbono y cloruros de hidrógeno
Clasificación toxicológica	Irritante Peligro medioambiental

4.2.2.3 Verde Malaquita

Tabla 3. Características físico-químicas del compuesto Verde Malaquita (elaboración propia).

Ítems	Descripción
Nombre Común	Verde Malaquita
Nominación Química	Verde Malaquita
Otros nombres	Basic Green 4 China Green Malachite green chloride
Fórmula	$C_{23}H_{25}ClN_2$
Masa Molecular	364.91
Presentación Común	Cristales Solución acuosa
Propiedades Organolépticas	Cristales verdes con lustre metálico. En solución, coloración verde azulada
Solubilidad	4×10^4 mg/L a 25°C, <i>agua</i> Muy soluble en etanol Soluble en metanol y alcohol amílico
Punto de ebullición	452°C
Punto de melting	180°C
Estabilidad y reactividad	Neutraliza ácidos en reacciones exotérmicas formando sales y agua. Incompatible con isocianatos, productos halogenados orgánicos, peróxidos, fenoles ácidos, epóxidos, anhídridos y ácidos haloides. Puede generar hidrógeno gaseoso inflamable al estar en combinación con agentes reductores fuertes.
Clasificación toxicológica	Corrosivo Irritante

4.2.2.4 Leuco Verde Malaquita

Tabla 4. Características físico-químicas del compuesto Leuco Verde Malaquita (elaboración propia).

Ítems	Descripción
Nombre Común	Leuco Verde Malaquita
Nominación Química	Leuco Verde Malaquita
Otros nombres	4,4'-Bis (dimethylamino) triphenylmethane Tetramethyldiaminotriphenylmethane

Ítems	Descripción
Fórmula	C ₂₃ H ₂₆ N ₂
Masa Molecular	330.47
Presentación Común	Polvo
Propiedades Organolépticas	Polvo blanquecino a ligeramente marrón
Solubilidad	6.4 x 10 ⁻² mg/ml a 25°C, <i>agua</i> Muy soluble en benceno y éter etílico 30 mg/ml en etilenglicol éter monometílico 4 mg/mL en etanol a 25°C
Punto de ebullición	414°C
Punto de melting	101°C
Estabilidad y reactividad	-
Clasificación toxicológica	Peligro para la salud

4.2.3 Impacto o daño para la salud humana

4.2.3.1 *Cristal Violeta*

4.2.3.1.1 Toxicidad

- Mutagénico. Es considerado un veneno mitótico (inhibe la mitosis) y clastógeno (induce la ruptura de cromosomas) bajo evidencia de experimentos realizados en cultivos celulares (Thomas & MacPhee, 1984).
- Carcinogénico. Induce la formación de carcinomas hepatocelulares y sarcomas en células reticulares en roedores (Littlefield *et al.*, 1985).
- Puede causar reacciones necróticas en la piel en dosis altas (Docampo & Moreno, 1990).
- Irritante de membranas mucosas. En altas concentraciones puede causar conjuntivitis, irritación gastrointestinal, cistitis hemorrágica y sangrado nasal (Docampo & Moreno, 1990).
- En altas concentraciones causa bajas en el conteo de leucocitos (Docampo & Moreno, 1990).

4.2.3.1.2 Carcinogénesis

No hay evidencia disponible para afirmar que CV o LCV son agentes causantes de cáncer en humanos. Sin embargo, existe evidencia de efectos carcinogénicos en animales de investigación (ratas, ratones, entre otros) (Littlefield *et al.*, 1985; Thomas & MacPhee, 1984). En el presente, la clasificación oficial para CV es *Grupo 2b: Posible carcinogénesis en humanos* y para LCV es *Grupo 3: no clasificable por su carcinogenicidad hacia humanos*.

4.2.3.1.3 Mutagenicidad

CV y LCV han demostrado tener efecto mutagénico en el genoma, causando inhibición de la mitosis, ruptura de cromosomas e interferencia en telómeros. Esto ha podido apreciarse en estudios realizado en embriones de pollo (Docampo & Moreno, 1990). Estas características, junto con la alta estabilidad de estos compuestos proporcionada por su estructura química sugiere que la acumulación de éstos y sus efectos mutagénicos pueda ser acumulable a través de generaciones.

4.2.3.2 Verde Malaquita

4.2.3.2.1 Toxicidad

- Mutagénico. VM genera fracturas cromosomales, efecto teratogénico y fertilidad reducida en truchas arcoíris, ratas y ratones alimentados con este compuesto (Culp, 2004; Culp *et al.*, 2006; Gerundo *et al.*, 1991; Mitrowska & Posyniak, 2004; Srivastava *et al.*, 2004).
- Carcinogénico. VM y LVM causan adenomas hepatocelulares, pituitarios y de células intersticiales así como carcinomas mamarios y hepatocelulares en ratas, ratones y conejos (Culp, 2004; Culp *et al.*, 2006; Ohta *et al.*, 2012).
- Veneno respiratorio. VM y LVM parecen inhibir la respiración celular a través del bloqueo del citocromo p450 (Culp, 2004; Culp *et al.*, 2006).
- Irritante de piel. En altas concentraciones puede generar necrosis celular (Culp, 2004).

4.2.3.2.2 Carcinogénesis

No hay evidencia disponible para afirmar que VM o LVM son agentes causantes de cáncer en humanos. Sin embargo, existe evidencia de efectos carcinogénicos en animales de investigación (ratas, ratones, entre otros) (Culp, 2004; Culp *et al.*, 2006). En el presente, la clasificación oficial para VM es *Grupo 3: no clasificable por su carcinogenicidad hacia humanos* y para LCV es *Grupo 2b: posible carcinogénesis en humanos*.

4.2.3.2.3 Mutagenicidad

VM y LVM han demostrado tener efecto mutagénico en el genoma. Fracturas cromosomales, fertilidad reducida y casos de teratogénesis fueron reportados en trucha arcoíris y roedores de experimentación (Culp, 2004; Culp *et al.*, 2006; Gerundo *et al.*, 1991; Mitrowska & Posyniak, 2004; Srivastava *et al.*, 2004) Estas características, junto con la alta estabilidad de estos compuestos proporcionada por su estructura química sugiere que la acumulación de éstos y sus efectos mutagénicos pueda ser acumulable a través de generaciones.

4.2.4 Identificación de las vías de contaminación y factores de riesgo

CV y VM pueden entrar al organismo de salmones a través de dos vías principales: el contacto con la piel y branquias o el consumo directo a través de la alimentación. Las posibles vías de ingreso de los peligros a la cadena son las siguientes:

- Desinfectantes y antisépticos
- Envases y tintas
- Agua
- Piensos e insumos

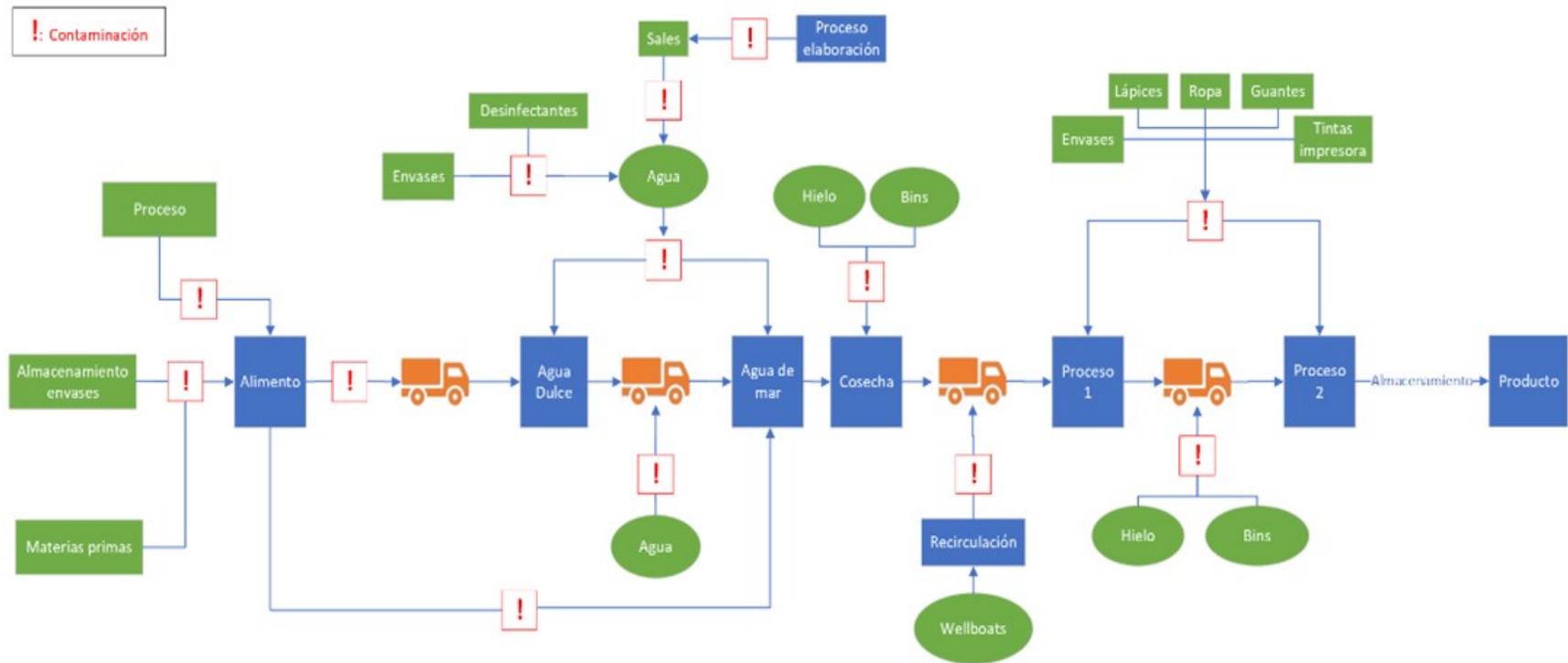


Figura 1. Diagrama de flujo de posibles vías de contaminación en la cadena del salmón (elaboración propia).

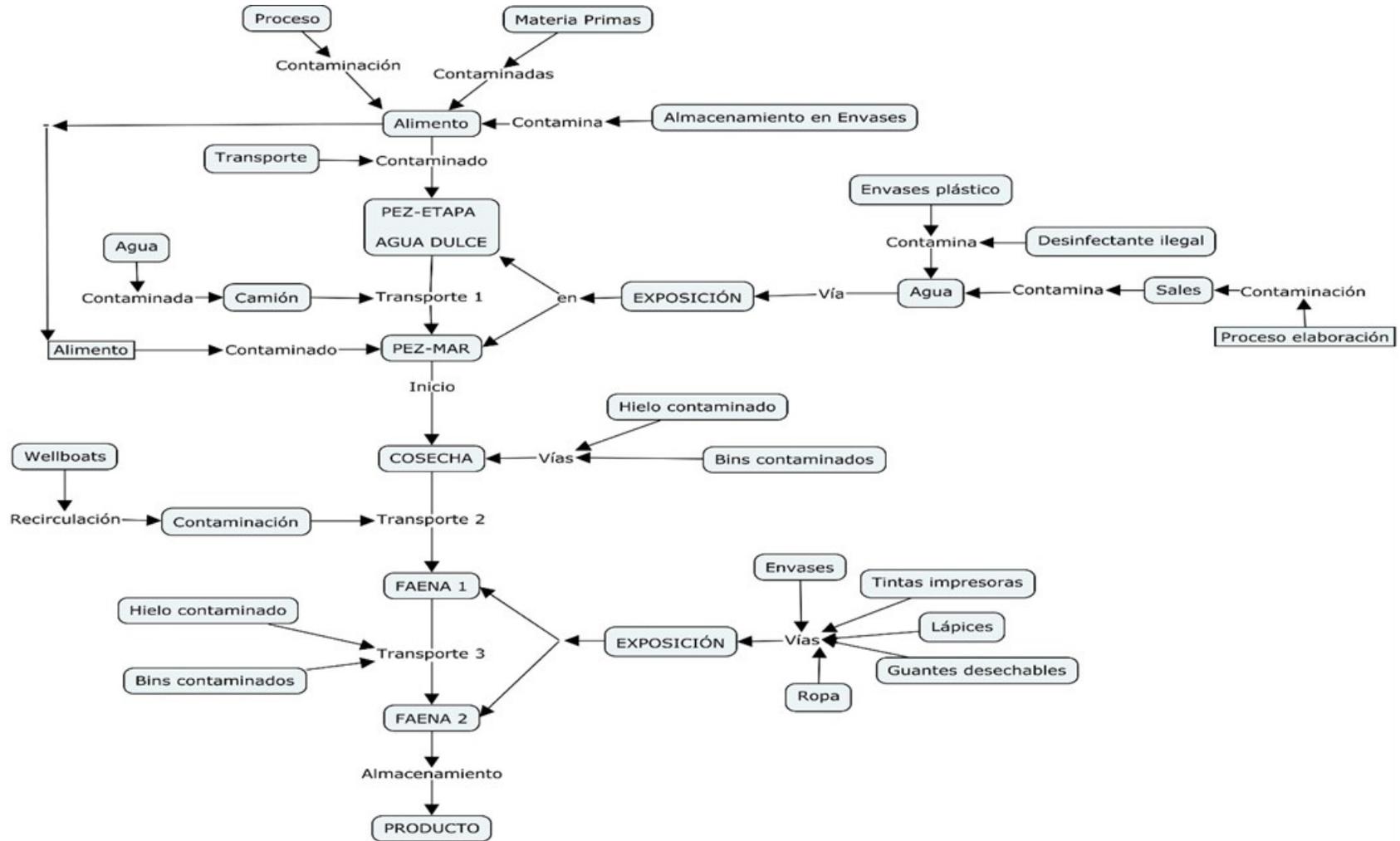


Figura 2. Diagrama de fuentes potenciales de riesgo de introducción de los peligros (elaboración propia).

4.2.4.1 Descripción de las Vías de Ingreso y Exposición

A continuación, se hace una breve descripción de los aspectos más relevantes relacionados con las posibles vías de ingreso de los peligros a los peces.

4.2.4.1.1 Piel / Contacto

VM y CV pueden ingresar al organismo mediante su absorción directa a través de la piel y principalmente de las branquias de los animales que se encuentren en contacto directo con los contaminantes. Tanto baños consecutivos (30 segundos) con concentraciones de 66.7 – 100 mg/ml de estos compuestos como baños de larga duración (3-6 hr) con concentraciones de hasta 6 mg/L generan concentraciones detectables en músculo de salmones sometidos a estos tratamientos (Sudova *et al.*, 2007).

4.2.4.1.2 Desinfectantes y antisépticos

Los colorantes trifenilmetanos son sustancias antisépticas y con propiedades desinfectantes. En altas concentraciones pueden combinarse con el protoplasma bacteriano tiñendo sus componentes ácidos o básicos. Particularmente, VM y CV son efectivos contra bacterias Gram positivas y sobre hongos del género *Candidae* especialmente (Singh *et al.*, 2020). CV fue ampliamente utilizado en acuicultura en forma de baños de pre-tratamiento para evitar infecciones fúngicas, aunque su uso en este ámbito se encuentra prohibido, persistiendo de forma acotada en desinfección de huevos y peces ornamentales y de acuario (Maley & Arbiser, 2013). Los detergentes, técnicas desinfectantes y antisépticos utilizados en el último tiempo contemplan otras alternativas tales como el uso de amonio cuaternario, compuestos clorados y aplicaciones de luz UV focalizada. De acuerdo a esto, formulaciones desinfectantes con VM y CV en la actualidad se encuentran prácticamente en desuso (Ruiz, 2013). En particular, CV fue utilizado como aditivo en comidas de aves de producción para impedir el crecimiento de hongos (Chen & Day, 1974; Jones & Falkinham, 2003; Maley & Arbiser, 2013), aunque no existe evidencia de que su uso continúe.

4.2.4.1.3 Envases y tintas

Como colorantes altamente estables y de colores vivos, VM y CV son utilizados ampliamente como pigmentos para envases y productos de gran variedad de materiales. Se trata de compuestos trifenilmetanos, es decir que contienen tres grupos feníles los cuales confieren al compuesto final una gran estabilidad a lo largo del tiempo, lo que los hace ideales para lograr colores vivos y duraderos. Lo anterior son utilizados a nivel industrial tanto de textiles como papeles, tintas de lápices e impresiones. En la industria de pigmentos, son también comúnmente llamados colorantes fanales (Gessner & Mayer, 2000; Schmidt, 2019). Los códigos de pigmentos utilizados a nivel mundial corresponden a Pigment Violet 3 y 27 (PV3 y PV27) para Cristal Violeta y Pigment Green 4 (PG4) para Verde Malaquita. Todos las tintas, telas y empaquetados que contengan estos códigos en su etiquetado, indican el uso de estos compuestos. Los pigmentos fanales suelen utilizarse en técnicas de impresión flexográficas al agua y en técnicas de huecograbado. Tintas de impresión Offset y de secado UV también utilizan estos compuestos (FSVO, 2017). En telas, se utilizan normalmente como pigmentos de materiales de alto contenido orgánico tales como telas de algodón, sedas y lino.

La probabilidad del ingreso de VM y CV a un producto final de salmones a partir de contacto con envases que contengan estos compuestos dependerá directamente del material del envase que estemos considerando. Distintas interacciones material-pigmento tendrán distintas constantes de disociación (K_D),

siendo K_D la solidez de las interacciones intermoleculares entre ambos compuestos. Mientras más pequeño sea su valor, mayor será la afinidad de unión entre ambos. Cuanto mayor sea el valor, se separarán con mayor facilidad. Como regla general, los compuestos trifenilmetanos como VM y CV con plásticos poseen una K_D muy baja, dando como resultado una unión muy estable. Sin embargo, otro tipo de materiales solubles al agua como cartones y papeles presentan una alta K_D con VM y CM siendo posible su disociación en contacto con humedad. Los materiales con contacto directo con el producto intermedio y final de la industria de salmones son de plástico, en forma de contenedores, cajas, bandejas, bolsas y productos similares. A nivel mundial, la elaboración de éstos se realiza a partir de termoplásticos derivados del petróleo, específicamente HDPE, LDPE y PET (Morawski, 1999). Los pigmentos para dar color a estos materiales se adicionan durante los procesos de polimerización y vulcanización al momento de elaborar los objetos plásticos, de modo que las moléculas de cualquier pigmento utilizado quedan físicamente entrelazadas con las cadenas poliméricas que componen al material plástico. Este procedimiento minimiza el riesgo de “floración” y “sangrado” de pigmento, denominaciones que se dan a la movilización de éste dentro de los materiales durante o luego de su elaboración (Crawford and Martin, 2020). Por otro lado, cabe considerar que los pigmentos denominados “orgánicos”, categoría a la que CV y VM pertenecen, son particularmente resistentes a la migración en materiales no solubles en agua como lo son los plásticos (Marzec, 2014).

La situación es distinta cuando estos pigmentos se utilizan en materiales solubles en agua como papel, cartón y tintas. En este caso, si existiese contacto de estos materiales con los animales sería posible una contaminación con CV o VM. Dado que todas las cajas y bandejas utilizadas son plásticas, el principal problema en esta situación son las tintas de lápices y las etiquetas utilizadas para marcar muestras y/o productos. Sin embargo, dentro de la normativa publicada por SERNAPESCA para la toma de muestras se incluye la exigencia de que las manipulaciones de productos y tomas de muestra se realicen con lápiz grafito, etiquetas blancas y guantes incoloros. La probabilidad de que exista contaminación a través de los insumos, tintas y envases es, por tanto, bastante baja.

4.2.4.1.4 Agua

Si bien no existe evidencia de que VM y CV (o sus compuestos metabolizados) ocurran de forma natural en el ambiente y por tanto en aguas, su producción y uso industrial puede resultar en la presencia de estos compuestos en el ambiente mediante desechos liberados a través de aguas contaminadas de origen tanto industrial como municipal (Tkaczyk *et al.*, 2020). Liberados en aguas, estos colorantes pueden permanecer solubles en sus formas catiónicas, aunque serán mayormente asimilados por compuestos particulados, sedimentos y fauna presente en el ambiente contaminado.

Hay evidencia de la presencia de CV y LCV en peces silvestres. En estudios realizados en 2008 y 2015, se evidenció la presencia de ambos compuestos en muestras de tejido muscular de anguila europea (*Anguilla anguilla*) tomadas entre los años 2000 y 2009 en diversos ríos, lagos y canales de Bélgica (Belpaire *et al.*, 2015) y en muestras de tejido de anguilas capturadas en zonas receptoras de aguas servidas municipales (Schuetze *et al.*, 2008).

VM pero no LVM fue encontrado en muestras de sedimento y material particulado de varios ríos de Alemania, en altas concentraciones, 543 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ricking *et al.*, 2013). Este estudio se suma al reporte de numerosos compuestos aromáticos relacionados con la manufactura de VM encontrados en Estados Unidos el año 1980 (Nelson & Hites, 1980) y de VM en aguas naturales en China (Zhang *et al.*, 2012). Por otro lado, numerosos estudios indican la presencia de este compuesto y su versión reducida en tejido de

peces silvestres, notoriamente en anguilas de zonas de agua de efluente de desecho en Alemania (Schuetze et al., 2008) y en Bélgica (Belpaire et al., 2015).

4.2.4.1.5 Consumo

El ingreso de VM y CV a través del piensos y por tanto por el consumo oral del animal es la vía más rápida para su acumulación en el organismo. A través de esta vía, los compuestos pasan directamente al sistema digestivo y al torrente sanguíneo, donde son rápidamente metabolizados a LVM y LCV respectivamente (Berntssen et al., 2018; Nacher-Mestre et al., 2015). Si bien cierta cantidad de estos compuestos es rápidamente eliminada del organismo, la acumulación de compuestos metabolizados a través de dietas altas en CV y VM proporcionadas en forma constante ha sido comprobada a través de numerosos estudios (Berntssen et al., 2018; Docampo & Moreno, 1990; Schuetze et al., 2008).

4.2.4.1.6 Piensos e insumos

Tanto VM como CV han sido detectados en piensos comerciales utilizados en acuicultura (Conti et al., 2014). La contaminación de piensos podría ocurrir tanto por insumos contaminados, por contaminación durante el proceso de fabricación y/o por contaminación de los alimentos terminados. Se ha descrito que las plumas de aves tienen una gran capacidad de absorción de VM (Akpor et al., 2018; Mi H. Beak et al., 2009; Chaturvedi et al., 2013), lo que podría explicar una mayor probabilidad de encontrar este compuesto en la harina de plumas, insumo frecuentemente utilizado en la fabricación de piensos para la acuicultura. Por otro lado, históricamente, CV fue utilizado como aditivo en comida de aves de producción para evitar la aparición de hongos (Chen & Day, 1974; Jones & Falkinham, 2003; Maley & Arbiser, 2013; Stewart et al., 1980), aunque no existe evidencia de que su uso continúe el día de hoy.

Si bien no se reportan de manera regular eventos de contaminación con estos compuestos en muestras de salmones, la presencia de CV y VM y sus leuco-derivados es la infracción más común encontrada a nivel mundial en peces de aleta producidos por acuicultura (Love et al., 2011). Según estudios realizados por diferentes grupos de investigación, los países que presentan mayor incidencia de eventos con agentes trifenilmetanos son Estados Unidos, Canadá, China y Vietnam, siendo este último país el que presenta el número más alto de violación a la restricciones de uso de drogas veterinarias y compuestos prohibidos (Gammoh et al., 2019; Giaccone et al., 2018; Love et al., 2011). Concentraciones residuales de CV y VM también han sido reportadas en peces de aleta italianos comprados tanto en el mercado como directamente en centros de crianza, en donde se reporta que el alimento contiene altas cantidades de proteína de origen animal (Giaccone et al., 2018). Cabe destacar que, si bien las condiciones de cultivo de distintos peces de aleta difieren por especie, un punto en común entre estos es el uso de harinas de origen animal como base proteínica en su alimentación en etapas de engorda. Estas harinas son también ampliamente utilizadas en el cultivo de salmónidos.

Es ampliamente conocido que los compuestos trifenilmetanos como CV y VM forman complejos muy estables con proteínas animales, siendo esta una de las causas para explicar su toxicidad. Esto favorece la hipótesis de que estos compuestos puedan estar presentes en harinas de origen animal aun luego del procedimiento de elaboración de éstas. Específicamente, forman asociaciones de alta estabilidad con albúmina, proteínas presentes en alta concentración en sangre y vísceras animales (Qin et al., 2016; Seedher & Saini, 1998).

Dentro de los insumos considerados de riesgo, según la evidencia disponible, se encuentran los siguientes:

– **Harina de sangre (hemoglobina)**

Subproducto de la industria de la sangre que resulta de la extracción del plasma. Se presenta en forma de polvo oscuro. Es un ingrediente de alto nivel proteico rico en los aminoácidos lisina y valina, así como hierro de fácil absorción. Es un producto seguro con gran capacidad de absorción de agua y palatabilidad. Es bajo en calcio, fósforo, aminoácidos azufrados e isoleucina.

– **Harina de plumas**

Subproducto de la industria avícola producido a partir de la hidrólisis en condición de presión y temperaturas elevadas de plumas. Alternativamente, se puede producir a través del uso de enzimas degradadoras. Es un producto alto en proteínas, pero desequilibrado en aminoácidos esenciales: alto en cistina, treonina y arginina y deficiente en metionina, lisina, triptófano e histidina.

– **Harina de cerdo**

Subproducto de subproductos de cerdos declarados aptos para el consumo. Se obtiene a partir del proceso de extracción de grasa, prensado y fundición de estos subproductos y el agregado de antioxidantes.

– **Harina de vísceras de ave**

Producto que contiene carne, vísceras, hueso, sangre, cabezas, grasa, tejido magro y tejido digestivo de aves. Puede ser desengrasada para obtener un producto más palatable y fácil de conservar, aunque de esta forma presenta un menor valor energético que la harina de ave no desengrasada. Este tipo de harina puede ser muy variable en cuanto a su composición por lo que generalmente se caracteriza con tres valores que indican su nivel de proteína, grasa y cenizas.

– **Aceite de pescado**

Aceite alto en ácidos grasos específicos tales como ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), ambos de la línea del Omega 3. Su composición y su criterio de uso son dependientes de la especie de proveniencia y destino.

– **Reproceso**

Derivado de la combinación de productos no utilizado o sobrante durante el procesamiento y elaboración de pellets y piensos de salmónidos. Dado que este ingrediente depende de cada proceso, su composición está sujeta a los otros ingredientes utilizados en el momento y puede cambiar con el tiempo.

4.2.4.2 *Modelo de simulación de concentración en músculo de peligros*

El comportamiento cinético de la entrada, acumulación y depuración de compuestos dentro de los salmones puede describirse a través de una aproximación utilizando un sistema de tres compartimentos dado que LCV y LVM pueden distribuirse en considerables cantidades tanto en tejido graso como muscular (Berntssen *et al.*, 2018; Roybal *et al.*, 1995). De acuerdo a esto, en este modelo el cuerpo del animal puede dividirse en 3 compartimientos:

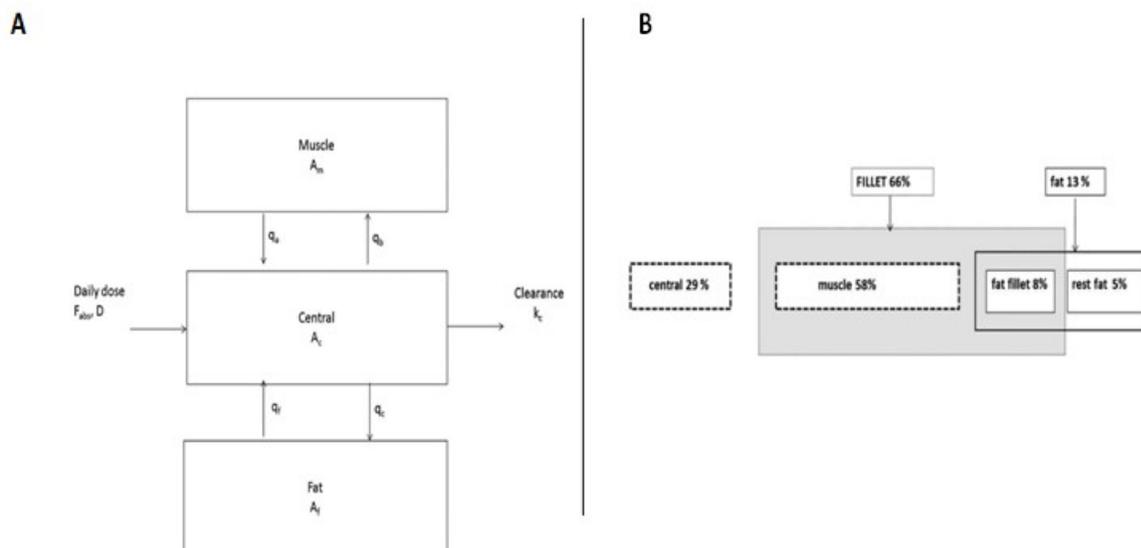


Figura 3. Modelo tricompartmental de la cinética de contaminantes (Berntssen et al., 2018).

- A. Representación esquemática de la disposición de Leuco Cristal Violeta y Leuco Verde Malaquita basada en la cinética fisiológica de *Salmón del Atlántico* adulto. “A”: cantidad de contaminante en cada compartimento (músculo A_m , central A_c y grasa A_f). “ F_{abs}, D ”: Fracción de la dosis que es absorbida al compartimento central. “ K_c ”: eliminación. “ q_b ” y “ q_c ”: parámetros de transferencia desde central a músculo y central a grasa respectivamente. “ q_a ” y “ q_f ”: parámetros de transferencia desde músculo a central y grasa a central respectivamente.
- B. Composición en porcentaje del peso total en un salmón completo.

Este modelo tricompartmental puede ser descrito con un set de 3 ecuaciones diferenciales que describen los cambios de LCV y LVM en cada uno de los compartimentos designados, de acuerdo a el trabajo realizado por Berntssen et al., 2018.

$$\frac{dA_f(t)}{dt} = \frac{q_c}{W_c(t)} * Q_c B_w * B_w(t) * A_c(t) - \frac{q_f}{W_f(t)} * Q_c B_w * B_w(t) * A_f(t)$$

$$\frac{dA_m(t)}{dt} = \frac{q_b}{W_c(t)} * Q_c B_w * B_w(t) * A_c(t) - \frac{q_a}{W_m(t)} * Q_c B_w * B_w(t) * A_m(t)$$

$$\frac{dA_c(t)}{dt} = F_{abs} * D(t) - \frac{dA_m(t)}{dt} - \frac{dA_f(t)}{dt} - k_c * \frac{W_i(t)}{W_c(t)} * A_c(t)$$

Donde:

$A_f(t)$ cantidad en el compartimento tejido graso, (μg , calculado), $A_f(0) = 0$

$A_c(t)$ cantidad en el compartimento central, (μg , calculado), $A_c(0) = 0$

$A_m(t)$ cantidad en el compartimento muscular, (μg , calculado), $A_m(0) = 0$

$B_w(t)$ peso corporal, (g , conocido)

$D(t)$ dosis administrada, ($\mu\frac{g}{\text{día}}$, conocido)

$W_c(t)$ peso del compartimento central, (g , conocido)

$W_m(t)$ peso del compartimento muscular, (g , conocido)

$W_f(t)$ peso del compartimento tejido graso, (g , conocido)

$W_l(t)$ peso del hígado, (g , conocido)

$Q_c B_w$ flujo cardiaco (ml , conocido)

q_c flujo relativo desde el compartimento central a tejido graso ($\frac{1}{ml}$, calibrado)

q_f flujo relativo desde el tejido graso a compartimento central ($\frac{1}{ml}$, calibrado)

q_a flujo relativo desde el músculo a compartimento central ($\frac{1}{ml}$, calibrado)

q_b flujo relativo desde el compartimento central a músculo ($\frac{1}{ml}$, calibrado)

F_{abs} proporción de compuesto absorbido por el sistema (adimensional, calibrado)

K_c cte de eliminación desde compartimento central ($\frac{1}{ml}$, calibrado)

(Berntssen *et al.*, 2018)

De acuerdo a los parámetros anteriores, el cálculo de concentración final en filete de salmón para LCV o LVM se realiza de la siguiente manera.

$$C_{\text{fillet}}(t) = [A_{\text{muscle}}(t) + \varphi \cdot A_{\text{fat}}(t)] / W_{\text{fillet}}(t)$$

(Berntssen *et al.*, 2018)

Siendo φ la fracción del total de tejido graso en filete basado en el tejido graso de la fracción de filete vs la fracción total del tejido graso en todo el animal.

En el estudio de Berntssen *et al.*, 2018, se recoge evidencia empírica de la acumulación de la versión metabolizada de estos compuestos (LCV y LVM) a través de una alimentación con dietas fortificadas con CV y VM en distintas concentraciones. A partir de sus experimentos y del modelo matemático previamente presentado, se logra realizar un modelo de simulación de concentración de los compuestos metabolizados en músculo de salmones. Cabe destacar que estos modelos computacionales están

modificados para incluir las variaciones propias de condiciones realistas de la crianza de salmones para consumo humano.

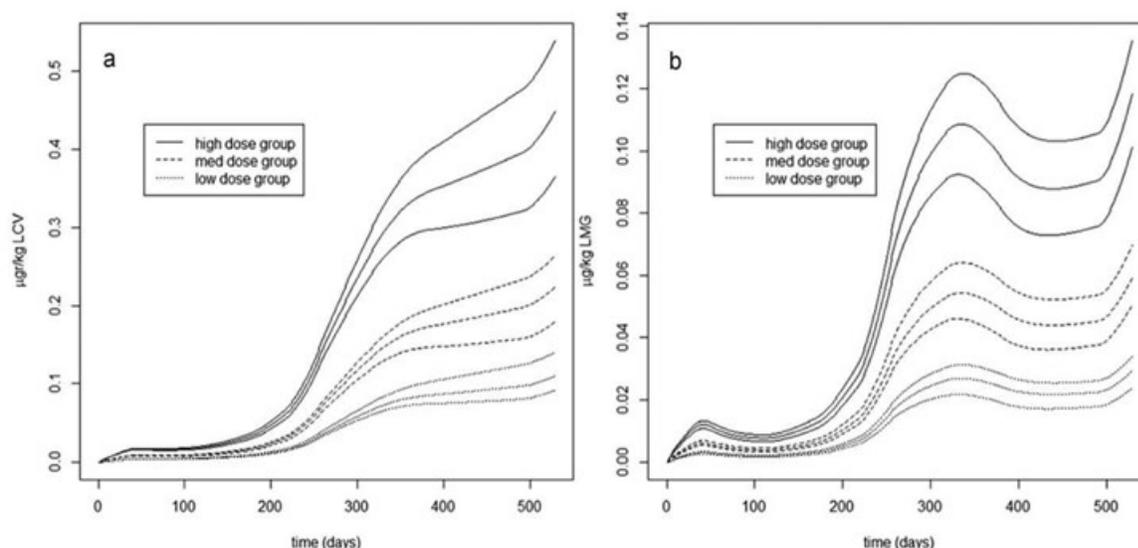


Figura 4. Concentraciones de LCV y LVM simuladas por modelo matemático-computacional (Berntssen et al., 2018).

Concentraciones estimadas de LCV (a) y LVM (b) a lo largo del tiempo en filetes de *Salmón del Atlántico* bajo condiciones realistas de un ciclo completo de producción en agua salada con dosis altas ($1.1 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea continua), medias ($0.55 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea discontinua) y bajas ($0.28 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea punteada). Las predicciones se entregan como niveles medios estimados (curva del medio de cada grupo) así como los intervalos de confianza del 95% (curva superior e inferior de cada grupo).

De acuerdo al modelo indicado anteriormente, es posible realizar predicciones de la concentración de los peligros en producto final de salmón tras una dieta con concentraciones estimadas. Las siguientes predicciones de tres casos hipotéticos de dietas contaminadas con CV o VM serán realizadas a través de la extrapolación de tres concentraciones promedio distintas de contaminantes que se comparan con las dietas utilizadas en el estudio de Berntssen et al., 2018. De este modo, las concentraciones hipotéticas de nuestros casos de estudio serán extrapoladas en los gráficos entregados en el artículo de Berntssen et al., 2018 (basados en las tres ecuaciones diferenciales previamente listadas). De este modo, se consigue una simulación aproximada de la metabolización de los contaminantes durante el proceso productivo del salmón. Para cada uno de los casos, se basará la contaminación hipotética en formulaciones reales utilizadas a lo largo del proceso productivo.

Tabla 5. Caso 1: Concentraciones bajas en ingredientes (elaboración propia).

Ingredientes riesgosos	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina Visceras de Ave	1	0,06	0,082	0	0	0,07	0,04	0

Ingredientes riesgosos	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina Sangre	1	0,04	0,045	0,0443	0,045	0,0407	0,0117	0,0106
Harina Vísceras de Cerdo	1	0,0295	0	0,04	0,1	0	0,04	0,12
Harina de Pluma	0	0	0	0	0	0	0	0
Reproceso	0	0	0	0	0	0	0	0
Harina de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0
Aceite de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0
	TOTAL (ug/kg)	0,1295	0,127	0,0843	0,145	0,1107	0,0917	0,1306
	Promedio	0,12						

En el caso hipotético de existir la presencia de los contaminantes en concentraciones muy bajas ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) en tres de los ingredientes riesgosos de las dietas de engorda de Salmón del Atlántico nos encontraremos, de acuerdo al porcentaje de estos ingredientes en el total de la dieta, con una concentración final de $0,12 \mu\text{g kg}^{-1}$ que se estaría proporcionando a los animales durante el proceso completo de producción en agua salada. En este caso, contamos con una dieta prolongada con una dosis menor a la dosis baja considerada por Berntssen *et al.*, 2018.

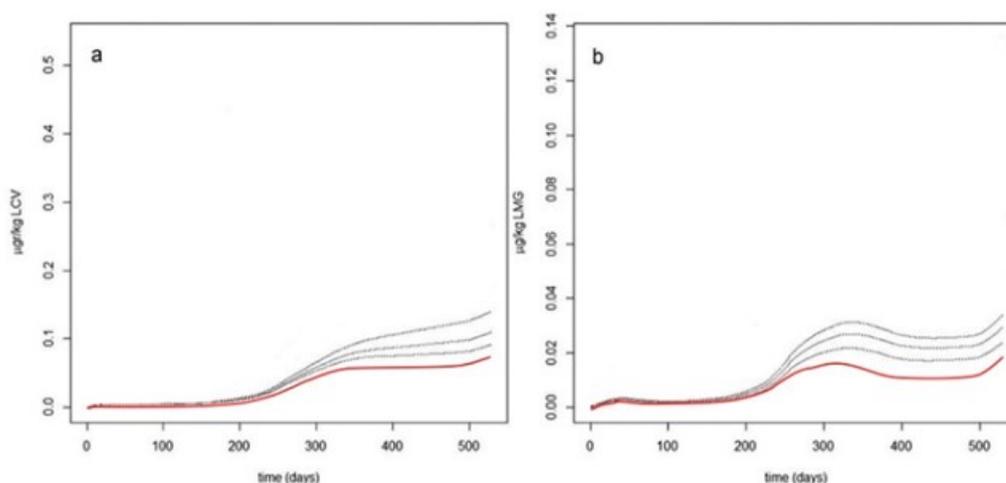


Figura 5. Concentraciones simuladas de LCV y LVM en modelo matemático considerando las concentraciones de piensos en el Caso 1 (adaptado de Berntssen *et al.*, 2018 y datos propios)

Concentraciones estimadas de LCV (a) y LVM (b) a lo largo del tiempo en filetes de *Salmón del Atlántico* bajo condiciones realistas de un ciclo completo de producción en agua salada de acuerdo al modelo de Berntssen *et al.*, 2018. Se muestra la dosis más baja considerada por Berntssen *et al.* ($0,28 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea punteada, intervalos de confianza del 95%) en comparación con la dosis putativa del caso 1 ($0,12 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea roja).

Extrapolando con el modelo matemático mostrado anteriormente se obtiene que la concentración en músculo de salmón no sobrepasaría los $0,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ para LCV (Figura 5) mientras que para LVM los niveles más altos equivaldrían a aproximadamente $0,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 5) en un periodo de 12 meses. Estos valores son inferiores tanto a los límites máximos de residuos establecidos, como al límite de decisión analítico ($CC\alpha$) de la técnica utilizada por Berntssen *et al.*, 2018. En el presente caso, no existiría una detección de los analitos en ningún momento del proceso.

Tabla 6. Caso 2: Concentraciones medias en ingredientes (elaboración propia).

Ingredientes riesgosos	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina Vísceras de Ave	1	0,06	0,082	0	0	0,07	0,04	0
Harina Sangre	1	0,04	0,045	0,0443	0,045	0,0407	0,0117	0,0106
Harina Vísceras de Cerdo	1	0,0295	0	0,04	0,1	0	0,04	0,12
Harina de Pluma	1	0	0,08	0,1	0,12	0,12	0,12	0,0957
Reproceso	1	0	0	0,02	0,025	0,03	0,025	0,03
Harina de Pescado	1	0,37	0,14	0,12	0,09	0,09	0,09	0,09
Aceite de Pescado	1	0,12	0,09	0,09	0,0792	0,0699	0,0699	0,0653
TOTAL (ug/kg)		0,6195	0,437	0,4143	0,4592	0,4206	0,3966	0,4116
Promedio		0,50						

En el caso hipotético de existir la presencia de los contaminantes en concentraciones muy bajas ($1 \mu\text{g kg}^{-1}$) en todos los ingredientes riesgosos de las dietas de engorda de Salmón del Atlántico, nos encontraremos de acuerdo al porcentaje de estos ingredientes en el total de la dieta con una concentración final de $0,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ que se estaría proporcionando a los animales durante el proceso completo de producción en agua salada. En este caso, contamos con una dieta prolongada con una dosis similar a la dosis media considerada por Berntssen *et al.*, 2018.

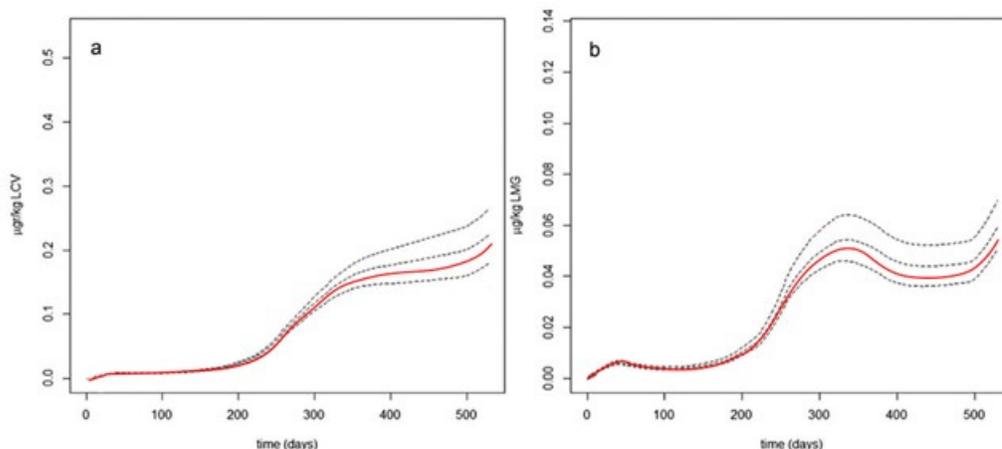


Figura 6 a y b. Concentraciones simuladas de LCV y LVM en modelo matemático considerando las concentraciones de piensos en el Caso 2 (adaptado de Berntssen *et al.*, 2018 y datos propios).

Concentraciones estimadas de LCV (a) y LVM (b) a lo largo del tiempo en filetes de *Salmon del Atlántico* bajo condiciones realistas de un ciclo completo de producción en agua salada de acuerdo al modelo de Berntssen *et al.*, 2018. Se muestra la dosis media considerada por Berntssen *et al.* ($0,55 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea punteada, intervalos de confianza del 95%) en comparación con la dosis putativa del caso 2 ($0,50 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea roja).

Extrapolando con el modelo matemático mostrado anteriormente, se obtiene que la concentración en músculo de salmón alcanzaría $0,185 \mu\text{g kg}^{-1}$ para LCV (Figura 6) mientras que para LVM los niveles más altos equivaldrían a aproximadamente $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 6) en un periodo de 12 meses. Los valores predichos para ambos compuestos son inferiores a los límites máximos de residuos establecidos. Sin embargo, el valor obtenido para LCV es superior al límite de decisión analítico ($CC\alpha$) de la técnica utilizada por Berntssen *et al.*, 2018 ($0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$). En el presente caso, existiría una detección de LCV mediante $CC\alpha$ que debiese ser reportada. No existiría una detección de LVM.

Tabla 7. Caso 3: Concentraciones altas en ingredientes (elaboración propia).

Ingredientes riesgosos	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina Vísceras de Ave	20	1,2	1,64	0	0	1,4	0,8	0
Harina Sangre	20	0,8	0,9	0,886	0,9	0,814	0,234	0,212
Harina Vísceras de Cerdo	0	0	0	0	0	0	0	0
Harina de Pluma	0	0	0	0	0	0	0	0
Reproceso	0	0	0	0	0	0	0	0

Ingredientes riesgosos	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0
Aceite de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL (ug/kg)		2	2,54	0,886	0,9	2,214	1,034	0,212
Promedio		1.4						

En el caso hipotético de existir la presencia de los contaminantes en concentraciones altas ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) en 2 de los ingredientes riesgosos de las dietas de engorda de Salmón del Atlántico se encontrará, de acuerdo al porcentaje de estos ingredientes en el total de la dieta, con una concentración final de $1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ que se estaría proporcionando a los animales durante el proceso completo de producción en agua salada. En este caso, contamos con una dieta prolongada con una dosis mayor a la dosis alta considerada por Bertssen *et al.*, 2018.

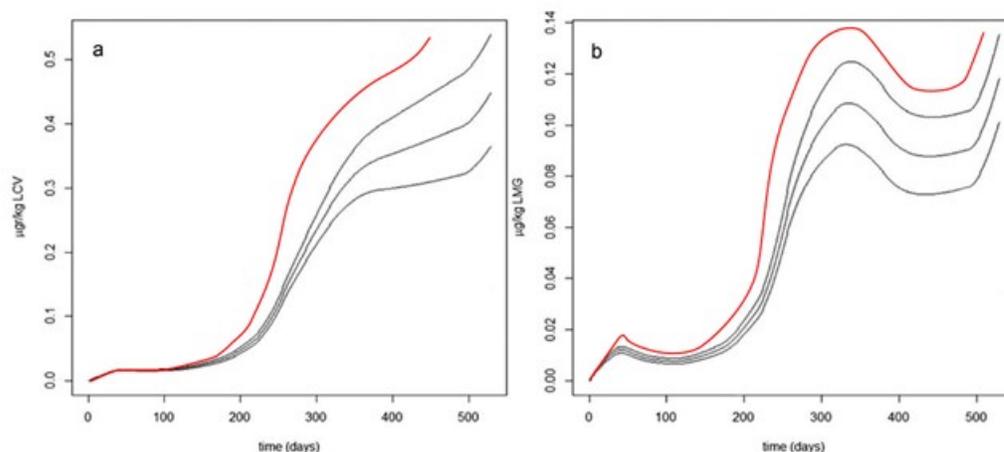


Figura 7 a y b. Concentraciones simuladas de LCV y LVM en modelo matemático considerando las concentraciones de piensos en el Caso 3 (adaptado de Bertssen *et al.*, 2018 y datos propios).

Concentraciones estimadas de LCV (a) y LVM (b) a lo largo del tiempo en filetes de *Salmón del Atlántico* bajo condiciones realistas de un ciclo completo de producción en agua salada de acuerdo al modelo de Bertssen *et al.*, 2018. Se muestra la dosis más alta considerada por Bertssen *et al.* ($1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea negra, intervalos de confianza del 95%) en comparación con la dosis putativa del caso 3 ($1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$, línea roja).

Extrapolando con el modelo matemático mostrado anteriormente se obtiene que la concentración en músculo de salmón alcanzaría $0,46 \mu\text{g kg}^{-1}$ para LCV (Figura 7) mientras que para LVM los niveles más altos equivaldrían a aproximadamente $0,138 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Figura 7) en un periodo de 12 meses. Los valores predichos para ambos compuestos son inferiores a los límites máximos de residuos establecidos. Sin embargo, el valor obtenido para LCV es superior al límite de decisión analítico ($CC\alpha$) de la técnica utilizada por Bertssen *et al.*, 2018 ($0,15 \mu\text{g kg}^{-1}$). En el presente caso, existiría una detección de LCV mediante $CC\alpha$ que

debiese ser reportada. No existiría una detección de LVM, aunque su concentración más alta se acerca bastante al CC α del método. Cabe destacar que el CC α depende del método de detección utilizado, por lo que es muy probable que con estos valores exista una detección de ambos compuestos con métodos más sensibles.

4.2.5 Taller de expertos

4.2.5.1 *Objetivo*

Robustecer la Evaluación de Riesgos para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas (Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita) en músculo de salmón con las opiniones de expertos.

4.2.5.2 *Metodología*

Se realizó un taller el 22 de noviembre del 2022 y tuvo una duración de una hora y cuarenta y cinco minutos (9:00-10:45), en las que el equipo CERES BCA presentó los resultados preliminares de la Evaluación de Riesgos. Esos resultados se discutieron con el panel de expertos. La sesión se llevó a cabo virtualmente por la plataforma Zoom. La jornada se dividió como se presenta a continuación:

- Presentación del proyecto.
- Presentación información de contaminantes (Anexo 1).
- Presentación de resultados de la evaluación de riesgo (Anexo 2).
- Discusión de expertos, autoridades y participantes.

4.2.5.3 *Participantes*

Tabla 8. Lista de expertos participantes del Taller.

Nombre	Función	Institución/Empresa
Alicia Gallardo	Experta en epidemiología animal y alta gestión pública de instituciones asociadas a la acuicultura	U. de Chile
Jurij Wacyk	Experto en alimentación de peces	U. de Chile
Mauro Araneda	Experto en alimentación de peces	AquaChile
Luciano Rivera	Experto en análisis y servicios de laboratorio asociados a la acuicultura	AQUAGESTIÓN
Jorge Eduardo Ponce	Experto en alimentación de peces	Consultor Independiente

Tabla 9. Lista de profesionales participantes del Taller.

Nombre	Función	Institución/Empresa
Héctor Escobar	Directiva	SERNAPESCA
Diego Fernández	Directiva	SERNAPESCA
María Eugenia Olguín	Directiva	SERNAPESCA
Maureen Alcayaga	Directiva	SUBPESCA
Rafael Hernández	Directiva	FIPA
Javiera Cornejo	Equipo Proyecto	FAVET
Ekaterina Pokrant	Equipo Proyecto	FAVET
Gabriela Asenjo	Equipo Proyecto	CERES BCA
Camila Huidobro	Equipo Proyecto	CERES BCA
Marcelo Olivares	Equipo Proyecto	CERES BCA
Pablo Binelli	Equipo Proyecto	CERES BCA

En el Anexo 3 se puede ver la evidencia de la realización del taller y los participantes.

4.2.5.4 Temas tratados

- Dentro de la conversación mantenida con los panelistas expertos, se llega a un consenso respecto que los insumos que componen el pienso son el grupo de mayor riesgo. Esto se desprende a partir de la investigación realizada por el equipo, las observaciones profesionales de los panelistas y la cantidad de materia prima rechazada por las empresas que elaboran piensos.
- Respecto a los insumos de piensos con mayor riesgo de contener estos contaminantes, se concuerda con que se trata de aquellos de origen animal. Se enfatiza que el insumo “Hemoglobina” es de mayor riesgo que la “Harina de Sangre”, por lo que queda registrado este punto para planear el proceso de toma de muestras.
- Además, los panelistas comentan que existe una falta de armonización entre los sistemas de control de la producción de piensos del SAG y SERNAPESCA.
- Se comenta que existe una red de monitoreo privado, integrado por 7 laboratorios (Eurofins, Bureau Veritas, SGS, Intertek, Labser, Qualified y AGQ), la cual realiza un monitoreo de materias de origen animal de los principales proveedores del país.
- Existe una preocupación por parte de algunos panelistas respecto a otros insumos que pueden pasar desapercibidos como posibles fuentes de contaminación de estos compuestos. Insumos como tintas de lápices y plumones, tinte y logos de cajas, guantes, entre otros, se encuentran dentro de esta lista. Sin embargo, se clarifica dentro de la conversación, que en la normativa y manuales de SERNAPESCA la toma de muestra se realiza con guantes sin coloración, en lápiz grafito y etiquetas blancas. Por tanto, los panelistas concuerdan que, si bien este riesgo es real, no resulta ser un ítem de alto riesgo.

- En relación a la toma de muestras, los panelistas se muestran de acuerdo en que es muy importante el volver a comunicarle a las empresas participantes y aquellas que deseen participar, de que se trata de un proyecto de investigación que gestionará con confidencialidad los resultados. Que, por tanto, no habrá problemas de eventuales sanciones si llegasen a encontrarse eventos de identificación de los contaminantes. De esta forma se favorecerá la cooperación de las plantas.

4.2.5.5 Conclusiones del Taller

- Los insumos que componen los piensos representan el mayor riesgo para la introducción de los peligros a la cadena productiva de salmón.
- Dentro de los insumos, los de mayor riesgo son los de origen animal.
- Existen otras vías de ingreso de los peligros a la cadena, como tintas y colorantes, pero no serían de alto riesgo.
- Existe la necesidad de insistir con las plantas de piensos, en que se garantiza la confidencialidad de los resultados de los análisis, dado que se trata de un proyecto de investigación.

4.3 Conclusiones parciales Objetivo Específico 1

- Los colorantes CV y VM, junto con sus versiones metabolizadas LCV y LVM son compuestos altamente estables con variadas aplicaciones, principalmente como colorantes y pigmentos para telas, tintas y plásticos, así como en pruebas histológicas y de laboratorio. Históricamente, estos compuestos han sido utilizados asociados a la producción animal como antifúngicos y desinfectantes.
- Estos compuestos, CV, VM, LCV Y LVM, están clasificados por organizaciones internacionales como altamente tóxicos, mutagénicos y posiblemente cancerígenos, por lo que no se considera segura su presencia en productos de consumo animal y humano. Por esta razón, Chile posee una de las legislaciones más estrictas a nivel mundial, donde no se admite la presencia de ninguno de estos compuestos en producto terminado.
- El análisis de las etapas de la cadena productiva de salmónidos permitió identificar las posibles vías de ingreso de los peligros que podrían producir la presencia de éstos en los animales y en el producto final. Las vías identificadas son desinfectantes y antisépticos utilizados durante el proceso, envases y tintas, agua y piensos e insumos. La información bibliográfica disponible indica que la contaminación con estos compuestos es la infracción más común a nivel mundial en peces de aleta producidos por acuicultura, relacionándose con la presencia de piensos e insumos contaminados. Los insumos considerados de riesgo corresponden a harinas de origen animal:

harina de sangre, harina de pluma, harina de cerdo, harina de vísceras de ave y aceite de pescado, así como cualquier reproceso que incluya estos ingredientes.

- Los compuestos como CV y VM forman complejos muy estables con proteínas animales, lo que es una de las causas de su toxicidad. Si bien se considera que estos compuestos tienen una tasa de depuración alta, el estudio realizado por el grupo noruego Berntssen et al, 2018, entrega pruebas indiscutibles de que estos compuestos pueden acumularse, tanto en tejido graso como muscular, en salmónidos alimentados con dietas contaminadas.
- El modelo matemático elaborado por Berntssen et al, 2018, considera los factores y variables involucrados en el proceso productivo de salmónidos. Utilizándolo como base, es posible estimar el efecto de materias primas de pienso contaminadas en la acumulación y posible posterior detección en producto final. De acuerdo con las estimaciones realizadas en el presente informe, concentraciones altas de estos contaminantes ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$) en ingredientes de pienso son capaces de generar una concentración de contaminante suficiente para ser detectada con los equipos utilizados actualmente.
- Los expertos en el área productiva y alimentación de salmónidos consultados durante el taller de expertos realizado el 22 de noviembre del 2022 se mostraron de acuerdo con las conclusiones preliminares del presente informe. Los expertos confirmaron que los insumos que componen los piensos corresponden al mayor riesgo asociado al ingreso de peligros a la cadena productiva del salmón y que entre estos, los ingredientes de origen animal son los de mayor riesgo.

5 OBJETIVO ESPECÍFICO 2

5.1 Metodología

5.1.1 Descripción de la normativa nacional e internacional

Se realizó una búsqueda documental de la normativa nacional e internacional en materia de residuos químicos en piensos para peces con foco en los aspectos de inocuidad alimentaria.

5.1.2 Descripción de insumos utilizados para alimentación de salmones

Se recopiló información sobre los insumos más utilizados en la alimentación para salmones a nivel nacional. Para lo anterior, se consultaron referencias nacionales elaboradas por empresas de producción de salmones, empresas de fabricación de piensos, SERNAPESCA y SAG. Adicionalmente se revisaron estudios y documentos académicos o de instituciones de investigación que se refieran a los principales ingredientes utilizados en la fabricación de piensos para salmones.

5.1.3 Descripción de residuos de sustancias no autorizadas

Se recopiló información científica sobre los residuos de sustancias no autorizadas en piensos para peces (CM, LCM, VM y LVM), considerando la composición, diseminación y efectos de los residuos en las distintas etapas de la producción acuícola.

5.1.4 Análisis de insumos utilizados para la alimentación de salmones

Se identificaron las condiciones bajo las cuales se puede presentar la sustancia no autorizada en piensos para salmones y los indicadores que determinan si dicha sustancia tiene un efecto negativo en la salud de las personas.

Para ello se determinaron cuáles residuos de sustancias no autorizadas son significativos, mediante el estudio de factores como probabilidad de ocurrencia, importancia e incidencia.

Probabilidad de ocurrencia: Es la frecuencia posible de presentación del peligro identificado (sustancia no autorizada), la cual se determina en forma cualitativa de acuerdo a los siguientes niveles de ocurrencia: alta, mediana, baja e insignificante.

Importancia: Se clasifica en crítica, mayor, media, baja e insignificante según sus efectos.

Incidencia: Corresponde a la posibilidad de que, una vez ocurrido el peligro (sustancia no autorizada), se obtenga un producto final inseguro.

5.1.5 Caracterización y estimación del riesgo

Para cada uno de los eslabones o fases de la cadena productiva se utilizó el score de riesgo para evaluar la probabilidad de ocurrencia de los eventos no deseados (contaminación de insumo, piensos o producto y exposición de peces a los peligros) considerando los factores de riesgo identificados.

Se determinó un score de riesgo, considerando la ponderación de las probabilidades de ocurrencia de eventos, exposición, presencia en producto final, junto con la evidencia existente para determinar si los vehículos o fuentes se consideran de riesgo y son candidatos a toma de muestra, de acuerdo a los siguientes pasos:

- a) Categorización de la probabilidad de ocurrencia de cada uno de los subfactores de riesgo de contaminación con CV y VM para cada etapa y evento de riesgo de los distintos eslabones de la cadena productiva del salmón. Este proceso se realizó contrastando la información científica existente con los antecedentes entregados por informantes calificados.
- b) Agregación de subfactores y sus riesgos finales por factor de riesgo. De acuerdo a la categorización obtenida del riesgo final de cada subfactor, se asoció un valor numérico (1 a 5). El valor de cada subfactor de riesgo fue ponderado a partir del trabajo con expertos, obteniéndose puntajes ponderados de los factores de riesgos.
- c) Finalmente se obtuvieron los puntajes ponderados de los subfactores de riesgos. Para este cálculo se utilizó el promedio de los puntajes de los subfactores correspondientes, resultando en un **puntaje de riesgo total**. Con el puntaje de riesgo total se determinó el índice o score de riesgo en función de la proporción del puntaje más alto, obteniéndose el índice de riesgo total. A partir de lo anterior se establecieron tres categorías de riesgo y aquellos casos que tuviesen índice de riesgo total igual o superior a 0,8 (alto) son los seleccionados para el muestreo posterior.

5.1.6 Evaluación incertidumbres asociadas a la estimación de riesgos

Para la evaluación de incertidumbres asociadas a la estimación de riesgo, se identificaron las brechas de información o incertidumbres asociadas durante el proceso, esto permitió tenerlas en consideración al momento de tomar decisiones tendientes a reducir los riesgos. En este caso, se incorporó dentro del score de riesgo y se utilizó una escala que evalúa la evidencia y datos existentes para cada evento de riesgo. El nivel de evidencia se evaluó del 1 al 3 según la escala que se muestra en la Tabla 10. En este sentido, el nivel de evidencia alto corresponde a incertidumbre baja y el nivel de evidencia bajo corresponde a incertidumbre alta.

Tabla 10. Escala de evidencia.

Nivel de evidencia	Definición	Ponderación
ALTA	Se dispone de datos sólidos y completos; se aportan pruebas sólidas de múltiples referencias.	3
MEDIA	Se dispone de algunos datos, pero no de todos, las pruebas se presentan en un número reducido de referencias.	2
BAJA	Los datos disponibles son escasos o inexistentes; las pruebas proceden de informes no publicados o se basan en observaciones o comunicaciones personales.	1

Elaborado por CERES BCA basado en:

Pfeiffer D.U., Ho H.P.J., Bremang A., Kim Y. & OIE team (2021). - Compartmentalisation Guidelines – African Swine Fever. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 148 pp.

5.1.7 Metodología de toma y análisis de muestra

Las muestras de piensos fueron tomadas desde las plantas y en caso necesario de los centros de cultivo (en la etapa final de engorda en agua de mar). Cada planta de piensos participante se codificó con el fin de mantener la confidencialidad de los resultados. A cada planta se le envió el código asignado.

Para el procedimiento de muestreo se tomó como referencia el Reglamento N° 691 /2013 de la Unión Europea (5) donde se señala el método de muestreo para piensos y el Manual de Inocuidad y Certificación de SERNAPESCA (2021) (6) donde se hace referencia sobre el método de muestreo en harina de carne.

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio FARMAVET de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, acreditado bajo Nomas Internacionales ISO 17025 of. 2017. Se validó el método analítico en piensos, tomando como referencia el Método validado en el laboratorio en músculo de salmón con piel en proporciones naturales. Considerando la naturaleza del pienso para peces, se realizaron las modificaciones necesarias en el procedimiento de extracción de las muestras.

5.2 Resultados

5.2.1 Descripción de la normativa nacional e internacional

SERNAPESCA elaboró el Manual de Inocuidad y Certificación (MIC), aprobado mediante la Resolución Exenta N° 5.125, de 29 de junio de 2016, el cual describe las normas y procedimientos que permiten garantizar la calidad sanitaria de los productos pesqueros y acuícolas de exportación a lo largo de toda la cadena productiva.

Las Normas y Procedimientos del MIC, contiene la sección I sobre “Control de Origen”, en la cual se ubica una sección específica de “Control en acuicultura de residuos de productos farmacéuticos, sustancias prohibidas, sustancias no autorizadas y contaminantes”. Esta parte del manual describe las normas y procedimientos para el control de residuos de productos farmacéuticos, sustancias prohibidas, sustancias

no autorizadas y contaminantes en peces de la acuicultura, con el propósito de garantizar la inocuidad de los productos elaborados en base a estos recursos.

Los establecimientos que están sujetos a los procedimientos y requisitos establecidos en este apartado, son todos los centros de cultivo de peces y los establecimientos que procesen este tipo de recursos.

El control de residuos de productos farmacéuticos en centros de cultivo, se efectuará a través de muestreos pre-cosecha, realizados directamente en los centros, por unidad de cultivo, a los peces tratados con el producto farmacéutico Oxitetraciclina, administrado por cualquier vía y en cualquier momento de la etapa en mar para peces en engorda y reproductores destinados a cosecha, y en cualquier momento de la etapa en agua dulce para peces cosechados desde pisciculturas (cultivo de tamaño porción o pan size y reproductores).

Para todos los centros de cultivo que destinen sus producciones al mercado de la Unión Económica Euroasiática, el muestreo pre-cosecha es obligatoria para los siguientes compuestos:

- a) Tetraciclinas (Oxitetraciclina, Clortetraciclina, Tetraciclina y sus 4-epímeros), independiente de si han realizado o no tratamientos con el fármaco Oxitetraciclina.
- b) Sustancias No Autorizadas (Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita).

En caso de no realizar estos muestreos, se debe indicar la restricción para este mercado en el documento Declaración de Garantía.

Estos muestreos deben realizarse acorde a los Procedimientos Relativos al Control en Acuicultura de Residuos de Productos Farmacéuticos, Sustancias Prohibidas, Sustancias No Autorizadas y Contaminantes, establecidos en la Sección de Autorización y Control de Entidades de Análisis, Muestreo y Muestreadores del MIC.

En caso de que un centro de cultivo no haya realizado tratamientos con el fármaco Oxitetraciclina, el Médico Veterinario responsable del centro debe emitir una Declaración Jurada Simple, certificando que no se han realizado tratamientos con este producto. Esta Declaración puede ser reemplazada por el Certificado Oficial para Peces Libres de Uso entregado por SERNAPESCA, en caso de contar con este documento. Esto no aplica para centros de cultivo que destinen sus producciones al mercado de la Unión Económica Euroasiática. La Solicitud de Muestreo para Cosecha respaldará a las unidades tratadas, sólo mientras se mantengan las condiciones del centro al momento del muestreo, es decir, que no se hayan realizado tratamientos posteriores a la toma de muestras.

Los peces de cultivo cosechados deben cumplir con los requisitos indicados en el Punto sobre “Límites máximos residuales en carne y piel de pescado”. De no cumplirse con las concentraciones señaladas, se debe prolongar el período de carencia y realizar un nuevo muestreo, o bien, indicar las restricciones de mercado correspondientes en el documento Declaración de Garantía.

En caso de cosechas excepcionales autorizadas por el Servicio, en que los peces se destinen a plantas que han incorporado en su PAC un peligro relacionado a la confusión de lotes, la empresa de cultivo debe informar claramente en la Declaración de Garantía las concentraciones de residuos con que fueron cosechados los peces.

El Manual de Inocuidad y Certificación de SERNAPESCA contempla el control de sustancias prohibidas y no autorizadas a través de muestreos oficiales que se realizan de forma rutinaria en centros de cultivo de peces. La frecuencia de muestreo es de una vez al año para los centros de cultivo con peces en etapa de

reproducción, alevinaje y/o smoltificación (pisciculturas, centros de río y lago, y centros de smoltificación en estuario), y de un muestreo durante la etapa de engorda para los centros de cultivo en mar.

Para el caso de CV y LCV, para determinar cuándo un resultado es desfavorable, se considerará la presencia de ambos analitos, es decir, CV + LCV, o bien, la sola presencia de LCV. Esto aplica de la misma forma para VM y LVM.

En casos de detección de centro de agua dulce, los peces solamente podrán ser trasladados con autorización de SERNAPESCA, se les realizará seguimiento y nuevos muestreos en la etapa de engorda. Para los casos positivos provenientes de centro de mar, los peces no podrán ser cosechados ni trasladados.

El SAG tiene como misión el proteger y mejorar la condición fito y zoonosanitaria de los recursos productivos, y conservar los recursos naturales renovables del ámbito silvoagropecuario del país, controlando los insumos y productos, a través de la elaboración, actualización y aplicación de la normativa vigente, para contribuir al desarrollo sustentable y competitivo del sector.

A partir de lo anterior, el SAG ha dispuesto normativas para garantizar la salud animal, inocuidad y trazabilidad de los piensos para animales, mediante la obtención y utilización de piensos procedentes de establecimientos nacionales bajo control oficial o piensos importados autorizados.

Adicionalmente el Reglamento de Alimentos para Animales (Decreto N°4/2016), señala que el SAG determinará la nómina de contaminantes, límites máximos permitidos y técnicas analíticas que deberán realizarse a los piensos para animales según su categoría y composición.

En este marco, el SAG ha definido criterios normativos que establecen límites máximos de contaminantes en piensos completos, suplementos, aditivos e ingredientes destinados a la alimentación de especies de consumo humano, dentro de lo cual se encuentran los niveles máximos de colorantes prohibidos en alimentación en peces de abasto (Resolución Exenta N° 7885, 25/01/2018).

En particular la normativa del SAG indica que para el caso de los colorantes Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita y Verde Brillante en piensos completos, debe existir ausencia ($Id=0,2$) de dichos colorantes.

El MINSAL tiene por misión construir un modelo de salud sobre la base de una atención primaria fortalecida e integrada, que pone al paciente en el centro, con énfasis en el cuidado de poblaciones durante todo el ciclo de vida, y que además estimule la promoción y prevención en salud, así como el seguimiento, trazabilidad y cobertura financiera.

En dicho contexto, el MINSAL ha establecido normativas que apuntan a garantizar la inocuidad de los piensos. Tal es el caso del Reglamento Sanitario de los Alimentos que indica que "Pienso Contaminado" es aquel que contiene microorganismos, virus o parásitos, sustancias extrañas o deletéreas de origen mineral, orgánico o biológico, sustancias radioactivas o sustancias tóxicas en cantidades superiores a las permitidas por las normas vigentes o que se presumen nocivas para la salud y que se prohíbe la comercialización, a cualquier título, de carnes y sus subproductos con residuos de plaguicidas, residuos de medicamentos de uso veterinario y de aditivos, usados en la alimentación animal, que estén por sobre los límites de tolerancia fijados (RSA, 1996).

El MINSAL fija los límites máximos para residuos de medicamentos de uso veterinario en la carne y otros piensos y debe asegurar que la exposición a medicamentos veterinarios de los animales destinados a la producción de piensos no represente un riesgo para la salud humana (Resolución Exenta N° 1560, 11/09/2019).

En este sentido el MINSAL, debe controlar el uso de los medicamentos veterinarios y verificar que se apliquen las prácticas adecuadas y que existan medidas eficaces establecidas dentro del sistema de distribución de medicamentos veterinarios y de producción de piensos, a fin de conferir una protección eficaz para la salud del consumidor.

De manera específica, el MINSAL definió normativamente que los colorantes Verde Malaquita y Violeta de Genciana no debe ser detectable en cualquier tejido comestible de cualquier especie animal, lo anterior considerando la suma de Verde Malaquita y Leuco Verde Malaquita.

Tabla 11. Normativa Nacional Cristal Violeta y Verde Malaquita (Elaboración propia).

Institución	Ámbito	Referencia
SERNAPESCA	<ul style="list-style-type: none"> Muestreo pre-cosecha obligatorio de sustancias no Autorizadas (Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita). Detección de sustancias no autorizadas (acciones). Establecimientos autorizados para exportar al mercado de la Unión Económica Euroasiática deben incorporar a sus verificaciones periódicas del PAC las sustancias no autorizadas (Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita, Leuco Verde Malaquita). LMR sustancias prohibidas y sustancias no autorizadas (ausencia). Lista de sustancias monitoreadas y los requisitos y procedimientos establecidos por SERNAPESCA en el Programa de Control de Fármacos. 	Manual de inocuidad y certificación
MINSAL	<ul style="list-style-type: none"> Límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los piensos (no detectable). 	Resolución 1560/2019
SAG	<ul style="list-style-type: none"> Límites máximos de contaminantes en insumos destinados a la alimentación animal. Alimentación en peces de abasto (Ausencia). 	Resolución 7885/2017

A nivel internacional, existen países que establecen la prohibición de uso de colorantes con VM y CV en producción de peces, definiendo valores referenciales de residuos muy bajos, determinando que los colorantes antes mencionados no sean detectables en el producto.

A nivel latinoamericano, los países analizados cuentan con normativa que hace referencia a la presencia de estos colorantes y señalan valores referenciales de residuos equivalentes.

En el caso de la Unión Europea o Estados Unidos, la CV y VM no están aprobados para uso en la acuicultura y sus valores referenciales de residuos, son aún más bajos.

A continuación, se indican algunas referencias normativas de distintos países, que hacen alusión al uso de este tipo de colorantes a la producción de pescado.

Tabla 12. Normativa Internacional Cristal Violeta y Verde Malaquita¹ (Elaboración propia).

Institución	Ámbito	Referencia
CODEX ALIMENTARIUS	<ul style="list-style-type: none"> Las autoridades competentes deben evitar los residuos de verde de malaquita en los piensos. Esto se puede lograr no utilizando verde de malaquita en animales destinados a la producción de piensos. 	Maximum Residue Limits (MRLs) And Risk Management Recommendations (RMRs) For Residues Of Veterinary Drugs In Foods CX/MRL 2-2018
Unión Europea	<ul style="list-style-type: none"> Valores de referencia para las sustancias farmacológicamente activas no autorizadas presentes en los piensos de origen animal. 0,5 µg/kg para la suma de verde de malaquita y leuco verde de malaquita. 	Reglamento (UE) 2019/1871 De La Comisión
Comisión Económica Euroasiática	<ul style="list-style-type: none"> Para el ingreso al territorio de la Unión Aduanera y (o) traslado entre las Partes no se admite los productos de pescado, - tratados con sustancias colorantes 	Requerimientos sanitarios y veterinarios unificados para las mercancías sujetas a control veterinario (vigilancia)
Estados Unidos-FDA	<ul style="list-style-type: none"> Medicamentos animales no aprobados para acuicultura. 	Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition-2021
Estados Unidos-FDA	<ul style="list-style-type: none"> La FDA determina que la violeta de genciana no se reconoce como segura y efectiva para el uso de ningún fármaco veterinario en animales destinados al consumo humano y es un nuevo fármaco animal sujeto a la sección 512 de la Ley Federal de Piensos, Medicamentos y Cosméticos. 	Code of Federal Regulations Title 21, Volume 6 CITE: 21CFR500.30
Japón Department of Food Safety, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, Ministry of Health, Labour, and Welfare	<ul style="list-style-type: none"> Establecimiento de los Límites Máximos de Residuos para productos agrícolas y sustancias químicas veterinarias en los piensos. Malachite green: 0.002 mg/kg Leucomalachite green: 0.002 mg/kg 	Ministry Health, Labour and Welfare Notification No. 645, 2006
Brasil	<ul style="list-style-type: none"> Establece los límites de referencia para el Plan Nacional de Control de Residuos y Contaminantes en Productos de Origen Animal - PNCRC de 2019. Sustancia prohibida o no autorizada para pescados. 	Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento/Secretaría de Defensa Agropecuaria Instrucción normativa N° 5.

¹ En el Anexo 4, se sintetiza el sistema de control de la UE, como un ejemplo relevante de referencia.

Institución	Ámbito	Referencia
	<ul style="list-style-type: none"> El Límite Mínimo de Rendimiento Requerido (LMDR) para el método analítico es de 2 µg/kg. 	
Ecuador	<ul style="list-style-type: none"> Establece los requisitos que debe cumplir el pescado fresco refrigerado o congelado de producción acuícola que se presenta para el consumo humano. El límite máximo de residuos de medicamentos veterinarios en los pescados es: Verde Malaquita más Leuco Verde Malaquita, 2 µg/kg 	Resolución N° 301 - NTE INEN 1896 sobre requisitos para pescados frescos, refrigerados o congelados de producción acuícola.
Colombia	<ul style="list-style-type: none"> Los colorantes triarilmetanos, (entre ellos CV, VM y sus versiones metabolizadas) se encuentran prohibidos para la administración en animales. las tomas de muestra y análisis de contaminantes que deben realizar las empresas como parte del programa HACCP deben incluir el análisis de estos componentes y la emisión de un certificado que compruebe su ausencia en todos los lotes producidos. Los análisis de las muestras deberán ser realizados por laboratorios debidamente acreditados a modo de asegurar que los resultados sean fiables. Además, tienen planes nacionales subsectoriales de vigilancia y control de residuos en piensos (PSVCR) los cuales implican la entrega de muestras obligatorias por parte de las empresas. 	Resolución N°730 de 1998 Resolución N°961 del 2003 Resolución N°770 del 2014

Si bien existen algunas diferencias mínimas entre los países y Codex, al compararlas con el sistema de control utilizado en Chile no existen grandes diferencias. Por un lado, todos los países analizados mantienen la prohibición del uso de colorantes triarilmetanos para acuicultura y los catalogan como compuestos posiblemente peligrosos. Como fue mencionado anteriormente en el presente informe, numerosos países mantienen una legislación que permite la presencia de estos compuestos únicamente en trazas. Respecto a este punto cabe destacar que Chile tiene una de las normas más estrictas, ya que la actual legislación del país clasifica a los colorantes triarilmetanos como no permitidos, lo que implica que no deben ser detectados en las muestras analizadas. Con respecto al análisis de muestras, en todos los países considerados, así como en las propuestas realizadas por las comisiones de la UE y de entidades globales como la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) se identifica el uso de programas que incluyan la toma de muestras de los productos y su análisis por un laboratorio no afiliado a la industria. Se comparte que la certificación de laboratorios es relevante para asegurar la calidad de resultados. En muchos casos, estos análisis deben incluirse dentro de programas HACCP que deben elaborar las empresas.

5.2.2 Descripción de insumos utilizados para alimentación de salmones

Tal como se describe en el punto 4.2.4.1.6, los insumos para la alimentación en acuicultura pueden presentar CV y VM, especialmente las harinas de origen animal, de ahí que sean considerados factores de riesgo de contaminación con dichos colorantes. Dado lo anterior, en el siguiente cuadro se describen los principales insumos utilizados en las formulaciones alimenticias utilizadas en salmones. Para cada uno de ellos se señalan las condiciones bajo las cuales se producen, sus propiedades nutricionales y las limitaciones para su uso.

Tabla 13. Descripción de principales insumos utilizados para alimentación de salmones (Elaboración propia).

Insumo	Características	Propiedades nutricionales	Limitaciones
Harina de pescado	La harina de pescado se obtiene cocinando, prensando, secando y moliendo pescado crudo fresco o recortes de pescado.	La harina de pescado contiene proteínas valiosas con alta digestibilidad. Además, las harinas de pescado tienen un contenido energético relativamente alto y son ricas en minerales importantes como el fósforo, en vitaminas B y en ácidos grasos esenciales.	Sus principales limitaciones son la disponibilidad, costo y la sustentabilidad de la industria acuícola.
Harina de sangre	La sangre se puede recolectar durante el sacrificio de varias especies de ganado (bovinos, cerdos, pollos, etc.) en una amplia gama de condiciones. Por lo general, se seca y se convierte en harina de sangre para que pueda manipularse e incorporarse a las raciones más fácilmente.	La harina de sangre contiene principalmente proteínas (alrededor del 90-95% de MS) y pequeñas cantidades de grasa (menos del 1% de MS) y cenizas (menos del 5% de MS).	Por su alto contenido de hierro, se debe limitar su inclusión.
Harina de plumas	La harina de plumas resulta del procesamiento de las plumas obtenidas después del sacrificio de aves de corral. Las plumas son un subproducto de las operaciones de procesamiento de pollos de engorde, pavo y otras aves de corral.	La harina de plumas es principalmente una fuente de proteínas. Contiene típicamente alrededor del 85% de MS de proteína, con algo de grasa (9%) y minerales (6%).	Digestibilidad de la proteína puede variar entre 67-87%.
Harina de cerdo	Es un producto que resulta de la fundición, prensado, y desengrasado de los subproductos del cerdo.	Buena fuente de proteínas con buen perfil de aminoácidos.	La calidad de la proteína se puede ver deteriorada por el uso de procesos térmicos.
Harina de vísceras de ave	Es un subproducto de la industria avícola, generalmente consiste en partes del animal consideradas	Alto en proteínas, con un buen perfil de aminoácidos esenciales. Es bajo en cenizas y contiene poco o ningún factor anti nutricional.	La calidad de la proteína se puede ver deteriorada por

Insumo	Características	Propiedades nutricionales	Limitaciones
	desfavorecidas para el consumo humano.		el uso de procesos térmicos.
Aceite de pescado	El aceite de pescado se extrae de los materiales pesqueros antes de hacer harina de pescado.	El aceite de pescado es una valiosa fuente primaria de lípidos que proporciona ácidos grasos poliinsaturados omega 3 beneficiosos.	Puede tener baja palatabilidad.
Aceite de Canola	Aceite vegetal ampliamente producido y distribuido.	Contienen altos niveles de ácido oleico y bajos niveles de ácidos grasos saturados.	No tiene los mismos niveles de ácidos grasos omega 3 que el aceite de pescado.
Soya	Leguminosa ampliamente producida y distribuida.	Buena fuente de proteínas y secundariamente grasa. La proteína de soya contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales para salmónidos.	Menor proteína que insumos de origen animal.
Reproceso	Residuo interno del proceso de elaboración de piensos. Compuesto por polvo fino, granos partidos, productos no conformes en forma, color, humedad, densidad entre otros.	Pueden contener las propiedades nutricionales correspondientes a la dieta de la cual de origina.	Difícil trazabilidad de insumos primarios.

5.2.3 Descripción de residuos de sustancias no autorizadas

CV y VM son compuestos trifenilmetanos que pertenecen a la misma familia de pigmentos. Son principalmente utilizados como pigmentos para telas de alto contenido orgánico, tintas de impresión, técnicas de laboratorio e históricamente como desinfectantes. Se clasifican como compuestos corrosivos, tóxicos y posiblemente carcinogénicos. Son compuestos altamente solubles en agua y con una gran estabilidad a temperaturas.

CV y VM, al igual que sus versiones metabolizadas se consideran sustancias no autorizadas en la acuicultura, es decir, su uso no se encuentra autorizado ni registrado por la autoridad competente en este ámbito. Esto se deriva de la capacidad toxicológica, teratogénicas, corrosivas y posiblemente cancerígenas de estos pigmentos. Existen, por tanto, mecanismos de control asociados con el fin de garantizar la ausencia de todos ellos en el producto terminado. Esto incluye que no deben encontrarse presente en los productos de alimentación de los animales cultivados. El procedimiento de control de sustancias no autorizadas se efectúa a través de muestreos oficiales, directamente en centros de cultivo de peces, por muestreadores oficiales bajo las directrices de SERNAPESCA. Este muestreo se realiza en los animales de

centros de cultivo, ya sea en su etapa de reproducción, alevinaje y/o smoltificación como en su etapa de engorda en agua salada.

En el caso de ambas sustancias no autorizadas, se considera la presencia de la versión común (CV o VM) junto con la presencia de sus versiones metabolizadas (LCV o LVM) para determinar un resultado desfavorable. Se considerará desfavorable también la identificación de las sustancias metabolizadas por sí solas (LCV o LVM). No se permite ningún nivel residual ni traza de estos metabolitos y deben ser reportados a la brevedad en caso de ser identificados. Los grupos de animales que presenten resultados desfavorables no pueden ser movilizados sin la autorización de SERNAPESCA y se requerirán nuevas pruebas.

5.2.4 Análisis de insumos utilizados para la alimentación de salmones

Para el análisis se consideró si los residuos de sustancias no autorizadas son significativos, mediante el estudio de factores como probabilidad de ocurrencia, importancia e incidencia, para cada uno de los insumos considerados en el estudio.

El siguiente cuadro muestra el resultado del análisis realizado.

Tabla 14. Resultado del análisis realizado de insumos utilizados para la alimentación de salmones (Elaboración propia).

Insumo	Probabilidad de ocurrencia	Importancia	Incidencia	Peligro significativo
Harina de pescado	Mediana	Media	A veces	No
Harina de sangre	Alta	Mayor	A veces	Si
Harina de plumas	Alta	Mayor	A veces	Si
Harina de cerdo	Alta	Mayor	A veces	Si
Harina de vísceras de ave	Alta	Media	A veces	Si
Aceite de pescado	Baja	Baja	A veces	No
Aceite de Canola	Insignificante	Insignificante	Nunca	No
Soya	Insignificante	Insignificante	Nunca	No
Reproceso	Mediana	Baja	A veces	No

5.2.4.1 Probabilidad de Presencia en Producto Final

5.2.4.1.1 Escala Probabilidades

PROBABILIDAD	MUY ALTA	5	Es casi seguro que ocurra.
	ALTA	4	Ocurre con mucha frecuencia.
	MEDIA	3	Ocurre con regularidad.
	BAJA	2	Es poco frecuente, pero se produce.
	MUY BAJA	1	Muy raro, pero no se puede excluir.

Elaborado por CERES BCA basado en:

Pfeiffer D.U., Ho H.P.J., Bremang A., Kim Y. & OIE team (2021). - Compartmentalisation Guidelines – African Swine Fever. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 148 pp.

5.2.4.2 Evaluación incertidumbres asociadas a la estimación de riesgos

5.2.4.2.1 Escala Evidencia

Evidencia	ALTA	Se dispone de datos sólidos y completos; se aportan pruebas sólidas de múltiples referencias.
	MEDIA	Se dispone de algunos datos, pero no de todos, las pruebas se presentan en un número reducido de referencias.
	BAJA	Los datos disponibles son escasos o inexistentes; las pruebas proceden de informes no publicados o se basan en observaciones o comunicaciones personales.

Elaborado por CERES BCA basado en:

Pfeiffer D.U., Ho H.P.J., Bremang A., Kim Y. & OIE team (2021). - Compartmentalisation Guidelines – African Swine Fever. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 148 pp.

5.2.5 Caracterización y estimación del riesgo

5.2.5.1.1 Score de Riesgo

Corresponde a la ponderación de las probabilidades de ocurrencia de eventos, exposición, presencia en producto final, junto con la evidencia existente para determinar si los vehículos o fuentes se consideran de riesgo y son candidatos a toma de muestra.

Los resultados obtenidos del score de riesgo determinaron que en 6 etapas y eventos de riesgo se superó el índice de 0,8, los cuales fueron seleccionados para la toma de muestra. Por otro lado, 8 etapas alcanzaron un índice menor a 0,5, lo que indica una baja probabilidad de presencia de los colorantes en esa etapa.

Las siguientes tablas muestran los resultados obtenidos en el proceso de determinación del score de riesgo para la fabricación de piensos y el proceso productivo del salmón.

La Tabla 15 muestra los resultados del score de riesgo de las etapas de fabricación y transporte de materias primas y de piensos para salmones. Los resultados muestran dos eventos de riesgo correspondientes al uso de insumos y materias primas contaminadas.

Tabla 15. Priorización de eventos de riesgo de contaminación por CV/LCV O VM/LVM en la fabricación de piensos.

ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO						SCORE		Candidata a Toma Muestra
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Evidencia	w ₃			
Fabricación de materias primas	Uso de insumos contaminados con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	BAJA	1	3,0	1,00	SI
	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2,0	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO
Transporte materias primas	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO
Fabricación de piensos	Uso de materias primas contaminados con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	BAJA	1	3,0	1,00	SI
	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,78	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO
Transporte piensos	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO

La Tabla 16 muestra los resultados del score de riesgo de las etapas de agua dulce, transporte, agua de mar, acopio, planta de proceso y bodega o frigorífico. Los resultados muestran dos eventos de riesgo correspondientes al uso de piensos contaminados tanto en agua dulce como agua de mar. Sin embargo, el uso en la etapa de agua de mar sería de mayor riesgo, ya que tiene un resultado de score de riesgo más alto.

Tabla 16. Priorización de eventos de riesgo de contaminación por CV/LCV O VM/LVM en la cadena de salmón.

ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								SCORE		Candidata a Toma Muestra
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Probabilidad de presencia en producto final	w ₃	Evidencia	w ₄			
Agua dulce	Pienso contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	MUY BAJA	1	BAJA	1	2,5	0,83	SI
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
Transporte smolt (terrestre)	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Transporte smolt (mar)	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Agua de mar	Pienso contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	BAJA	2	MEDIA	2	3	1	SI
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
Transporte cosecha	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO

ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								SCORE		Candidata a Toma Muestra
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Probabilidad de presencia en producto final	w ₃	Evidencia	w ₄			
Acopio	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Planta de proceso primaria	Uso de envases plásticos con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de envases de papel/cartón con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Uso de ropa que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de hielo contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY ALTA	5	MUY BAJA	1	BAJA	1	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
Transporte producto planta primaria	No se identifica		0		0		0		0	-	-	NO
Planta de proceso secundaria	Uso de envases plásticos con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de envases de papel/cartón con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Uso de ropa que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de hielo contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY ALTA	5	MUY BAJA	1	BAJA	1	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
Bodega o frigorífico	Superficie contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO

La Tabla 17 muestra los resultados del score de riesgo de las etapas de toma de muestra y procesamiento de laboratorio. Los resultados muestran dos eventos de riesgo correspondientes al etiquetado con tinta que contiene los contaminantes en ambas etapas.

Tabla 17. Priorización de eventos de riesgo de contaminación por CV/LCV O VM/LVM en la toma de muestra.

ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								SCORE	Candidata a Toma Muestra	
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Probabilidad de presencia en producto final	w ₃	Evidencia	w ₄			
Toma de muestra	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	ALTA	4	MUY ALTA	5	MUY ALTA	5	MEDIA	2	4	1	SI
Procesamiento en laboratorio	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	ALTA	4	MUY ALTA	5	MUY ALTA	5	MEDIA	2	4	1	SI
	Contacto con material contaminado	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	BAJA	1	1	0,25	NO

5.2.6 Evaluación incertidumbres asociadas a la estimación de riesgos

Los resultados del score de riesgo apuntan a que los insumos utilizados para la fabricación de piensos y el pienso terminado utilizado en la etapa productiva de agua de mar son candidatos a toma de muestra. Estos resultados incorporan la evaluación de la incertidumbre o, en este caso, de la evidencia disponible. Para el caso de los insumos, existe baja evidencia de la presencia de contaminantes, principalmente debido a la escasa información publicada respecto a este tema. La principal fuente de información proviene de informantes calificados de la industria. Por otro lado, los piensos terminados se evaluaron con evidencia media, lo que quiere decir que existe mayor cantidad de publicaciones referentes a la contaminación de estos productos con respecto a los insumos, sin embargo, estas siguen siendo escasas.

5.2.6.1 Resumen score de riesgo

La evaluación de riesgo, utilizando el Score de Riesgo, se centró en identificar los principales vehículos o fuentes responsables de la posible contaminación de productos con los contaminantes Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita y Leuco Verde Malaquita. Estos vehículos se consideran como los puntos de control, mediante análisis de laboratorio, para toma de muestra y análisis para detectar la presencia de estos contaminantes. Para esta evaluación se consideraron las etapas productivas, los tiempos, cantidades, la evidencia de bioacumulación y los antecedentes bibliográficos disponibles. De acuerdo a los antecedentes recabados y lo discutido en la reunión de expertos, se tomaron las muestras relacionadas con la fabricación de piensos considerados de mayor riesgo.

El resumen de los principales candidatos a toma de muestra se detalla en la tabla continuación.

Tabla 18. Candidatos toma de muestra según etapa.

Etapa		Candidato toma de muestra	
Fabricación de piensos		Insumos	1) Harina de sangre
			2) Harina de plumas
			3) Harina de cerdo
Cadena productiva de salmón	Agua de mar	Pienso	

5.3 Conclusiones parciales Objetivo Específico 2

- Se compararon las normativas que regulan la presencia de CV, VM, LCV y LVM en diferentes países y el Codex Alimentarius, comparándolas con la normativa actual chilena. Si bien existen algunas diferencias entre los países y Códex, todas las normativas prohíben el uso de colorantes triarilmetanos en acuicultura. Algunos países permiten la presencia de trazas de estos compuestos en producto terminado. Chile se encuentra dentro de los países con las normas más estrictas, clasificando estos compuestos como no permitidos.

- Cada uno de los insumos previamente determinados como alta fuente de riesgo fue analizado de acuerdo con su probabilidad de ocurrencia, importancia e incidencia. Este análisis determinó que las harinas de sangre, plumas, cerdo y vísceras de ave presentan un peligro significativo.
- La evaluación de riesgo se llevó a cabo utilizando escalas cualitativas de probabilidad y evidencia que asignan un valor numérico por cada estrato de la escala. Estos valores fueron utilizados para asignar un score de riesgo a cada una de las vías de ingreso y eventos de riesgo previamente identificados. El score de riesgo obtenido indica a su vez si el riesgo evaluado debe ser considerado para una toma de muestra y posterior análisis en laboratorio.
- De acuerdo con los resultados de la evaluación de riesgo, los candidatos a toma de muestra identificados son parte de la etapa de fabricación de piensos, y corresponden a los siguientes insumos: harina de sangre, harina de plumas y harina de cerdo. Asimismo, el análisis de riesgo indicó que, durante la etapa de agua de mar del proceso productivo del salmón, los piensos elaborados son también candidatos a toma de muestra dado el valor alto de su score de riesgo asociado.

6 OBJETIVO ESPECÍFICO 3

6.1 Metodología

6.1.1 Validación del método analítico para los colorantes; Verde Malaquita (VM), cristal Violeta (CV), y sus metabolitos respectivos en piensos para salmónidos.

El presente método analítico, fue implementado para la detección de las moléculas de Cristal Violeta (CV), Leuco Cristal Violeta (LCV), Verde Malaquita (VM) y Leuco Verde Malaquita (LVM) en las matrices de alimento de salmón, harinas de origen animal y hemoglobina. La metodología utiliza cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo y tiene como objetivo la detección confirmatoria y cuantificación de los analitos descritos previamente, en las matrices señaladas, cumpliendo las indicaciones y reglamentaciones nacionales e internacionales bajo norma ISO 17025:2017, Unión Europea, Decisión de la Comisión 2002/657/CE, FDA, Q2B *Validation of Analytical Procedures: Methodology* y *Codex Alimentarius* 2009: Producción de Alimentos de Origen Animal.

6.1.2 Resumen de la metodología analítica

Los colorantes no autorizados y sus metabolitos CV, LCV, VM y LVM son extraídos desde la matriz a interés (alimento para salmón, harinas de origen animal, y hemoglobina) con buffer citrato y acetonitrilo, para luego realizar la extracción con diclorometano mediante la separación de bases orgánicas (extracción en base sólida). El Diclorometano se seca bajo flujo de nitrógeno en baño de agua entre 40-50°C. El residuo resultante, es reconstituido con 200 µl fase móvil, sonificado, centrifugado y filtrado. La fase acuosa final es inyectada al HPLC-MS/MS 3q.

6.1.3 Requisitos técnicos para implementación

6.1.3.1 *Terminología*

Tiempo de retención del analito: tr

- Droga Pura: dp
- Límite de Detección: LD
- Límite de Cuantificación: LC
- Relación Señal Ruido: rsr
- Fase Móvil: fm
- Desviación Standard: ds
- Recuperación: R

6.1.3.2 *Parámetros analíticos evaluados*²

- a) **Tiempo de retención:** Su determinación se realizó mediante el análisis de los tiempos de retención obtenidos para cada analito, siguiendo las indicaciones metodológicas propuestas. La totalidad de tiempos de retención para cada analítico deben presentar un CV% menor al 5%.
- b) **Especificidad:** Se realizó mediante el análisis de las diferentes matrices de estudio (Alimento completo, harinas de subproductos, y hemoglobina) de diferentes orígenes, se determinó que las matrices no tuvieran interferentes en los tiempos de retención establecidos para cada analito en la metodología. De acuerdo con los tiempos de retención y masas específicas para cada uno de los analitos estudiados.
- c) **Límite de Detección y Cuantificación:** Se realizó mediante la fortificación de muestras blanco, aceptando señales analíticas mínimas de 3:1 y 10:1 para los límites de detección y cuantificación en su relación señal ruido, respectivamente.
- d) **Linealidad:** Se determinó mediante la construcción de curvas de calibración (n = 3), aceptando un coeficiente de determinación mayor a 0.95 en la totalidad de las matrices, con un CV% de las pendientes menor a un 25%.
- e) **Recuperación:** La recuperación se calculó comparando muestras fortificadas versus muestras libres de matriz. Ambos grupos deben estar a los mismos niveles de concentración. Se aceptó el parámetro obteniéndose un porcentaje de recuperación mayor al 80% para cada nivel y analito.
- f) **Precisión:** Se evaluó mediante el análisis de la repetitividad y reproducibilidad. Se aceptó el parámetro analítico, de acuerdo con lo establecido por el laboratorio, en donde los CV% de la reproducibilidad aceptados no deberán ser más que un 35%, para concentraciones entre 1 y 10 µg/kg.
- g) **Robustez:** Para la metodología analítica se seleccionaron 3 factores que puedan influir en el resultado final. Mediante el método de Youden se realizó un diseño factorial fraccional incompleto para detectar las interacciones entre los factores seleccionados.
- h) **Incertidumbre:** Se realizó evaluación de factores fijos y aleatorios, evaluando mediante curvas de calibración la variabilidad de cuadrados obtenidos. Se informa como porcentaje con relación a la cuantificación obtenida.

² Para la ampliación de cada matriz analítica incluida en la validación (harinas de subproductos y hemoglobina), se realiza evaluación de los parámetros de tiempos de retención, especificidad y linealidad.

6.1.4 Equipamiento

- Homogeneizador (Moulinex)
- Centrífuga Eppendorf Thermo Scientific, Hetich
- Agitador de tubos Heidolph Multireax
- Tubos para centrífuga de 50 ml con tapa rosca (Falcón)
- Matraz de Erlenmeyer de 100, 250 500 ml.
- Micropipetas de 100-1000 μ l y de 10-100 μ l.
- Agitador magnético
- Matraces aforados
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Dispensadores de solventes
- pH metro
- Balanza Analítica
- Cromatógrafo compuesto por:
 - o 2 -Bombas Perkin Elmer Series 200
 - o Autosampler Perkin Elmer Series 200
 - o Horno calefactor Perkin Elmer Series 200
- Spectrometro de masas API 4000, Apliedd Biosystem
- Columna Analítica Symmetry Waters C18, 2.1x150mm.
- Refrigerador entre 2 y 8°C y Congelador
- Filtros Millex de: 13 mm x 0,22 μ m y Whatman
- Sonicador
- Sistema secado nitrógeno gas (8 vías)
- Balanzas analíticas
- Balanzas pesaje de muestras

6.1.5 Reactivos y soluciones utilizadas para la extracción y análisis

- Ácido cítrico monohidrato Grado P.A. (Merck o similar)
- Cloruro de sodio NaCl Grado P.A. (Merck o similar)
- Hidróxido de sodio NaOH Grado P.A. (Merck o similar)
- Agua Grado HPLC (Fisher, Merck o similar)
- Ácido acético Grado HPLC (Merck o similar)
- Acetonitrilo Grado HPLC (Fisher, Merck o similar)
- Dietilenglicol Grado P.A. (Merck o similar)
- Metanol Grado HPLC (Fisher, Merck o similar)
- Diclorometano Grado HPLC (Merck, Fisher o similar)
- Columna Aromatic Sulfonic (JT Baker o similar)
- Acetona Grado P.A. (Merck, Fisher o similar)
- Amoniac Grado P.A. (Merck o similar)
- Acetato de amonio Grado P.A. (Merck o similar)
- Ácido Acético Glacial Grado P.A. (Merck o similar)

6.1.5.1 *Soluciones de extracción utilizadas en la metodología analítica*

- Buffer Citrato: Para 500 mL pesar 5,9 g de Ácido cítrico monohidrato y 1,3 g de cloruro de sodio, disolver en 400 mL de agua, ajustar el pH a $4,0 \pm 0,1$ utilizando hidróxido de sodio muy diluido, completar el volumen con agua a 500 mL.
- Ácido acético 6 % en acetonitrilo: Para 250 mL, agregar a 235 mL de acetonitrilo y 15 mL de ácido acético glacial, y agitar.
- Amoníaco al 6 % en Acetonitrilo: Para 250 mL, agregar a 235 mL de acetonitrilo y 15 mL de amoníaco concentrado, y agitar.
- Dietilenglicol en metanol: Diluir 1 mL de dietilenglicol en 9 mL de metanol.

6.1.5.2 *Fase móvil utilizada en módulos HPLC*

- Fase A: 20 mM de acetato de amonio pH= $4,5 \pm 0,2$. En una botella de 500 mL agregar 770 mg de acetato de amonio, y disolver con 500 mL de agua. Se debe ajustar el pH = 4.5 ± 0.2 con ácido acético glacial, y finalmente agitar y filtrar.
- Fase B: Acetonitrilo grado HPLC.

6.1.6 Estándares analíticos certificados

- Leuco Verde Malaquita (Sigma o similar) Pureza según certificado.
- Verde Malaquita (Aldrich o similar) Pureza según certificado.
- Violeta Básico 3 (Dr. Ehrenstorfer o similar) Pureza según certificado.
- Leuco Cristal Violeta (Dr. Ehrenstorfer o similar) Pureza según certificado.
- LVM D5 (Sigma-Aldrich o similar) Pureza según certificado.

Cada uno de los estándares analíticos señalados, fueron preparados a 10.000 mg/Kg, con el fin de ser utilizados en las curvas de calibración en matriz fortificada y en controles internos asociados a la metodología analítica.

6.1.7 Procedimiento de extracción³

Procedimiento:

1. Pesar $5 \pm 0,5$ g de la matriz (alimento para peces, harinas, o hemoglobina) en un tubo de polipropileno de 50 mL (tipo Falcon).
2. Agregar 10 mL de buffer citrato y 10 mL de acetonitrilo, disgregar matriz.
3. Agitar con vortex 3 minutos, sonicar 5 minutos, agitar nuevamente 3 minutos con vortex.
4. Centrifugar 5 minutos a 4500 rpm.
5. Transferir sobrenadante a otro tubo Falcon de 50 mL.
6. Agregar 8 mL de diclorometano, y una punta de espátula de cloruro de Sodio (NaCl).
7. Agitar con vortex 5 minutos.
8. Centrifugar 5 minutos a 4000 rpm.
9. Extraer la fase inferior (diclorometano), y transferirla a otro tubo de 50 mL.
10. Agregar 5 mL de diclorometano.
11. Agitar con vortex 5 minutos.
12. Centrifugar 5 minutos a 4500 rpm.
13. Extraer la fase inferior (diclorometano), y juntarlo con el extracto anterior.
14. Secar los extractos colectados (Diclorometano) con suave flujo de Nitrógeno entre 40 y 50°C.
15. Reconstituir con 5 mL de Ácido acético 5% en acetonitrilo, agitar 5 minutos y centrifugar 3 minutos a 5000 rpm.
16. Acondicionar columnas SPE Sulfónica Aromática acida con: 5 mL de Ácido acético 5 % en acetonitrilo.
17. Pasar la muestra por la columna.
18. Lavar con 2,5 mL de acetona, 5 mL de metanol y 5 mL de acetonitrilo.
19. Eluir con 8 mL de amoniaco al 5 % en Acetonitrilo, sobre un tubo que contenga 100 µL de dietilenglicol al 10 % metanol.

³ Antes de realizar el proceso de extracción, se debe evitar el uso de lápices, plumones, destacadores, o cualquier elemento que contenga uso de tintas de cualquier tipo. Se debe utilizar solo lápiz grafito/mina para la totalidad de registros y anotaciones.

20. Secar con suave flujo de Nitrógeno entre 40 y 50°C.
21. Reconstituir con 200 µL de fase móvil, agitar 3 minutos y centrifugar 30 minutos a 2000 rpm.
22. Pasar a través de filtros Millex 0.22 µm a un vial de inyección para LC-MS-MS.

6.1.8 Configuración de parámetros de análisis instrumental HPLC-MS/MS 3q

6.1.8.1 *Detección por espectrometría de masas*

Todas las transiciones referidas a las moléculas de interés se determinaron por modo de ionización positivo. Las masas de los iones precursores, iones productos, y los parámetros de la fuente de ionización para la selección de masas se detallan en la Tabla 19. Por su parte, los parámetros utilizados para la ionización de cada analito se detallan en Tabla 20.

Tabla 19. Parámetros eléctricos de fuente de ionización para selección de masas.

ID	Q1 (Da)	Q3 (Da)	Time (msec)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)
VM 1	329.4	313.2	450	121	10	47	8
VM 2	329.4	208.1	450	121	10	47	12
LVM 1	331.4	239.3	450	40	8	40	14
LVM 2	331.4	316.2	450	40	8	30	20
CV 1	372.5	356.3	450	121	10	53	16
CV 2	372.5	340.3	450	121	10	69	10
LCV 1	374.5	358.3	450	50	10	35	20
LCV 2	374.5	239.3	450	50	10	35	15
LVM-D5	336.2	239.2	450	91	10	39	12

Tabla 20. Parámetros de ionización de fuente.

Parámetros de la fuente	
CUR	15
CAD	8
IS	5500
TEM	400
GS1	60
GS2	40

6.1.8.2 Condiciones cromatográficas y de bomba HPLC

- Columna Analítica Symmetry C18 3,5 um 2,1 x 150 mm Waters.
- Temperatura del calefactor de columna: 30°C ± 1°C.
- Flujo: Programa gradiente (detallados en Tabla 21).
- Volumen Inyección: 20uL.

Tabla 21. Gradiente de flujos utilizada para separación cromatográfica

Tiempo	Flujo (ml/min)	A%	B%
0	200	40	60
3	200	40	60
4	200	10	90
10	200	10	90
11	400	40	60
14	400	40	60
22	200	40	60

6.1.9 Criterios de confirmación analítica

Los resultados serán expresados en ng/g (ppb).

Los criterios de confirmación los analitos detectados por LC-MS/MS son los siguientes:

- a) Tiempo de Retención del analito: El tiempo de retención del analito detectado en una muestra no debe superar en un ± 2,5% del tiempo de retención del control fortificado.
- b) Tiempo de Retención Relativo: El cociente entre el tiempo de retención del analito y el Tiempo de retención del estándar interno, no debe superar un ± 2,5% entre una muestra positive y el control.
- c) Ratio: Primero se calcula el cociente entre la transición minoritaria y la transición mayoritaria, expresada en A veces.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Área transición minoritaria}}{\text{Área transición mayoritaria}}$$

Una vez obtenido el ratio, este se multiplica por 100 para ser expresado como Intensidad Relativa:

$$\text{Intensidad Relativa} = \text{Ratio} * 100\%$$

Obtenida la Intensidad relativa, tanto para las muestras detectadas como para los controles, la Intensidad relativa del control se compara con la siguiente tabla de Intensidades relativas.

Tabla 22. Tolerancia máxima establecida para intensidad relativa de fragmentación.

Intensidad relativa (% del pico de base)	Tolerancia máxima permitida
>50%	+/- 20%
>20%-50%	+/- 25%
>10%-20%	+/- 30%
≤10%	+/- 50%

A cada intensidad relativa le corresponde una tolerancia. Tal tolerancia se aplica entonces al ratio del control, quedando:

$$\text{Ratio control} \pm \text{Tolerancia}$$

Luego, se compara si el ratio obtenido para una muestra positiva cae dentro del intervalo de ratio de los controles. Cabe destacar que el ratio es siempre menor o igual a 1.

- d) Señal Ruido: Debe ser igual o mayor a 3 en la transición minoritaria de una muestra considerada positiva.

Luego, una muestra es considerada positiva si cumple con los 4 criterios de confirmación en forma simultánea.

6.1.10 Parámetros de validación obtenido mediante HPLC-MS/MS 3Q para las diferentes matrices de estudio

La totalidad de los parámetros fueron obtenidos en un cromatógrafo ABSciex, modelo TQ 5500.

6.2 Resultados

6.2.1 Método validado: Método Analítico mediante HPLC-MS/MS 3Q para las diferentes matrices de estudio.

Los resultados obtenidos para cada parámetro de validación evaluado según matriz de estudio se detallan en la Tabla 23, Tabla 24 y Tabla 25. Todos los parámetros analíticos evaluados cumplieron los requisitos normativos y analíticos para la confirmación y cuantificación de total las moléculas evaluadas. Las planillas de validación en alimento para peces se encuentran en Anexo 5 y la ampliación metodológica para harinas de origen animal y hemoglobina en Anexo 6.

Se estableció un límite de detección para todas las matrices de 0,1 µg/kg. El detalle de los resultados para los otros parámetros se muestra en las tablas a continuación (Tabla 23, 24 y 25). En la Figura 8 se observan cromatogramas representativos de la inyección de estándar interno de muestras blanco (libre de residuos de colorantes), en donde no se observan interferentes en los tiempos de retención específicos de cada analito.

Tabla 23. Parámetros analíticos obtenidos para alimento para Peces.

Parámetro	Observación
Tiempo de Retención	VM: 5,39 min. LVM: 12,95 min. CV: 9,01 min. LCV: 13,05 min. LVM D4: 12,847 min.
Especificidad	No se presentan interferentes en los tiempos de retención de los analitos, por lo tanto, se cumple con el criterio de especificidad.
Límite de Detección	0.1 µg/Kg
Límite de Cuantificación	0.11 µg/Kg
Linealidad de curvas de calibrado en matriz	Coficiente de variación de las pendientes es inferior al 25% y el coeficiente de determinación es de 0,99.
Recuperación	VM: 89,57% LVM: 79,55% CV: 89,96% LCV: 80,59%.
Precisión	Se cumple en cada uno de los analitos los criterios de repetitividad y reproducibilidad evaluadas en la precisión.
Repetitividad (CV%)	VM: 3,94% LVM: 3,1% CV: 2,2% LCV: 3,3%
Repetitividad (CV%)	VM: 8.7% LVM: 11 % CV: 15,7% LCV: 11,7%
Robustez	Se comprueba la robustez del método a través de la prueba de Youden. Se seleccionan los factores de centrifugación y agitación por ser los factores que más influyen.
Incertidumbre	Se cumple con los criterios de incertidumbre en cada uno de los puntos de concentración evaluados.

Tabla 24. Parámetros analíticos obtenidos para Harinas de Origen animal.

Parámetro	Observación
Tiempo de Retención	VM: 5,39 min. LVM: 12,95 min. CV: 9,01 min. LCV: 13,05 min. LVM D4: 12,847 min.
Especificidad	No se presentan interferentes en los tiempos de retención de los analitos, por lo tanto, se cumple con el criterio de especificidad.

Parámetro	Observación
Límite de Detección	0.1 µg/Kg
Límite de Cuantificación	0.11 µg/Kg
Linealidad de curvas de calibrado en matriz	Coficiente de variación de las pendientes es inferior al 25% y el coeficiente de determinación es de 0,99.

Tabla 25. Parámetros analíticos obtenidos para Hemoglobina.

Parámetro	Observación
Tiempo de Retención	VM: 5,39 min. LVM: 12,95 min. CV: 9,01 min. LCV: 13,05 min. LVM D4: 12,847 min.
Especificidad	No se presentan interferentes en los tiempos de retención de los analitos, por lo tanto, se cumple con el criterio de especificidad.
Límite de Detección	0.1 µg/Kg
Límite de Cuantificación	0.11 µg/Kg
Linealidad de curvas de calibrado en matriz	Coficiente de variación de las pendientes es inferior al 25% y el coeficiente de determinación es de 0,99.

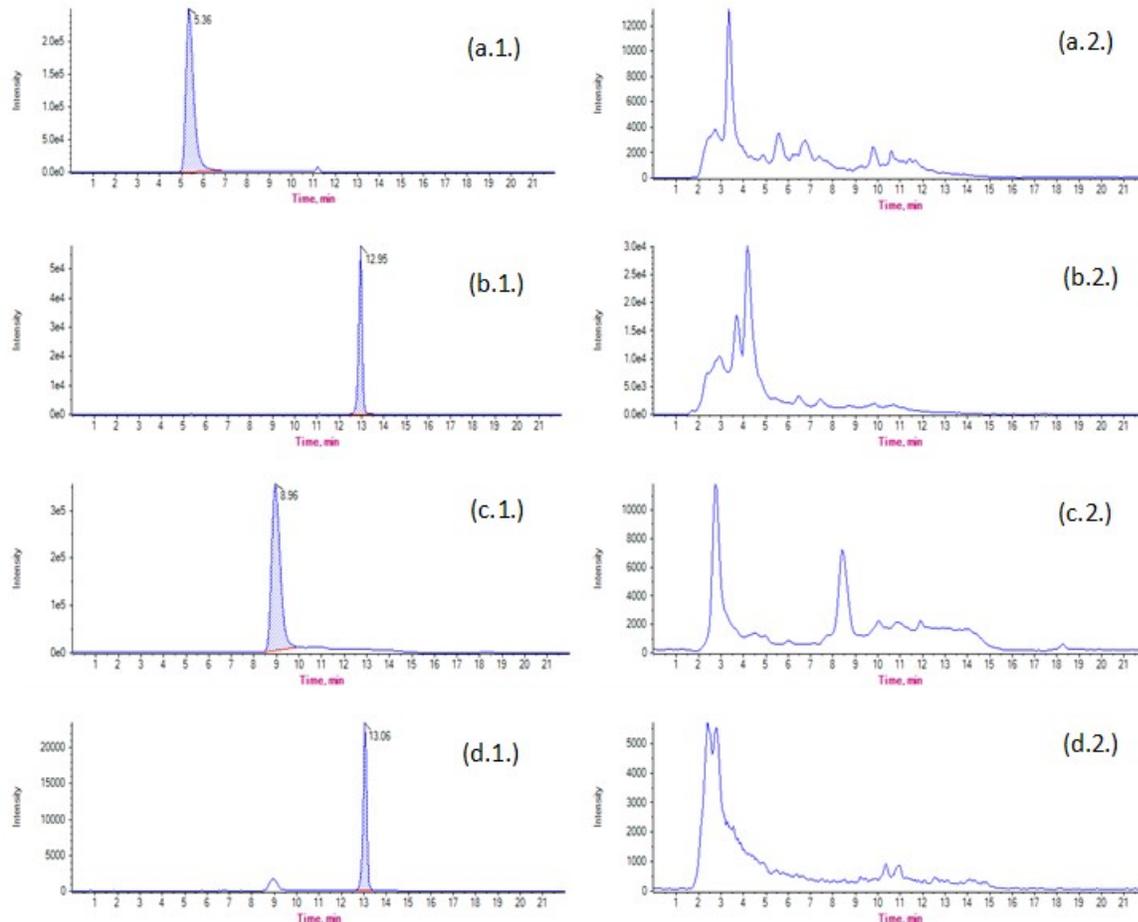


Figura 8. (a.1.) cromatograma de VM (329.4/313.2) representativo de inyección de estándar certificado; **(a.2.)** cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo); **(b.1.)** cromatograma de LVM (331.4/239.3) representativo de inyección de estándar certificado; **(b.2.)** cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo); **(c.1.)** cromatograma de CV (372.5/356.3) representativo de inyección de estándar certificado; **(c.2.)** cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo); **(d.1.)** cromatograma de LCV (374.6/358.3) representativo de inyección de estándar certificado; **(d.2.)** cromatograma de muestra blanco de alimento para salmón (libre de residuo).

6.2.2 Análisis de las muestras para la búsqueda activa de los colorantes mencionados obtenidas desde las plantas de piensos.

Con la finalidad de realizar el levantamiento de información sobre la presencia de sustancias prohibidas, Verde Malaquita (VM); Leuco Verde Malaquita (LVM); Cristal Violeta (CV); Leuco Cristal Violeta (LCV), en el alimento para peces, se analizaron los productos críticos, correspondientes a la dieta final de salmónidos y a harinas de subproductos de origen animal que fueron utilizadas como ingredientes para la fabricación de las respectivas dietas finales muestreadas.

Específicamente, las matrices muestreadas fueron: alimento completo (dieta final para salmónidos), harina de cerdo, harina de hemoglobina, harina de plumas y harina de vísceras. Todas las muestras fueron analizadas mediante el método analítico previamente validado, para el cual se determinó un límite de detección de 0,1 ng/gr.

En una primera etapa se realizó un screening para determinar la presencia de los contaminantes y rango de trabajo para la construcción de curvas de calibración, con la finalidad de evitar extrapolaciones durante la cuantificación. Para este fin, se analizaron muestras de forma preliminar, lo cual también permitió verificar la performance de la metodología en matrices incurridas (muestras de terreno), debido a que durante el proceso de validación solo se realiza el análisis de muestras fortificadas, es decir muestras a las cuales se les adicionan las moléculas de interés en concentraciones conocidas. Esta primera aproximación fue fundamental para el análisis de la totalidad de las muestras.

Posterior al screening, 59 muestras fueron analizadas mediante un método cuantitativo confirmatorio, utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS), tecnología ideal para la detección simultánea de diferentes compuestos y que entrega una gran confiabilidad en la identificación gracias a la determinación de las masas y tiempos de retención de cada uno de los compuestos. En la Tabla 26 se observan los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas y en la Figura 9 se grafican los porcentajes de positividad a cada uno de los contaminantes.

Tabla 26. Resultados de análisis para la identificación de contaminantes en alimento completo e ingredientes.

Nº	Identificación	Tipo de muestra	D	ND	Analitos detectados
1	E073-6488	Harina de plumas		x	
2	E073-888	Harina de hidrolizado de proteínas	x		CV
3	E073-6585	Harina de plumas	x		CV
4	E076-1001	Harina de vísceras		x	
5	E074-6563	Harina de plumas		x	
6	E074-663	harina de sangre	x		CV
7	E074-886	Harina hidrolizada de proteínas		x	
8	E074-661	harina de sangre	x		LVM
9	E074-70303	Alimento completo	x		CV

Nº	Identificación	Tipo de muestra	D	ND	Analitos detectados
10	E074-6557	Harina de plumas		x	
11	E075-0102	Harina de plumas		x	
12	E066-7023	Harina de cerdo		x	
13	E066-6956	Harina de hemoglobina de cerdo		x	
14	E066-0301	Alimento completo	x		LVM
15	E067-6956	Harina de hemoglobina		x	
16	E067-7023	Concentrado proteico aviar		x	
17	E067-0302	Alimento completo	x		CV
18	E068-100	Harina de hidrolizado proteico aviar		x	
19	E068-0406	Alimento completo		x	
20	E069-8679	Alimento completo	x		LVM-LCV
21	E070-8680	Alimento completo	x		LVM
22	E071-3094	Alimento completo	x		LCV
23	E072-3129	Alimento completo		x	
24	E073-0302	Alimento completo		x	
25	E077-0109	harina de hemoglobina de cerdo	x		CV
26	E078-6001	harina de plumas		x	
27	E079-1004	harina de vísceras		x	
28	E080-0102	harina de vísceras	x		CV
29	E081-8001	harina de hemoglobina		x	
30	E082-310	harina de hemoglobina de cerdo		x	
31	E083-2024	harina de vísceras de cerdo		x	
32	E084-8834	harina de plumas		x	
33	E085-2601	harina de hemoglobina		x	
34	E085-5410	harina de hemoglobina		x	
35	E085-310	harina de hemoglobina de cerdo		x	
36	E085-276	harina de hemoglobina		x	
37	E086-414	harina de cerdo	x		CV

Nº	Identificación	Tipo de muestra	D	ND	Analitos detectados
38	E086-1018	harina de cerdo		x	
39	E086-100(A)	Alimento completo		x	
40	E086-2024	harina de cerdo		x	
41	E087-1292	harina de plumas		x	
42	E087-0203	harina de plumas	x		LCV
43	E087-8834	harina de plumas		x	
44	E087-1293	harina de plumas		x	
45	E087-3937	harina de plumas		x	
46	E087-1651	harina de plumas	x		VM
47	E087-6650	harina de plumas		x	
48	3036-1	harina de vísceras	x		CV-LCV
49	3035-2	harina de vísceras	x		CV
50	3700-3	harina de plumas		x	
51	3701-4	harina de plumas		x	
52	3037-5	harina de vísceras	x		LVM
53	5172-6	Harina de vísceras de ave		x	
54	6265-7	harina de cerdo		x	
55	5137-8	Harina de plumas hidrolizada	x		LCV
56	6309-9	harina de cerdo	x		CV
57	7747-10	Alimento completo		x	
58	7797-11	Alimento completo	x		CV
59	70a-12	Alimento completo	x		CV

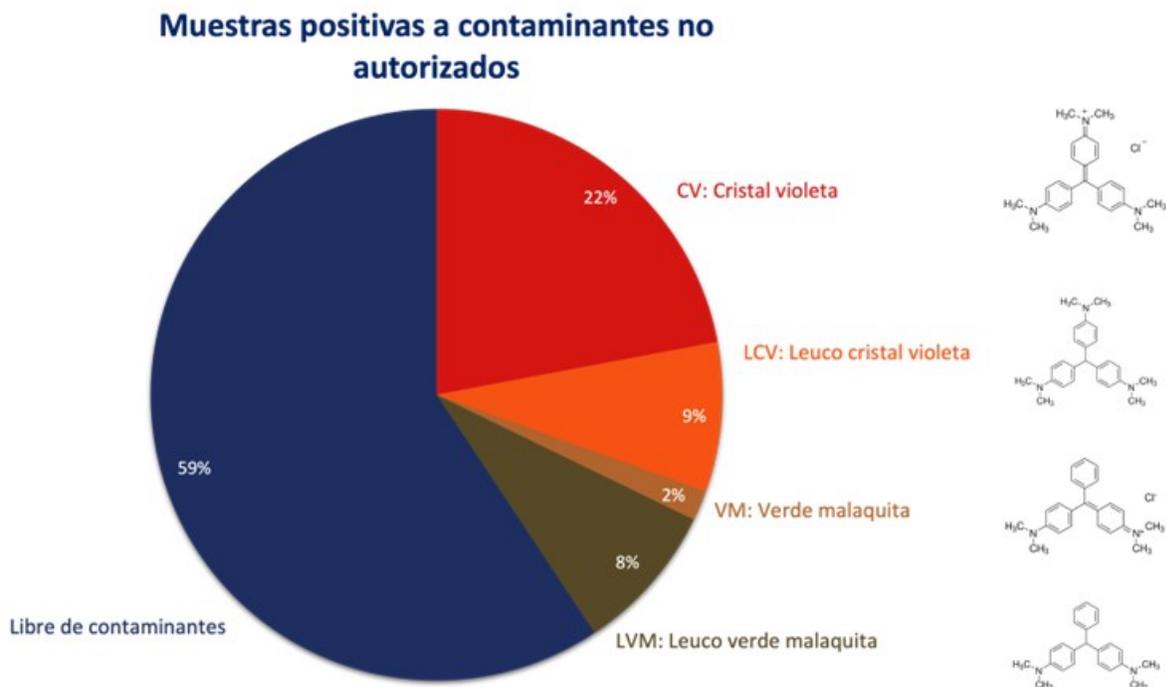


Figura 9. Porcentajes de muestras positivas a los contaminantes Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita y Leuco Cristal Malaquita respecto a las 59 muestras.

Para asegurar la validez de los resultados de los ensayos, se utilizaron estándares certificados tanto para la evaluación como para la preparación de los controles de calidad (controles positivos y curvas de calibración para cuantificación de resultados), los cuales se realizaron junto con los ítems de ensayo programados en el mismo día de trabajo. Esto permitió verificar que los procesos de extracción de las metodologías analíticas se hayan realizado correctamente. Los controles positivos y curvas de calibración corresponden a muestras fortificadas a concentraciones conocidas y a diferentes niveles. Además, se realiza la calibración y comprobación funcional de equipos instrumentales utilizados para el proceso de extracción y la identificación de los analitos de interés.

La confirmación de los analitos de interés se realizó utilizando como criterio dos fragmentos característicos por cada analito estudiado, la razón entre el fragmento menos abundante/fragmento más abundante, el tiempo de retención, el tiempo de retención relativo y la relación señal-ruido. Los criterios específicos para la aceptación de los resultados se especifican en la Tabla 27.

Tabla 27. Resumen de los criterios de confirmación de muestras en ensayo.

Criterio específico	Descripción	Valor
Tiempo de Retención del analito	El tiempo de retención del ion de transición mayoritaria del ítem de ensayo respecto al tiempo de los controles positivos	Variabilidad máxima de $\pm 2,5 \%$.

criterio específico	Descripción	Valor
Tiempo de Retención Relativo	Relación entre el analito y estándar interno en cada ítem de ensayo.	Variabilidad máxima en totalidad de <i>batch</i> $\pm 2,5$ %.
Ratio (Razón entre fragmentos)	Relación entre el área del ion de transición minoritaria y el área del ion de transición mayoritaria	<i>Ratio</i> de una muestra positiva la que debe estar dentro del intervalo de ratio de los controles. Tolerancia máxima permitida entregada por la intensidad relativa de la molécula.
IR %	Ratio multiplicado por 100	Intensidad relativa (% del pico de base) / Tolerancia máxima permitida: >50% → +/-20% >20%-50% → +/-25% >10%-20% → +/-30% <10% → +/-50%
Señal Ruido	Relación señal ruido para el ion de transición minoritaria	$\geq 3:1$

6.2.3 Evaluación de los resultados de laboratorio obtenidos sobre residuos de sustancias no autorizadas en los piensos.

La presencia de los contaminantes LVM, CV y LCV se detectaron tanto en dieta final como en los ingredientes. Por su parte, solo una muestra correspondiente a harina de plumas fue positiva a la presencia de VM en niveles menores al límite de detección (0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Las muestras analizadas y determinadas como positivas dieron cumplimiento a los criterios de confirmación, en donde se observó para las muestras positivas una relación ion ratio menor al establecido de acuerdo con los controles positivos y un ratio para el tiempo de retención no mayor al 2.5%. Se determinó que, de un total de 59 muestras testeadas, 22 dieron positivas a la presencia de los diferentes contaminantes. De las muestras positivas, 8 correspondieron a alimento completo y 14 a ingredientes. Las concentraciones detectadas y cuantificadas para cada una de las muestras positivas se detallan en la Tabla 28.

Tabla 28. Concentraciones de contaminantes VM, LVM, CV y LCV en muestras de dieta final e ingredientes positivos.

ID Muestra	Alimento completo Positivo	Analitos detectados	Concentración
E073-888	Harina de hidrolizado de proteínas	CV	CV: <LD
E073-6585	Harina de plumas	CV	CV: <LD
E074-663	Harina de sangre	CV	CV: <LD
E074-661	Harina de sangre	LVM	LVM: <LD
E074-70303	Alimento completo	CV	CV: <LD

ID Muestra	Alimento completo Positivo	Analitos detectados	Concentración
E066-0301	Alimento completo	LVM	LVM: 0,102 µg/kg
E067-0302	Alimento completo	CV	CV: <LD
E069-8679	Alimento completo	LVM / LCV	LVM 0,151 µg/kg / LCV: <LD
E070-8680	Alimento completo	LVM	LVM: 0,175 µg/kg
E071-3094	Alimento completo	LCV	<LD
E077-0109	Harina de hemoglobina de cerdo	CV	CV: <LD
E080-0102	Harina de vísceras	CV	CV: <LD
E086-414	Harina de cerdo	CV	CV: <LD
E087-0203	Harina de plumas	LCV	LCV: 0,111 µg/kg
E087-1651	Harina de plumas	VM	<LD
3036-1	Harina de vísceras	LCV -CV	LCV: 0,111 µg/kg / CV: <LD
3035-2	Harina de vísceras	CV	CV: <LD
3037-5	Harina de vísceras	LVM	LVM:<LD
5137-8	Harina de plumas hidrolizada	LCV	LCV: 0,248 µg/kg
6309-9	Harina de cerdo	CV	CV: <LD
7797-11	Alimento completo	CV	CV: <LD
70a-12	Alimento completo	CV	CV: <LD

LD: 0,1 µg/Kg.

Las muestras correspondientes al alimento completo presentaron niveles de los contaminantes por debajo del límite de detección establecido para la metodología analítica, y se observó que 3 muestras se encontraron cercanas al nivel del LD, cuantificando 0,102 a 0,175 µg/kg según la curva de calibración utilizada.

Por su parte, los ingredientes positivos a la presencia de colorante presentaron concentraciones por debajo o al nivel del LD y solo una muestra correspondiente a harina de plumas hidrolizada presentó un nivel de 0,248 µg/kg de LCV.

En la Tabla 29 se observa la relación entre las muestras de alimento completo positivas y los respectivos ingredientes utilizados para su fabricación. Se observó que algunos de los alimentos positivos a ciertos contaminantes presentaron ingredientes positivos a la presencia de esos contaminantes, lo que indicaría que el ingrediente es un factor de riesgo para la contaminación y transferencia de contaminantes no autorizados en el alimento para peces.

Tabla 29. Muestras de alimento completo positivas a contaminantes y sus respectivos ingredientes positivos a la presencia de contaminante.

ID	Alimento completo Positivo	Analitos detectados	ID	Ingrediente	Analitos detectados
E074-70303	Alimento completo	CV	E074-663	Harina de sangre	CV
			E074-661	Harina de sangre	LVM
E069-8679	Alimento completo	LVM / LCV	3036-1	Harina de vísceras	LCV / CV
			3035-2	Harina de vísceras	CV
			3037-5	Harina de vísceras	LVM
E070-8680	Alimento completo	LVM	3036-1	Harina de vísceras	LCV -CV
			3035-2	Harina de vísceras	CV
			3037-5	Harina de vísceras	LVM
E071-3094	Alimento completo	LCV	5137-8	Harina de plumas hidrolizada	LCV

En la Figura 10, se observan cromatogramas obtenidos a partir de la inyección de estándar certificado y muestras positivas a los contaminantes.

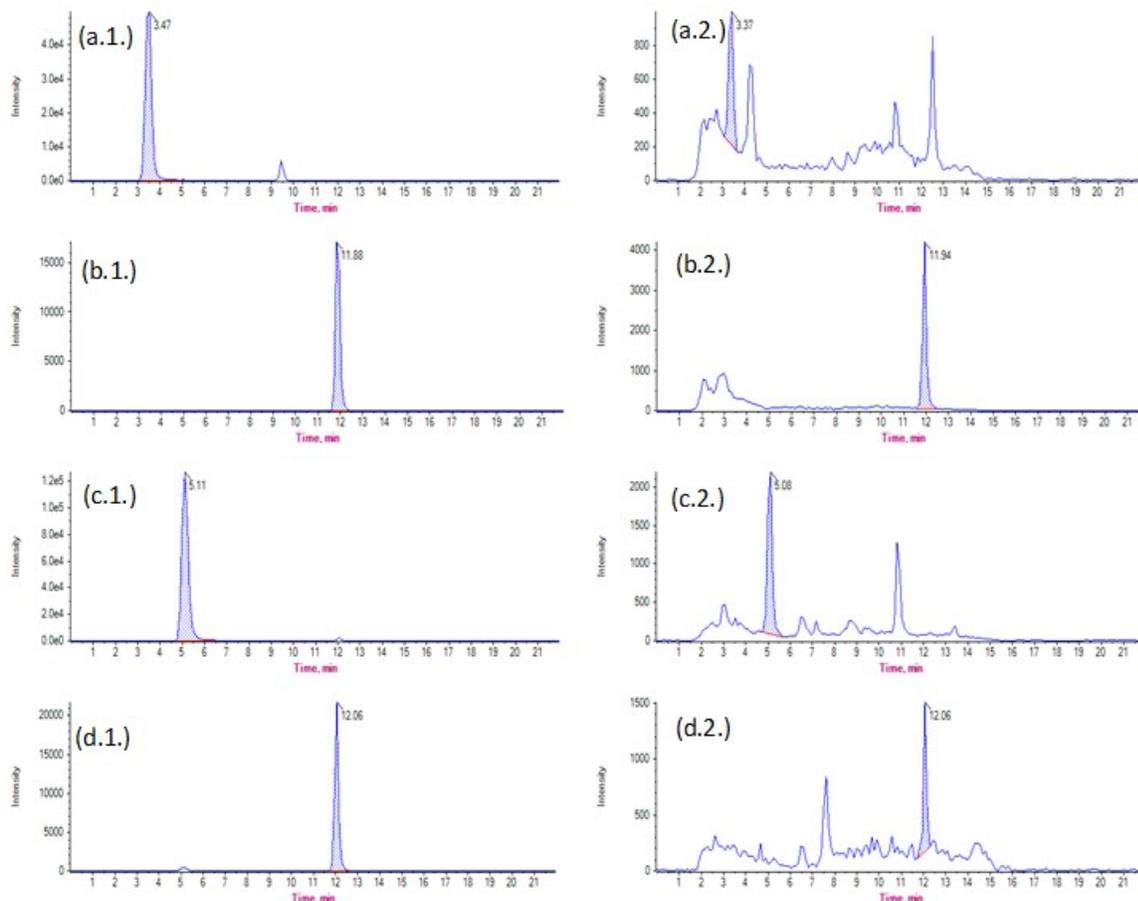


Figura 10. (a.1.) cromatograma de VM (329.4/313.2) representativo de inyección de estándar certificado; (a.2.) cromatograma de VM (329.4/313.2) detectado en muestra ID E087-1651; (b.1.) cromatograma de LVM (331.4/239.3) representativo de inyección de estándar certificado; (b.2.) cromatograma de LVM (331.4/239.3) detectado en muestra ID E069-8679; (c.1.) cromatograma de CV (372.5/356.3) representativo de inyección de estándar certificado; (c.2.) cromatograma de CV (372.5/356.3) detectado en muestra ID E073-888; (d.1.) cromatograma de LCV (374.6/358.3) representativo de inyección de estándar certificado; (d.2.) cromatograma de LCV (374.6/358.3) detectado en muestra ID E069-8679.

6.3 Conclusiones parciales Objetivo Específico 3

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la validación de la metodología analítica, bajo los estándares y recomendaciones de guías internacionales, permite concluir que el método implementado y validado es preciso y confiable para la determinación de los contaminantes: Cristal Violeta, Leuco Cristal Violeta, Verde Malaquita y Leuco Verde Malaquita en las matrices de alimento para salmónidos y en

harinas de subproductos. Por lo que el método cumplen con los requerimientos necesarios para dar validez a los resultados obtenidos durante el ensayo de muestras de estas matrices a partir de las diferentes plantas productoras de piensos para salmónidos. En cuanto al análisis de los ensayos de las 59 muestras de alimento y subproductos, fue posible detectar la presencia de todos los contaminantes, los cuales fueron pesquisados y confirmados tanto en dieta final como en los ingredientes muestreados. Se determinó que, de un total de 59 muestras testeadas, 22 dieron positivas a la presencia de los diferentes contaminantes. De las muestras positivas, 8 correspondieron a alimento completo y 14 a ingredientes.

Se observó que algunos de los alimentos positivos a ciertos contaminantes presentaron ingredientes positivos a la presencia de esos contaminantes, lo que indicaría que el ingrediente es un factor de riesgo para la contaminación y transferencia de contaminantes no autorizados en el alimento para peces. Respecto a las plantas muestreadas, todas estas, presentaron positividad en alguno de sus productos ya sea el ingrediente utilizado para la fabricación del pienso o la dieta final.

7 CONCLUSIONES

- a. Los hallazgos muestran que es posible detectar niveles de estos contaminantes en los ingredientes de origen animal y en piensos completos destinados a la alimentación de peces en etapa final por sobre el límite de detección de la técnica. Por lo que, las harinas de origen animal se podrían considerar como una posible ruta de ingreso de CV y VM a la cadena productiva.
- b. Los ingredientes identificados como de alto riesgo durante la evaluación se utilizan durante todo el proceso productivo de los salmónidos, por lo que la presencia de contaminantes en éstos se traduce en la posibilidad de estar administrando CV y VM a los salmónidos en cualquier etapa de producción o incluso la administración continua durante todo el proceso. Si bien concentraciones bajas constantes (1 ng/g) de los contaminantes en los ingredientes no alcanzarían concentraciones detectables en producto final, concentraciones altas esporádicas o continuas de estos contaminantes en piensos (20 ng/g) si pueden generar una alerta de éstos en el producto final.
- c. Todas las muestras analizadas que presentaron resultados sobre el límite de detección utilizado en el estudio corresponden a las variantes metabolizadas de los compuestos analizados (LVM y LCV). Estos compuestos se generan a través de una reacción de reducción de los compuestos VM y CV. Esta reacción puede ocurrir ya sea mediante un proceso enzimático dentro de un organismo (metabolización) o bien a través exposición a luz ultravioleta por tiempos prolongados. De acuerdo a esto, lo más probable es que la fuente de contaminación se encuentre en el origen de las materias primas y no ocurra durante el proceso de elaboración ni almacenamiento de estas para la producción de piensos de salmónidos al no existir durante este proceso fuentes de luz UV o procesado de animales vivos que permitan la reacción química de reducción para generar LVM y LCV.
- d. Si bien, gran parte de los contaminantes evaluados son excretados por los salmónidos de ser consumidos vía oral, existe un porcentaje que es metabolizado en hígado y almacenado en tejido muscular y grasas. Esto implica que puede existir una acumulación de los metabolitos en estos tejidos, si la dieta proporcionada a los animales es constante en su contaminación o muy alta en una situación esporádica. De acuerdo al modelo matemático publicado por Berntssen *et al.*, 2018, concentraciones de 1,4 ng/g de contaminantes, consumidos de modo constante durante el proceso productivo, es suficiente para generar una alerta de CV luego de 12 meses de administración, incluyendo adicionalmente una alerta de VM en equipos con una $C\alpha$ menor al utilizado en dicho estudio (0,15 ng/g). Dietas con concentraciones de contaminantes mayores a 1,4 ng/g alcanzarán los niveles de detección en tiempos proporcionalmente menores de administración.
- e. En la legislación actual, las acciones aplicadas para evitar la contaminación del producto final con sustancias químicas peligrosas como lo son VM, CV y sus derivados metabolizados se realizan únicamente en los animales en engorda (muestreo pre-cosecha). Lo cual resulta, a la luz de los resultados obtenidos insuficiente para garantiza la ausencia de los contaminantes en el producto final.
- f. Todas las legislaciones extranjeras evaluadas coinciden en que debe evitarse la presencia de contaminantes en productos de consumo como salmones, debido a que están catalogados como posiblemente cancerígenos y peligrosos para la salud animal y humana, por lo que.

8 RECOMENDACIONES

8.1 Medidas de Control

8.1.1 Medidas auto control de la Industria del salmon

- a. Es deseable la implementación o el fortalecimiento de los sistemas de autocontrol en los establecimientos importadores o comercializadores de materias primas o insumos y de los establecimientos de fabricación de piensos para salmónes. Estos sistemas deben considerar el análisis de peligros y puntos críticos de control, específicos para contaminantes químicos (CV, VM, LCV y LVM).
- b. Se debiera incorporar en la normativa la obligatoriedad de informar a SERNAPESCA de manera oportuna y rutinaria, de los hallazgos en materias primas, por parte de los elaboradores de piensos para salmónes y de las medidas adoptadas por ellos para reducir el riesgo, en caso de detectar presencia de colorantes químicos.

En el caso de identificar materias primas positivas a los contaminantes evaluados en el presente informe, así como otros posibles riesgos, se deben establecer protocolos de eliminación de dicha materia prima o mitigación del riesgo en caso de ser posible. Estos protocolos deben ser controlados por SERNAPESCA con el fin de que dichas materias primas no puedan ser reingresadas al mismo u otro mercado.

- c. El Programa Integral de Vigilancia de Dioxinas, Furanos y PCB's, fue creado por la industria de las carnes blancas el año 2008, en colaboración con el SAG, para dar cumplimiento a las normativas nacionales e internacionales en esta materia y satisfacer las necesidades y exigencias de los consumidores. Este programa puede servir de referencia para la creación de un homólogo en la industria del salmón.

8.1.2 Medidas de control para la Autoridad

- a. Los resultados obtenidos en las matrices seleccionadas permiten considerar que sería factible y positivo delegar a SERNAPESCA las facultades para verificar el cumplimiento de las obligaciones y requisitos establecidos en el Reglamento de Alimentos para Animales del SAG, en lo concerniente a la producción e importación de piensos para salmónes.
- b. Durante la transición del eventual proceso de delegación, se debiera armonizar el sistema de control de contaminantes químicos (colorantes) entre el SAG y SERNAPESCA. Para ello es necesario establecer el conjunto de criterios a los que el proceso productivo de los salmónes debe ajustarse para que se considere aceptable para su consumo.
- c. Se deben tomar medidas para fortalecer el control que realiza actualmente el SAG y SERNAPESCA en los establecimientos elaboradores de piensos para salmónes, conforme al nivel de riesgo identificado en base a diferentes parámetros como: el origen de la materia prima, el tipo de

materia prima, los procesos utilizados en la elaboración de los piensos y los puntos críticos de control utilizados.

- d. La normativa debe prohibir el uso de materias primas e insumos con niveles detectables de colorantes químicos (CV, VM, LCV y LVM) para la formulación y fabricación de los piensos destinados a salmones. Se debe evitar que las plantas de fabricación de piensos mezclen materias primas e insumos con niveles detectables de colorantes y que, por dilución, esto no sean detectables en los productos finales.

8.1.3 Medidas de control Establecimientos Elaboradores

- a. La normativa debe indicar de manera explícita y precisa cómo los establecimientos que elaboran, fabrican o importan piensos o ingredientes destinados a la alimentación de salmones, garantizan que el riesgo de contaminación con CV y VM es mínimo.
- b. Para la autorización de importación de un ingrediente de origen animal (harina de sangre, harina de plumas, harina de cerdo o harina de vísceras de aves) utilizado en alimentación de salmones, se debe requerir que el programa de autocontrol del establecimiento considere análisis de peligros y puntos críticos de control, específicos para contaminantes químicos como CV y VM.
- c. Los establecimientos elaboradores de piensos para salmones deben solicitar al proveedor de materias primas, las evidencias que demuestren que el producto ha sido procesado de conformidad con la regulación, está considerado en el plan de HACCP y que el proveedor ha abordado el peligro de los colorantes.
- d. Mantener un sistema de reportes de los resultados obtenidos en el programa de control y monitoreo, para que las empresas de producción de salmones examinen a los proveedores de piensos o materia prima, de acuerdo al nivel de hallazgos que presentan.

8.2 Medidas de Monitoreo

- a. Establecer un monitoreo rutinario en los establecimientos de elaboración de piensos para salmones, realizando muestreos de CV y VM en los productos terminados que utilizan insumos de origen animal. Este tipo de monitoreo permite tomar las medidas de prevención y gestionar un historial de los establecimientos.
- b. Establecer un sistema de muestreo de CV y VM basado en riesgos, de los insumos de origen animal utilizados en la elaboración de piensos para salmones (harina de sangre, harina de plumas, harina de cerdo o harina de vísceras de aves), para la detección oportuna de estos peligros y así enfrentar de forma apropiada los factores que inciden en el riesgo de presencia de dichos contaminantes, durante las distintas etapas de producción de piensos para salmones.
- c. Las empresas elaboradoras de piensos para salmones deben mantener registros que incluyan, entre otros, los resultados de las pruebas de residuos de colorantes con probabilidad razonable de estar presentes, registros de monitoreo HACCP reflejando el monitoreo del enfoque de riesgo

de colorantes en la acuicultura, informes de las visitas del elaborador a los proveedores de materia prima. Dichos registros podrán ser requeridos por SERNAPESCA.

- d. Establecer un sistema articulado entre los actores del sector público y privado para fortalecer el monitoreo y control de estos contaminantes en el piensos y materias primas

.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABC-Salmonicultura chilena. 2018. ¿Cómo es el ciclo de cultivo de los salmones?
- Akpor, O. B., Deborah, J. E., & Oluba, O. M. (2018). Comparative decolouration of crystal violet dye using chicken feather fibre, chemical oxidation and bacterial cells. *Journal of Environmental Science and Technology*, 11(5). <https://doi.org/10.3923/jest.2018.246.253>
- Alderman, D. J., & Clifton-Hadley, R. S. (1993). Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 16(4), 297–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1993.tb00864.x>
- Alqathami, M., Blencowe, A., & Ibbott, G. (2016). Experimental determination of the influence of oxygen on the PRESAGE® dosimeter. *Physics in Medicine and Biology*, 61(2). <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/2/813>
- Belpaire, C., Reyns, T., Geeraerts, C., & Van Loco, J. (2015). Toxic textile dyes accumulate in wild European eel *Anguilla anguilla*. *Chemosphere*, 138, 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.007>
- Bergwerff, A. A., & Scherpenisse, P. (2003). Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 788(2), 351–359. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00042-4)
- Berntssen, M. H. G., Hannisdal, R., Buttle, L., Hoogenveen, R., Mengelers, M., Bokkers, B. G. H., & Zeilmaker, M. J. (2018). Modelling the long-term feed-to-fillet transfer of leuco crystal violet and leuco malachite green in Atlantic salmon (*Salmón del Atlántico*). *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(8), 1484–1496. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1487587>
- Chaturvedi, V., Bhange, K., Bhatt, R., Verma, P. (2013). Biodetoxification of high amounts of malachite green by a multifunctional strain of *Pseudomonas mendocina* and its ability to metabolize dye adsorbed chicken feathers. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 1205–1213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.09.009>
- CODEX ALIMENTARIUS Límites Máximos de Residuos LMR) y Recomendaciones sobre la Gestión de Riesgo (RGR) para Residuos de Medicamentos Veterinarios CX/MRL 2018
- CODEX ALIMENTARIUS. Manual de procedimiento. Vigésima séptima edición. FAO y OMS, 2019
- Codex Alimentarius, Organically Produced Foods, FAO, 2001; Organically Produced Foods, Codex Alimentarius, FAO and WHO, 2007. Bergwerff AA, Scherpenisse P. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003 May 25;788(2):351-9.
- Conti, G. O., Copat, C., Wang, Z., D'Agati, P., Cristaldi, A., Ferrante, M. (2015). Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. *Food Control* 50 937-941. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.050>
- Crawford, R. J. and Martin, P. J. (2020) 'General properties of plastics', in *Plastics Engineering*. doi: 10.1016/b978-0-08-100709-9.00001-7.
- Culp, S. J. (2004). NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. In *Toxicity report series* (Issue 71).
- Culp, S. J., Mellick, P. W., Trotter, R. W., Greenlees, K. J., Kodell, R. L., & Beland, F. A. (2006). Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F1 mice and F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44(8). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.01.016>
- Dhevi G.G., K., Sanyal, B., & Ghosh, S. K. (2020). Radiation response studies of acetonitrile solutions of crystal

- violet and leuco crystal violet. *Radiation Physics and Chemistry*, 177. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109068>
- Docampo, R., & Moreno, S. N. J. (1990). The metabolism and mode of action of gentian violet. *Drug Metabolism Reviews*, 22(2–3), 161–178. <https://doi.org/10.3109/03602539009041083>
- Dowling G, Mulder PP, Duffy C, Regan L, Smyth MR. Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2007 Mar 14;586(1-2):411-9.
- Dubreil, E., Mompelat, S., Kromer, V., Guitton, Y., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., & Verdon, E. (2019). Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse. *Food Chemistry*, 294(April), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.056>
- Edward J.Noga. (2010). *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, Second Edition. Wiley-Blackwell.
- Gerundo, N., Alderman, D. J., Clifton-Hadley, R. S., & F, S. W. (1991). Pathological effects of repeated doses of malachite green: a preliminary study. *Journal of Fish Diseases*, 14(5), 521–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00607.x>
- Gessner, T., & Mayer, U. (2000). Triarylmethane and Diarylmethane Dyes. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. https://doi.org/10.1002/14356007.a27_179
- H. A. Shindy. (2016). Basics in Colors, Dyes and Pigments Chemistry: A Review. *Chemistry International*, 2(1).
- Herrman (2001) Sampling: Procedures for Feed. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service.
- Jiang, Y., Xie, P., & Liang, G. (2009). Distribution and depuration of the potentially carcinogenic malachite green in tissues of three freshwater farmed Chinese fish with different food habits. *Aquaculture*, 288(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.025>
- Jonathan A. Harbin, Karen A. Barnes, John Bygrave and William H. H. Farrington. Screening and confirmation of triphenylmethane dyes and their leuco metabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS. *Analyst*, 1998, 123, 2567-2571.
- Littlefield, N. (1985). Chronic toxicity and carcinogenicity studies of gentian violet in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 5(5). [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(85\)90172-1](https://doi.org/10.1016/0272-0590(85)90172-1)
- Littlefield, N. A., Blackwell, B. N., Hewitt, C. C., & Gaylor, D. W. (1985). Chronic toxicity and carcinogenicity studies of gentian violet in mice. *Toxicological Sciences*, 5(5). <https://doi.org/10.1093/toxsci/5.5.902>
- Maley, A. M., & Arbiser, J. L. (2013). Gentian violet: A 19th century drug re-emerges in the 21st century. In *Experimental Dermatology* (Vol. 22, Issue 12). <https://doi.org/10.1111/exd.12257>
- Martínez Bueno, M.J., Herrera, S., Uclés, A., Agüera, A., Hernando, M. D., Shimelis, O., Rudolfsson, M., Fernández-Alba, A. (2010). Determination of malachite green residues in fish using molecular imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 665: 47-54. 2010.
- Marzec, A. (2014) 'The Effect of Dyes, Pigments and Ionic liquids on the Elastomer Composites', University Claude Bernard, Lyon 1.
- Menegat, Mariana B., Robert D. Goodband, Joel M. DeRouchey, Mike D. Tokach, Jason C. Woodworth, and Steve S. Dritsch. (2019) SWINE NUTRITION GUIDE, GENERAL NUTRITION PRINCIPLES. Feed Sampling and Analysis. Kansas State University Applied Swine Nutrition. 10.1080/10934520902720132
- Mitrowska, K., & Posyniak, A. (2004). Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in fish muscle by liquid chromatography. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48(2), 173–

176.

- Morawski, L. (1999) 'Plastics Engineering', *Imagine*, 6(3). doi: 10.1353/imag.2003.0244
- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Beltrán, E., Pérez-Sánchez, J., Silva, J., Karalazos, V., Hernández, F., & Berntssen, M. H. G. (2015). Occurrence and potential transfer of mycotoxins in gilthead sea bream and Atlantic salmon by use of novel alternative feed ingredients. *Chemosphere*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.021>
- Nelson, C. R., & Hites, R. A. (1980). Aromatic Amines in and near the Buffalo River. *Environmental Science and Technology*, 14(9). <https://doi.org/10.1021/es60169a020>
- Ohta, R., Takagi, A., Ohmukai, H., Marumo, H., Ono, A., Matsushima, Y., Inoue, T., Ono, H., & Kanno, J. (2012). Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *Journal of Toxicological Sciences*, 37(5). <https://doi.org/10.2131/jts.37.879>
- Olson, T & Criddle, K. 2008. Industrial evolution: a case study of Chilean salmon aquaculture. *Aquaculture Economics & Management*, 12:89–106. DOI: 10.1080/13657300802110687
- Parejas, I. 2020. Efecto de las materias primas utilizadas en la fabricación de dietas para salmónidos sobre sus propiedades térmicas medidas por calorimetría diferencial de barrido.
- Reis, B. F., & Borges, S. S. (2011). An environmental friendly procedure for photometric determination of hypochlorite in tap water employing a miniaturized multicommuted flow analysis setup. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/463286>
- Report about risk assesement of malachite green in food, 2007 <http://www.food.dtu.dk>. 2. E.
- Ricking, M., Schwarzbauer, J., & Apel, P. (2013). Malachite green in suspended particulate matter and surface sediments in Germany. *Malachite Green in Suspended Particulate Matter and Surface Sediments in Germany*.
- Rushing, H. C., Thompson, J. (2007). Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *J. Chrom. A.*, 1172: 121-126.
- Sabnis, R. W. (2007). Handbook of acid-base indicators. In *Handbook of Acid-Base Indicators*. <https://doi.org/10.1201/9780849382192>
- SAG (2017) Reglamento de alimentos para animales.
- Schaeffer, A. B., & Fulton, M. D. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990). <https://doi.org/10.1126/science.77.1990.194>
- Schermerhorn, P. G., & Munns, R. K. (1994). Determination of leucogentian violet in chicken fat by liquid chromatography with electrochemical and ultraviolet detection: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 77(6). <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.6.1454>
- Schmidt, M. U. (2019). Industrial organic pigments. <https://doi.org/10.1107/97809553602060000984>
- Schuetze, A., Heberer, T., & Juergensen, S. (2008). Occurrence of residues of the veterinary drug crystal (gentian) violet in wild eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. *Environmental Chemistry*, 5(3). <https://doi.org/10.1071/EN08008>
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) (2022). Manual de Inocuidad y Certificación /Julio 2022
- Singh, R., Chiam, K. H., Leiria, F., Pu, L. Z. C. T., Choi, K. C., & Militz, M. (2020). Chromoendoscopy: Role in modern endoscopic imaging. In *Translational Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 5). <https://doi.org/10.21037/tgh.2019.12.06>
- Sinha, R., & Jindal, R. (2020). Elucidation of malachite green induced behavioural, biochemical, and histo-architectural defects in *Cyprinus carpio*, as piscine model. *Environmental and Sustainability Indicators*,

- 8(June), 100055. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2020.100055>
- Slaunwhite, D., Clements, J., Tuggey, R. L., & Reynoso, G. (1979). Leucomalachite green assay for free hemoglobin in serum. *American Journal of Clinical Pathology*, 72(5). <https://doi.org/10.1093/ajcp/72.5.852>
- Srivastava, S., Sinha, R., & Roy, D. (2004). Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*, 66(3), 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008>
- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., & Vesely, T. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review. *Veterinarni Medicina*, 52(12), 527–539. <https://doi.org/10.17221/2027-VETMED>
- The Federal Food Safety and Veterinary Office (2017). Joint safety evaluation of substances in printing inks by Germany (BfR) and Switzerland (FSVO), 5th EFSA FIP Network FCM Meeting Parma, 10.-11.7.2017, Stefan Merkel (BfR) and Stefan Kucsera (FSVO)
- Thomas, C. 2015. Optimización de los procesos de planificación de producción integrada en una empresa salmonera.
- Thomas, S. M., & MacPhee, D. G. (1984). Crystal violet: a direct-acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. *Mutation Research Letters*, 140(4). [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(84\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0165-7992(84)90071-X)
- Tkaczyk, A., Mitrowska, K., & Posyniak, A. (2020). Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 717). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137222>
- Urrutia, L. 2016. Determinación de la rentabilidad de un cultivo offshore de salmones en la VIII región.
- Zhang, Z., Zhou, K., Bu, Y. Q., Shan, Z. J., Liu, J. F., Wu, X. Y., Yang, L. Q., & Chen, Z. L. (2012). Determination of malachite green and crystal violet in environmental water using temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 4(2). <https://doi.org/10.1039/c2ay05665h>

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1: Presentación Contaminantes Taller de Expertos



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PELIGROS: Características Químicas



Nombre Común	Cristal Violeta
Fórmula	$C_{25}H_{20}O_4N_2$
Masa Molecular	407.98
Presentación Común	Pólvoro Solución acuosa
Solubilidad	4000 mg/l a 25°C, agua 10 – 50 g/l a 27°C, pH 3.07, agua Soluble en etanol y cloroformo
Punto de ebullición	631.92 °C
Punto de melting	205 – 215 °C (descomposición) 198 °C (sin descomposición)
Estabilidad y reactividad	Estable bajo condiciones normales Sensible a luz Incompatible con agentes oxidantes fuertes, agentes reductores y ácidos fuertes
Clasificación toxicológica	Corrosivo Irritante Peligro para la salud Peligro medioambiental

Nombre Común	Leuco Cristal Violeta
Fórmula	$C_{25}H_{22}N_2$
Masa Molecular	373.53
Presentación Común	Pólvoro
Solubilidad	1.3 mg/l a 20°C, agua 600 mg/l en etanol
Punto de ebullición	Descomposición a 227.8 antes de alcanzar ebullición
Punto de melting	176.8 °C
Estabilidad y reactividad	Estable a condiciones normales Sensible a luz y aire
Clasificación toxicológica	Irritante Peligro medioambiental



Cristal Violeta



Leuco Cristal Violeta

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PELIGROS: Características Químicas



Nombre Común	Verde Malaquita
Fórmula	$C_{23}H_{22}O_4N_2$
Masa Molecular	364.91
Presentación Común	Cristales Solución acuosa
Solubilidad	4×10^4 mg/l a 25°C, agua Muy soluble en etanol Soluble en metanol y alcohol amílico
Punto de ebullición	452°C
Punto de melting	180°C
Estabilidad y reactividad	Neutraliza ácidos en reacciones exotérmicas formando sales y agua Incompatible con isocianatos, productos halogenados orgánicos, peróxidos, fenoles ácidos, epóxidos, anhídridos y ácidos halóidos. Puede generar hidrógeno gaseoso inflamable al estar en combinación con agentes reductores fuertes.
Clasificación toxicológica	Corrosivo Irritante

Nombre Común	Leuco Verde Malaquita
Fórmula	$C_{23}H_{24}N_2$
Masa Molecular	330.47
Presentación Común	Pólvoro
Solubilidad	6.4×10^2 mg/ml a 25°C, agua Muy soluble en benceno y éter etílico 30 mg/ml en etilenglicol éter monometílico 4 mg/ml en etanol a 25°C
Punto de ebullición	414°C
Punto de melting	101°C
Estabilidad y reactividad	
Clasificación toxicológica	Peligro para la salud



Verde Malaquita



Leuco Verde Malaquita

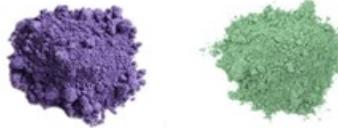
IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PELIGROS: Usos



Cristal Violeta / Verde Malaquita
Pigmento Pigment Violet 3 y 27 (PV3 y PV27) Pigment Green 4 (PG4) Telas de alto contenido orgánico Impresión Offset y flexografía
Función Farmacológica Antifúngico, Antibacterial, Desinfectante
Tinción Biológica Tinción histoquímica, Marcaje en cirugías, exámenes gastrointestinales (CV)

Leuco Cristal Violeta / Leuco Verde Malaquita
Pigmento Precusores de Cristal Violeta y Verde Malaquita
Estudios analíticos Agente cromogénico forense Espectrofotometría Medición de radiación

Posibles mutagénicos, carcinogénicos, irritantes de membranas y venenos respiratorios



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PELIGROS: Ocurrencia Ambiental



No se generan de forma natural en el ambiente

- Contaminación ambiental procedente de desechos industriales, municipales y uso cosmético (Tkaczyk et al., 2020).
- Absorción por suelos altos en carbón orgánico y arcillas
- En agua es absorbido por sedimentos y sólidos suspendidos.
- Encontrados en muestras de sedimento y material particulado de varios ríos de Alemania (Ricking et al., 2013). Existen reportes de ambos compuestos en aguas de USA (Nelson & Hites, 1980) y China (Zhang et al., 2012). Se han encontrado ambos compuestos en diversas concentraciones en anguilas europeas en Alemania (Schuetze et al., 2008; Belpaire et al., 2015)

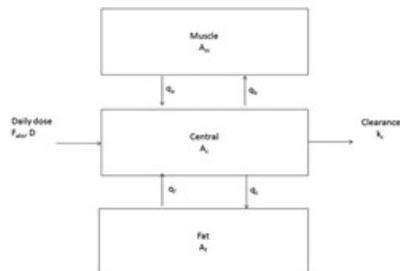
ZONAS DE METABOLIZACIÓN



Modelo Cinético de tres compartimientos

- Entrada:**
- Ingestión
 - Contacto con aguas contaminadas

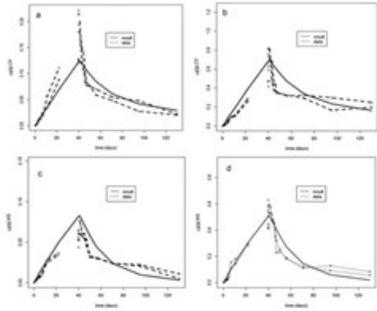
Metabolización:
Hígado
Bacterias Intestinales



Almacenamiento
Tejido graso
Tejido muscular

Eliminación
CV y VM se eliminan completamente en alrededor de 4 días, LCV y LVM permanecen

PERMANENCIA EN EL ORGANISMO



$$\frac{dA_f(t)}{dt} = \frac{q_f}{W_f(t)} + Q_f B_w + B_w(t) + A_f(t) - \frac{q_f}{W_f(t)}$$

$$+ Q_f B_w + B_w(t) + A_f(t)$$

$$\frac{dA_m(t)}{dt} = \frac{q_m}{W_m(t)} + Q_m B_w + B_w(t) + A_m(t) - \frac{q_m}{W_m(t)}$$

$$+ Q_m B_w + B_w(t) + A_m(t)$$

$$\frac{dA_o(t)}{dt} = F_{abs} + D(t) - \frac{dA_m(t)}{dt} - \frac{dA_f(t)}{dt} - k_e$$

$$+ \frac{W_f(t)}{W_o(t)} + A_o(t)$$

All values in the fish compartment are in ug/kg, q_f is the amount of the contaminant ingested by the fish, W_f is the weight of the fish, Q_f is the weight of the fish compartment by biomass, B_w is the weight of the contaminant in the water, A_f is the amount of the contaminant in the fish, q_m is the amount of the contaminant ingested by the mussel, W_m is the weight of the mussel, Q_m is the weight of the mussel compartment by biomass, B_w is the weight of the contaminant in the water, A_m is the amount of the contaminant in the mussel, F_{abs} is the amount of the contaminant absorbed by the mussel, $D(t)$ is the amount of the contaminant eliminated by the mussel, k_e is the elimination rate constant of the contaminant in the mussel, W_o is the weight of the organism, W_f is the weight of the fish, W_m is the weight of the mussel, W_o is the weight of the organism, W_f is the weight of the fish, W_m is the weight of the mussel, W_o is the weight of the organism, W_f is the weight of the fish, W_m is the weight of the mussel, W_o is the weight of the organism.

Figure 4. (a-d) Measured concentration amount (ug kg⁻¹), data points consist of two pooled samples from five fish per time point. All data = 40 data points consist of 10 individual fish samples of three control water (LCV and LMG) and three real-world green (LSC) in the fish of Atlantic salmon fed two levels of LCV (0.08 and 4.2 mg kg⁻¹) and 4, respectively and LMG (0.17 and 4.7 mg kg⁻¹) and 4, respectively for 40 days, followed by a 40 day observation. All general model simulated concentration time curves based on fitted parameters. Model simulation is over time (results) and measured values (data) are data points with broken line.

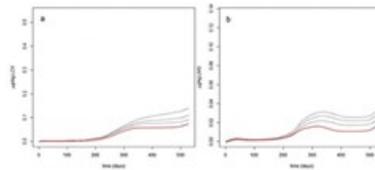
(Berntssen et al., 2018)

PERMANENCIA EN MÚSCULO: PREDICCIONES



Caso 1: Concentraciones bajas en ingredientes.

Ingredientes (kg/kg)	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina Visceras de Aze	1	0,06	0,082	0	0	0,07	0,04	0
Harina Sangre	1	0,04	0,045	0,0443	0,045	0,0407	0,0117	0,0106
Harina Visceras de Cerdo	1	0,0295	0	0,04	0,1	0	0,04	0,12
Harina de Pluma	0	0	0	0	0	0	0	0
Reproceso	0	0	0	0	0	0	0	0
Harina de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0
Acete de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL (ug/kg)		0,1295	0,127	0,0843	0,145	0,1107	0,0917	0,1306
Promedio								0,12



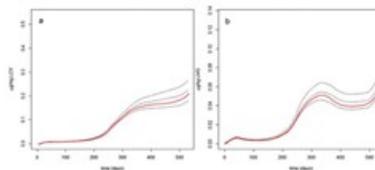
	LCV	LMG
Límite establecido	✓	✓
CCa técnica	✓	✓

PERMANENCIA EN MÚSCULO: PREDICCIONES



Caso 2: Concentraciones medias en ingredientes.

Ingredientes (kg/kg)	Contaminante (ug/kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/kg)						
		100-200	200-500	500-1000	1000-2000	2000-3000	3000-UP	4500-UP
Harina Visceras de Aze	1	0,06	0,082	0	0	0,07	0,04	0
Harina Sangre	1	0,04	0,045	0,0443	0,045	0,0407	0,0117	0,0106
Harina Visceras de Cerdo	1	0,0295	0	0,04	0,1	0	0,04	0,12
Harina de Pluma	1	0	0,08	0,1	0,12	0,12	0,12	0,0957
Reproceso	1	0	0	0,02	0,025	0,03	0,025	0,03
Harina de Pescado	1	0,37	0,14	0,12	0,09	0,09	0,09	0,09
Acete de Pescado	1	0,12	0,09	0,09	0,0792	0,0699	0,0699	0,0653
TOTAL (ug/kg)		0,6295	0,437	0,4243	0,4592	0,4206	0,3966	0,4216
Promedio								0,30



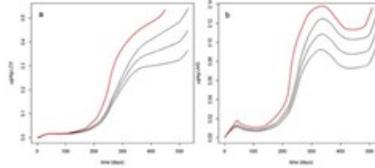
	LCV	LMG
Límite establecido	✓	✓
CCa técnica	✓	✓

PERMANENCIA EN MÚSCULO: PREDICCIONES



Caso 3: Concentraciones altas en ingredientes.

Ingredientes riesgosos	Contaminante (ug/Kg)	Concentración Contaminante por dieta (ug/Kg)							
		100- 200	200- 500	500- 1000	1000- 2000	2000- 3000	3000- UP	4500- UP	
Harina Vísceras de Aze	20	1,2	1,64	0	0	1,4	0,8	0	
Harina Sangre	20	0,8	0,9	0,886	0,9	0,854	0,294	0,212	
Harina Vísceras de Cerdo	0	0	0	0	0	0	0	0	
Harina de Pluma	0	0	0	0	0	0	0	0	
Regresos	0	0	0	0	0	0	0	0	
Harina de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0	
Acete de Pescado	0	0	0	0	0	0	0	0	
TOTAL (ug/Kg)	2	2,54	0,886	0,9	2,214	1,094	0,212		
Promedio					1,4				



	LCV	LMG
Límite establecido	✓	✓
CCa técnica	▲	✓



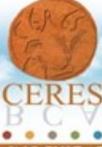
SOLUCIONES EN SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

PROYECTO FIPA N°2021-40

Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio



10.2 Anexo 2: Presentación Resultados Preliminares Evaluación de Riesgos Taller de Expertos



SOLUCIONES EN SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

PROYECTO FIPA N°2021-40

Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio

Noviembre 2022



METODOLOGÍA



ESCALAS



Probabilidad

MUY ALTA	5	Es casi seguro que ocurra.
ALTA	4	Ocurre con mucha frecuencia.
MEDIA	3	Ocurre con regularidad.
BAJA	2	Es poco frecuente, pero se produce.
MUY BAJA	1	Muy raro, pero no se puede excluir.

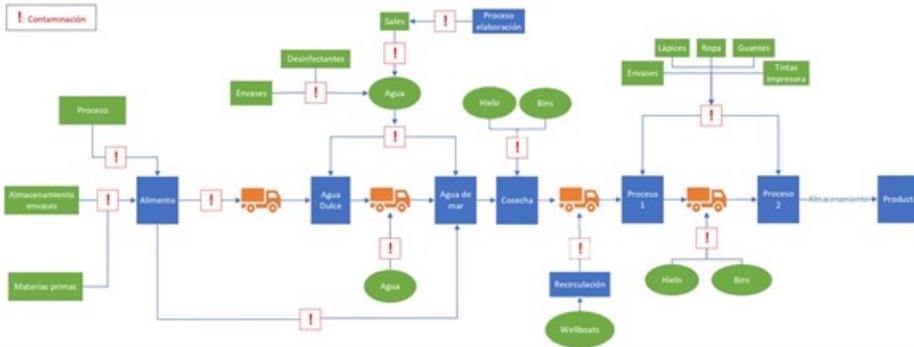
Evidencia

ALTA Se dispone de datos sólidos y completos; se aportan pruebas sólidas de múltiples referencias.

MEDIA Se dispone de algunos datos, pero no de todos, las pruebas se presentan en un número reducido de referencias. Los datos disponibles son escasos o inexistentes; las pruebas proceden de informes no publicados o se basan en observaciones o comunicaciones personales.

BAJA

VÍAS DE INGRESO



INSUMOS



SCORE DE RIESGO ALIMENTOS



ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO						SCORE	Candidata a Toma Muestra	
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Evidencia	w ₃			
Fabricación de materias primas	Uso de insumos contaminados con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	BAJA	1	3,0	1,00	SI
	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2,0	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO
Transporte materias primas	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO
	Uso de materias primas contaminados con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	BAJA	1	3,0	1,00	SI
	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,78	NO
Transporte alimentos	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	ALTA	3	1,7	0,56	NO

SCORE DE RIESGO SALMÓN



ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								SCORE	Candidata a Toma Muestra	
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Probabilidad de presencia en producto final	w ₃	Evidencia	w ₄			
Agua dulce	Alimento contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	MUY BAJA	1	BAJA	1	2,5	0,83	SI
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
Transporte smolt (terrestre)	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Transporte smolt (mar)	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Agua de mar	Alimento contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY ALTA	5	BAJA	2	MEDIA	2	3	1	SI
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO

SCORE DE RIESGO SALMÓN



ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								SCORE	Candidata a Toma Muestra	
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Probabilidad de presencia en producto final	w ₃	Evidencia	w ₄			
Transporte cosecha	Uso de envases con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Acopio	Agua contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	ALTA	4	MUY BAJA	1	MEDIA	2	2	0,67	NO
Planta de proceso primaria	Uso de envases plásticos con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de envases de papel/cartón con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Uso de ropa que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de hielo contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY ALTA	5	MUY BAJA	1	BAJA	1	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO

SCORE DE RIESGO SALMÓN



ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								SCORE	Candidata a Toma Muestra	
		Probabilidad del evento	w ₁	Probabilidad de exposición	w ₂	Probabilidad de presencia en producto final	w ₃	Evidencia	w ₄			
Transporte producto planta primaria	No se identifica		0		0		0		0	-	-	NO
Planta de proceso secundaria	Uso de envases plásticos con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de envases de papel/cartón con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	BAJA	2	BAJA	2	MEDIA	2	2,3	0,75	NO
	Uso de ropa que contenga CV/LCV o VM/LVM	MEDIA	3	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,8	0,58	NO
	Uso de hielo contaminado con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY ALTA	5	MUY BAJA	1	BAJA	1	2	0,67	NO
	Uso de desinfectantes que contengan CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO
Bodega o frigorífico	Superficie contaminada con CV/LCV o VM/LVM	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MEDIA	2	1,3	0,42	NO

SCORE DE RIESGO LABORATORIO



ETAPAS	EVENTOS DE RIESGO	CRITERIOS DE RIESGO								Candidata a Toma Muestra		
		Probabilidad del evento	w_1	Probabilidad de exposición	w_2	Probabilidad de presencia en producto final	w_3	Evidencia	w_4		SCORE	
Toma de muestra	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	ALTA	4	MUY ALTA	5	MUY ALTA	5	MEDIA	2	4	1	SI
Procesamiento en laboratorio	Etiquetado con tinta que contenga CV/LCV o VM/LVM	ALTA	4	MUY ALTA	5	MUY ALTA	5	MEDIA	2	4	1	SI
	Contacto con material contaminado	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	MUY BAJA	1	BAJA	1	1	0,25	NO

RESUMEN SCORE DE RIESGO



Etapa	Candidato toma de muestra
Fabricación de alimentos	1) Harina de sangre
	2) Harina de plumas
	3) Harina de cerdo
Cadena productiva de salmón	Agua dulce Alimento
	Agua de mar Alimento
Laboratorio	Toma de muestra Etiquetado (tinta)
	Procesamiento Etiquetado (tinta)



SOLUCIONES EN SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

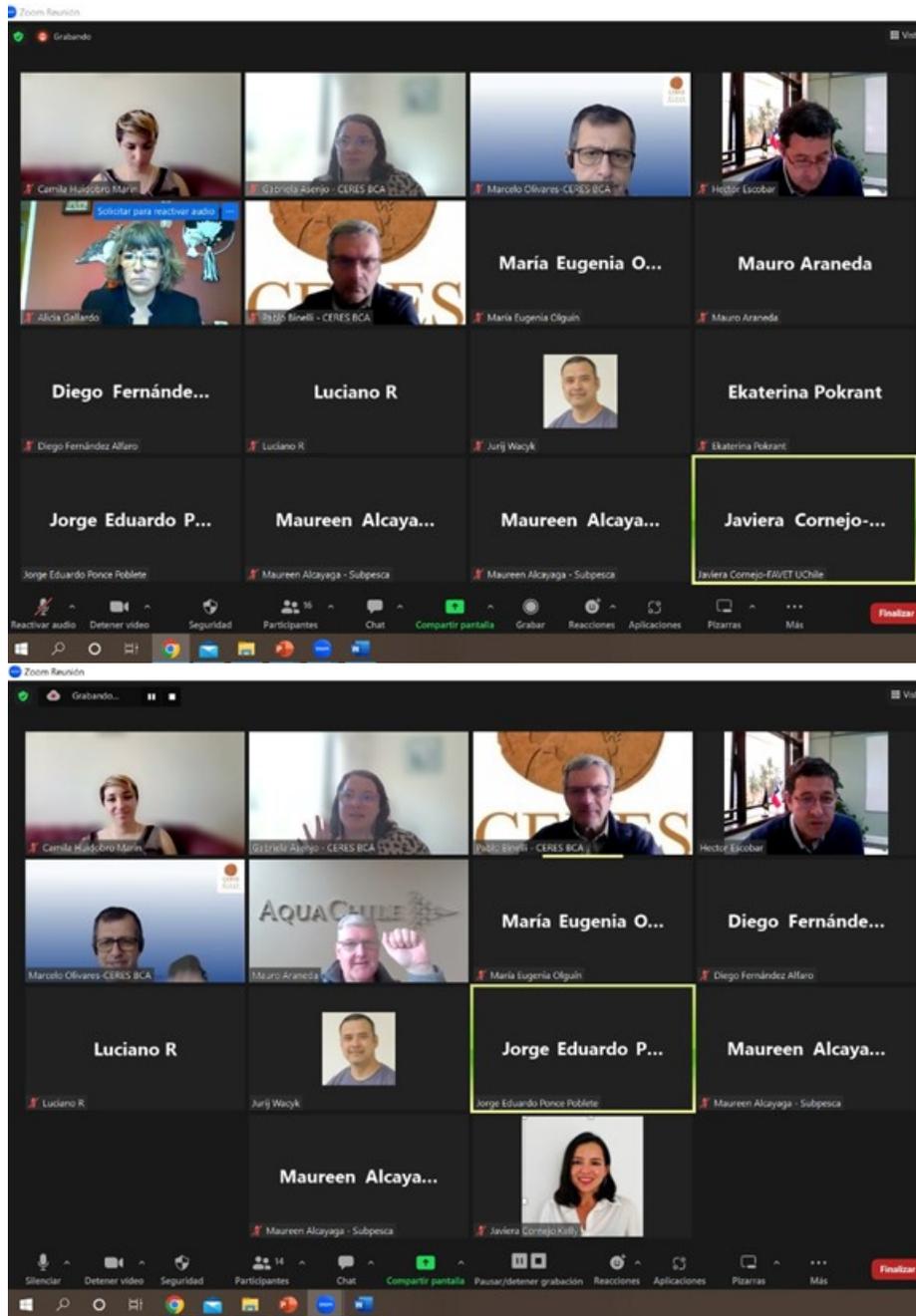
PROYECTO FIPA N°2021-40

Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio

Noviembre 2022



10.3 Anexo 3: Evidencias de la realización del Taller de Expertos



10.4 Anexo 4: Sistema de control Unión Europea

Los países de la Unión Europea (UE) deben implementar planes de seguimiento de residuos para detectar el uso ilegal o indebido de medicamentos veterinarios autorizados en animales destinados a la producción de piensos e investigar los motivos de las infracciones de residuos.

En el mismo sentido los países extracomunitarios que exporten a la UE deben implementar un plan de control de residuos que garantice un nivel equivalente de inocuidad alimentaria.

En este contexto, la UE ha establecido directrices para la realización programas de vigilancia de residuos y sustancias en animales vivos o productos generados del procesamiento de dichos animales. En particular la Directiva 96/23/CE de la Unión Europea, establece a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.

Dicha normativa establece la existencia de una coordinación central para la realización de los planes de vigilancia para la detección de residuos o sustancias, definiendo tareas específicas en esta materia. En particular el artículo N° 4 señala que los Estados miembros confiarán a un servicio u organismo público central la tarea de coordinar la ejecución de las detecciones del plan de vigilancia, el cual estará encargado de las siguientes acciones:

- a. Elaborar el plan previsto en el artículo 5, que permita a los servicios competentes efectuar las detecciones previstas;
- b. Coordinar las actividades de los servicios centrales y regionales encargados de la vigilancia de los diversos residuos. Dicha coordinación se extenderá a todos los servicios que participen en la lucha contra la utilización fraudulenta de sustancias o productos en la ganadería;
- c. Reunir el conjunto de los datos necesarios para evaluar los medios aplicados y los resultados obtenidos en la ejecución de las medidas previstas en el presente capítulo;
- d. Transmitir anualmente a la Comisión, a más tardar el 31 de marzo de cada año, los datos y resultados contemplados en la letra c), incluidos los resultados de las investigaciones emprendidas.

El plan de vigilancia contiene las medidas que se deben implementar para la vigilancia de los residuos, en especial:

- a. Prever la detección de grupos de residuos o de sustancias según el tipo de animal, de conformidad con el Anexo II;
- b. Precisar, en particular, las medidas de detección de la presencia:
 - a. de las sustancias a que se refiere la letra a) en los animales y en el agua de beber de los animales, así como en todos los lugares en que se críen o mantengan los animales;
 - b. de residuos de las sustancias antes citadas en los animales vivos, sus excrementos y líquidos biológicos, así como en los tejidos y productos de origen animal, como la carne, la leche, los huevos, la miel;
- c. respetar las normas y los niveles y frecuencias de muestreo definidos en los Anexos III y IV.

En relación al tipo de sustancias que deben ser muestreadas, la normativa europea señala los grupos de residuos o sustancias que deben detectarse según el tipo de animales, sus piensos y agua de beber y por tipos de productos animales de origen primario. En el caso de animales de piscicultura deben muestrearse sustancias del grupo A (Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas), tales como estilbenos, derivados de los estilbenos, sus sales y ésteres; esteroides y sustancias farmacológicamente activas para las que no puede establecerse límite máximo alguno. También deben muestrearse sustancias del grupo B (Medicamentos veterinarios⁴ y contaminantes), tales como sustancias antibacterianas, incluidas las sulfamidas, quinolonas; antihelmínticos; compuestos organoclorados, incluidos los PCB; elementos químicos; micotoxinas y colorantes.

La Directiva de la UE, establece el número mínimo de animales que deben someterse a muestreo y la detección de presencia de una o más sustancias.

En el caso de productos de la acuicultura la normativa establece las siguientes condiciones de muestreo.

Una muestra es uno o varios peces, según la dimensión del pez considerado y según las exigencias del método analítico.

Los Estados miembros deben respetar las siguientes frecuencias de muestreo mínimo, dependiendo de la producción anual de peces de piscifactoría (expresada en toneladas).

El número mínimo de muestras recogidas cada año debe ser al menos igual al 1% de las toneladas de la producción anual. Las sustancias buscadas y las muestras seleccionadas para el análisis deben seleccionarse según la utilización prevista de dichas sustancias.

Debe respetarse la siguiente división:

- a. Grupo A: un tercio del total de las muestras. Todas las muestras deben tomarse en la piscifactoría, sobre peces en todas las fases de la cría⁵, incluidos los peces preparados para ser comercializados para el consumo.
- b. Grupo B: dos tercios del total de las muestras. La toma de muestras deberá efectuarse:
 - a. De preferencia en la piscifactoría, sobre peces preparados para ser puestos en el mercado para el consumo;
 - b. En el establecimiento de transformación o a nivel de la venta al por mayor, sobre peces frescos, a condición de que, en caso de resultados positivos, se pueda remontar a la piscifactoría de origen de los peces («tracing back»).

En todos los casos, las muestras tomadas en la piscifactoría deben tomarse a partir de un mínimo del 10 % de los puntos de producción registrados.

En el informe del año 2020 sobre los resultados del seguimiento de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias en animales vivos y productos de origen animal, realizado por la European Food Safety Authority (EFSA), se informaron colorantes (B3e) en el sector de acuicultura

⁴ Incluidas las sustancias no registradas que podrían utilizarse a efectos veterinarios.

⁵ Para las crías en el mar, donde las condiciones de toma de muestras pueden ser especialmente difíciles, la toma de muestras podrá hacerse sobre los piensos en vez de en los peces.

en una proporción de 0,61% (11 muestras no conformes de un total de 1.792 muestras). Las sustancias encontradas fueron Cristal Violeta y Leuco Cristal Violeta y Verde Malaquita y Leuco Verde Malaquita. El uso de estos colorantes está prohibido en la UE para su uso en la producción de piensos, pero sus residuos pueden tener su origen, según el informe de EFSA, en concentraciones en piensos para peces, como proteínas animales procesadas; estos colorantes pueden persistir en los tejidos del pescado graso durante mucho tiempo.

Sin perjuicio de los controles efectuados en el marco de la aplicación de los planes de vigilancia establecidos en la normativa europea, los Estados miembros de la UE pueden proceder a controles oficiales por muestreo:

- a. en la fase de fabricación de las sustancias enumeradas en el grupo A, así como en la fase de manipulación, almacenamiento, transporte, distribución y venta o adquisición.
- b. en la fase de la cadena de producción y de la distribución de los piensos para animales.
- c. a lo largo de toda la cadena de producción de los animales y de los productos básicos de origen animal incluidos en el ámbito de aplicación de la presente Directiva.

Los Estados de la UE deben designar por lo menos un laboratorio nacional de referencia, y cada residuo o grupo de residuos sólo debe asignarse a un único laboratorio nacional de referencia.

En cuanto a controles de los piensos animales, la UE cuenta con el Reglamento N°882/2002 que establece normas generales para la realización de controles oficiales a fin de comprobar el cumplimiento de las normas orientadas en particular a: prevenir, eliminar o reducir a niveles aceptables los riesgos que amenazan directamente o a través del medio ambiente a las personas y los animales y garantizar prácticas equitativas en el comercio de piensos y proteger los intereses de los consumidores, incluidos el etiquetado de piensos y otras modalidades de información al consumidor.

Esta regulación indica las condiciones que deben tener los controles oficiales de piensos por parte de los servicios responsables, entre las que se menciona la realización de controles oficiales con regularidad, basados en riesgos y con la frecuencia apropiadas; sin previo aviso, salvo en casos tales como las auditorías, en las que será necesaria la notificación del explotador de la empresa alimentaria o de piensos y que se podrán realizar controles oficiales ad hoc; que se llevarán a cabo en cualquiera de las fases de la producción, la transformación y la distribución de los piensos o de los animales y productos de origen animal.

La autoridad competente tiene la facultad de delegar tareas de control específicas en uno o más organismos de control

Los controles oficiales se deben realizar por medio de métodos y técnicas de control adecuados, como el control, la vigilancia, la verificación, la auditoría, la inspección, el muestreo y el análisis.

Los controles oficiales de piensos consistirán, entre otras, en las actividades siguientes:

- a. el examen de todos los sistemas de control puestos a punto por los explotadores de empresas alimentarias y de piensos y de los resultados obtenidos.
- b. la inspección de:

- instalaciones de producción primaria, empresas alimentarias y de piensos, con inclusión de sus inmediaciones, locales, oficinas, equipos, instalaciones, maquinaria y transporte, así como de los piensos.
 - las materias primas, los ingredientes, los coadyuvantes tecnológicos y otros productos utilizados en la preparación y fabricación de piensos.
 - los productos semielaborados.
 - el material y los objetos que vayan a estar en contacto con los piensos.
 - los productos y los procesos de limpieza y mantenimiento, y los plaguicidas.
 - el etiquetado, la presentación y la publicidad.
- c. la comprobación de las condiciones de higiene en las empresas alimentarias y de piensos;
- d. la evaluación de los procedimientos de buenas prácticas de fabricación, prácticas correctas de higiene, buenas prácticas agrícolas y HACCP, teniendo en cuenta el empleo de guías elaboradas de conformidad con la legislación comunitaria;
- e. el examen de la documentación escrita y otros registros que puedan ser relevantes para evaluar el cumplimiento de la legislación sobre piensos o la legislación alimentaria;
- f. entrevistas con los explotadores de las empresas alimentarias y de piensos y con su personal;
- g. la lectura de los valores registrados por los instrumentos de medición de la empresa alimentaria o de piensos;
- h. controles realizados con el propio instrumental de la autoridad competente para verificar las mediciones llevadas a cabo por los explotadores de la empresa alimentaria o de piensos.

La normativa también señala que la autoridad competente designa los laboratorios que pueden realizar el análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales.

10.5 Anexo 5: Detalle de resultados de parámetros validados en piensos para salmones

Tabla 30. Tiempo de retención.

Analito	Tiempo de Retención (min)								
	1	2	3	4	5	6	Promedio	Desv. Est.	CV
Verde Malaquita 329.4/313.2	5.140	5.360	5.510	5.480	5.510	5.360	5.393	0.142	2.64
Verde Malaquita 329.4/208.1	5.130	5.350	5.500	5.490	5.500	5.350	5.387	0.145	2.69
Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3	12.860	12.950	13.010	12.890	13.010	12.950	12.945	0.061	0.47
Leuco Verde Malaquita 331.4/316.2	12.850	12.940	13.000	12.880	13.000	12.940	12.935	0.061	0.47
Cristal Violeta 372.5/356.3	8.590	8.960	9.210	9.140	9.210	8.960	9.012	0.236	2.62
Cristal Violeta 372.5/340.3	8.570	8.960	9.200	9.130	9.200	8.960	9.003	0.239	2.65
Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3	12.960	13.060	13.120	13.000	13.120	13.060	13.053	0.064	0.49
Leuco Cristal Violeta 374.6/239.3	12.950	13.060	13.110	12.990	13.110	13.060	13.047	0.065	0.50
Leuco Verde Malaquita D4 336.3/239.2	12.76	12.85	12.91	12.8	12.91	12.85	12.847	0.060	0.46

Tabla 31. Límite de detección y cuantificación Verde Malaquita en piensos.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	18.54	0.09
2	0.1	18.95	0.09
3	0.1	18.3	0.09
4	0.1	18.81	0.09
5	0.1	18.56	0.09
6	0.1	18.94	0.09
7	0.1	18.59	0.09
8	0.1	18.81	0.09
9	0.1	18.49	0.09
10	0.1	18.46	0.09
11	0.1	18.55	0.09

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
12	0.1	18.2	0.09
13	0.1	18.13	0.09
14	0.1	18.69	0.09
15	0.1	18.68	0.09
16	0.1	18.16	0.09
17	0.1	18.26	0.09
18	0.1	18.66	0.09
19	0.1	18.46	0.09
20	0.1	18.04	0.09
Promedio		18.514	0.087
Desv. Estándar		0.266	0.001
CV (%)		1.44	0.81

Tabla 32. Limite detección y cuantificación Leuco Verde Malaquita en piensos.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.24	0.08
2	0.1	0.24	0.08
3	0.1	0.24	0.08
4	0.1	0.23	0.07
5	0.1	0.23	0.07
6	0.1	0.24	0.08
7	0.1	0.23	0.07
8	0.1	0.24	0.08
9	0.1	0.23	0.07
10	0.1	0.23	0.07
11	0.1	0.23	0.07
12	0.1	0.23	0.07
13	0.1	0.23	0.07
14	0.1	0.24	0.08
15	0.1	0.24	0.08

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
16	0.1	0.24	0.08
17	0.1	0.24	0.08
18	0.1	0.24	0.08
19	0.1	0.24	0.08
20	0.1	0.23	0.07
Promedio		0.236	0.073
Desv. Estándar		0.005	0.003
CV (%)		2.17	4.02

Tabla 33. Limite detección y cuantificación Cristal Violeta en piensos.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	40.92	0.10
2	0.1	40.71	0.10
3	0.1	40.68	0.10
4	0.1	40.35	0.10
5	0.1	40.64	0.10
6	0.1	40.03	0.09
7	0.1	40.68	0.10
8	0.1	40.76	0.10
9	0.1	40.35	0.10
10	0.1	40.93	0.10
11	0.1	40.52	0.10
12	0.1	40.46	0.10
13	0.1	40.03	0.09
14	0.1	40.28	0.09
15	0.1	40.86	0.10
16	0.1	39.99	0.09
17	0.1	40.18	0.09
18	0.1	40.13	0.09
19	0.1	40.25	0.09

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
20	0.1	40.27	0.09
Promedio		40.451	0.096
Desv. Estándar		0.307	0.001
CV (%)		0.76	0.95

Tabla 34. Limite detección y cuantificación Leuco Cristal Violeta en piensos.

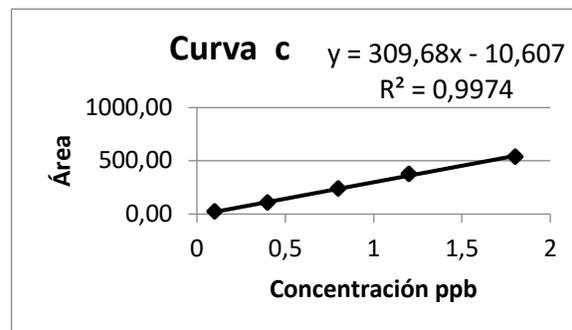
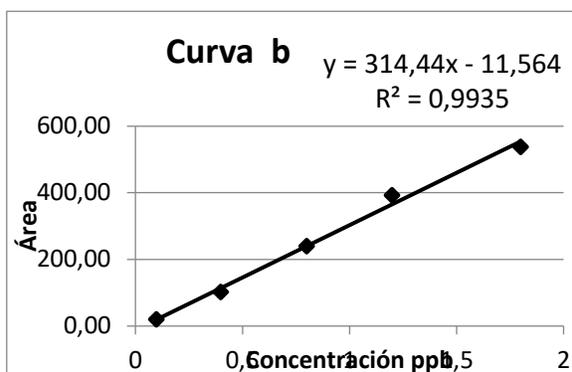
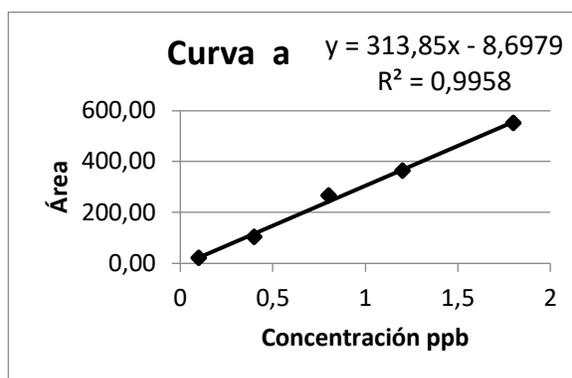
Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.5	0.19	0.08
2	0.5	0.2	0.09
3	0.5	0.19	0.08
4	0.5	0.2	0.09
5	0.5	0.19	0.08
6	0.5	0.2	0.09
7	0.5	0.19	0.08
8	0.5	0.19	0.08
9	0.5	0.2	0.09
10	0.5	0.2	0.09
11	0.5	0.2	0.09
12	0.5	0.19	0.08
13	0.5	0.2	0.09
14	0.5	0.2	0.09
15	0.5	0.2	0.09
16	0.5	0.2	0.09
17	0.5	0.2	0.09
18	0.5	0.2	0.09
19	0.5	0.19	0.08
20	0.5	0.19	0.08
Promedio		0.196	0.089
Desv. Estándar		0.005	0.004
CV (%)		2.56	4.74

Tabla 35. Linealidad metodología analítica y análisis de pendientes obtenidas en piensos.

Analito	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO	DESV. ESTA	CV%
VM	313.85	314.44	309.68	312.66	3	0.830
LVM	1.8	2.1	2.1	1.96	0	7.646
CV	310.25	317.08	311.63	312.99	4	1.154
LCV	1.25	1.33	1.25	1.28	0	3.618

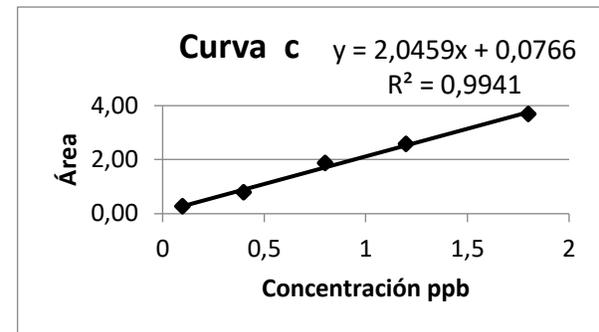
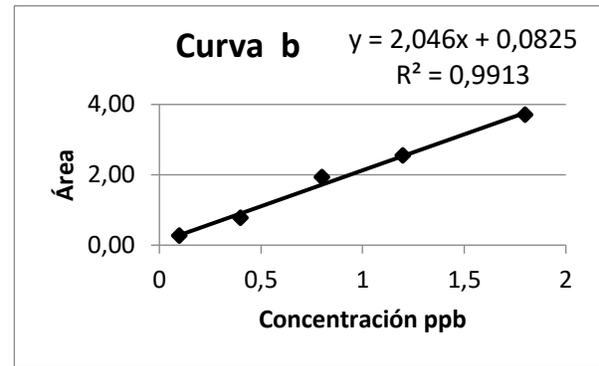
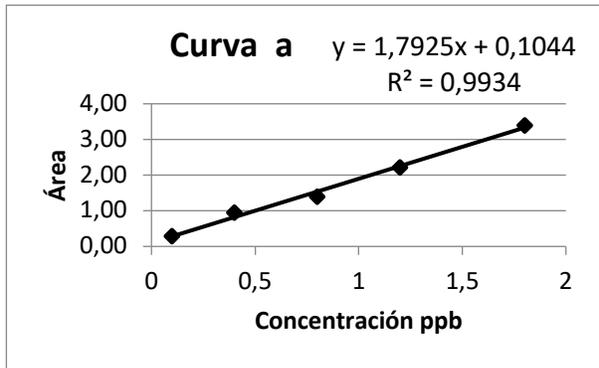
– Obtención grafica de linealidad Verde Malaquita en piensos.

CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	20.88
F2-1	0.4	0.16	104.25
F3-1	0.8	0.64	265.78
F4-1	1.2	1.44	363.44
F5-1	1.8	3.24	551.73
CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-2	0.1	0.01	20.21
F2-2	0.4	0.16	102.45
F3-2	0.8	0.64	239.22
F4-2	1.2	1.44	393.56
F5-2	1.8	3.24	538.84
CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-3	0.1	0.01	21.21
F2-3	0.4	0.16	103.95
F3-3	0.8	0.64	239.11
F4-3	1.2	1.44	377.06
F5-3	1.8	3.24	537.27



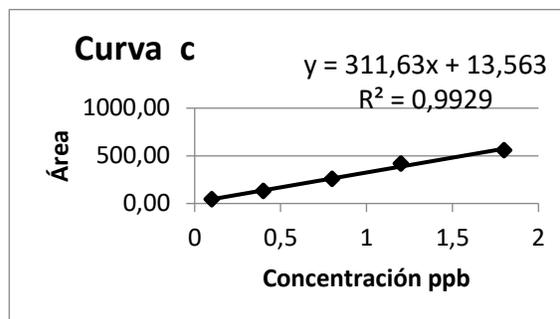
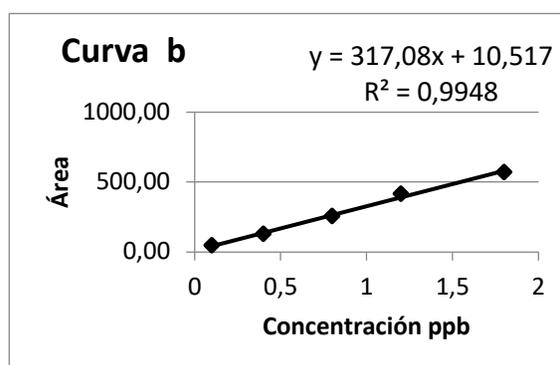
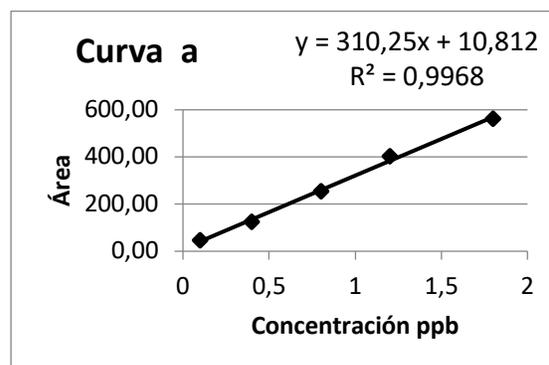
– Obtención gráfica de linealidad Leuco Verde Malaquita en piensos.

CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.28
F2-1	0.4	0.16	0.94
F3-1	0.8	0.64	1.40
F4-1	1.2	1.44	2.22
F5-1	1.8	3.24	3.39
CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-2	0.1	0.01	0.27
F2-2	0.4	0.16	0.77
F3-2	0.8	0.64	1.93
F4-2	1.2	1.44	2.54
F5-2	1.8	3.24	3.70
CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-3	0.1	0.01	0.27
F2-3	0.4	0.16	0.78
F3-3	0.8	0.64	1.87
F4-3	1.2	1.44	2.57
F5-3	1.8	3.24	3.69



– Obtención Gráfica linealidad Cristal Violeta en piensos.

Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-1	0.1	0.01	45.72
F2-1	0.4	0.16	125.88
F3-1	0.8	0.64	253.78
F4-1	1.2	1.44	401.91
F5-1	1.8	3.24	560.85
Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-2	0.1	0.01	46.44
F2-2	0.4	0.16	127.66
F3-2	0.8	0.64	255.44
F4-2	1.2	1.44	416.24
F5-2	1.8	3.24	570.24
Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-3	0.1	0.01	44.26
F2-3	0.4	0.16	129.37
F3-3	0.8	0.64	258.10
F4-3	1.2	1.44	417.41
F5-3	1.8	3.24	558.67



– Obtención Gráfica linealidad Leuco Cristal Violeta en piensos.

Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.23
F2-1	0.4	0.16	0.64
F3-1	0.8	0.64	0.99
F4-1	1.2	1.44	1.54
F5-1	1.8	3.24	2.38
Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-2	0.1	0.01	0.22
F2-2	0.4	0.16	0.56
F3-2	0.8	0.64	1.13
F4-2	1.2	1.44	1.80
F5-2	1.8	3.24	2.41
Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área Ratio
F1-3	0.1	0.01	0.23
F2-3	0.4	0.16	0.61
F3-3	0.8	0.64	1.03
F4-3	1.2	1.44	1.54
F5-3	1.8	3.24	2.37

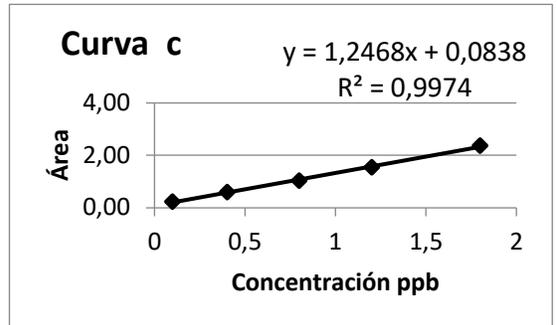
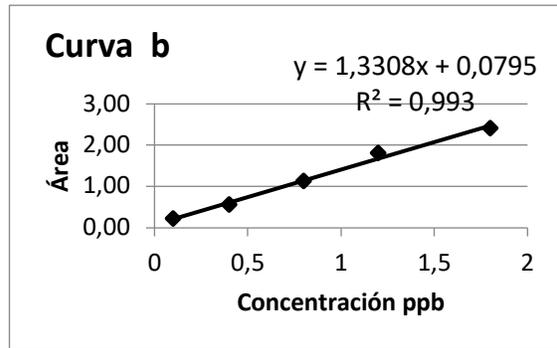
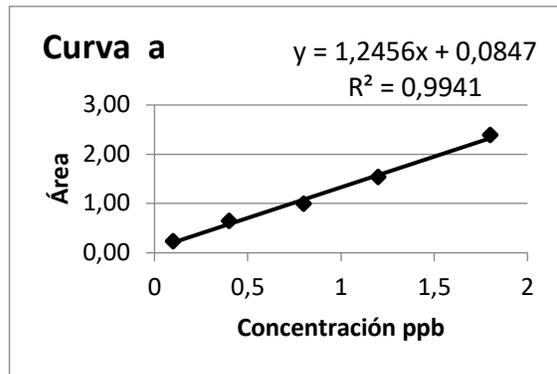


Tabla 36. Precisión Metodología analítica Verde Malaquita en piensos.

Repetitividad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.1	0.1	0.0701	0.064	0.0687	0.0666	0.1	0.00	0.04	3.94
0.8	0.8561	0.8486	0.8508	0.8613	0.8532	0.8568	0.9	0.00	0.01	0.53
1.8	1.7769	1.78	1.7791	1.7748	1.7781	1.7766	1.8	0.00	0.00	0.11
Reproducibilidad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.0727	0.0696	0.0572	0.0714	0.0701	0.064	0.1	0.01	0.09	8.68
0.8	0.8465	0.8518	0.8728	0.8486	0.8508	0.8613	0.9	0.01	0.01	1.16
1.8	1.7809	1.7787	1.77	1.78	1.7791	1.7748	1.8	0.00	0.00	0.23

Tabla 37. Precisión Metodología analítica Leuco Verde Malaquita en piensos.

Repetitividad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1327	0.1278	0.1304	0.1	0.00	0.03	3.12
0.8	0.7473	0.7505	0.7639	0.7444	0.7527	0.7483	0.8	0.01	0.01	0.91
1.8	1.8217	1.8204	1.8149	1.8229	1.8195	1.8213	1.8	0.00	0.00	0.15
Reproducibilidad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.1401	0.1409	0.1056	0.1464	0.1351	0.1291	0.1	0.01	0.11	10.98
0.8	0.7319	0.7305	0.7906	0.7212	0.7403	0.7505	0.7	0.02	0.03	3.33
1.8	1.828	1.8286	1.8039	1.8325	1.8246	1.8204	1.8	0.01	0.01	0.56

Tabla 38. Precisión Metodología analítica Cristal Violeta piensos.

Repetitividad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.088	0.0932	0.0902	0.0892	0.0912	0.0928	0.1	0.00	0.02	2.23
0.8	0.8204	0.8115	0.8167	0.8183	0.815	0.8123	0.8	0.00	0.00	0.42
1.8	1.7916	1.7953	1.7931	1.7925	1.7938	1.7949	1.8	0.00	0.00	0.08
Reproducibilidad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.0888	0.0851	0.0831	0.0845	0.0927	0.0565	0.1	0.01	0.16	15.71
0.8	0.8191	0.8253	0.8288	0.8263	0.8125	0.8739	0.8	0.02	0.03	2.63
1.8	1.7921	1.7896	1.7881	1.7892	1.7949	1.7696	1.8	0.01	0.01	0.50

Tabla 39. Precisión Metodología analítica Leuco Cristal Violeta en piensos.

Repetitividad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.1	0.1	0.1	0.1206	0.1293	0.1327	0.1	0.00	0.03	3.33
0.8	0.7556	0.7589	0.7569	0.77	0.7502	0.7444	0.8	0.01	0.01	0.95
1.8	1.8183	1.8169	1.8177	1.8144	1.8205	1.8229	1.8	0.00	0.00	0.16
Reproducibilidad										
Concentración enriquecimiento	Concentración cuantificada						Promedio	DV	CV	CV %
	a	b	c	d	e	f				
0.1	0.1393	0.1101	0.1482	0.1513	0.1223	0.1342	0.1	0.02	0.12	11.71
0.8	0.7333	0.7828	0.7181	0.7128	0.7621	0.7418	0.7	0.03	0.04	3.60
1.8	1.8275	1.8071	1.8337	1.8359	1.8156	1.8239	1.8	0.01	0.01	0.60

Tabla 40. Recuperación Verde Malaquita en piensos.

VERDE MALAQUITA				
Análisis	Concentración (ppb)	Área Matriz Fortificada	Área Droga Pura	Promedio %
1	0.1	4.701	5.284	88.97%
2	0.1	4.759	5.257	90.53%
3	0.1	4.482	5.209	86.04%
4	0.1	4.596	5.123	89.71%
5	0.1	4.803	5.209	92.21%
6	0.1	4.565	5.257	86.84%
7	0.1	4.586	5.116	89.64%
8	0.1	4.628	5.197	89.05%
9	0.1	4.781	5.171	92.46%
10	0.1	4.639	5.139	90.27%
Promedio		4.65	5.20	89.57%
Desv. Estándar		0.10	0.06	
CV %		2.24%	1.13%	

Tabla 41. Recuperación Leuco Verde Malaquita en piensos.

LEUCO VERDE MALAQUITA				
Análisis	Concentración (ppb)	Área Matriz Fortificada	Área Droga Pura	Promedio %
1	0.1	0.061	0.080	76.25%
2	0.1	0.062	0.079	78.48%
3	0.1	0.063	0.080	78.75%
4	0.1	0.068	0.081	83.95%
5	0.1	0.067	0.080	83.75%
6	0.1	0.070	0.079	88.61%
7	0.1	0.063	0.081	77.78%
8	0.1	0.061	0.080	76.25%
9	0.1	0.062	0.081	76.54%
10	0.1	0.061	0.081	75.31%
Promedio		0.06	0.08	79.55%
Desv. Estándar		0.00	0.00	
CV %		5.16%	0.98%	

Tabla 42. Recuperación Cristal Violeta en piensos.

CRISTAL VIOLETA				
Análisis	Concentración (ppb)	Área Matriz Fortificada	Área Droga Pura	Promedio %
1	0.1	13.027	14.707	88.58%
2	0.1	12.986	14.684	88.44%
3	0.1	13.817	14.621	94.50%
4	0.1	13.061	14.715	88.76%
5	0.1	13.097	15.095	86.76%
6	0.1	13.136	15.085	87.08%
7	0.1	12.932	14.621	88.45%
8	0.1	13.188	14.921	88.39%
9	0.1	13.744	14.573	94.31%
10	0.1	13.497	14.255	94.68%
Promedio		13.25	14.73	89.96%
Desv. Estándar		0.32	0.25	
CV %		2.42%	1.71%	

Tabla 43. Recuperación Leuco Cristal Violeta en piensos.

LEUCO CRISTAL VIOLETA				
Análisis	Concentración (ppb)	Área Matriz Fortificada	Área Droga Pura	Promedio %
1	0.1	0.071	0.077	92.21%
2	0.1	0.066	0.085	77.65%
3	0.1	0.066	0.082	80.49%
4	0.1	0.068	0.081	83.95%
5	0.1	0.063	0.083	75.90%
6	0.1	0.064	0.081	79.01%
7	0.1	0.068	0.084	80.95%
8	0.1	0.063	0.080	78.75%
9	0.1	0.061	0.083	73.49%
10	0.1	0.066	0.078	84.62%
Promedio		0.07	0.08	80.59%
Desv. Estándar		0.00	0.00	
CV %		4.50%	3.13%	

10.6 Anexo 6: Detalle de resultados de parámetros validados para harinas de subproductos y Hemoglobina.

Tabla 44. Límite de detección y cuantificación Verde Malaquita Harinas.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.23	0.07
2	0.1	0.26	0.08
3	0.1	0.27	0.08
4	0.1	0.23	0.07
5	0.1	0.25	0.07
6	0.1	0.23	0.07
7	0.1	0.23	0.07
8	0.1	0.27	0.08
9	0.1	0.27	0.08
10	0.1	0.24	0.07
Promedio		0.248	0.072
Desv. Estándar		0.018	0.007
CV (%)		7.31	9.91

Tabla 45. Límite de detección y cuantificación Leuco Verde Malaquita Harinas.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.11	0.07
2	0.1	0.12	0.08
3	0.1	0.11	0.07
4	0.1	0.12	0.08
5	0.1	0.12	0.08
6	0.1	0.12	0.08
7	0.1	0.12	0.08
8	0.1	0.12	0.08
9	0.1	0.12	0.08
10	0.1	0.11	0.07
Promedio		0.117	0.081
Desv. Estándar		0.005	0.005
CV (%)		4.13	5.76

Tabla 46. Límite de detección y cuantificación Cristal Violeta Harina.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.32	0.07
2	0.1	0.36	0.08
3	0.1	0.41	0.10
4	0.1	0.35	0.08
5	0.1	0.37	0.08
6	0.1	0.38	0.09
7	0.1	0.34	0.08
8	0.1	0.37	0.08
9	0.1	0.4	0.09
10	0.1	0.33	0.07
Promedio		0.363	0.083
Desv. Estándar		0.029	0.008
CV (%)		8.01	9.39

Tabla 47. Límite de detección y cuantificación Leuco Cristal Violeta Harinas.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.03	0.08
2	0.1	0.03	0.08
3	0.1	0.03	0.08
4	0.1	0.03	0.08
5	0.1	0.03	0.08
6	0.1	0.03	0.08
7	0.1	0.03	0.08
8	0.1	0.03	0.08
9	0.1	0.03	0.08
10	0.1	0.03	0.08
Promedio		0.030	0.081
Desv. Estándar		0.000	0.000
CV (%)		0.00	0.00

Tabla 48. Linealidad metodología analítica y análisis de pendientes obtenidas para harinas de subproductos.

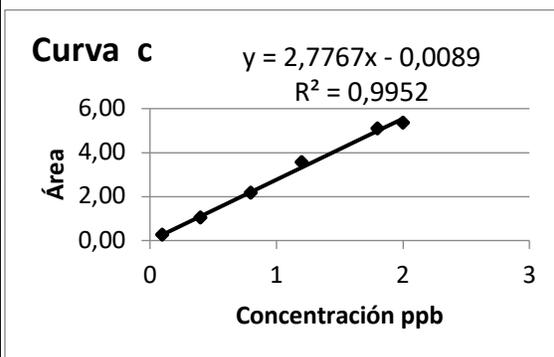
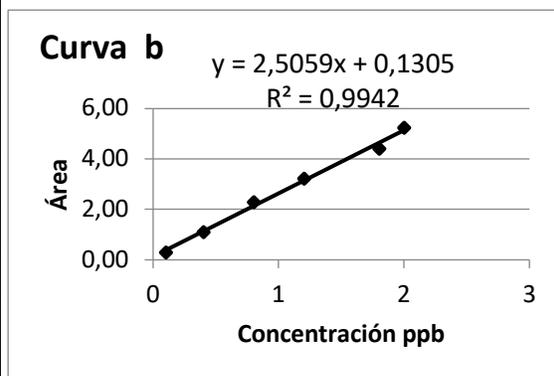
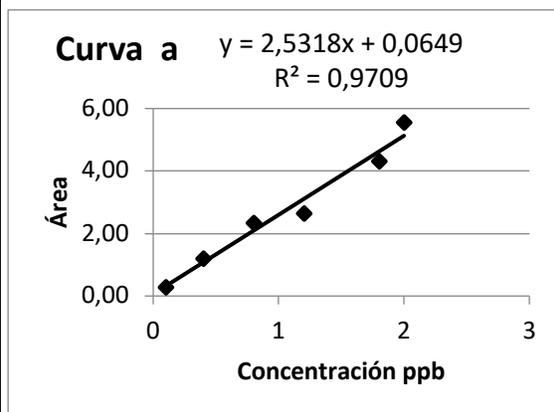
Análito	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO	DESV. ESTA	CV%
VM	2.53	2.51	2.78	2.61	0	5.772
LVM	1.04	1.06	1.06	1.05	0	1.096
CV	3.75	3.55	4.05	3.78	0	6.652
LCV	0.33	0.34	0.32	0.33	0	3.030

– Obtención Gráfica de linealidad Verde Malaquita en Harinas.

CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.28
F2-1	0.4	0.16	1.20
F3-1	0.8	0.64	2.34
F4-1	1.2	1.44	2.65
F5-1	1.8	3.24	4.32
F6-1	2	4	5.55

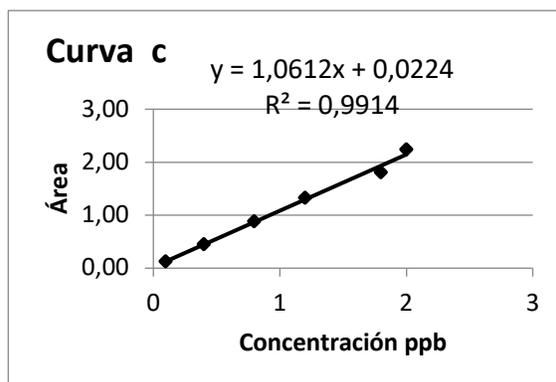
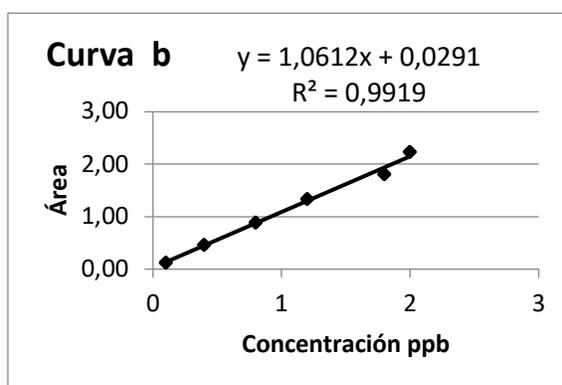
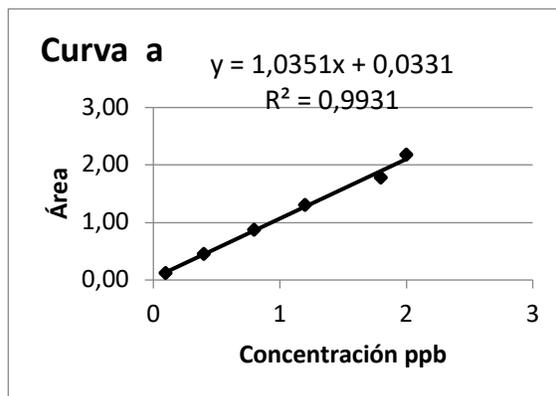
CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.29
F2-1	0.4	0.16	1.11
F3-1	0.8	0.64	2.30
F4-1	1.2	1.44	3.21
F5-1	1.8	3.24	4.41
F6-1	2	4	5.25

CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.25
F2-1	0.4	0.16	1.03
F3-1	0.8	0.64	2.17
F4-1	1.2	1.44	3.55
F5-1	1.8	3.24	5.09
F6-1	2	4	5.35



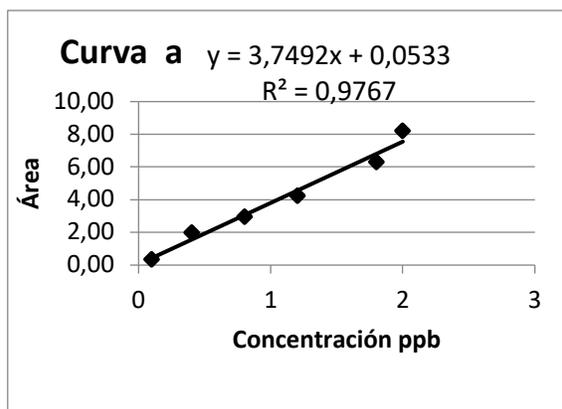
– Obtención Gráfica de linealidad Leuco Verde Malaquita en Harinas.

CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.12
F2-1	0.4	0.16	0.45
F3-1	0.8	0.64	0.88
F4-1	1.2	1.44	1.31
F5-1	1.8	3.24	1.78
F6-1	2	4	2.18
CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.12
F2-1	0.4	0.16	0.46
F3-1	0.8	0.64	0.89
F4-1	1.2	1.44	1.34
F5-1	1.8	3.24	1.81
F6-1	2	4	2.24
CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.12
F2-1	0.4	0.16	0.45
F3-1	0.8	0.64	0.88
F4-1	1.2	1.44	1.33
F5-1	1.8	3.24	1.80
F6-1	2	4	2.24

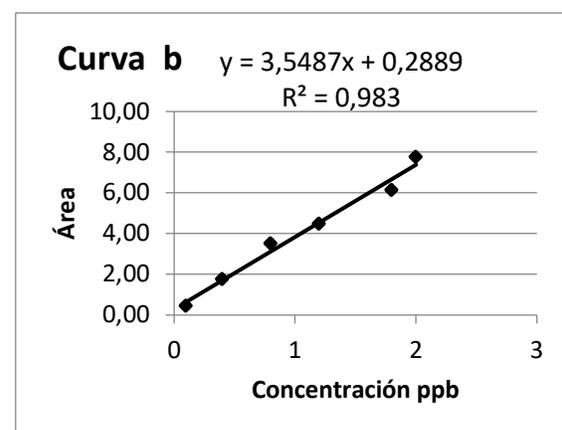


– Obtención Gráfica de linealidad Cristal Violeta en Harinas.

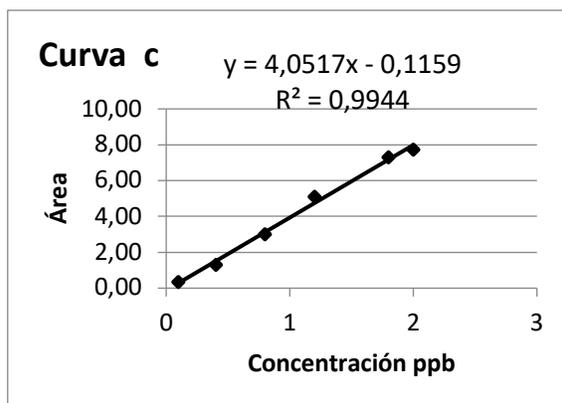
Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.34
F2-1	0.4	0.16	1.97
F3-1	0.8	0.64	2.95
F4-1	1.2	1.44	4.21
F5-1	1.8	3.24	6.29
F6-1	2	4	8.18



Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.45
F2-1	0.4	0.16	1.75
F3-1	0.8	0.64	3.52
F4-1	1.2	1.44	4.47
F5-1	1.8	3.24	6.14
F6-1	2	4	7.76



Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.36
F2-1	0.4	0.16	1.31
F3-1	0.8	0.64	3.01
F4-1	1.2	1.44	5.11
F5-1	1.8	3.24	7.30
F6-1	2	4	7.74



– Obtención Gráfica de linealidad Leuco Cristal Violeta en Harinas.

Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.03
F2-1	0.4	0.16	0.14
F3-1	0.8	0.64	0.26
F4-1	1.2	1.44	0.42
F5-1	1.8	3.24	0.56
F6-1	2	4	0.68
Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.03
F2-1	0.4	0.16	0.14
F3-1	0.8	0.64	0.27
F4-1	1.2	1.44	0.41
F5-1	1.8	3.24	0.58
F6-1	2	4	0.69
Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.03
F2-1	0.4	0.16	0.14
F3-1	0.8	0.64	0.26
F4-1	1.2	1.44	0.40
F5-1	1.8	3.24	0.55
F6-1	2	4	0.68

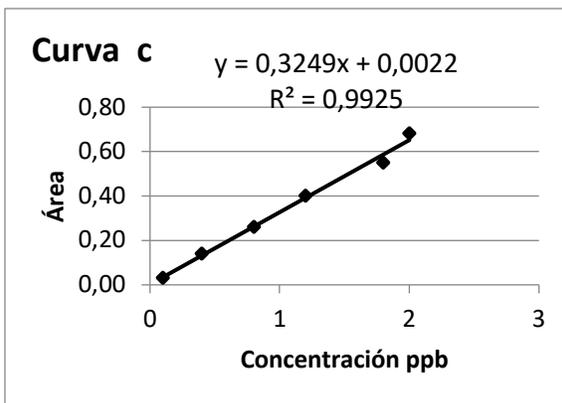
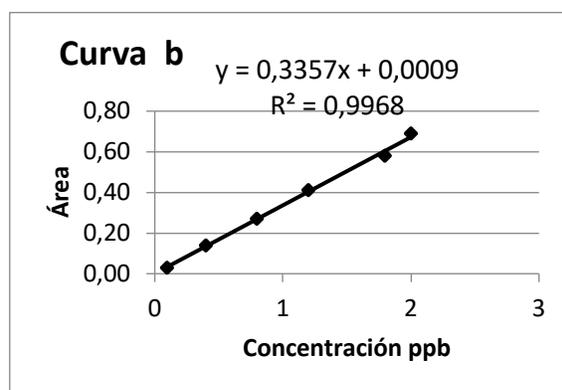
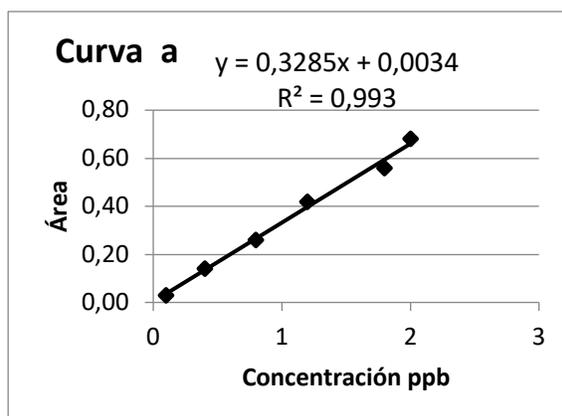


Tabla 49. Límite de detección y cuantificación Verde Malaquita Hemoglobina.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.01	0.14
2	0.1	0.01	0.14
3	0.1	0.01	0.14
4	0.1	0.01	0.14
5	0.1	0.01	0.14
6	0.1	0.01	0.14
7	0.1	0.01	0.14
8	0.1	0.01	0.14
9	0.1	0.01	0.14
10	0.1	0.01	0.14
Promedio		0.010	0.145
Desv. Estándar		0.000	0.000
CV (%)		0.00	0.00

Tabla 50. Límite de detección y cuantificación Leuco Verde Malaquita Hemoglobina.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.13	0.12
2	0.1	0.11	0.11
3	0.1	0.13	0.12
4	0.1	0.13	0.12
5	0.1	0.13	0.12
6	0.1	0.12	0.12
7	0.1	0.12	0.12
8	0.1	0.12	0.12
9	0.1	0.12	0.12
10	0.1	0.15	0.14
Promedio		0.126	0.121
Desv. Estándar		0.011	0.009
CV (%)		8.53	7.05

Tabla 51. Límite de detección y cuantificación Cristal Violeta Hemoglobina.

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.31	0.15
2	0.1	0.26	0.13
3	0.1	0.32	0.15
4	0.1	0.28	0.14
5	0.1	0.3	0.14
6	0.1	0.29	0.14
7	0.1	0.3	0.14
8	0.1	0.26	0.13
9	0.1	0.36	0.16
10	0.1	0.29	0.14
Promedio		0.297	0.144
Desv. Estándar		0.029	0.009
CV (%)		9.92	6.29

Tabla 52. Límite de detección y cuantificación Leuco Cristal Violeta Hemoglobina

Análisis	Concentración (ng/gr)	Área/Ratio	Concentración Cuantificada (ng/gr)
1	0.1	0.04	0.07
2	0.1	0.04	0.07
3	0.1	0.04	0.07
4	0.1	0.04	0.07
5	0.1	0.04	0.07
6	0.1	0.04	0.07
7	0.1	0.04	0.07
8	0.1	0.05	0.10
9	0.1	0.04	0.07
10	0.1	0.04	0.07
Promedio		0.041	0.074
Desv. Estándar		0.003	0.008
CV (%)		7.71	10.94

Tabla 53. Linealidad metodología analítica y análisis de pendientes obtenidas para hemoglobina.

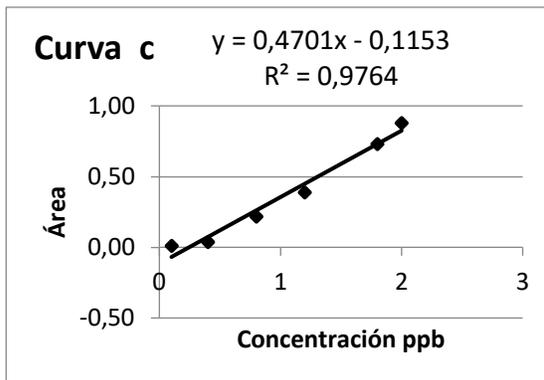
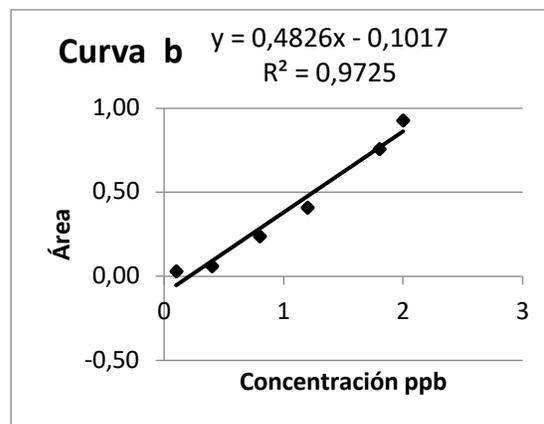
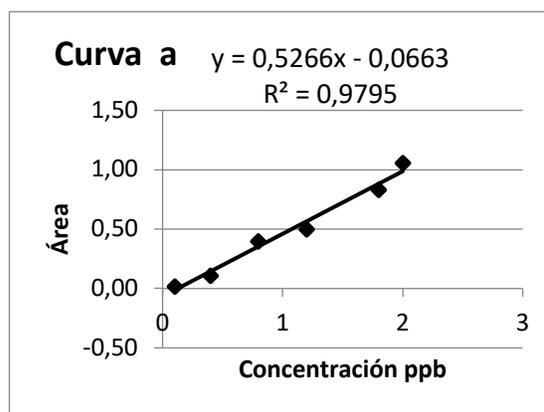
Analito	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO	DESV. ESTA	CV%
VM	0.53	0.48	0.47	0.49	0	6.516
LVM	1.26	1.41	1.12	1.26	0	11.480
CV	3.26	3.18	3.30	3.25	0	1.882
LCV	0.39	0.46	0.39	0.41	0	9.778

– Obtención Gráfica de linealidad Verde Malaquita Hemoglobina.

CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.02
F2-1	0.4	0.16	0.11
F3-1	0.8	0.64	0.40
F4-1	1.2	1.44	0.50
F5-1	1.8	3.24	0.83
F6-1	2	4	1.06

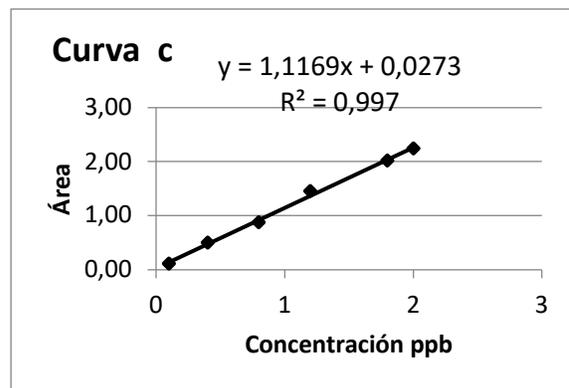
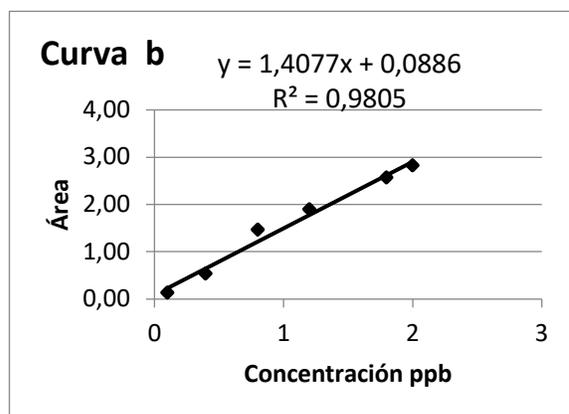
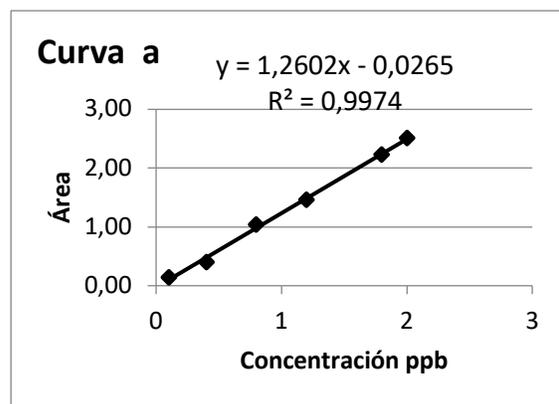
CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.03
F2-1	0.4	0.16	0.06
F3-1	0.8	0.64	0.24
F4-1	1.2	1.44	0.41
F5-1	1.8	3.24	0.76
F6-1	2	4	0.93

CURVA Verde Malaquita 329.4/313.2			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.01
F2-1	0.4	0.16	0.04
F3-1	0.8	0.64	0.22
F4-1	1.2	1.44	0.39
F5-1	1.8	3.24	0.73
F6-1	2	4	0.88



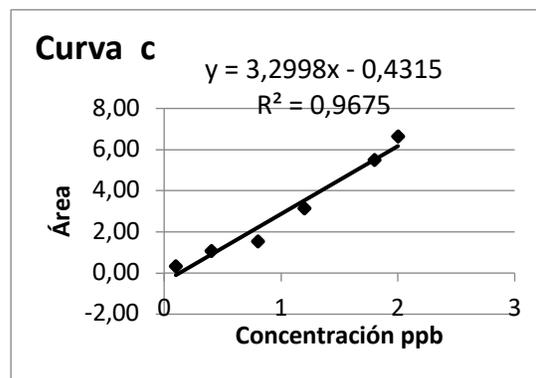
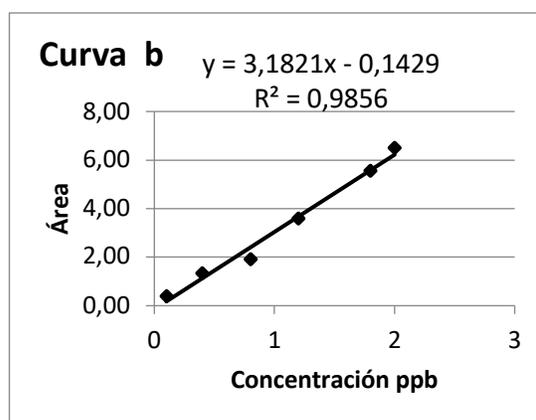
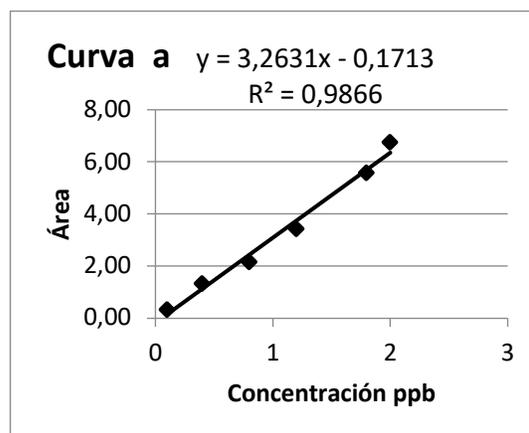
– Obtención Gráfica de linealidad Leuco Verde Malaquita en Hemoglobina.

CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.14
F2-1	0.4	0.16	0.40
F3-1	0.8	0.64	1.04
F4-1	1.2	1.44	1.46
F5-1	1.8	3.24	2.23
F6-1	2	4	2.51
CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.13
F2-1	0.4	0.16	0.53
F3-1	0.8	0.64	1.47
F4-1	1.2	1.44	1.89
F5-1	1.8	3.24	2.56
F6-1	2	4	2.82
CURVA Leuco Verde Malaquita 331.4/239.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.11
F2-1	0.4	0.16	0.50
F3-1	0.8	0.64	0.88
F4-1	1.2	1.44	1.45
F5-1	1.8	3.24	2.02
F6-1	2	4	2.24



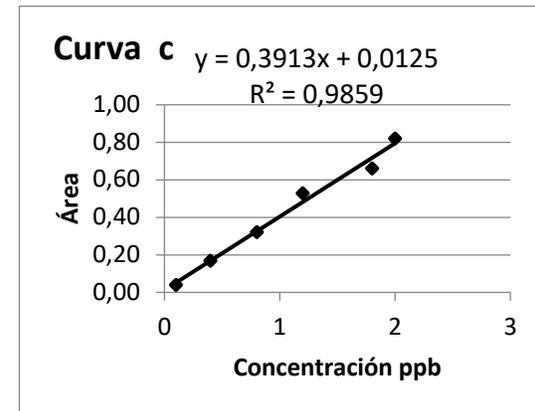
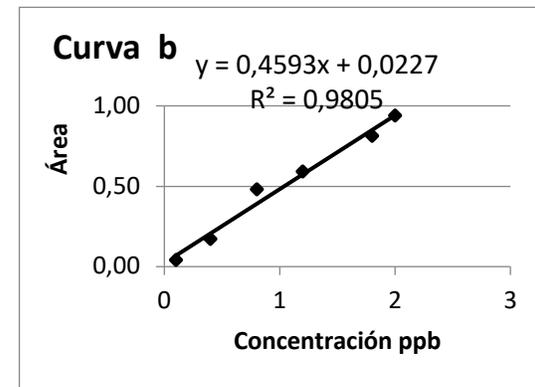
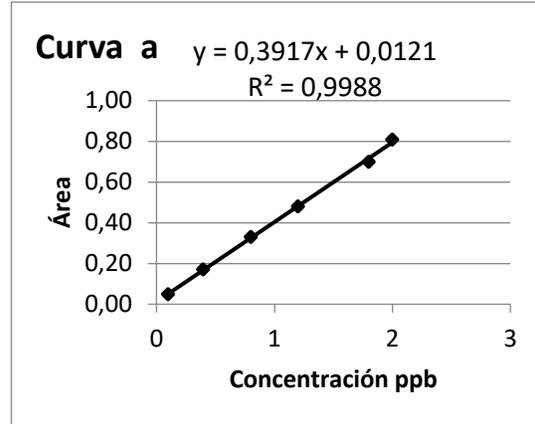
– Obtención Gráfica de linealidad Cristal Violeta Hemoglobina.

Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.32
F2-1	0.4	0.16	1.33
F3-1	0.8	0.64	2.15
F4-1	1.2	1.44	3.43
F5-1	1.8	3.24	5.56
F6-1	2	4	6.74
Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.38
F2-1	0.4	0.16	1.33
F3-1	0.8	0.64	1.89
F4-1	1.2	1.44	3.57
F5-1	1.8	3.24	5.54
F6-1	2	4	6.48
Curva de Cristal Violeta 372.5/356.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.33
F2-1	0.4	0.16	1.08
F3-1	0.8	0.64	1.54
F4-1	1.2	1.44	3.13
F5-1	1.8	3.24	5.48
F6-1	2	4	6.64



– Obtención Gráfica de linealidad Leuco Cristal Violeta Hemoglobina.

Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.05
F2-1	0.4	0.16	0.17
F3-1	0.8	0.64	0.33
F4-1	1.2	1.44	0.48
F5-1	1.8	3.24	0.70
F6-1	2	4	0.81
Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.04
F2-1	0.4	0.16	0.17
F3-1	0.8	0.64	0.48
F4-1	1.2	1.44	0.59
F5-1	1.8	3.24	0.81
F6-1	2	4	0.94
Curva Leuco Cristal Violeta 374.6/358.3			
Análisis	Concentración (ppb)	x ²	Área/Ratio
F1-1	0.1	0.01	0.04
F2-1	0.4	0.16	0.17
F3-1	0.8	0.64	0.32
F4-1	1.2	1.44	0.53
F5-1	1.8	3.24	0.66
F6-1	2	4	0.82



10.7 Anexo 7. Gráficos de positividad de acuerdo al tipo de muestra según contaminante y grafico de positividad según planta.

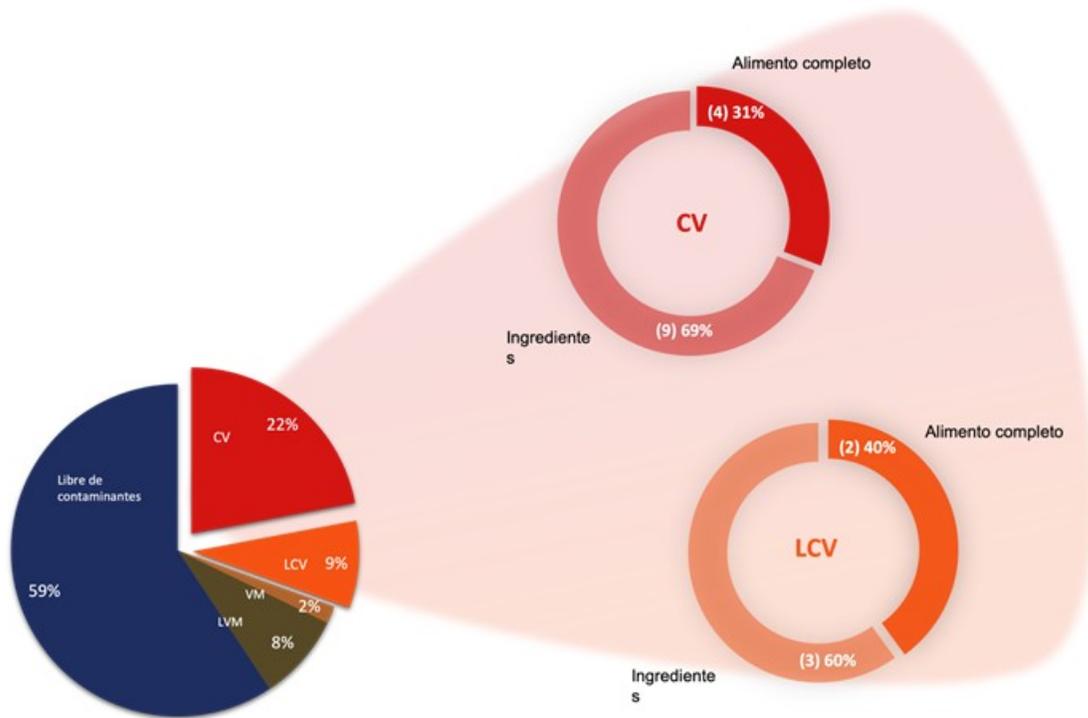


Figura 11. Porcentaje del tipo muestras positivas a Cristal Violeta y Leuco Cristal Violeta.

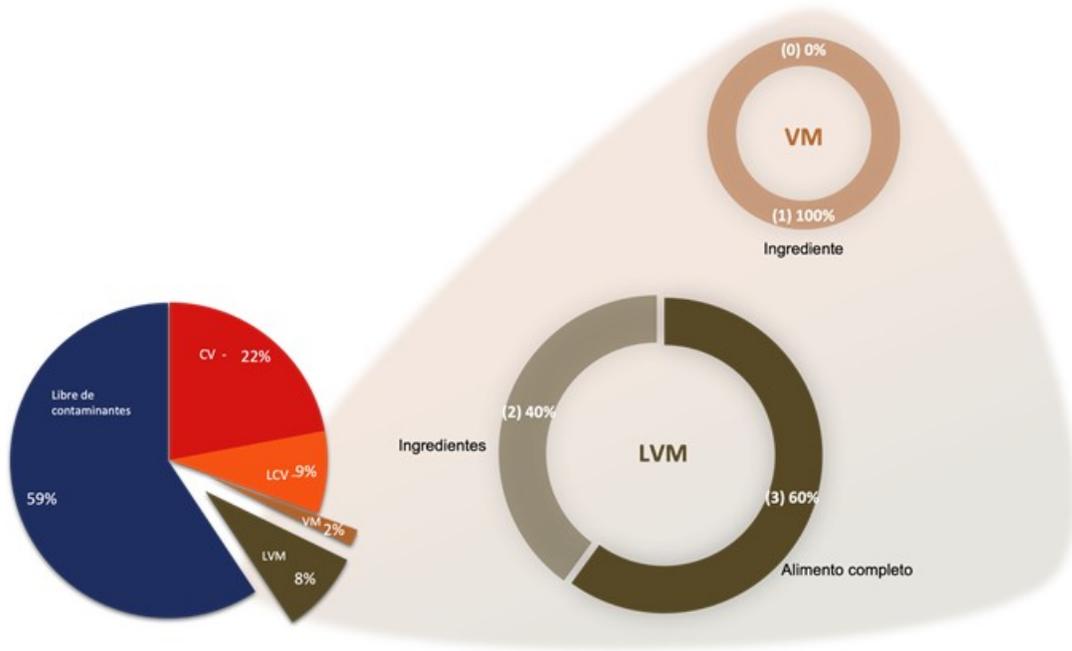


Figura 12. Porcentaje del tipo muestras positivas a Verde Malaquita y Leuco Verde Malaquita.

PORCENTAJE DE MUESTRAS POSITIVAS SEGÚN PLANTA MUESTREADA

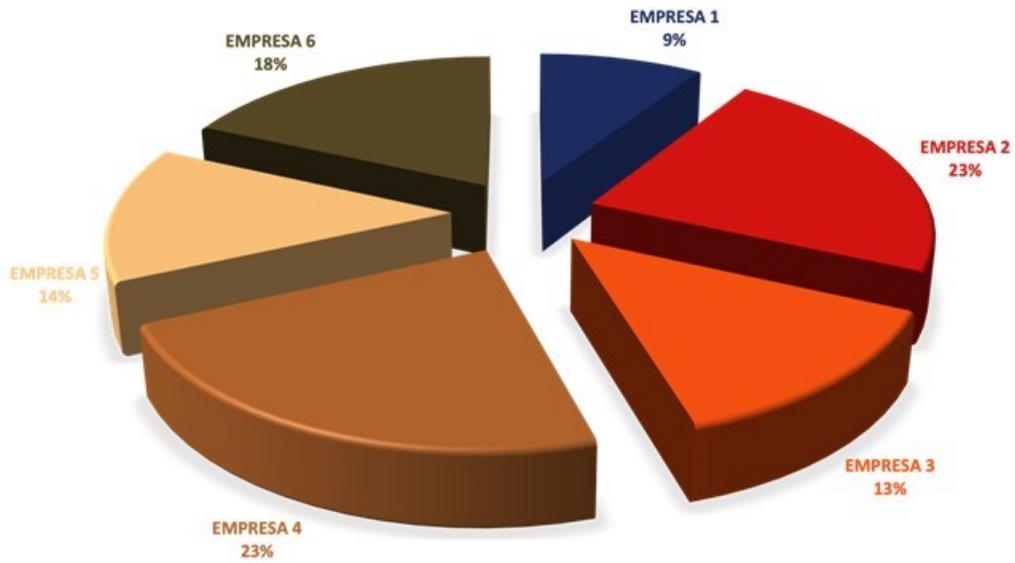


Figura 13. Gráfico que muestra porcentaje de positividad según planta muestreada.

10.8 Anexo 8. Carta Gantt del proyecto

OBJETIVO/ ACTIVIDAD	ACTIVIDAD	RESULTADO ESPERADO ASOCIADO	MES											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
ACTIVIDADES GENERALES														
ACTIVIDAD 1	<i>Coordinación equipo de trabajo</i>													
OBJETIVO ESPECIFICO 1	Evaluar la cadena productiva del salmón para Identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias <i>no autorizadas</i> en músculo de salmón.													
ACTIVIDAD 1	<i>Caracterización de la cadena de proceso</i>	Descripción de la cadena productiva de piensos para salmón, con las potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias NO autorizadas en músculo de salmón												
ACTIVIDAD 2	<i>Caracterización de peligros</i>													
ACTIVIDAD 3	<i>Identificación de las vías de contaminación y factores de riesgo</i>													
ACTIVIDAD 4	<i>Taller de expertos</i>													
OBJETIVO ESPECIFICO 2	Identificar insumos de riesgo para la presencia de residuos de sustancias <i>no autorizadas</i> en piensos para peces.													
ACTIVIDAD 1	<i>Descripción de la normativa nacional e internacional</i>													
ACTIVIDAD 2	<i>Descripción de insumos utilizados para alimentación de salmones</i>	Modelo de análisis de riesgo de contaminación con sustancias NO autorizadas en piensos para salmones, de acuerdo con la identificación de potenciales fuentes y factores de riesgo en la cadena productiva del pienso para salmones												
ACTIVIDAD 3	<i>Descripción de residuos de sustancias no autorizadas en piensos para peces</i>													
ACTIVIDAD 4	<i>Análisis de insumos utilizados para la alimentación de salmones</i>													
ACTIVIDAD 5	<i>Caracterización y estimación de riesgo</i>													
ACTIVIDAD 6	<i>Evaluación incertidumbres asociadas a la estimación de riesgos</i>													
OBJETIVO ESPECIFICO 3	Realizar un levantamiento de la situación de contaminación en piensos para peces con sustancias no autorizados.													

OBJETIVO/ ACTIVIDAD	ACTIVIDAD	RESULTADO ESPERADO ASOCIADO	MES												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
ACTIVIDAD 1	<i>Validación del método analítico para los colorantes; Verde Malaquita, Cristal Violeta y sus metabolitos respectivos en piensos para salmones</i>	Método validado	■	■											
ACTIVIDAD 2	<i>Análisis de las muestras para la búsqueda activa de los colorantes mencionados obtenidas desde las plantas de piensos.</i>	Tabla con los resultados de muestreo y análisis de laboratorio, indicando nombre, pienso o insumo o materia prima, proveedor (Codificado), lote de producción, contaminante concentrado/unidad de piensos (Plantas Piensos)			■	■	■	■							
ACTIVIDAD 3	<i>Análisis de las muestras para la búsqueda activa de los colorantes mencionados obtenidas desde las plantas de piensos</i>	Tabla con los resultados de muestreo y análisis de laboratorio, indicando nombre, piensos o insumo o materia prima, proveedor (Codificado), lote de producción, contaminante concentrado/unidad de piensos (Plantas Piensos)					■	■	■	■					
ACTIVIDAD 4	<i>Evaluación de los resultados de laboratorio obtenidos sobre residuos de sustancias no autorizadas en los piensos</i>	Resultado general de los análisis									■	■	■		
CONCLUSIONES	Síntesis de principales conclusiones generales del estudio realizado.										■	■	■		
RECOMENDACIONES	<i>Elaboración de las recomendaciones para mejorar el sistema de monitoreo de sustancias prohibidas.</i>										■	■	■		
TALLERES O REUNIONES	Talleres o reuniones														
ACTIVIDAD 1	Reunión de coordinación		■			■				■					
ACTIVIDAD 1	Reunión final													■	
ACTIVIDAD 1	Taller de difusión													■	
INFORMES	Informes														
ACTIVIDAD 1	Informe avance 1				■										
ACTIVIDAD 2	Pre-informe final										■				
ACTIVIDAD 3	Informe final													■	

10.9 Anexo 9. Personal participante del proyecto, certificado de actividades realizadas y actas de reuniones de trabajo.

NOMBRE	ACTIVIDAD POR PROFESIONAL O TÉCNICO	HH MENSUAL POR ACTIVIDAD												TOTALES HH	
		MES													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Dra. Javiera Cornejo Kelly	Directora de Proyecto, profesional a cargo del desarrollo del proyecto	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	600
Matias Maturana Medina	Extracción de ítems de ensayo y análisis cromatográfico mediante HPLC MS/MS	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	X	X	300
Ekaterina Valerievna Pokrant Huerta	Interpretación y análisis cromatográfico de resultados, análisis estadístico general, confección y revisión de figuras y tablas relacionadas	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	X	X	160
Roxana Payacan Campos	Seguimiento cláusulas contractuales, tramitación garantías, pagos, cumplimiento de Carta Gantt, tramitación de cualquier requerimiento de carácter administrativo y operativo.	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	360
Jurij Mauricio Wacyk González	Muestreo de alimentos en plantas de alimentos para peces, en Castro, Calbuco, Osorno, Los Ángeles y Coronel	Muestreo previa coordinación												136	



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Dra. Javiera Cornejo Kelly

Actividad Principal: Directora de Proyecto, profesional a cargo del desarrollo del proyecto

Profesión: M.V. PhD En Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Universidad de Chile.

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales	Horas Totales
Gestión directiva del proyecto	50	
Supervisión de correcto desarrollo de los objetivos en el marco del proyecto	50	600
Participación de reuniones con actores del proyecto	50	
Confección y aprobación de informe de avance	50	

JAVIERA
CORNEJO KELLY

Firmado digitalmente por JAVIERA CORNEJO KELLY.

Fecha: 2023.01.30
15:17:07 -03'00'

Javiera Cornejo Kelly

M.V. PhD. Profesor asociado FAVET Directora Proyecto
FIPA 2021-40



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Dr. Jurij Mauricio Wacyk Gonzáles

Actividad Principal: Investigador Facultad de Ciencias Agronómicas Profesión:
Ingeniero Agrónomo, MSc., PhD.

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales	Horas Totales
Profesional a cargo de la supervisión de la toma de Muestras de alimentos Adecuados para la ejecución del proyecto	34	136
Interpretación de los resultados obtenidos en los piensos en cuanto a su aplicación en la cadena productiva	34	
Entrega de recomendaciones para posibles mejoras de dietas de peces.	34	


 Jurij Mauricio Wacyk Gonzáles Ing.
 Agrónomo, MSc., PhD

Investigador Facultad de Ciencias Agronómicas



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Dra. Ekaterina Pokrant Huerta Actividad Principal:

Investigador FARMAVET- FAVET

Profesión: M.V. MSc. PhD en Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales	Horas Totales
Interpretación y análisis cromatográfico de los resultados obtenidos	16	
Análisis estadístico general	16	
Confección y revisión de tablas y figuras relacionadas a los resultados obtenidos y analizados.	16	160
Identificación de potenciales fuentes de riesgo que puedan llevar a la presencia de sustancias no autorizadas en músculo de salmón	16	
Confección y revisión de informe técnico	16	

Ekaterina Pokrant Huerta

M.V. MSc. PhD

Investigadora FARMAVET- FAVET



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Roxana Andrea Payacan Campos

Actividad Principal: Gestión administrativa y financiera

Profesión: MBA – Ingeniera Comercial

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales	Horas Totales
Seguimiento cláusulas contractuales, tramitación garantías, pagos, cumplimiento de Carta Gantt	30	360
Gestión bancaria y administrativa para renovación de garantía que respalda el anticipo por M\$50.000.-	30	
Gestión de boletas de honorarios e informes para solicitar el pago de los profesionales	30	
Recolección de informe de HH de profesionales, con descripción de las actividades y horas ejecutadas	30	


 Roxana Andrea
 Payacán Campos
 13.265.537-5
 12/09/2023 - 15:57
 ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
 CV: 6500b4a506941667154344ff
Roxana Payacan Campos



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

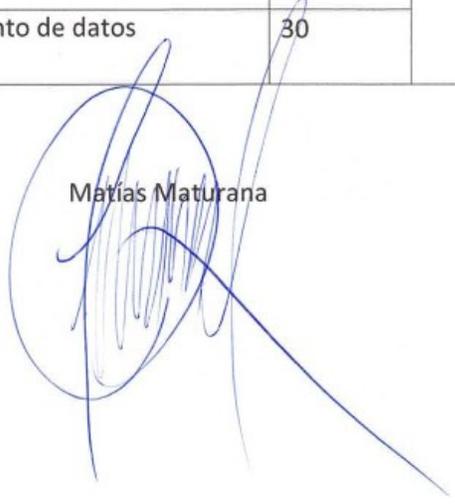
Nombre Profesional: Matías Raúl Maturana Medina

Actividad Principal: Extracción de ítems de Ensayo y análisis cromatográfico mediante HPLC MS/MS

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales	Horas Totales
Validación de metodología analítica	30	300
Ampliación de matrices de la metodología analítica	30	
Extracción, procesamiento y lectura de ítems de ensayo	30	
Análisis y procesamiento de datos	30	

Matías Maturana

A large, stylized handwritten signature in blue ink is written over the printed name 'Matías Maturana'.

ACTA REUNIÓN DE COORDINACIÓN

PROYECTO FIPA N°2021-40

EVALUACIÓN DE LA CADENA PRODUCTIVA DEL SALMÓN PARA IDENTIFICAR POTENCIALES FUENTES Y FACTORES DE RIESGO QUE PUEDAN RESULTAR EN LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS POR EL SERVICIO OFICIAL EN MÚSCULO DE SALMÓN

Jueves 19 de mayo 2022

Lugar: Laboratorio FARMAVET. Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias

Participantes:

- Héctor Escobar Candia. Subdirector. Subdirección de Inocuidad y Certificación SERNAPESCA
- M. Eugenia Olguín Catalán. Certificación y gestión de requisitos de mercado SERNAPESCA
- Betty San Martín Núñez. Responsable del proyecto FARMAVET- FAVET
- Aldo Maddaleno. Investigador FARMAVET- FAVET
- Yester Núñez. Investigador FARMAVET- FAVET
- Jorge Ponce. Profesional de terreno (toma de muestra)
- Hernán Roja. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada
- Pablo Binelli. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada
- Camila Huidobro. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada

Tabla reunión: Coordinación de las actividades a realizar en el proyecto

Desarrollo:

- Presentación de cada uno de los participantes en la reunión
 - El Subdirector de SERNAPESCA, Héctor Escobar plantea la posibilidad mejorar los siguientes puntos del proyecto
 - ✓ Incluir en el muestreo de las muestras las harinas provenientes de la industria avícola, de cerdos y especies acuáticas
 - ✓ Considerar al Laboratorio FARMAVET en el análisis de riesgo
 - ✓ Que el muestreo de los alimentos y harina de pluma comience después de que se realice un avance del análisis de riesgo
- Solicita además presentar el proyecto y los resultados de este a la industria del salmón y realizar reuniones periódicas de coordinación
- La responsable del proyecto Dra. Betty San Martín, recuerda el compromiso de SERNAPESCA de contactarse con las plantas de alimento, con el fin de facilitar la toma de muestras. Señala, además que:

- ✓ El laboratorio no tiene problemas de incorporar en el proyecto el muestreo de las harinas, pero que previamente hay que validar el método en esta nueva matriz
 - ✓ Que el avance del análisis de riesgo se realice lo antes posible, con el fin de no atrasar el análisis de las muestras
 - ✓ Que el laboratorio entregará todas las facilidades para una auditoría dentro del concepto del análisis de riesgo
- El representante de CERES BCA, Hernán Rojas señala que
- Coincide en la importancia de coordinar y socializar el trabajo con la industria salmonera
 - Efectuar un análisis de toda la cadena de producción para identificar los puntos críticos donde se puede producir la contaminación con los peligros estudiados
 - Buscar, en conjunto con la autoridad, opciones de financiamiento para etapas siguientes del proyecto, en especial vinculadas al uso de antimicrobianos

Acuerdos

- El Subdirector de SERNAPESCA, Héctor Escobar, se compromete que dentro de dos semanas realizará los contactos con las plantas de alimento
- Se validará el método analítico en las harinas
- El muestreo en las plantas de alimento incorporará las harinas
- Se considerará en el análisis de riesgo el laboratorio FARMAVET
- El avance del análisis de riesgo se entregará a más tardar a fines de Julio
- Se realizará la primera reunión o seminario con la industria del salmón una vez finalizada las validaciones de los métodos analíticos y entregado el avance del análisis de riesgo

ACTA REUNIÓN DE COORDINACIÓN

PROYECTO FIPA N°2021-40

EVALUACIÓN DE LA CADENA PRODUCTIVA DEL SALMÓN PARA IDENTIFICAR POTENCIALES FUENTES Y FACTORES DE RIESGO QUE PUEDAN RESULTAR EN LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS POR EL SERVICIO OFICIAL EN MÚSCULO DE SALMÓN

FECHA: Miércoles 20 de julio, 2022

LUGAR: Reunión vía Zoom, a las 10 a.m.

PARTICIPANTES:

Rafael Hernández	Director Ejecutivo FIPA
Malú Zavando	Profesional FIPA
Maureen Alcayaga	Profesional SUBPESCA
María Eugenia Olguín	Profesional SERNAPESCA
Diego Fernández	Profesional SERNAPESCA
Betty San Martín	Directora del Proyecto (Facultad de Veterinaria)
Yester Núñez	Profesional del proyecto (Facultad de Veterinaria)
Jorge Ponce	Profesional de terreno (Toma de muestra)
Pablo Binelli	Profesional del proyecto (CERES BCA)
Hernán Rojas	Profesional del proyecto CERES (BCA)

TABLA REUNIÓN: Coordinación de las actividades del proyecto con el director del FIPA, profesionales de SUBPESCA, SERNAPESCA y del proyecto.

DESARROLLO:

- Presentación de cada uno de los participantes en la reunión.
- Intervención de la Dra. Betty San Martín, Directora del proyecto:
 - ✓ Presenta una introducción del proyecto, los objetivos, el plan de muestreo en las plantas de alimento y la carta Gantt.
 - ✓ Señala que se está validando el método analítico en las harinas que se incorporan a los alimentos para salmones. Esto, con el fin de incluir dentro del muestreo, las harinas provenientes de la industria avícola, de cerdos y especies acuáticas, como fue acordado con el Subdirector de SERNAPESCA, Sr. Héctor Escobar en la reunión realizada con fecha 19 de mayo del presente.
 - ✓ Solicita al Sr. Rafael Hernández comunicarse con las plantas de alimento para dar a conocer el proyecto y facilitar la entrada a sus dependencias para la toma de muestras.

- Intervención del Director Ejecutivo del FIPA, Sr. Rafael Hernández:
 - ✓ Solicita una respuesta oficial a las observaciones realizadas a la propuesta.
 - ✓ Señala que la institucionalidad se contactará con las plantas de alimento en el menor plazo posible.
 - ✓ Solicita un ajuste a la carta Gantt considerando las observaciones de la propuesta y lo acordado en las reuniones de coordinación.
 - ✓ Señala que la contraparte técnica del proyecto por parte de SERNAPESCA serán los profesionales María Eugenia Olgún y Diego Fernández y por parte de SUBPESCA Maureen Alcayaga.

- Intervención de María Eugenia Olgún, Profesional SERNAPESCA
 - ✓ Señala que, en la reunión del 19 de mayo del presente, SERNAPESCA solicitó que antes de que se comience con la toma de muestra, que CERES BCA desarrolle una evaluación de riesgo preliminar, que oriente la búsqueda de los contaminantes.
 - ✓ Solicitó que se aclare cuál va a ser la función de SERNAPESCA frente a los resultados del laboratorio.

El Director Ejecutivo del FIPA, Sr. Rafael Hernández responde que este tema será aclarado por la institucionalidad.

Al respecto, la Dra. San Martín recomienda que los resultados de esta investigación podrían servir para futuras medidas a considerar en las normativas.

Intervención de Pablo Binelli Profesional del proyecto (CERES BCA)

- a. Se compromete a entregar la primera parte del análisis de riesgo dentro de los primeros 15 días de agosto, para discusión interna, en el cual estará considerado la toma de muestras y el procesamiento de éstas en los laboratorios.

ACUERDOS:

- Las actas de las reuniones serán realizadas por la Dra. Betty San Martín.
- La institucionalidad se contactará con las plantas de alimento a la mayor brevedad.
- La Dra. Betty San Martín enviará la carta Gantt modificada a más tardar el 29 de julio.
- La Dra. Betty San Martín enviará la respuesta a las observaciones realizadas a la propuesta a más tardar el 29 de Julio.
- Pablo Binelli, profesional de CERES BCA, enviará la primera parte del análisis de riesgo a más tardar el 15 de agosto, para discusión al interior del equipo ejecutor del proyecto (FAVET y CERES BCA).

ACTA REUNIÓN DE COORDINACIÓN

PROYECTO FIPA N°2021-40

EVALUACIÓN DE LA CADENA PRODUCTIVA DEL SALMÓN PARA IDENTIFICAR POTENCIALES FUENTES Y FACTORES DE RIESGO QUE PUEDAN RESULTAR EN LA PRESENCIA DE SUSTANCIAS NO AUTORIZADAS POR EL SERVICIO OFICIAL EN MÚSCULO DE SALMÓN

Viernes 25 de agosto 2023

Lugar: Zoom

Participantes:

- Héctor Escobar Candia. Subdirector. Subdirección de Inocuidad y Certificación SERNAPESCA
- Paulina Isler. Profesional coordinación SERNAPESCA
- Carlos Navarro. Profesional Sanidad SERNAPESCA
- Maureen Alcayaga. Profesional coordinación SUBPESCA
- Malú Zavando. Profesional coordinación SUBPESCA
- Javiera Cornejo. Responsable del proyecto FARMAVET- FAVET
- Aldo Maddaleno. Investigador FARMAVET- FAVET
- Ekaterina Pokrant. Investigador FARMAVET- FAVET
- Marcelo Olivares. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada
- Pablo Binelli. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada
- Camila Huidobro. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada
- Gabriela Asenjo. Profesional CERES BCA. Institución subcontratada

Tabla reunión: Presentación resultados, conclusiones y recomendaciones del Proyecto FIPA N° 2021-40

Desarrollo:

- Presentación de cada uno de los participantes y objetivos de la reunión
- Presentación del proyecto: Javiera Cornejo
- Presentación resultados evaluación de riesgo: Camila Huidobro
- Presentación resultados análisis de laboratorio: Ekaterina Pokrant
- Presentación conclusiones y recomendaciones: Pablo Binelli
- Consultas y discusión

Acuerdos

- Consultas y discusión:
 - Se considera que los resultados obtenidos evidencian fallas importantes en los sistemas de monitoreo de las empresas fabricantes de piensos para salmónes.
 - Existe coincidencia en que hay mucho por hacer en términos de auto control de la industria del salmón, tanto de los productores de salmónes como de los proveedores críticos (fábricas de piensos).
 - Se coincide en que es necesario avanzar en la coordinación de los servicios públicos

con responsabilidades en la aplicación del Reglamento de Alimentos para Animales:
SAG y SERNAPESCA.

- Se acuerda fecha, contenidos y participantes del taller final de difusión del proyectos



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Dra. Javiera Cornejo Kelly

Actividad Principal: Directora de Proyecto, profesional a cargo del desarrollo del proyecto

Profesión: M.V. PhD En Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Universidad de Chile.

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales
Gestión directiva del proyecto	50
Supervisión de correcto desarrollo de los objetivos en el marco del proyecto	50
Participación de reuniones con actores del proyecto	50
Confección y aprobación de informe de avance	50

JAVIERA
CORNEJO KELLY



Firmado digitalmente por JAVIERA CORNEJO KELLY

Fecha: 2023.01.30

15:17:07 -03'00'

Javiera Cornejo Kelly

M.V. PhD. Profesor asociado FAVET Directora Proyecto FIPA 2021-40



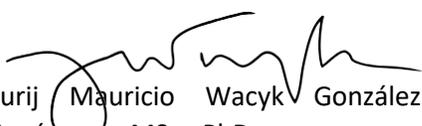
CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Dr. Jurij Mauricio Wacyk Gonzáles

Actividad Principal: Investigador Facultad de Ciencias Agronómicas Profesión:
Ingeniero Agrónomo, MSc., PhD.

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales
Profesional a cargo de la supervisión de la toma de muestras de alimentos adecuados para la ejecución del proyecto	34
Interpretación de los resultados obtenidos en los piensos en cuanto a su aplicación en la cadena productiva	34
Entrega de recomendaciones para posibles mejoras de dietas de peces.	34


Jurij Mauricio Wacyk Gonzáles Ing.
Agrónomo, MSc., PhD

Investigador Facultad de Ciencias Agronómicas



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Dra. Ekaterina Pokrant Huerta Actividad Principal:

Investigador FARMAVET- FAVET

Profesión: M.V. MSc. PhD en Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales
Interpretación y análisis cromatográfico de los resultados obtenidos	16
Análisis estadístico general	16
Confección y revisión de tablas y figuras relacionadas a los resultados obtenidos y analizados.	16
Identificación de potenciales fuentes de riesgo que puedan llevar a la presencia de sustancias no autorizadas en músculo de salmón.	16
Confección y revisión de informe técnico	16

Ekaterina Pokrant Huerta

M.V. MSc. PhD

Investigadora FARMAVET- FAVET



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Roxana Andrea Payacan Campos Actividad

Principal: Gestión administrativa y financiera Profesión: MBA –
Ingeniera Comercial

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales
Seguimiento cláusulas contractuales, tramitación garantías, pagos, cumplimiento de carta Gantt	30
Gestión bancaria y administrativa para renovación de garantía que respalda el anticipo por M\$50.000.-	30
Gestión de boletas de honorarios e informes para solicitar el pago de los profesionales	30
Recolección de informe de HH de profesionales, con descripción de las actividades y horas ejecutadas	30


 Roxana Andrea
 Payacán Campos
 13.265.537-5
 30/01/2023 - 11:48
 ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
 CV: 63d7d8a7a942eb37f686354

Roxana Payacan Campos



CERTIFICADO DE ACTIVIDADES REALIZADAS

Nombre Profesional: Matías Raúl Maturana Medina

Actividad Principal: Extracción de ítems de ensayo y análisis cromatográfico mediante HPLC MS/MS.

Profesión: Médico Veterinario

Proyecto: FIPA 2021-40 Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio oficial en músculo de salmón

Actividades realizadas	Horas Mensuales
Validación de metodología analítica.	30
Ampliación de matrices de la metodología analítica.	30
Extracción, procesamiento y lectura de ítems de ensayo.	30
Análisis y procesamiento de datos.	30

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dashed line. The signature is highly stylized and cursive, with several loops and flourishes.

10.10 Anexo 10. Taller Final

1) Objetivo

Difundir los resultados, conclusiones y recomendaciones del Proyecto FIPA 2021-40: Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio, con los representantes de la industria salmonera nacional.

2) Fecha

Lunes 04 de septiembre 2023, de 10:00 a 12:00 hrs.

3) Metodología

El taller tuvo una duración de dos horas, en las que se presentaron los resultados y conclusiones de la Evaluación de Riesgos y, posteriormente las recomendaciones entregadas por el equipo. Esos resultados fueron discutidos con los asistentes. La sesión se llevó a cabo virtualmente por la plataforma Zoom. La jornada se dividió como se presenta a continuación:

Ítems	Responsable	Duración (Minutos)
Presentación de los participantes	Marcelo Olivares	10
Presentación del proyecto	Javiera Cornejo	15
Presentación metodología y resultados evaluación de riesgo	Camila Huidobro	15
Presentación metodología y resultados análisis de laboratorio	Javiera Cornejo / Aldo Maddaleno	25
Presentación de recomendaciones	Pablo Binelli	20
Consultas y discusión	Marcelo Olivares (Moderador)	35



TALLER DE DIFUSIÓN Proyecto FIPA 2021-40

“Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el Servicio”

Directora: Javiera Cornejo Kelly
Laboratorio Farmacología Veterinaria (FARMAVET)
Universidad de Chile, Santiago, Chile
Septiembre, 2023



SOLUCIONES EN SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

PROYECTO FIPA N°2021-40

Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio

EVALUACIÓN DE RIESGOS

Septiembre 2023



Validación de metodologías analíticas



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



Análisis de las muestras desde las plantas de piensos para la búsqueda activa de colorantes no autorizados.



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



Facultad **faveT**
Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile

CERES
B C V

SOLUCIONES EN SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

PROYECTO FIPA N°2021-40

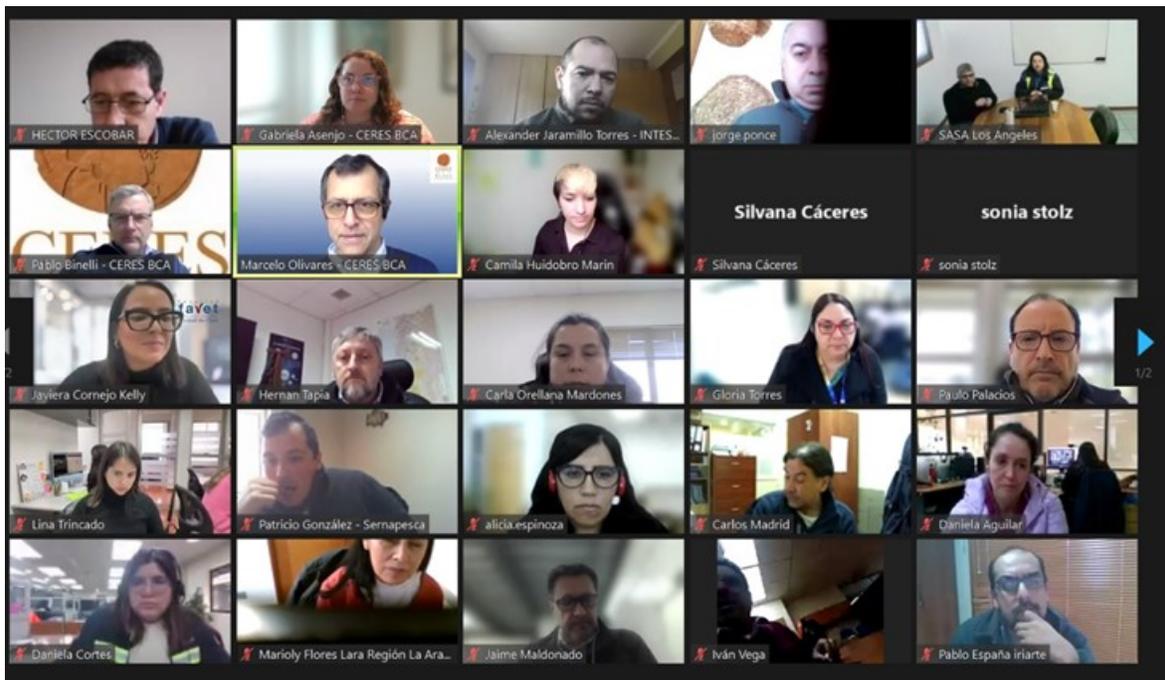
Evaluación de la cadena productiva del salmón para identificar potenciales fuentes y factores de riesgo que puedan resultar en la presencia de sustancias no autorizadas por el servicio

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Septiembre 2023

e. Asistentes

- Industria: especialmente gremios, representantes de las empresas productoras de alimentos y de las salmoneras.
- Autoridades: especialmente de SUBPESCA, SERNAPESCA Y FIPA



Informe Final Proyecto FIPA 2021-40

The image shows a screenshot of a Zoom meeting grid with 25 participants. The participants are arranged in a grid that is 5 columns wide and 5 rows deep. Each tile contains a video feed (or a placeholder) and the name of the participant. The names are as follows:

alicia espinoza	Carlos Madrid	Daniela Aguilar	Daniela Cortes	Marioly Flores Lara Región La Ara...
Jaime Maldonado	Iván Vega	Pablo España Iriarte	Hernan Tapia	RuBen Pinochet Chile S Pesca-Acul...
Lorena.barrient... 2/2 Lorena.barrientos Camanchaca	 Jurij Wacyk	scatalan scatalan	Vicente Sánchez... Vicente Sánchez González	Maureen Alcaya... 2/2 Maureen Alcayaga - Subpesca
Pablo Salgado Pablo Salgado	Ignacia Soto Ignacia Soto	Sebastian Figue... Sebastian Figueroa	stefan.dipietran... stefan.dipietranтони	Annei Mansilla Annei Mansilla
CARLOS Feliu CARLOS Feliu	Rolando Rolando	gisselle fuentes gisselle fuentes	iPhone de Aldo iPhone de Aldo	Manuela Isabel... Manuela Isabel Pérez Aragón - Din...