

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**IMPLICACIONES DEL ETIQUETADO
INCORRECTO EN ESPECIES DE
MERLUCCIUS CON DISTINTOS
NIVELES DE METALES PESADOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

POR

JUAN LUIS LÓPEZ SÁNCHEZ

JULIO, 2021





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR: EVA GARCÍA VÁZQUEZ y ALBA ARDURA GUTIÉRREZ
Dr. D. (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. **Juan Luis López Sánchez** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 15^a promoción curso 2020-2021.

Oviedo, 8 de JULIO de 2021

D. (Tutor) EVA GARCÍA VÁZQUEZ ; ALBA ARDURA GUTIÉRREZ

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega
Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mis tutoras Eva García Vázquez y Alba Ardura Gutiérrez por todo lo que he aprendido gracias a ellas y por el apoyo que me han dado durante la realización de este TFM.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS-EXPERIMENTALES	12
2.1. Género <i>Merluccius</i>. Biología, hábitat, distribución geográfica, capturas	12
2.1.1. <i>Merluccius merluccius</i>	15
2.1.2. <i>Merluccius senegalensis</i>	18
2.1.3. <i>Merluccius polli</i>	19
2.1.4. <i>Merluccius capensis</i> / <i>Merluccius paradoxus</i>	21
2.1.5. <i>Merluccius hubbsi</i>	23
2.2. Metales pesados. Generalidades	25
2.2.1. Cadmio	27
2.2.2. Plomo	27
2.2.3. Arsénico	28
2.2.4. Mercurio	29
2.2.5. Níquel	30
2.2.6. Cobre	31
2.2.7. Zinc	32
2.2.8. Cromo	33
2.3. Técnicas basadas en la identificación de ácidos nucleicos	34
2.3.1. Extracción de ADN	34
2.3.2. Amplificación del ADN mediante PCR	35
2.3.3. Región control del ADN mitocondrial	37
2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa	38
2.3.5. Secuenciación del ADN	39

2.3.6. BioEdit	41
2.3.7. BLAST	42
2.4. Análisis de metales pesados	44
2.4.1. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente ...	44
2.4.2. PAST. Análisis estadístico	45
3. METODOLOGÍA	47
3.1. Muestras	47
3.2. Metodología usada para la detección e identificación de las muestras ..	48
3.2.1. Extracción del ADN	48
3.2.2. Amplificación del ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
3.2.3. Visualización en gel de agarosa	50
3.2.4. Secuenciación del ADN, alineamiento e identificación	52
3.3. Metodología empleada para la cuantificación de metales pesados	54
3.3.1. Preparación y digestión de las muestras	54
3.3.2. Cuantificación de las concentraciones de metales pesados	54
3.4. Método de búsqueda de información	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1. Resultados del etiquetado incorrecto	56
4.2. Resultados de metales pesados	58
4.2.1. Validación de las medidas	59
4.2.2. Análisis de los resultados con PAST	60
4.2.3. Concentración de metales pesados frente a los límites máximos permitidos	64
4.2.4. Ingesta semanal máxima tolerable	65
5. CONCLUSIONES	67
6. BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXO I	80
ANEXO II	83
ANEXO III	86

RESUMEN

El etiquetado incorrecto es una amenaza para la gestión adecuada de las especies marinas, ya que impide determinar de manera precisa su estado de conservación, y a la vez constituye un engaño para el consumidor que está adquiriendo una especie que realmente no es la que está demandando. En el presente trabajo se pone el foco en especies del género *Merluccius* ya que es una de las especies más consumidas a nivel global y una de las que más etiquetado incorrecto sufre, especialmente con fines económicos. En la muestra analizada se obtuvo un 32,81 % de etiquetado incorrecto, destacando principalmente aquel en el que no se especificaba la especie (*Merluccius spp.*).

Los metales pesados implican numerosos riesgos para la población, dependiendo del metal y de la ingesta, en especial aquellos metales exógenos procedentes de fuentes antrópicas, que no forman parte del metabolismo normal, como son: el arsénico, mercurio, cadmio y plomo. Gran parte de esos metales acaban en los ecosistemas marinos, bioacumulándose en los diferentes organismos y alcanzando, generalmente, niveles más elevados conforme se asciende en la cadena trófica.

A parte del análisis de etiquetado incorrecto, este estudio también se centra en examinar el contenido de diferentes metales pesados presente en los individuos que componen la muestra de merluza, un pez demersal y depredador intermedio que puede ser un gran bioindicador.

Se analizó: mercurio, cadmio, arsénico, plomo, zinc, níquel, cromo y cobre; obteniéndose diferencias significativas entre especies para el mercurio, cadmio y arsénico. *M. merluccius* y *M. polli* presentaban una mayor concentración de mercurio, *M. hubbsi* albergaba más cadmio que el resto y *M. merluccius* se diferenciaba por su concentración en arsénico. Todas las especies de merluzas superaban el valor máximo permitido de arsénico, mientras que 3 individuos de *M. polli* superaban los niveles de mercurio permitidos.

ABSTRACT

Mislabeled is a threat to the proper management of marine species, since it prevents a precise determination of their conservation status, and at the same time provides deceptive information to the consumer. This Masters Dissertation focuses on one of the most consumed species around the world, which also suffers the most from mislabeling, especially for economic purposes: the *Merluccius*. The analyzed sample unveiled a 32.81% of incorrect labeling, mainly due to a non-specification of the species (*Merluccius spp.*).

Depending on the type and the intake quantity, heavy metals are responsible for numerous health risks among the population, especially exogenous metals from anthropic sources, which are not part of natural metabolism, such as arsenic, mercury, cadmium and lead. A large part of these metals ends up in marine ecosystems, bioaccumulating throughout different organisms and generally with more presence at higher trophic levels.

This study also focuses on examining the content of different heavy metals present in the specimens that make up the hake sample, a groundfish and intermediate predator that can serve as a great bioindicator.

The presence of mercury, cadmium, arsenic, lead, zinc, nickel, chromium and copper was analyzed, obtaining significant differences between groups of species for mercury, cadmium and arsenic. *M. merluccius* and *M. polli* had a higher concentration of mercury, *M. hubbsi* carried more cadmium than the rest, and *M. merluccius* was differentiated by its concentration of arsenic. All species of hake exceeded the maximum allowable value of arsenic, while 3 individuals of *M. polli* exceeded the allowable levels of mercury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía merluza (ejemplo: <i>M. paradoxus</i>)	12
Figura 2. Zona del océano donde habita la merluza	13
Figura 3. Distribución geográfica de las diferentes especies del género <i>Merluccius</i> ..	14
Figura 4. Áreas de pesca de la FAO	15
Figura 5. <i>M. merluccius</i>	16
Figura 6. Área de distribución geográfica de <i>M. merluccius</i>	16
Figura 7. Área 27, subzona VIII con sus diferentes divisiones: a, b, c, d y e. Costas de Galicia y Golfo de Vizcaya	17
Figura 8. Capturas mundiales anuales en toneladas de <i>M. merluccius</i>	17
Figura 9. <i>M. senegalensis</i>	18
Figura 10. Área de distribución geográfica de <i>M. senegalensis</i>	18
Figura 11. Capturas mundiales anuales en toneladas de <i>M. senegalensis</i> / <i>M. polli</i>	19
Figura 12. <i>M. senegalensis</i> y <i>M. polli</i>	20
Figura 13. Área de distribución geográfica de <i>M. polli</i>	20
Figura 14. <i>M. capensis</i>	21
Figura 15. <i>M. paradoxus</i>	21
Figura 16. Área de distribución geográfica de <i>M. capensis</i> / <i>M. paradoxus</i>	22
Figura 17. <i>M. hubbsi</i>	23
Figura 18. Área de distribución geográfica de <i>M. hubbsi</i>	24
Figura 19. Capturas mundiales anuales en toneladas de <i>M. hubbsi</i>	25
Figura 20. Diferentes compuestos orgánicos en los que se encuentran metales pesados	26
Figura 21. Ejemplo de biomagnificación a lo largo de la red trófica	26
Figura 22. Componentes principales y etapas de la PCR	37

Figura 23. ADN mitocondrial	37
Figura 24. Electroforesis horizontal. Vista lateral	39
Figura 25. Método de secuenciación Sanger	40
Figura 26. Cromatograma visualizado con BioEdit	41
Figura 27. Parte de la secuencia que se eliminaría por presentar picos mal definidos	42
Figura 28. Introducción de la secuencia problema en el programa	43
Figura 29. Resultados obtenidos con el BLAST para una secuencia concreta	43
Figura 30. ICP-MS	45
Figura 31. Número de muestras y porcentajes para cada zona FAO	47
Figura 32. Número de muestras y porcentajes para cada denominación comercial	48
Figura 33. Programa usado para la amplificación del marcador de la región control	50
Figura 34. Uno de los geles que se prepararon para visualizar el producto de la PCR sin resultados	51
Figura 35. Uno de los geles que se prepararon para visualizar el producto de la PCR donde se observan resultados tras la dilución 1/10 de los productos de la extracción de ADN	52
Figura 36. Cromatograma de una de las secuencias leídas en BioEdit. Se aprecia a la izquierda una parte de la secuencia con mucho ruido de fondo que habría que eliminar y a la derecha una parte bien definida	53
Figura 37. Alineamientos de una de las secuencias del estudio (Query) con diferentes secuencias de la base de datos GenBank (Sbjct)	53
Figura 38. Espectrómetro Agilent 7900	54
Figura 39. Representación del número de especies y porcentajes de cada patrón de etiquetado incorrecto sobre las muestras mal etiquetadas	57

Figura 40. Comparación del contenido medio de Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de <i>M. hubbsi</i> , <i>M. merluccius</i> y <i>M. polli</i>	62
Figura 41. Comparación del contenido medio de Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de las especies de <i>Merluccius</i>	63
Figura 42. Comparación del contenido medio de As ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de las especies de <i>Merluccius</i>	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Precio medio de la merluza por especie en el mercado español (2013)	15
Tabla 2. Volúmenes y concentraciones para cada componente del mix de PCR	49
Tabla 3. Muestras que no corresponden con la especie que se representa en el etiquetado	56
Tabla 4. Media del contenido de los distintos metales pesados esenciales, media de la RSD (%) para las diferentes especies y comparación con el músculo patrón ERM®-BB422	59
Tabla 5. Media del contenido de los distintos metales pesados no esenciales, media de la RSD (%) para las diferentes especies y comparación con el músculo patrón ERM®-BB422	59
Tabla 6. Media del contenido de los distintos metales pesados esenciales y de la SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para las diferentes especies	60
Tabla 7. Media del contenido de los distintos metales pesados no esenciales y de la SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para las diferentes especies	60
Tabla 8. Metales que presentan diferencias significativas entre especies	61
Tabla 9. Diferencias significativas para el Hg entre cada par de especies tras la prueba Tukey con PAST	61
Tabla 10. Diferencias significativas para el Cd entre cada par de especies tras la prueba Tukey con PAST	62

Tabla 11. <i>Diferencias significativas para el As entre cada par de especies tras la prueba Tukey con PAST</i>	63
Tabla 12. <i>Comparación del contenido medio de cada metal pesado ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para las diferentes especies frente al límite máximo permitido (LM) en ($\mu\text{g}/\text{kg}$)</i>	65
Tabla 13. <i>Ingesta de pescado semanal máxima tolerable en kg, teniendo en cuenta cada metal y especie</i>	66

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha visto incrementado el consumo de pescado debido, en especial, al creciente interés de la población mundial por alimentarse de forma saludable (Ghidini et al., 2019). Mientras que en el año 1961 la ingesta media de pescado por persona era de 9,0 kg, en 2018 la cantidad se elevaba hasta 20,5 kg (FAO, 2020). Asimismo, las capturas marinas a nivel global no han parado de ascender, llegando en 2018 a las 84,4 millones de toneladas (FAO, 2020); siendo el producto más comercializado a nivel global (Pardo et al., 2016).

Como consecuencia de este incremento de la demanda global, las cadenas de suministro de pescado resultan cada vez más complejas para satisfacer las necesidades de la población, facilitando la posible pérdida de la trazabilidad (Lewis & Boyle, 2017) en alguno de sus pasos: la pesca del producto, el transporte hasta el destinatario inicial, el procesamiento o envasado, llegada a los mayoristas, reparto a los minoristas y restaurantes y, en última instancia, la recepción del producto por parte de los consumidores (Shehata et al., 2019). La complejidad de las cadenas de suministro acaba favoreciendo las actividades fraudulentas, como consecuencia de una vigilancia que resulta insuficiente (Manning & Soon, 2014), fomentando la comercialización de productos ilegales no declarados y no regulados (INDNR) (Miller & Sumaila, 2014). De hecho, el pescado y sus derivados son una de las categorías de alimentos más susceptibles al fraude (FAO, 2018).

Entre las prácticas fraudulentas con pescado que más se repiten se encuentra el etiquetado incorrecto, que tiene lugar cuando se vende un producto con un nombre distinto al de la especie original (Spencer & Bruno, 2019), debido principalmente al registro erróneo, de forma accidental, de especies que se pescan juntas, y al fraude intencionado con el objetivo de llegar a las ventas previstas, así como para alcanzar mayores ganancias cuando la especie que se presenta en el etiquetado tiene un valor económico superior a la sustituta (Blanco-Fernandez et al., 2021). La industria pesquera es uno de los sectores en los que más casos de fraude por etiquetado erróneo se han notificado, siendo algo muy frecuente, como indican diferentes publicaciones científicas (Galal-Khallaf et al., 2016; Guardone et al., 2017; Stamatis et al., 2015; Warner et al., 2019; entre otros). Asimismo, son más susceptibles al fraude aquellas especies que se venden procesadas como filetes congelados, ahumados o precocidos, ya que se pierden

las características morfológicas, volviéndose muy difícil su identificación (Morán & Garcia-Vazquez, 2006).

Todo ello, a pesar de que los gobiernos presentan distintas normativas nacionales e internacionales para controlar la producción y conservación de los alimentos (Galal-Khallaf et al., 2014), como es el caso del reglamento de la UE (UE 1379/2013) que indica que las etiquetas deben presentar el nombre científico de la especie de captura, su denominación comercial (nombre común), método de producción, indicación de la zona de captura y fecha de duración mínima, en el caso de envasados. No obstante, a pesar de todas esas exigencias, esta normativa no siempre se cumple observando como en diferentes países, como el caso de España o Italia, existen etiquetas con información incompleta en productos pesqueros (Blanco-Fernandez et al., 2021).

Las consecuencias del etiquetado incorrecto repercuten en el consumidor y el medio ambiente. Al primero se le engaña, al venderle una especie que no demanda, lo que influye directamente en su derecho a decidir si evita comprar una especie por estar ligada a problemas de salud y/o por contribuir a su conservación (Delpiani et al., 2020). En el caso del medio ambiente, el etiquetado erróneo contribuye a impedir una gestión adecuada de las especies (Galal-Khallaf et al., 2016), lo que resulta en una estimación inexacta de las poblaciones de peces, poniendo en riesgo: la sostenibilidad de la pesca, el agotamiento de los recursos pesqueros y la extinción de especies sobreexplotadas (Agnew et al., 2009).

En este proyecto, se pondrá el foco en el género *Merluccius* (Rafinesque, 1810), de la familia Merlucciidae y del orden Gadiformes, que abarca 12 especies que habitan en la mayor parte de las plataformas continentales, exceptuando las costas asiáticas del océano Pacífico (Lloris et al., 2003). La merluza es uno de los pescados con mayor interés por su abundancia, calidad de carne e importancia económica (Pérez et al., 2018). Su comercio se basa exclusivamente en capturas marinas, ya que aún no se producen por acuicultura (Muñoz-Colmenero et al., 2015). En el año 2015 se pescaron 1.210.812 toneladas en todo el mundo, siendo el 70 % de las capturas en el océano Atlántico; reflejándose un descenso de 104.390 capturas anuales, respecto a 2013 (Secretaría General de Pesca, 2017). Atendiendo a España, se trata del primer productor de merluza (*Merluccius merluccius*) de la UE, presentando el 58 % de las capturas totales; exportó en el año 2016 62.370 toneladas e importó 130.670 toneladas (Secretaría General de Pesca, 2017), no cubriéndose las necesidades de mercado con merluza nacional. Lo anterior tiene relación

directa con el hecho de que las poblaciones de merluza mundial han ido disminuyendo en las últimas décadas a causa de la sobrepesca (Pitcher & Alheit, 1995), lo que ha llamado la atención de los investigadores relacionados con el sector pesquero y de la industria alimentaria (Pérez et al., 2018).

Para los consumidores no todas las especies son apreciadas de igual manera, como es el caso de *Merluccius merluccius* que presenta mejores características organolépticas en comparación con otras especies del mismo género como son *Merluccius australis* o *Merluccius hubbsi* (García-Soto et al., 2013). Además de la variación del valor de las especies que tiene para los consumidores, también existen importantes fluctuaciones económicas entre una especie y otra, que al ser procesadas (mediante filetes congelados, por ejemplo) y al presentar una morfología similar se vuelven indistinguibles para los consumidores (Pérez et al., 2018).

El etiquetado incorrecto de las especies de merluza puede ocurrir por un lado de forma accidental, debido a especies de merluza simpátricas, que presentan un solapamiento en sus áreas de distribución geográfica, como el caso de *Merluccius capensis* y *Merluccius paradoxus* y, por ende, se pescan a la vez; resultando prácticamente imposible su diferenciación y desencadenando un etiquetado erróneo (Blanco-Fernandez et al., 2021; Pitcher & Alheit, 1995). Por otro lado, también tienen lugar sustituciones de forma deliberada entre especies alopátricas de *Merluccius* (Blanco-Fernandez et al., 2021).

Para poner fin a esta problemática se puede recurrir a métodos de identificación de ADN, siendo la secuenciación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) el procedimiento más usado en la identificación de peces (Griffiths et al., 2014) y el que se va a emplear en este proyecto. Estos métodos permiten el reconocimiento inequívoco y rápido de especies, aunque se traten de productos procesados, y constituye una herramienta eficaz para el disminuir el etiquetado incorrecto, como sugiere el estudio de Mariani et al. (2014) para el bacalao en Irlanda; sin embargo aún no se ha incluido la autenticación de ADN como procedimiento rutinario para evitar el etiquetado incorrecto (Blanco-Fernandez et al., 2021).

Así pues, el primer objetivo del trabajo va a ser detectar la tasa de etiquetado erróneo de la muestra de 64 merluzas que se va a evaluar, estableciendo una serie de conclusiones a partir de los resultados obtenidos.

Por otra parte, se debe afrontar en un futuro cercano la contaminación de los ecosistemas marinos, causada por los impactos ambientales que provoca el ser humano mediante la presión que ejerce sobre estos ambientes con diversas actividades, como son la agricultura, industria o minería, que producen un aumento del contenido de metales pesados, que se suman a la cantidad ya presente de forma natural en el ambiente (Djedjibegovic et al., 2020).

El término metales pesados hace referencia a aquellos elementos con una densidad comprendida entre 4 g/cm^3 y 7 g/cm^3 y cuya peligrosidad radica en que no se degradan, se acumulan en los seres vivos y conforme se va ascendiendo en la cadena trófica aumenta la concentración de estos, es decir, se biomagnifican (los organismos van acumulando metales pesados presentes en los organismos situados en escalones inferiores de la red trófica) (Ministerio para la Transición Ecológica, 2016; Rajeshkumar & Li, 2018). Los metales pesados son un peligro para la salud y el medio ambiente, sin embargo, algunos de ellos son necesarios para los seres vivos a bajas concentraciones como es el caso del zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) o el magnesio (Mg), que participan en procesos biológicos esenciales. Otros en cambio, como cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg) o plomo (Pb), no forman parte de las células, ni en trazas, por lo que aunque se encuentren presentes a bajas concentraciones pueden resultar muy tóxicos (Salvaggio et al., 2020).

El ecosistema acuático se trata del medio que más contaminación presenta, siendo el destino final de gran parte de los xenobióticos, entre los que se encuentran los metales pesados, que se vierten directamente al mar o a ríos; que finalmente desembocan en el mar. (Copat et al., 2018).

Los peces han ido adquiriendo un gran interés en los últimos años como bioindicadores, por su capacidad de acumulación de metales pesados; principalmente en el tejido muscular, permitiendo evaluar la seguridad del ecosistema marino, así como los posibles riesgos que supone la ingesta de pescado, presente en una zona concreta, para la población (Salvaggio et al., 2020). Gran parte del interés que genera evaluar los riesgos que desencadenan los metales pesados en los organismos, surge a raíz de la catástrofe que tuvo lugar en el año 1956 en Minamata (Japón) cuando gran parte de su población se intoxicó tras la ingesta de pescado y mariscos que habían acumulado metilmercurio tras vertidos en aguas residuales de una industria química, provocando graves afecciones como lesiones cerebrales o ataxia (Harada, 1995).

Estos elementos presentan una menor biodisponibilidad en el medio marino, en comparación con el agua dulce (García-Vázquez et al., 2021), tendiendo a acumularse en los sedimentos situados en el fondo, lo que afecta directamente a la biota bentónica expuesta a los sedimentos, ya que es más susceptible de bioacumular metales pesados (Ansari et al., 2003). El nivel de bioacumulación de los metales pesados en los peces depende de diversos factores bióticos y abióticos, como el hábitat biológico, la temperatura, el pH del agua, la edad de los peces, la masa corporal o el género (Has-Schön et al., 2006).

Los peces pelágicos, a pesar de vivir gran parte de su vida sin estar en contacto con el fondo marino nadando a través de las aguas superficiales, pueden aglomerar concentraciones de metales elevadas, como consecuencia de la biomagnificación que tiene lugar a través de la red trófica, puesto que algunos depredadores pelágicos, como es el caso del atún, se sitúan en niveles tróficos superiores (Naccari et al., 2015). Las principales fuentes de biomagnificación son el agua y los sedimentos (Rajeshkumar & Li, 2018). Los peces demersales que viven en aguas profundas presentan un contacto estrecho con el bentos (Pennino & Bellido, 2012). Este hecho desencadena que puedan absorber metales de los sedimentos, además se tratan de especies generalmente depredadoras que, por ende, se sitúan en niveles superiores de la red trófica, pudiendo presentar una alta bioacumulación y biomagnificación que supera a la de otras especies (Naccari et al., 2015; Stergiou & Karpouzi, 2002).

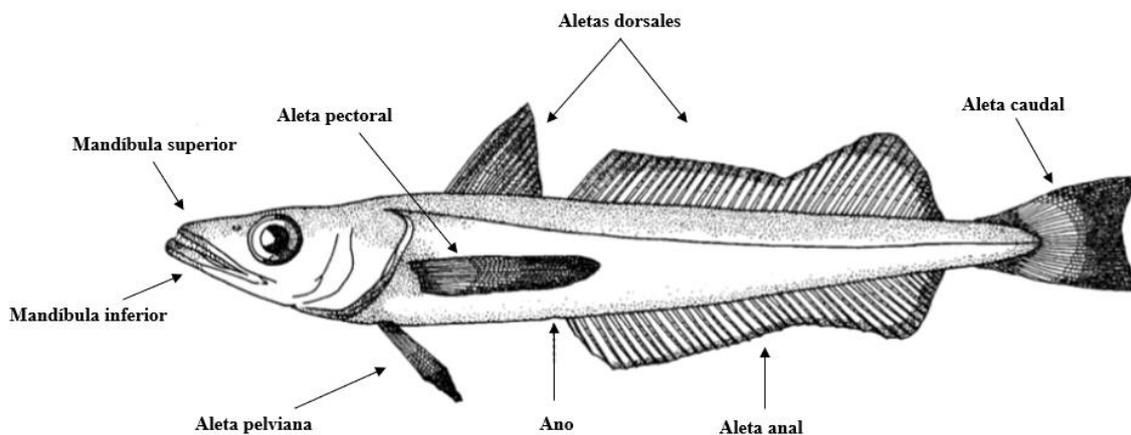
Anteriormente se han hecho varios estudios centrándose sobre todo en *Merluccius merluccius* (Ozuni et al., 2014; Zyadah & Chouikhi, 2009; Salvaggio et al., 2020) dada su importancia comercial y valor económico, pero hay muy pocos relacionados con el resto de especies de merluzas. La merluza se trata de un pez demersal y depredador intermedio, por lo que el análisis del contenido de metales en diferentes especies de este género puede aportar valiosa información para evaluar la contaminación presente en una zona de captura concreta, así como los riesgos que conlleva su consumo para los seres humanos. El segundo objetivo del trabajo se centrará en este análisis, complementando los trabajos existentes y ampliando el conocimiento sobre esta problemática

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS-EXPERIMENTALES

2.1 Género *Merluccius*. Biología, hábitat, distribución geográfica, capturas

La morfología de las especies del género *Merluccius* (orden Gadiformes, familia Gádidos) se caracteriza por: una cabeza grande, plana en la zona superior; una boca grande que presenta numerosos dientes con forma de gancho y una mandíbula inferior más prominente que la superior; un cuerpo alargado y fino; dos aletas pectorales largas y estrechas; dos aletas pelvianas ubicadas delante de las pectorales; dos aletas dorsales, la situada en la parte anterior es corta y tiene forma triangular, mientras que la posterior presenta forma ensanchada y se extiende hasta la cola; una aleta anal larga y angosta; y la aleta caudal en forma de horquilla. Respecto a la coloración, se caracteriza por presentar la piel gris azulada en la zona dorsal y blanca plateada en la zona ventral (Figura 1). (Secretaría General de Pesca, 2017).

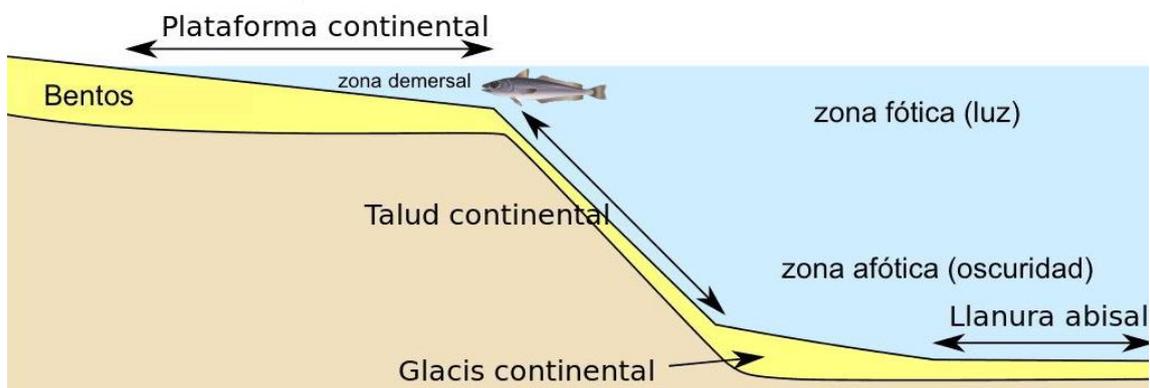
Figura 1. Anatomía merluza (ejemplo: M. paradoxus) (Modificado de: Cohen & Scialabba, 1990).



En cuanto al tamaño, las merluzas que habitan en aguas frías pueden llegar a medir 1 metro, mientras que las de aguas cálidas suelen rondar los 32 cm (Cohen & Scialabba, 1990).

Las merluzas son especies generalmente demersales que habitan en la plataforma continental y en la parte superior del talud (Figura 2), realizando migraciones verticales hacia la superficie por la noche para alimentarse (Cohen & Scialabba, 1990). La profundidad a la que suelen vivir se sitúa entre los 150 metros y los 600-1000 metros (Secretaría General de Pesca, 2017).

Figura 2. Zona del océano donde habita la merluza (Modificado de <https://www.geoenciclopedia.com/zonas-y-profundidades-del-oceano/>).

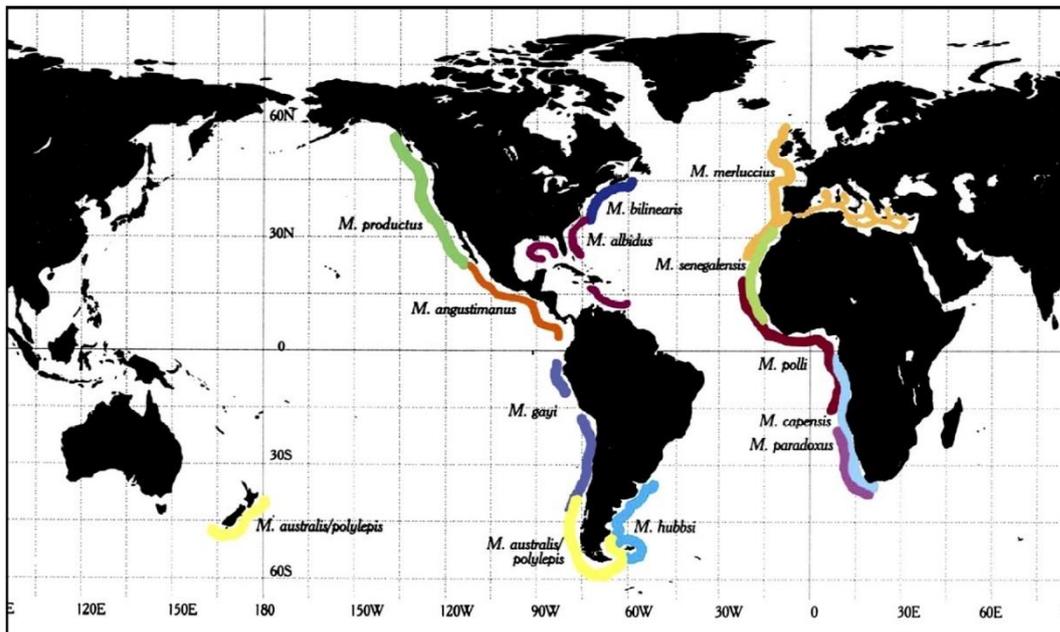


Son peces carnívoros que varían su alimentación en función de la etapa de vida en la que se encuentren, los individuos juveniles se alimentan de animales planctónicos como crustáceos y peces (Cohen & Scialabba, 1990), mientras que los individuos adultos suelen comer peces pelágicos de menor tamaño y calamares (Secretaría General de Pesca, 2017); además se han notificado casos de canibalismo entre individuos de la misma especie, como en el caso de *M. hubbsi* (Ocampo Reinaldo et al., 2011).

Asimismo, llevan a cabo migraciones estacionales de primavera a verano hacia latitudes más altas y zonas costeras, y hacia latitudes más bajas y aguas más profundas de otoño a invierno; siendo la puesta de huevos de primavera a verano en la mayor parte de las especies (Cohen & Scialabba, 1990). Las migraciones se caracterizan por ser de largo recorrido lo que fomenta las superposiciones geográficas (Quinteiro et al., 2000) lo que promueve que especies simpátricas como *M. capensis* y *M. paradoxus* se pesquen juntas (Pitcher & Alheit, 1995).

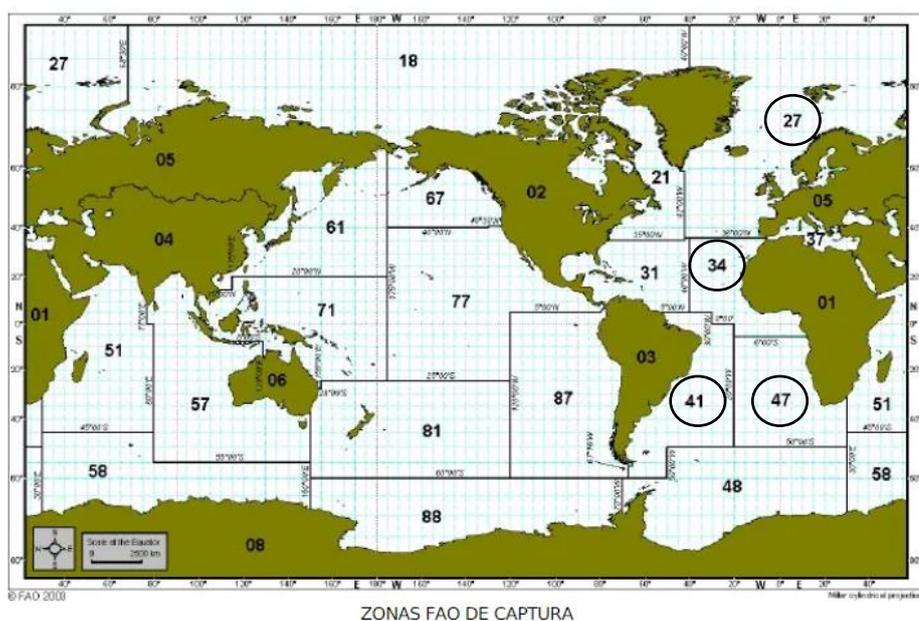
El género *Merluccius* está compuesto por 12 especies: *M. merluccius* que habita a lo largo de las costas de Europa; *M. senegalensis*, *M. polli*, *M. capensis* y *M. paradoxus* en África occidental; *M. bilinearis* y *M. albidus* en el noreste de América; *M. hubbsi* y *M. australis* en el sureste de América; *M. productus* y *M. angustimanus* en el noroeste de América; y *M. gayi* y *M. australis* en el suroeste de América, está última también presente al este de Nueva Zelanda (Figura 3) (Campo et al., 2007).

Figura 3. Distribución geográfica de las diferentes especies del género *Merluccius*. (Pitcher & Alheit, 1995; modificado por Castillo, 2002).



Asimismo, la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) establece 19 áreas pesqueras distintas a lo largo de la masa oceánica (FAO, 2019) (Figura 4), de las que tienen especial interés para este trabajo: la zona 27 (*M. merluccius*); 34 (*M. senegalensis* y *M. polli*); 41 (*M. hubbsi*) y 47 (*M. capensis* y *M. paradoxus*).

Figura 4. Áreas de pesca de la FAO (Extraído de: http://www.mercafish.com/ZONAS_FAO/index.htm)



ZONAS FAO DE CAPTURA	
Atlántico Noroeste	Zona FAO n.o 21.
Atlántico Noreste	Zona FAO n.o 27.
Mar Báltico	Zona FAO n.o 27, III d.
Atlántico Centro-Oeste	Zona FAO n.o 31.
Atlántico Centro-Este	Zona FAO n.o 34.
Atlántico Suroeste	Zona FAO n.o 41.
Atlántico Sureste	Zona FAO n.o 47.
Mar Mediterráneo	Zona FAO n.o 37.1.
Mar Negro	Zona FAO n.o 37.4.
Océano Índico	Zona FAO n.o 51 y 57.
Océano Pacífico	Zona FAO n.o 61, 67, 71, 77, 81 y 87.
Antártico	Zona FAO n.o 48, 58 y 88.

El precio medio por kilogramo para las especies de merluzas que se van a estudiar (Tabla 1) varía mucho de una especie a otra, siendo *Merluccius merluccius* más valorada económicamente y *M. senegalensis* y *M. polli* las menos valoradas (Muñoz-Colmenero et al., 2015).

Tabla 1. Precio medio de la merluza por especie en el mercado español (2013) (Extraído de: Muñoz-Colmenero et al., 2015).

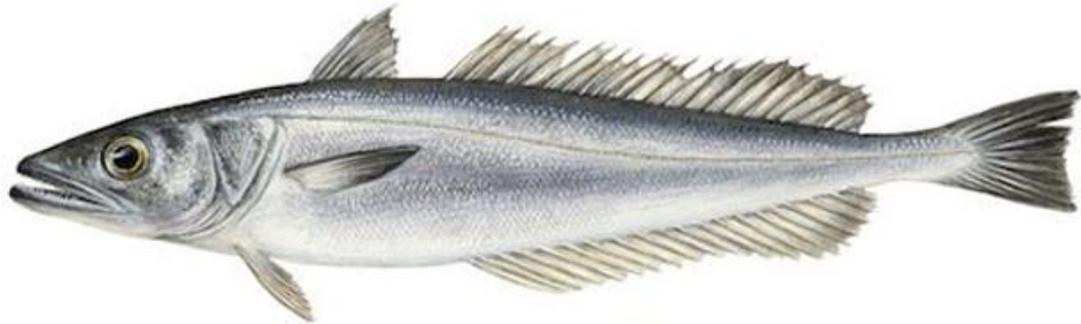
	Precio medio (€/kg)
<i>M. hubbsi</i>	5,661
<i>M. merluccius</i>	10,387
<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	8,562
<i>M. senegalensis/M. polli</i>	4,500

2.1.1. *Merluccius merluccius*

Merluccius merluccius (Linnaeus, 1758), conocida como merluza europea, se caracteriza por presentar un tono grisáceo, que se acrecienta en el lomo, y un color blanco

plateado en la zona ventral (Figura 5); con un tamaño que oscila de 35 a 130 cm (Secretaría General de Pesca, 2017).

Figura 5. *M. merluccius* (Extraído de: <https://pecesmediterraneo.com/peces-del-mar-mediterraneo/merluccius-merluccius/>).



Se trata de una especie demersal y bentopelágica que habita sobre fango arenoso de la plataforma y talud continental, a una profundidad media de 50 y 370 metros (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005). La alimentación de los individuos más jóvenes se basa en pequeños crustáceos como los eufásidos y la de los adultos en calamares y pequeños peces pelágicos como las sardinas (FAO, 2021c).

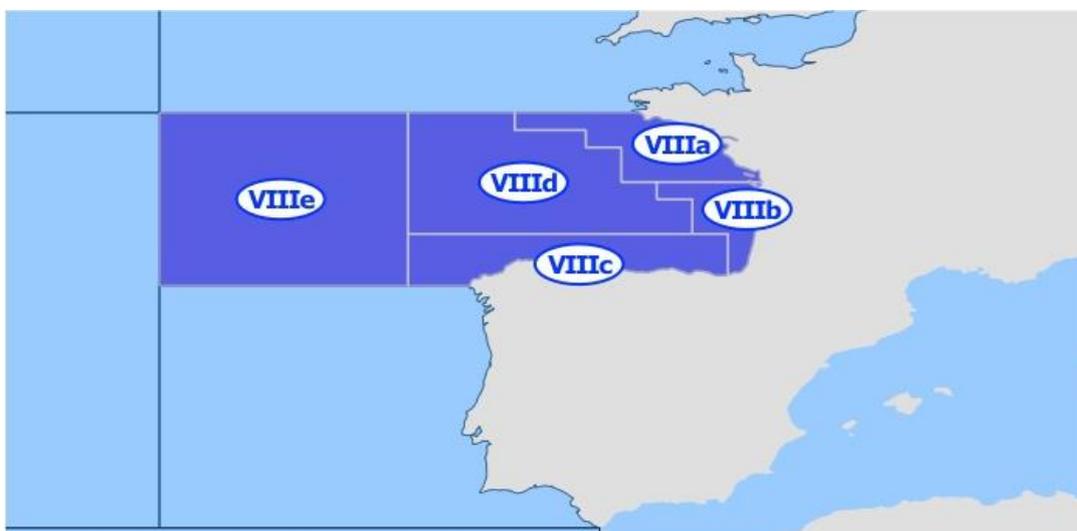
El área de distribución geográfica de *M. merluccius* abarca el Atlántico Oriental, desde la costa noruega hasta la de Mauritania (Figura 6), solapando, en aguas marroquíes, con la zona de distribución de *M. senegalensis*.

Figura 6. Área de distribución geográfica de *M. merluccius* (Extraído de: Cohen & Scialabba, 1990).



En este proyecto tiene especial interés el área 27, subzona VIII compuesta por varias divisiones (Figura 7) donde se encuentra la merluza del Cantábrico.

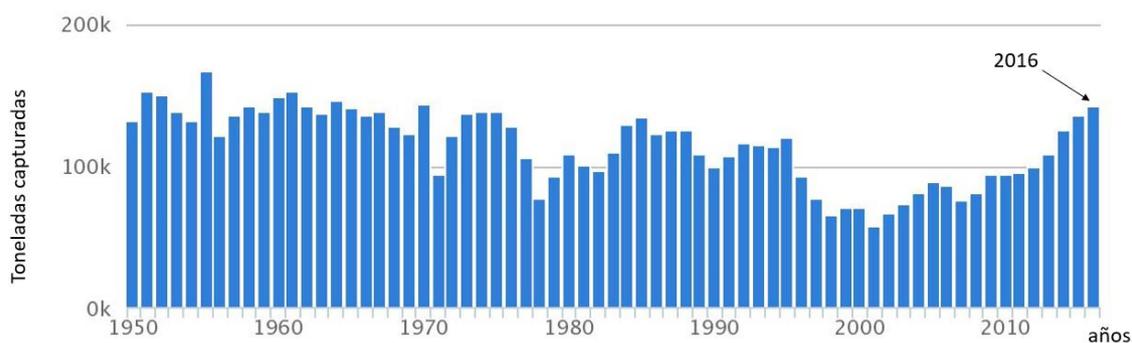
Figura 7. Área 27, subzona VIII con sus diferentes divisiones: a, b, c, d y e. Costas de Galicia y Golfo de Vizcaya (Extraído de: https://fish-commercial-names.ec.europa.eu/fish-names/area_es?code=27)



Las dos técnicas de pesca más comunes que se aplican para capturar a esta especie es por redes de arrastre y palangre (FAO, 2021c). Al tratarse de una merluza de calidad se suele vender prácticamente en su totalidad como producto fresco entero o fileteado (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005).

Las toneladas anuales capturadas de merluza europea han ido variando con los años, registrándose, por ejemplo, descensos destacables de las capturas en los años 1996 o 2001 y una tendencia ascendente en las cantidades capturadas desde el año 2012, con 98.969 toneladas, hasta el año 2016, con 142.190 toneladas; último año del que se disponen datos (Figura 8) (FAO, 2021c).

Figura 8. Capturas mundiales anuales en toneladas de *M. merluccius* (Modificado de: FAO, 2021c).



2.1.2. *Merluccius senegalensis*

Merluccius senegalensis (Cadenat, 1950), también conocida como merluza negra o del Senegal, presenta una coloración grisácea en la zona dorsal y blanco plateado en los laterales y vientre (Figura 9). Puede llegar a adquirir un tamaño de 81 cm, pero la medida más común se sitúa en torno a los 42 cm (Cohen & Scialabba, 1990)

Figura 9. *M. senegalensis* (Extraído de: http://www.ictioterm.es/nombre_cientifico.php?nc=52)



Esta especie habita generalmente a poca profundidad, de 18 a 500 metros; alimentándose de peces pequeños, crustáceos y cefalópodos (FAO, 2021d).

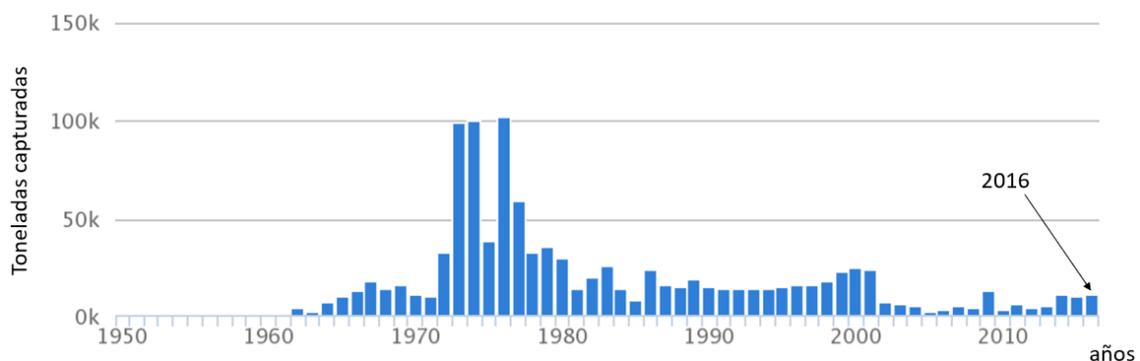
Su zona de distribución se sitúa en el noroeste de África, zona FAO 34, solapando en el norte con la zona de distribución de *M. merluccius* y en el sur con *M. polli* (Figura 10).

Figura 10. Área de distribución geográfica de *M. senegalensis* (Extraído de: Cohen & Scialabba, 1990).



Se suele pescar por redes de arrastre, junto a *M. merluccius* y, en especial junto a *M. polli*, desconociéndose el tamaño exacto del stock de *M. senegalensis* ya que no se diferencian entre ambas especies en las capturas, y, por ende, los datos existentes no son exactos. No obstante, el registro disponible nos da una idea aproximada de como ha ido evolucionando el stock de esta especie durante los últimos 70 años. En la década de los 70 esta especie fue especialmente sobreexplotada, llegando a alcanzar un pico en las capturas de 101.934 toneladas en el año 1976 y, como consecuencia, en la actualidad el rendimiento máximo sostenible es muy bajo capturándose en 2016 11.561 toneladas, casi diez veces menos (Figura 11) (FAO, 2021d).

Figura 11. Capturas mundiales anuales en toneladas de *M. senegalensis*/*M. polli* (Modificado de: FAO, 2021d)

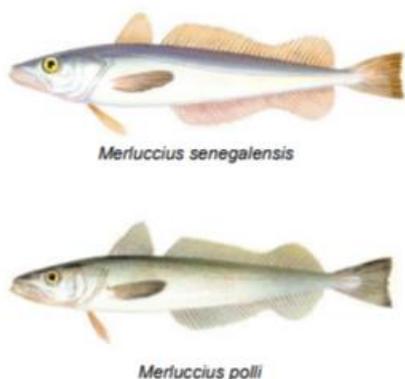


Se comercializa como producto fresco y congelado, principalmente; además también se usa para producir harina y aceite de pescado (FAO, 2021d).

2.1.3. *Merluccius polli*

Merluccius polli (Cadenat, 1950), también conocida como merluza negra o de Angola, comparte características muy similares con *M. senegalensis*, siendo la principal diferencia entre ambas que *M. polli* tiene el dorso negro, en vez de gris como *M. senegalensis* (Figura 12) (Secretaría General de Pesca, 2017). Su tamaño máximo puede llegar a 80 cm, siendo la talla común 38 cm (Cohen & Scialabba, 1990).

Figura 12. *M. senegalensis* y *M. polli* (Extraído de: Secretaría General de Pesca, 2017)



Esta especie demersal habita cerca del fondo de la plataforma continental y el talud, a una profundidad que va de los 50 a los 550 metros de profundidad, viviendo a aguas más profundas que *M. senegalensis*. Su alimentación se basa en peces pequeños, calamares y camarones. Su área de distribución comprende el Atlántico oriental, desde las islas Canarias hasta Angola, dentro del área FAO 34 (Figura 13) (Cohen & Scialabba, 1990).

Figura 13. Área de distribución geográfica de *M. polli* (Extraído de: Cohen & Scialabba, 1990).



Se pesca mediante redes de arrastre y se comercializa como producto fresco, congelado, así como para hacer harina y aceite de pescado (Cohen & Scialabba, 1990).

Asimismo, el área de distribución de *M. polli* solapa en el norte con la de *M. senegalensis*. Debido a su parecido externo y a este solapamiento, estas dos especies se

suelan registrar juntas como *Merluccius spp.*, considerando a ambas como un solo stock (Fernández-Peralta et al., 2011).

2.1.4. *Merluccius capensis*/*Merluccius paradoxus*

Merluccius capensis (Castelnaud, 1861), también conocida como merluza del Cabo (Figura 14), y *Merluccius paradoxus* (Franca, 1960), conocida según el Listado de Denominaciones Comerciales de Especies Pesqueras y de Acuicultura admitidas en España (MAGRAMA) como merluza del Cabo o merluza de altura (Figura 15), son dos especies que presentan en el dorso un tono ligeramente pardo y en el vientre un tono blanquecino. Llegan a alcanzar los 120 cm, no obstante su talla media se sitúa entre los 40 y 60 cm (Cohen & Scialabba, 1990).

Figura 14. *M. capensis* (Extraído de: <https://opromar.com/catalogo-especies/es/merluza-del-cabo>).

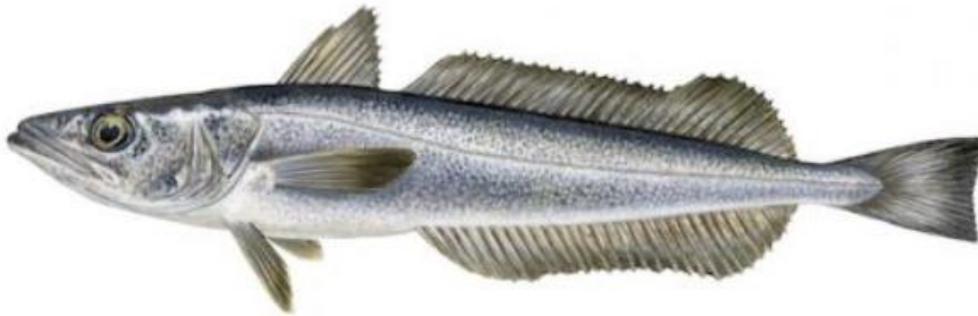


Figura 15. *M. paradoxus* (Extraído de: <https://opromar.com/catalogo-especies/es/merluza-de-altura-del-cabo>)



M. capensis y *M. paradoxus* se capturan conjuntamente presentando la misma zona de distribución: el Atlántico suroriental, frente a las costas de Namibia y Sudáfrica, perteneciente a la zona FAO 47 (Figura 16) (Secretaría General de Pesca, 2017).

Figura 16. Área de distribución geográfica de *M. capensis*/*M. paradoxus* (Extraído de: Cohen & Scialabba, 1990).



M. capensis se sitúa normalmente a 100-450 metros de profundidad, mientras que *M. paradoxus* a 300-1000 metros (Wilhelm et al., 2015) . Solapan en el norte con el área de distribución de *M. polli*, y parcialmente entre ellas, a unos 228-283 metros de profundidad. Se alimentan generalmente de pequeños peces, como el jurel, pequeños crustáceos e incluso manifiestan comportamientos caníbales (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005).

Se capturan principalmente usando redes de arrastre (FAO, 2021) y se comercializan, generalmente, como *M. capensis*/*M. paradoxus*, de diferentes maneras: como producto fresco, entero o en filetes y como congelado, sin cabeza y vísceras, en bloques con o sin piel. La mayor parte de las capturas mundiales se venden en Europa, en especial en España (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005).

Los datos existentes de ambas especies sobre capturas se registran conjuntamente, obteniéndose un pico de capturas en el año 1972 con 1.122.000 toneladas, siendo hasta 1978 las merluzas más capturadas del mundo (Iwamoto, T., 2015), siguiendo una tendencia descendente gracias a la aplicación de medidas de gestión por la Comisión Internacional para las Pesquerías del Atlántico Sudeste (ICSEAF) (Lloris, D., Matallanas,

J. & Oliver, 2005) que dieron sus frutos alcanzando, por ejemplo, en el año 2000 las 700 toneladas capturadas, o en el año 2010 las 2100 toneladas (Iwamoto, T., 2015).

2.1.5. *Merluccius hubbsi*

Merluccius hubbsi (Marini, 1933), también conocida como merluza argentina, presenta una coloración plateada con vetas doradas en la zona dorsal y la cabeza más pequeña de las merluzas anteriormente vistas (Secretaría General de Pesca, 2017) (Figura 17). Presenta una talla máxima de 95 cm; siendo la media 50-60 cm (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005)..

Figura 17. *M. hubbsi* (Extraído de: <https://conxemar.com/en/argentine-hake>).



Esta especie habita en profundidades que van de los 50 a 500 metros, generalmente entre 100 y 200 metros, alimentándose de peces (anchoas, merluza) y calamares cuando son adultos, y de pequeños crustáceos cuando se tratan de ejemplares más jóvenes (Cohen & Scialabba, 1990).

Su área de distribución comprende el Atlántico suroccidental, desde Cabo Frío (Brasil) hasta el sur de Argentina; dentro del área FAO 41 (Figura 18) (Secretaría General de Pesca, 2017).

Figura 18. Área de distribución geográfica de *M. hubbsi* (Extraído de: Cohen & Scialabba, 1990).

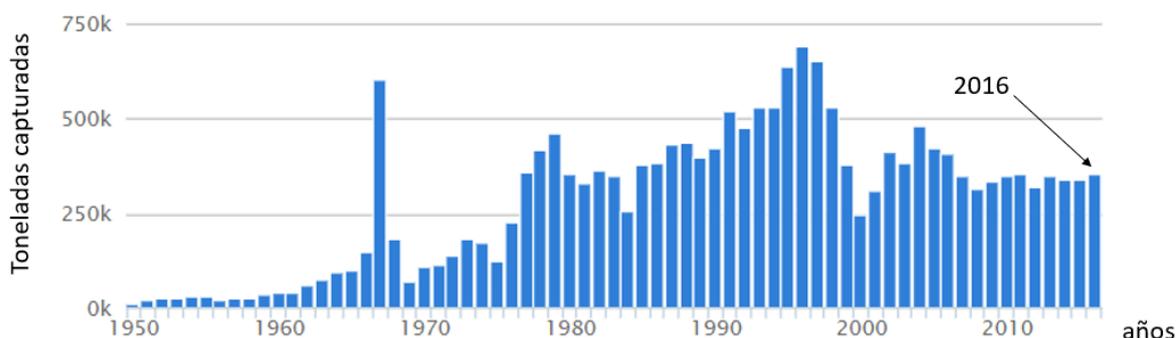


Solapa con *M. australis* (merluza austral) al sureste, por lo que es muy probable que se hayan reconocido capturas de merluzas australes como merluzas argentinas (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005).

Se suele vender como producto fresco en Argentina y Uruguay, debido a la proximidad, y como congelado cuando se exporta a países, como los pertenecientes a la Unión Europea, en forma de ejemplares enteros eviscerados, descabezados o fileteados en bloque (Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, 2005); siendo la especie más representativa dentro del mercado de los congelados (Secretaría General de Pesca, 2017).

Las capturas mundiales de esta especie (Figura 19) han ido variando con los años registrándose picos como el de 1967 con 598.800 toneladas o el máximo histórico de capturas que se dio en el año 1996 con 681.999 toneladas. Desde el año 2007 se registra una tendencia similar en las capturas de esta especie, llegando a 2016 a las 352.277 capturas mundiales (FAO, 2021b) (Figura 19), siendo en la actualidad la especie de merluza más capturada a nivel mundial (Secretaría General de Pesca, 2017).

Figura 19. Capturas mundiales anuales en toneladas de *M. hubbsi* (Modificado de: FAO, 2021b).



2.2. Metales pesados. Generalidades

Los metales pesados son elementos que se encuentran naturalmente presentes en la corteza terrestre que no son destruidos ni degradados, es decir, no son biodegradables (Baby et al., 2011). La liberación de los metales pesados de forma natural tiene lugar desde la roca madre a la superficie por procesos biológicos y físicos (meteorización), emisiones volcánicas y por lixiviación (Barraza et al., 2018).

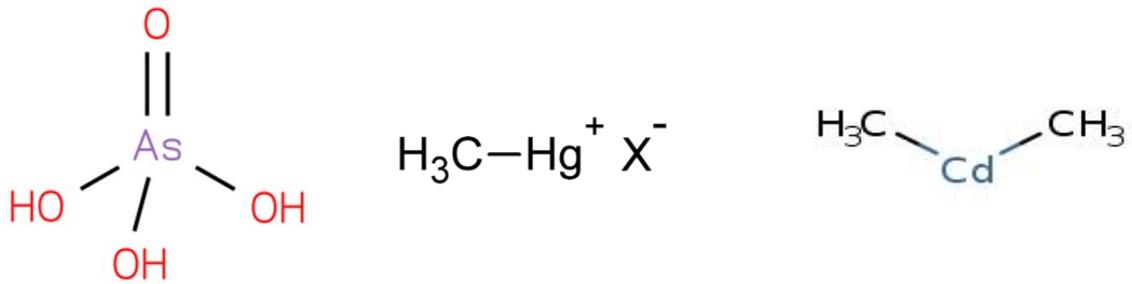
La actividad humana ha propiciado que la concentración de metales pesados aumente en la naturaleza, mediante actividades como: la minería, explotaciones petrolíferas y de gas en alta mar, desechos de industrias como pesticidas, pinturas, fertilizantes, productos farmacéuticos, escurrientías con residuos agrícolas o la lluvia ácida. Muchos de los metales pesados acaban en el mar, llegando a los sedimentos, donde la concentración de metales es entre tres y cinco veces superior que en el agua dulce; formando precipitados insolubles (Ansari et al., 2003).

La toxicidad que causan estos elementos está directamente relacionada con la forma en la que se encuentran en el medio marino, es decir, con su biodisponibilidad, que se refiere a la concentración o parte de una sustancia química que está potencialmente disponible para su absorción por parte de un organismo acuático (Ansari et al., 2003). La biodisponibilidad de los metales pesados depende de diferentes factores, que pueden ser exógenos (abióticos) o endógenos (bióticos) (Barraza et al., 2018).

Entre los factores exógenos se encuentran: la temperatura del agua, aguas calientes favorecen la incorporación y toxicidad de metales pesados en los peces; la concentración de oxígeno, a mayores concentraciones de oxígeno en el agua mayor biodisponibilidad;

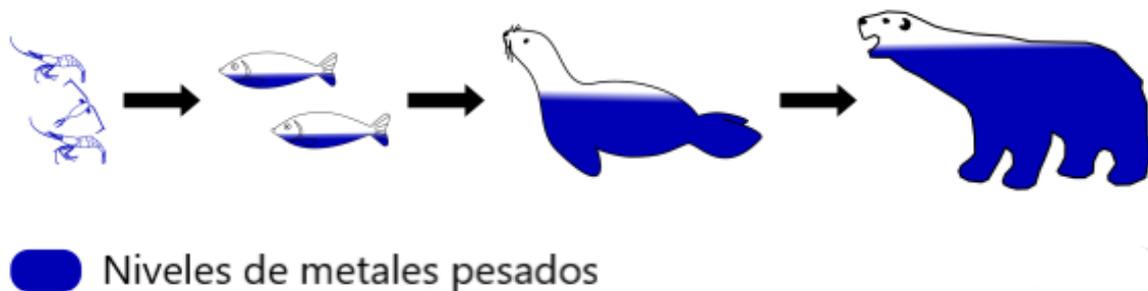
la forma química en la que se encuentra el metal, si un metal pesado combina con otro elemento formando un compuesto orgánico (ácido arsénico, metilmercurio o dimetilcadmio) (Figura 20) presenta una mayor biodisponibilidad que si estuviese en forma inorgánica (Barraza et al., 2018).

Figura 20. Diferentes compuestos orgánicos en los que se encuentran metales pesados (de izquierda a derecha: ácido arsénico, metilmercurio, dimetilcadmio)



Asimismo, entre los factores endógenos se encuentran: la vía de ingreso de los metales pesados al pez. En forma disuelta, mediante la respiración a través de las branquias, órgano que está en contacto constante con el agua y que presenta una vía de intercambio de iones metálicos (Bawuro et al., 2018); a través de la dieta donde acumulan más metales los peces carnívoros que los herbívoros, puesto que estos últimos forman parte de niveles inferiores en la cadena trófica, y, por ende, son susceptibles a una mayor biomagnificación (Figura 21) (Barraza et al., 2018); y por sedimentos que incluyen metales pesados (Miao et al., 2021), observándose una correlación entre zonas con sedimentos que presentan un alto contenido en metales pesados y bioacumulación en las especies que habitan cerca; no obstante, se desconoce cuál es el mecanismo de transferencia de metales pesados de los sedimentos a los peces (Miao et al., 2021).

Figura 21. Ejemplo de biomagnificación a lo largo de la red trófica (Modificado de: <http://mrbreweress.weebly.com/ddt-biomagnification.html>)



En este trabajo, se va a poner el foco en el análisis de ocho metales pesados: cromo, níquel, cobre, zinc, arsénico, cadmio, mercurio y plomo; ya que se tratan de elementos muy comunes en el ambiente gracias a fuentes antrópicas.

2.2.1. Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal no esencial presente en la naturaleza ligado a metales como el zinc, el cobre o el plomo (AESAN, 2020b). Se libera al medio ambiente a través de gases, procedentes de incendios o volcanes activos, que pueden recorrer largas distancias y finalmente ser depositados en ríos u océanos en forma particulada (Barraza et al., 2018).

Asimismo, su liberación antrópica al medio tiene lugar como residuo de la actividad minera; como consecuencia de actividades industriales que conllevan la quema de combustibles fósiles, metalurgia e incineración de basuras; y a través del empleo de fertilizantes que contienen fosfatos y lodos residuales (AESAN, 2020b).

El cadmio se acumula principalmente en el hígado y riñón de los humanos, presentando una vida media en el organismo de 17 a 30 años (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008).

Su peligrosidad radica principalmente en su capacidad de acumularse en el túbulo proximal pudiendo desencadenar una disfunción renal, desmineralización de los huesos y, además, se trata de un agente cancerígeno. La principal fuente de cadmio se presenta en los cereales y derivados, así como pescados y mariscos, entre otros (AESAN, 2020b).

La EFSA (*European Food Safety Authority*) establece como límite una ingesta semanal tolerable de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal.

En la UE, es el Reglamento 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, de la Comisión, el que establece la concentración máxima permitida para diferentes contaminantes en alimentos, fijando el límite permitido de cadmio para los alimentos más propensos a albergar este elemento, incluyendo el pescado, en 0,050 mg/kg peso fresco.

2.2.2. Plomo

El plomo (Pb) es un elemento no esencial presente de forma natural en el medioambiente, presentándose en las corteza terrestre en forma de galena (sulfuro de plomo) (Barraza et al., 2018).

El plomo llega de forma natural al medio acuático principalmente por erosión del suelo y deposición atmosférica (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008). En el pasado, formaba parte de las tuberías de agua, pinturas, gasolina o latas de alimentos (AESAN, 2020e).

Este elemento, entra al organismo principalmente mediante la ingestión de comida e inhalación del aire. Una vez se absorbe, pasa a la sangre que lo va transportando a diferentes tejidos, acumulándose principalmente en huesos, dientes, hígado, pulmón, riñón, cerebro y bazo; presentando una vida media de 35 días en sangre, 40 días en tejidos blandos y de 20 a 30 años en los huesos (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008).

El plomo altera el desarrollo del sistema nervioso central en niños, mientras que en adultos puede provocar hipertensión y enfermedades renales crónicas. Además el plomo inorgánico es un posible carcinógeno para los seres humanos (AESAN, 2020e).

El Reglamento (CE) n° 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006, de la Comisión, establece un límite de 0,30 mg/kg peso fresco para carne de pescado. Según el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (2011) se establece una ingesta semanal tolerable para el plomo de 25 µg/kg.

2.2.3. Arsénico

El arsénico (As) se trata de un elemento no esencial presente de forma natural en la corteza terrestre. Puede liberarse de forma natural a través de la meteorización y erosión de sulfuros minerales (Barraza et al., 2018).

No obstante, la principal fuente de liberación de este mineral es mediante actividades antrópicas como la minería, metalurgia, industria electrónica o la aplicación de arsénico a la madera de los barcos con el fin de protegerla (Barraza et al., 2018).

Puede encontrarse en forma inorgánica u orgánica, estando el arsénico inorgánico presente en aguas subterráneas, que se utilizan para beber constituyendo un problema de gran índole en países asiáticos como Taiwán o Bangladesh; y el orgánico en alimentos, principalmente mariscos y pescados. El arsénico inorgánico resulta mucho más tóxico que el orgánico (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008).

Se suele acumular en orina, sangre, cabello, dientes, huesos y uñas; considerándose un elemento cancerígeno para los seres humanos, principalmente cáncer de pulmón, de

riñón, de vejiga y de piel (Castro-González & Méndez-Armenta, 2008). Las principales fuentes de arsénico inorgánico a las que se expone la población con su dieta serían: pan de trigo, arroz, leche, productos lácteos y agua del grifo (AESAN, 2020a).

Según un informe emitido por el Ministerio de Sanidad y Consumo (2009) donde se comparan la legislación china y de la UE respecto al límite permitido de metales pesados, se establece un límite de arsénico de 0,5 mg/kg de peso fresco según la legislación china, para la UE no hay normativa. En cuanto a la ingesta semanal tolerable, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (2011) indica un valor de 15 µg/kg.

2.2.4. Mercurio

El mercurio (Hg) es un elemento no esencial que se encuentre presente en la corteza terrestre formando parte del mineral cinabrio (sulfuro de mercurio), así como impureza de otros minerales como la pirita (sulfuro de hierro) (AESAN, 2020c).

Se libera de forma natural mediante la erosión de las rocas y procesos volcánicos. También llegan al medioambiente gracias a actividades antrópicas como: la minería, metalurgia, por combustión de fuentes de energía como el carbón, la industria del plástico; así como por haber sido o ser constituyente de pinturas, vacunas, amalgamas dentales, baterías, pilas, lámparas fluorescentes, aparatos de medición como termómetros o aparatos electrónicos (AESAN, 2020c).

El mercurio está presente en el medio en tres formas químicas distintas: como mercurio elemental en su forma metálica (Hg^0), como mercurio inorgánico y como mercurio orgánico. El Hg^0 tiene su origen en la acción antrópica, siendo por ejemplo uno de los componentes principales de la amalgama dental, llegando a la atmósfera en forma de vapor (Bjørklund et al., 2017). El mercurio elemental puede permanecer unos 6 meses en la atmósfera gracias a su baja reactividad química y su gran solubilidad en agua (Francés-Monerris et al., 2020). El mercurio elemental puede oxidarse formando mercurio inorgánico (Hg^{1+} y Hg^{2+}) que se deposita en el agua y sedimentos, además se libera de forma natural de la corteza terrestre (AESAN, 2020e) y se ha llegado a encontrar en productos cosméticos o laxantes (Bjørklund et al., 2017). La última forma de mercurio es en su forma orgánica, que se encuentra en el agua generalmente en forma de metilmercurio (CH_3Hg^+), a partir de la metilación del mercurio inorgánico (Francés-Monerris et al., 2020) mediante bacterias reductoras o reacción química directa (AESAN, 2020c). Además se ha encontrado en insecticidas y fungicidas (Bjørklund et al., 2017).

El mercurio elemental e inorgánico pueden dañar la piel, riñones y el sistema nervioso central, no obstante, el individuo afectado puede recuperarse de forma rápida si cesa la exposición a estos compuestos (Ansari et al., 2003).

La forma más tóxica del mercurio es como mercurio orgánico, produciendo graves alteraciones en el sistema nervioso, ya que la parte orgánica de la molécula (CH_3 en el caso del metilmercurio) puede disolverse en la capa de grasa que rodea al cordón nervioso y atravesar las barreras placentarias y hematoencefálicas provocando la lisis de las células del cerebro. Entre las afecciones que provoca en los seres humanos se encuentran la pérdida de sensibilidad en las extremidades y en los músculos de la cara; pérdida de coordinación del sistema locomotor; dificultad para hablar y caminar; y pérdida de audición. Asimismo, las mujeres embarazadas y niños son muy sensibles a este compuesto organometálico, afectando al sistema nervioso en desarrollo de los fetos con consecuencias fatales como trastornos mentales graves o un retraso en el desarrollo físico (Ansari et al., 2003).

El mercurio orgánico se encuentra principalmente presente en pescados y crustáceos, estableciéndose un límite máximo, según el Reglamento (CE) n° 1881/2006, de 19 de diciembre de 2006 de la Comisión, de 0,50 mg/kg de peso fresco; y según la EFSA una ingesta semanal tolerable de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

2.2.5. Níquel

El níquel (Ni) es un elemento del que se desconoce si se trata de un elemento esencial para los seres humanos (Schaumlöffel, 2012); aunque si se ha demostrado en otros seres vivos, como es el caso de las plantas, que se trata de un micronutriente imprescindible (Witte et al., 2002).

Se encuentra de forma natural en la corteza terrestre en forma de minerales, pudiendo distribuirse a diferentes ambientes a través de fenómenos geológicos como la meteorización o las erupciones volcánicas (Schaumlöffel, 2012).

Las actividades industriales como la minería o la metalurgia, así como la quema de combustibles fósiles, son las principales fuentes de emisión antrópicas de este elemento al medioambiente. Suele llegar a las aguas superficiales y al suelo como parte de materia particulada que se transporta a través de la atmósfera y, por ende, los seres vivos pueden acumularlo (Schaumlöffel, 2012).

El níquel puede presentarse en diferentes formas oxidadas en el medioambiente, siendo su forma Ni²⁺ la más común en los alimentos y agua potable. Las principales partes del cuerpo que se encuentran más expuestas al níquel son la piel y el sistema respiratorio, siendo la afección más común la dermatitis alérgica de contacto. Además, el níquel se trata de un elemento cancerígeno, que tras su inhalación puede causar diferentes tipos de cáncer como son el de pulmón, de cavidad nasal y de senos parasenales (AESAN, 2020d).

En la actualidad, no hay ninguna legislación de la UE sobre los valores máximos de Ni en alimentos, no obstante, la EFSA sugiere como límite 1,3 mg/kg de peso corporal.

2.2.6. Cobre

El cobre (Cu) es un elemento que se encuentra en la naturaleza en su estado nativo, así como en los seres vivos, tratándose de un micronutriente esencial para el funcionamiento del organismo, participando en algunos procesos como: la formación del tejido conectivo, la formación de melanina, la producción de tiroxina en la glándula tiroidea, en el metabolismo del hierro, como antioxidante o en la producción de energía en forma de ATP (Feoktistova Victorava & Clark Feoktistova, 2018).

Asimismo, se encuentra presente en altas concentraciones en crustáceos, decápodos, gasterópodos y cefalópodos, ya que presentan un pigmento respiratorio, la hemocianina, que alberga cobre (Ansari et al., 2003).

La principal fuente de cobre es mediante la dieta, encontrándose principalmente en vísceras, frutos secos, mariscos, legumbres, vegetales y agua de grifo (Strand et al., 2018).

Entre los problemas que origina su déficit en los seres humanos destacan: anemia, osteoporosis, arritmia cardíaca, alteraciones en el sistema nervioso, pérdida de pigmentación en la piel y pelo (Feoktistova Victorava & Clark Feoktistova, 2018).

Asimismo, no son comunes los casos en los que se producen afecciones por exceso de cobre con la ingesta de alimentos, ya que el hígado presenta un mecanismo muy eficaz para eliminar su exceso en el organismo, desencadenándose sus principales síntomas cuando se produce una acumulación excesiva en el hígado: dolor abdominal, náuseas y vómitos, diarreas, daño hepático severo y fallo renal (Feoktistova Victorava & Clark Feoktistova, 2018).

Actualmente, no hay normativas por parte de la UE o la EFSA que regulen el límite máximo de ingesta de cobre.

2.2.7. Zinc

El zinc (Zn), principalmente como Zn^{2+} , se trata de un metal pesado esencial, empleado por más de 2800 macromoléculas y más de 300 enzimas para llevar a cabo su función (Lee, 2018); siendo el 24º elemento más numeroso en la corteza terrestre (Bonaventura et al., 2015) y el segundo metal más abundante en los seres humanos, con una concentración aproximada de 2-3 gramos, acumulándose en especial en la próstata, páncreas y huesos (Wessels et al., 2017).

Sus funciones en el organismo son varias, interviene en la respiración celular, la función inmunitaria, síntesis proteica, cicatrización de heridas, la síntesis de ADN y la división celular (Bonaventura et al., 2015).

Se ha estudiado bastante la deficiencia de zinc como causante de graves defectos en el crecimiento y en el desarrollo, así como en la alteración de la funcionalidad de los sistemas reproductivo, neurosensorial e inmunológico (Lee, 2018). Sin embargo, son pocos los estudios que reflejan afecciones derivadas de un consumo excesivo de zinc ya que los casos de deficiencia son muchos más comunes, estimándose que en el mundo hay dos mil millones de personas que presentan deficiencia de zinc, afectando en especial a los países en desarrollo (Wessels et al., 2017).

Las principales fuentes dietéticas de zinc son las carnes rojas y ostras, mientras que los cereales no refinados o las legumbres disminuyen su biodisponibilidad en el organismo al asociarse con este elemento (Wessels et al., 2017).

Existen 3 vías por las que el zinc puede llegar a ser tóxico en el organismo: mediante la inhalación de óxido de zinc empleado en la metalurgia como polvo o humo, por la piel o por ingestión. Sin embargo, diferentes estudios apuntan a que tanto la exposición industrial como la exposición a altas concentraciones de zinc mediante la dieta no producen cuadros clínicos graves (Lee, 2018).

La ingesta oral excesiva de zinc (150 mg/día) durante años puede interferir en el contenido de cobre del organismo desencadenando hipocupremia (déficit de cobre) (Lee, 2018). No hay legislaciones que contemplen el límite máximo permitido en alimentos para este metal.

2.2.8. Cromo

El cromo (Cr) es un elemento que se puede presentar en diferentes estados de oxidación que van de +6 a -2, siendo las formas más estables el Cr (III) y el Cr (VI) que pueden intercambiarse entre sí, así como presentar diferentes efectos en el organismo dependiendo de la forma en la que se encuentren (Tumolo et al., 2020).

El Cr (III) es esencial para los seres humanos, presentando una mala absorción, y se encuentra principalmente en el medio ambiente presente en el mineral cromita, que tras procesos microbianos y geoquímicos puede liberarse al medio ambiente. Asimismo, también se encuentra en diferentes alimentos como los mejillones, brócoli o patatas; contribuyendo a disminuir el riesgo de desarrollar diabetes mellitus, ya que ayuda al buen funcionamiento de la insulina (Tumolo et al., 2020).

El Cr (VI) se encuentra ligado a actividades industriales como la industria de cuero, industria textil o la industria petrolera. Presenta una gran absorción en el organismo mediante vía oral, respiratoria y a través de la piel, reduciéndose a cromo III en las mitocondrias y núcleo, lo que desencadena la formación de reactivos intermedios como Cr (IV) o Cr (V) que pueden alterar el ADN (Molina Montoya et al., 2010).

El Cr (III) es imprescindible para el organismo. Sin embargo, también puede inducir toxicidad y cáncer si se sobrepasa la ingesta de 8 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante un periodo de tiempo prolongado (Tumolo et al., 2020).

Por otro lado, el Cr (VI) se trata de la forma más tóxica del cromo, desencadenando varios efectos para la salud como: erupciones cutáneas, malestar de estómago, problemas respiratorios, daño hepático, cáncer de pulmón, daño renal, inmunodepresión. Su toxicidad radica en que presenta la capacidad de reducirse en el interior celular, mencionada anteriormente, y en que puede traspasar las membranas celulares, de lo que no es capaz el Cr (III) (Molina Montoya et al., 2010).

No hay legislaciones que contemplen el límite máximo permitido en alimentos para este metal.

2.3. Técnicas basadas en la identificación de ácidos nucleicos

2.3.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN es el primer paso para liberar el material genético que se aloja en el interior del núcleo de las células con el objetivo de tenerlo disponible para realizar diferentes estudios, en el caso de este proyecto amplificarlo mediante PCR.

Los métodos de extracción deben permitir romper la célula de forma que causen el menor daño posible al ADN. En el caso de este proyecto se usa la extracción con Chelex[®] que se trata de un método rápido y barato que no requiere el uso de disolventes orgánicos tóxicos, como el fenol-cloroformo empleado en otros protocolos de extracción (Phillips et al., 2012).

El Chelex[®] es una resina de la empresa Bio-Rad que previene la rotura del ADN gracias a su acción quelante sobre cationes como el Mg^{2+} , que permiten la activación de nucleasas que pueden romper el ADN una vez se libera de la célula junto a otros componentes celulares por tratamientos térmicos. Además de capturar a cationes y, por ende, inactivar las endonucleasas, se une a los restos celulares resultantes de la lisis celular al final del proceso de extracción.

El otro componente que se va a emplear en la extracción va a ser la enzima proteinasa K que se encarga de digerir proteínas, eliminando la contaminación en las muestras que pueda interferir en la PCR.

El protocolo de extracción que se sigue presenta las siguientes etapas:

- 1) Se introducen las muestras junto con Chelex[®] y proteinasa K a un horno a 56 ° C y se agitan cada 15 minutos. En esta fase se produce la lisis celular por el tratamiento térmico, se produce la digestión de proteínas mediante la proteinasa K y la acción quelante del Chelex[®].
- 2) Se sube la temperatura a 99° C para terminar de inactivar las proteínas de la muestra, incluyendo a la proteinasa K que también podría interferir en la realización de la PCR.
- 3) Finalmente, se puede observar en el tubo donde se preparó la muestra dos fases que se pueden distinguir entre sí: en la base queda un sobrenadante en el que se encuentra el Chelex[®] junto a restos a celulares, mientras que en la parte superior del tubo se encuentra el ADN ya aislado.

2.3.2. Amplificación del ADN mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) fue impulsada por Kary Mullis en 1986 tratándose de una técnica muy novedosa que le permitió obtener el Premio Nobel de Química en el año 1993. Este método permite obtener una gran cantidad de copias de un fragmento de interés de ADN para poder analizarlo posteriormente en diferentes estudios como identificación de especies, diagnóstico médico o en medicina forense, mediante técnicas de separación de fragmentos de ADN como es el caso de la electroforesis.

Para realizar la PCR se prepara una mezcla con los siguientes componentes (Pérez de Castro, 2011):

- El ADN que contiene el fragmento de interés que se pretende amplificar. Se conoce como ADN molde.
- Agua bidestilada: es la base del mix.
- ADN polimerasa: es una enzima que permite crear copias del fragmento, en sentido 5'-3', que se quiere amplificar a partir del ADN molde. En el proyecto se usa la Taq polimerasa, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, de ahí su nombre, que es capaz de soportar las altas temperaturas a las que se ve sometida el proceso de PCR.
- Solución tampón o Buffer: permite el funcionamiento adecuado de la ADN polimerasa.
- MgCl₂ (cloruro de magnesio): es un cofactor que mejora la actividad de la ADN polimerasa, aumentando la tasa de amplificación del ADN.
- Cebadores o primers: son secuencias cortas de ADN de cadena sencilla que hibridan con el ADN molde, delimitan así la región que se quiere amplificar por la ADN polimerasa. Son diseñados específicamente para el fragmento de interés y añaden nucleótidos al extremo 3' de la doble cadena de ADN, usándose uno para cada hebra (directo y reverso). Para ello se emplearon dos cebadores, diseñados por Lundy et al. (2000): un cebador en sentido directo (HK01) con la secuencia: 5'-GGGGGGCCGACAGAGTTATA-3' y un cebador en sentido inverso (HK02) con la secuencia: 5'-CCCGCTAGACTTGCTTACTAA-3', para amplificar un fragmento de 436 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial.

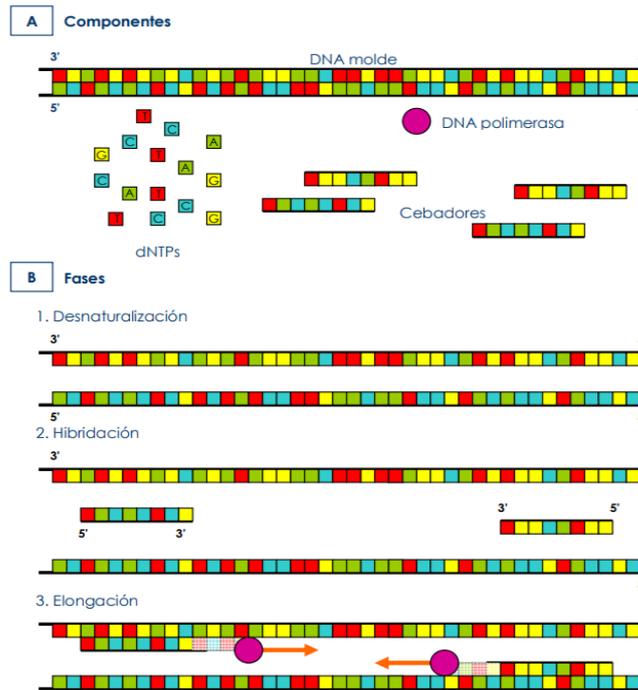
- dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato): son los nucleótidos que va a emplear la ADN polimerasa para sintetizar una cadena complementaria a partir de la adición de estos nucleótidos al extremo 3' de los cebadores que se unen a la cadena molde.

Todos estos componentes se emplean durante la PCR que consta de numerosos ciclos, en el caso de este proyecto 35, teniendo lugar en cada uno las siguientes tres etapas (Figura 22):

- Desnaturalización: en primer lugar, se requiere que el ADN molde se desnaturalice, es decir, que se las dos cadenas se separen. Para ello se emplean temperaturas altas.
- Hibridación: una vez separadas las cadenas de ADN, se disminuye la temperatura para permitir a los cebadores unirse por complementariedad, o hibridar, con el ADN molde. Cada uno se une a una hebra distinta del ADN molde, dependiendo del sentido del sentido en el que se produzca la síntesis.
- Extensión o elongación: la ADN polimerasa comienza a añadir nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' donde hibridaron los cebadores. La temperatura depende de la ADN polimerasa empleada, en el caso de este proyecto se usa una temperatura de 72 ° C ya que es la temperatura óptima que presenta la Taq polimerasa para ejecutar la elongación.

Finalmente, tras sucesivos ciclos, se obtienen millones de copias del fragmento de interés.

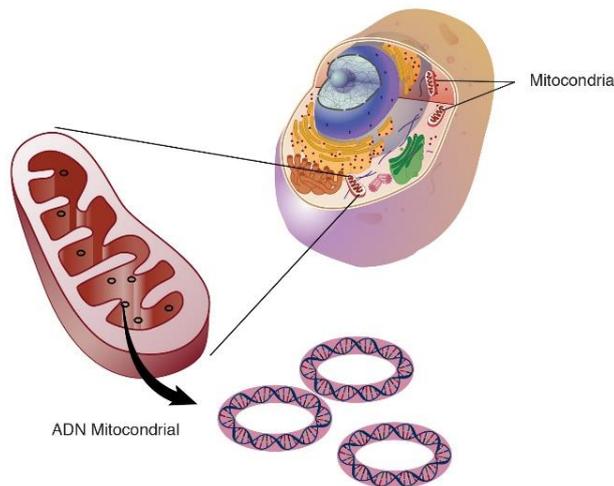
Figura 22. Componentes principales y etapas de la PCR (Extraído de: Pérez de Castro, 2011).



2.3.3. Región control del ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) es el material genético existente en las mitocondrias que presenta una estructura circular de doble cadena (Figura 23).

Figura 23. ADN mitocondrial (Extraído de: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-mitocondrial>).



Entre sus características destacan su pequeño tamaño, que es haploide, presenta escasa o nula recombinación, una elevada tasa de mutación, un gran número de copias, ausencia de intrones y además existe un gran número de taxones para los que están disponibles las secuencias de genes mitocondriales en la base de datos GenBank.

El ADN mitocondrial está compuesto por numerosos genes como son el citocromo b, citocromo oxidasa I, 16S ARNr o la región control; que se emplean como marcadores moleculares para la identificación de especies, entre otros usos.

En el presente estudio se va a emplear como marcador para distinguir entre especies del género *Merluccius* un fragmento de 436 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial (Lundy et al., 2000). Esta región no codificante controla la transcripción y replicación de los genes mitocondriales, y, además, presenta una elevada tasa de mutación que lo hace un marcador excelente para analizar la variabilidad entre especies.

2.3.4. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis permite analizar los fragmentos amplificados de ADN resultantes de la PCR, separándolos por su tamaño. En este caso, se emplea para comprobar si la PCR se ha llevado a cabo con éxito.

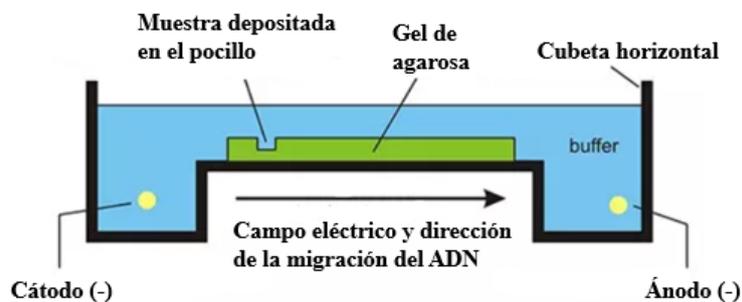
Para llevar a cabo la electroforesis de este proyecto se emplean un gel hecho a base de agarosa, un polisacárido presente en algas, que será la matriz donde se separaran los fragmentos de ADN. Este gel presenta los siguientes componentes:

- Tampón o buffer para mantener el pH de la solución.
- Preparado comercial no mutagénico, SimplySafe™, que permitirá revelar el resultado de la electroforesis mediante luz ultravioleta. Su capacidad de revelado radica en que es un fluorocromo capaz de intercalarse y marcar el ADN y emitir una longitud de onda cuando se estimula con luz ultravioleta a través de un transiluminador.
- Marcador de peso molecular que sirve de referencia para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN de interés.

Para la realización de la electroforesis horizontal de este proyecto se emplea (Figura 24):

- Una cubeta horizontal, que es el soporte donde se deposita el gel de agarosa, solidificado y embebido en el tampón, con una serie de pocillos hechos a partir de unos moldes denominados peines donde se introducirá el producto de la PCR.
- Dos electrodos conectados a una fuente eléctrica, cada uno situado en cada extremo de la cubeta, un ánodo (+) que se sitúa en uno de los extremos y un cátodo (-) situado en el otro. Al aplicarse una carga eléctrica el ADN va a desplazarse mediante el gel de agarosa hacia el polo positivo, debido a la carga negativa que presenta esta molécula gracias a sus grupos fosfato.

Figura 24. Electroforesis horizontal. Vista lateral (Modificado de: <https://orbitbiotech.com/agarose-gel-electrophoresis-for-dna-samples-gel-electrophoresis-macro-molecules-edta-tris-glacial-acetic-acid-gel-loading-agarose-dye-buffer-gel-case-tae-glycerol-etbr/>).



Una vez que los fragmentos se han separado se visualizan en un transiluminador gracias a la acción del fluorocromo.

2.3.5. Secuenciación del ADN

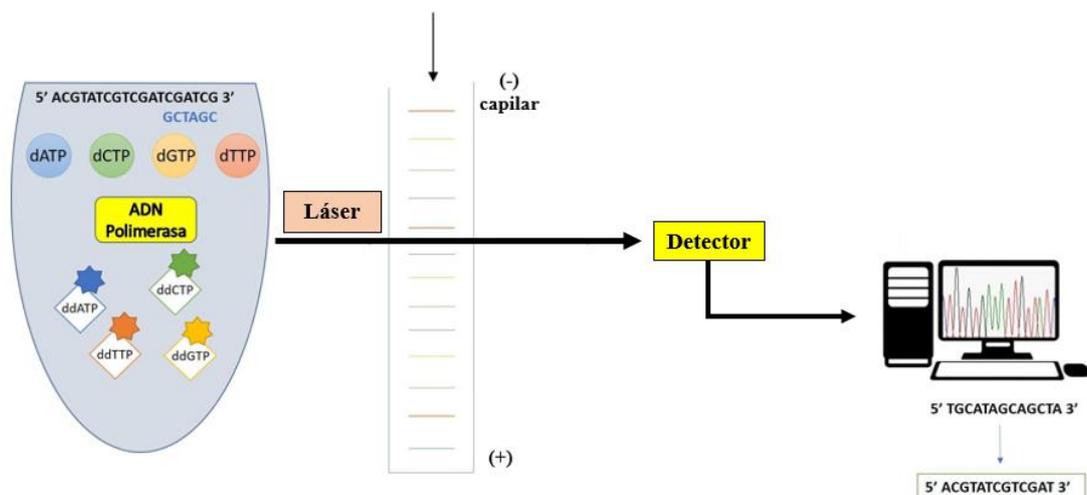
La secuenciación del ADN engloba un conjunto de métodos que tienen como fin determinar el orden las cuatro bases (adenina, timina, guanina y citosina) que forman un fragmento de ADN, es decir, averiguar su secuencia concreta. El método de secuenciación que se emplea en este proyecto es el método Sanger, desarrollado en 1975 por Frederick Sanger.

El proceso llevado a cabo en el método Sanger (Figura 25) emplea cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), también denominados nucleótidos de parada. Estos nucleótidos no presentan el grupo 3'-OH, que posibilita la adición del nucleótido sucesivo, de manera que cuando la ADN polimerasa agrega alguno de ellos se detiene la formación. Esto posibilita que se consigan fragmentos secuenciados

de tamaño diferente, dependiendo de donde se hayan agregado los didesoxinucleótidos (ddNTPs) de la nueva hebra, que permiten obtener la secuencia mediante electroforesis. El método consta de las siguientes etapas (Garrigues, 2017):

- 1) En primer lugar, ocurren cuatro reacciones diferentes en un solo tubo. El contenido del tubo está compuesto por una cadena molde (ADN de cadena simple que se puede obtener mediante desnaturalización), ADN polimerasa, un cebador específico, cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) y cuatro ddNTPs marcados cada uno de ellos con un fluorocromo.
- 2) El cebador se une por complementariedad a la hebra molde, permitiendo el reconocimiento de la ADN de la polimerasa y el inicio de la formación de la nueva cadena.
- 3) La ADN polimerasa añade dNTPs hasta que aleatoriamente incorpora un ddNTP marcado y se para la síntesis del fragmento.
- 4) A continuación, tiene lugar la electroforesis capilar. En esta etapa cada fragmento recién secuenciado, tras la interrupción de su síntesis, avanza por un gel a través de un tubo capilar. A partir de aquí pasa a un detector, donde el fluorocromo se excita con un láser y emite una fluorescencia con un color concreto, dependiendo del ddNTP con el que haya sido marcado el fragmento.
- 5) Finalmente, la determinación de cada color para cada base permite obtener un registro digitalizado de los cuatro colores, que combinados forman una secuencia.

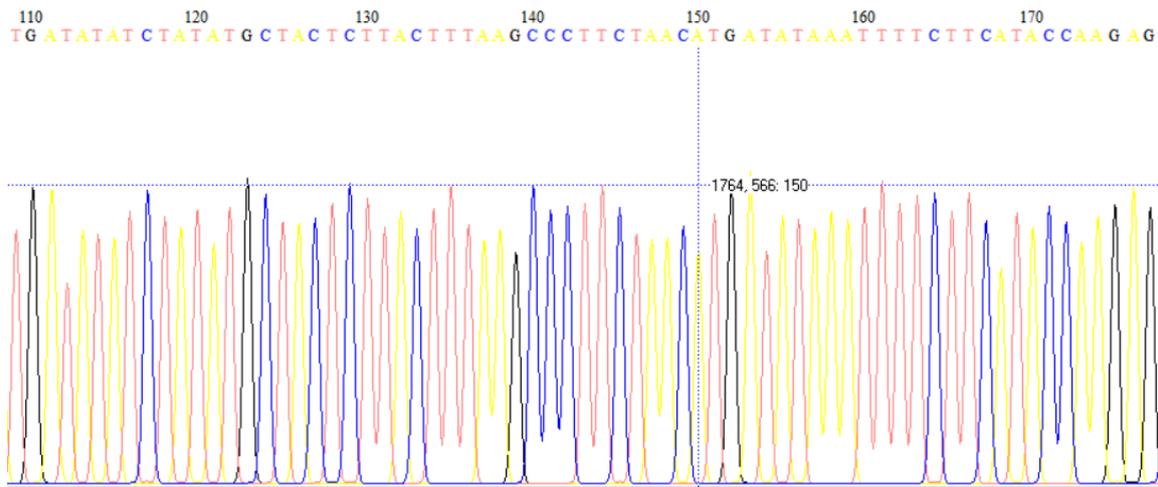
Figura 25. Método de secuenciación Sanger (Modificado de: Garrigues, 2017).



2.3.6. Bioedit

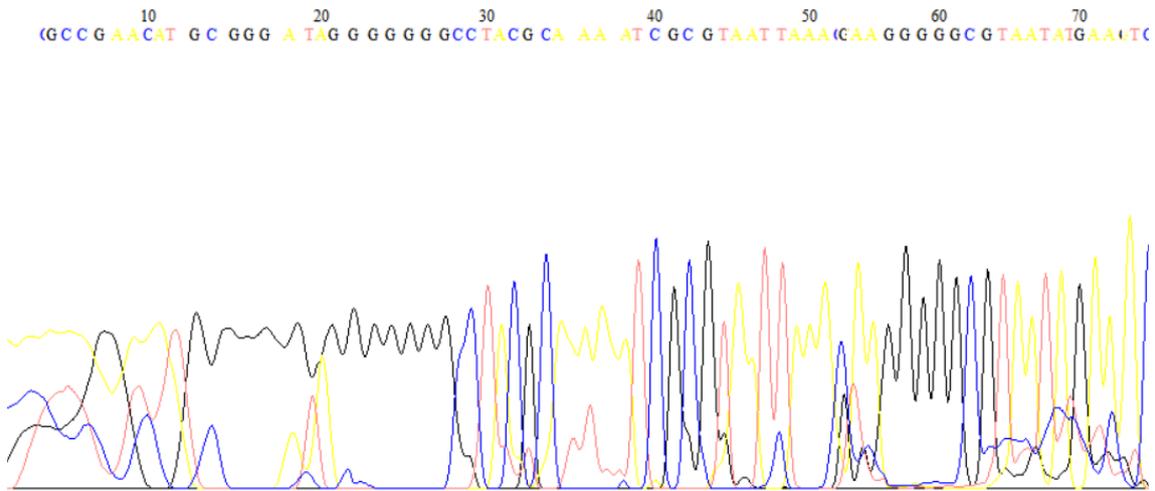
BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) es un programa gratuito muy usado en biología molecular. Permite analizar y modificar manualmente cromatogramas, que representan una secuencia de ADN (Figura 26). Los cromatogramas son el resultado de la electroforesis capilar donde se observan distintos picos de colores, correspondiendo a cada uno de los nucleótidos.

Figura 26. Cromatograma visualizado con BioEdit.



Para editar las secuencias en BioEdit hay que comprobar que los picos, que representan las bases, se corresponden con la secuencia situada en la parte superior, eliminando aquella parte de la secuencia en la que no haya correspondencia (Figura 27). Al principio y al final de la secuencia los picos no se encuentran bien definidos por lo que se deben eliminar esas partes para dejar la secuencia limpia y poder analizarla mediante un algoritmo BLAST.

Figura 27. Parte de la secuencia que se eliminaría por presentar picos mal definidos.



2.3.7. BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) es un programa informático de dominio público desarrollado por el NIH (*National Institutes of Health*), que puede ser usado de forma gratuita desde la página web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Permite el alineamiento local de secuencias de ADN, aunque también de ARN y proteínas, comparando una secuencia concreta (query) con las secuencias existentes en una base de datos (subject), denominada GenBank. Una vez introducida la secuencia en el programa (Figura 28), el algoritmo detecta las secuencias presentes en la base de datos que tienen mayor similitud con la secuencia introducida y aporta una serie de resultados (Figura 29).

Figura 28. Introducción de la secuencia problema en el programa.

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

TATTATGCTCATGATATATCTATATGCTACTCTTACTTTAAGCCCTTCTAACATGATATAAATTTTCTCATACCAAGAGCAAGTTCAACCCCTGACGAGAACTACCGGTTCACACTCTGGGATGCCAGATGAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAACC

Query subrange
From:
To:

Or, upload file: Ningún archivo seleccionado [?](#)

Job Title:
Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database: Standard databases (nr etc.): rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

Organism: [?](#) exclude
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Exclude: Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to: Sequences from type material

Entrez Query: [YouTube](#) [Create custom database](#)
Enter an Entrez query to limit search [?](#)

Program Selection

Optimize for: Highly similar sequences (megablast) More dissimilar sequences (discontiguous megablast) Somewhat similar sequences (blastn) [?](#)
Choose a BLAST algorithm [?](#)

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences) Show results in a new window

Figura 29. Resultados obtenidos con el BLAST para una secuencia concreta.

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Merluccius merluccius mitochondrion, partial genome	Merluccius merluccius	283	283	100%	2e-72	99.36%	16853	MT410897.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Merluccius merluccius isolate Merlucc-09 control region, partial sequence: mitochondrial	Merluccius merluccius	283	283	100%	2e-72	99.36%	434	EF362874.1

Para poder elegir la secuencia que mayor nivel de confianza aporte de todas las que aparecen tras la realización del BLAST, es necesario saber interpretar los diferentes parámetros que aporta el programa (The Regents of the University of California, 2020):

- Max score (puntuación máxima): es la puntuación de alineación que presenta la mayor coincidencia entre la secuencia problema y las secuencias presentes en la base de datos. Es inversamente proporcional al e-valor.
- Total score (puntuación total): es la suma de todas las puntuaciones de alineación de las secuencias de la base de datos.

- Query cover (cubierta de consulta): es el porcentaje de la longitud de la secuencia problema que se incluye en los segmentos alineados.
- E-value (E-valor): es un parámetro que indica el número esperado de alineaciones que se han producido al azar. Disminuye a medida que aumenta la puntuación. Se trata de uno de los parámetros más importantes, ya que cuanto menor sea este valor más significativo y fiable será un alineamiento.
- Per. Ident (porcentaje de identidad): indica la similitud de la secuencia problema con las secuencias de la base de datos.
- Acc. Len (longitud de la accesión): número de nucleótidos identificados por el número de acceso.
- Accesion (número de acceso): es un código que se le asigna a los registros de la base de datos.

2.4. Análisis de metales pesados

2.4.1. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica analítica que se usa para medir determinar y cuantificar gran parte de los elementos de la tabla periódica, entre los que se encuentran los metales pesados.

Es un tipo de análisis que presenta la gran ventaja de poder medir numerosos elementos de forma simultánea en un solo análisis, frente a otras técnicas similares como la absorción atómica con llama en la que solo se puede medir un número limitado de elementos a la vez. La anterior ventaja es la más significativa, pero también presenta otras como (Wilschefski & Baxter, 2019):

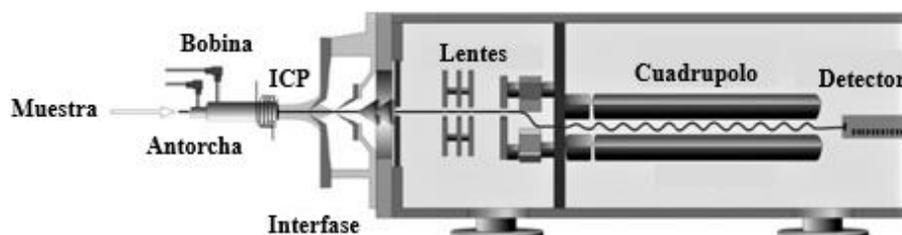
- Presenta un amplio rango analítico
- Límite de detección bajo
- Alto rendimiento de la muestra
- Necesita poco volumen de muestra
- Preparación de la muestra sencilla

Para usar un espectrómetro de masas acoplado inductivamente (ICP-MS) lo primero que hay que hacer es preparar la muestra para el análisis. Para ello, se digiere térmicamente con ácidos diluidos como el ácido nítrico, quedando la muestra líquida.

El ICP-MS presenta seis compartimentos principales donde ocurre el análisis: el sistema de introducción de muestras, plasma acoplado inductivamente (ICP), interfase, lentes iónicas, analizador de masas (cuadrupolo) y un detector (Figura 30).

En primer lugar, las muestras líquidas se nebulizan en el sistema de introducción de muestras, formando un aerosol que se transfiere al plasma de argón; un gas ionizado generado en la bobina y la antorcha que va a ionizar la muestra. El plasma, con una temperatura alta, atomiza e ioniza la muestra, produciendo iones que se extraen mediante la zona de la interfase y en las lentes iónicas. Las lentes enfocan y dirigen el haz de iones hacia el analizador de masas (MS), que en el caso de este trabajo se trata de un cuadrupolo. El analizador de masas clasifica los iones en función de su relación masa-carga (m/z), midiéndose en el detector (Wilschefski & Baxter, 2019).

Figura 30. ICP-MS. (Modificado de: Wilschefski & Baxter, 2019).



2.4.2. PAST. Análisis estadístico

Past (*Paleontological Statistics*) es un software gratuito usado para analizar datos, realización de gráficos, manipulación de datos, análisis descriptivo, análisis interferencial, análisis multivariado, análisis especializado para arqueología y ecología.

La versión que se va a emplear va a ser la 4.06b y se usará para:

- Hacer un análisis simple de varianza (ANOVA) de un factor para observar si hay diferencias significativas en el contenido de cada uno de los metales pesados (variable cuantitativa) entre las diferentes especies del género *Merluccius*.
- Si para algún metal existiesen diferencias significativas entre especies, se haría una segunda prueba estadística para cada uno: la prueba de Tukey. Esta prueba nos permite hacer comparaciones múltiples enfrentando a los diferentes especies,

con el fin de determinar si existen diferencias significativas en el contenido medio de cada metal entre una merluza y otra.

3. METODOLOGÍA

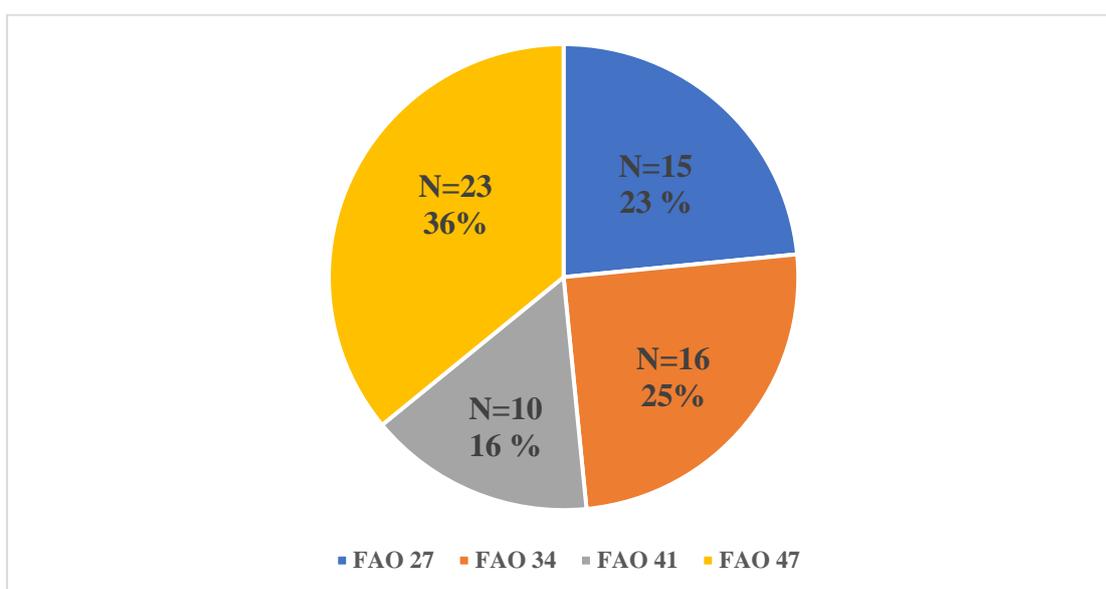
Con el objetivo de tener porciones disponibles de cada muestra para la detección e identificación, cuantificación de metales pesados y posibles errores que conlleven repetir procedimientos, se cortó una porción de tamaño variable de cada ejemplar que se envolvió con film transparente, junto a su etiqueta comercial y el código que se va a usar a partir de ese momento para referirse a cada muestra. Una vez preparadas las muestras se introdujeron en el congelador para conservarlas. Además de lo anterior, se fotografiaron cada una de las etiquetas comerciales para conseguir una mayor trazabilidad que evite cualquier impedimento a la hora de la identificación de los ejemplares.

3.1. Muestras

Se obtuvieron un total de 64 muestras del género *Merluccius* (n=64) procedentes de pesca extractiva, tanto frescas como congeladas. Fueron adquiridas en una pescadería, procedentes de la Nueva Rula de Avilés, y en distintos supermercados de Asturias, de octubre de 2020 a marzo de 2021. Toda la información relativa al etiquetado aparece en el Anexo I.

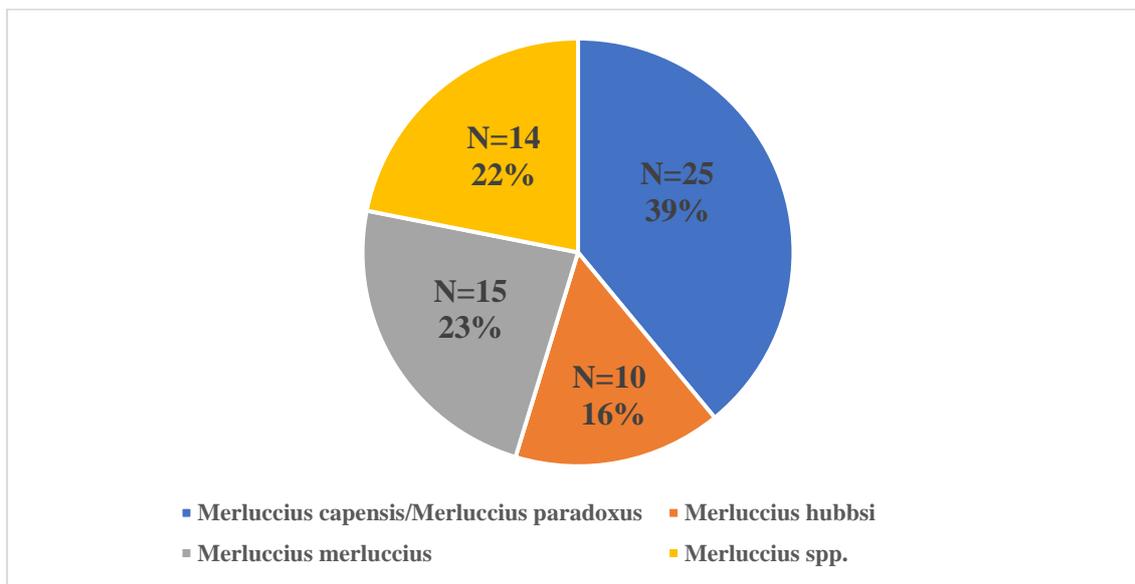
Según las etiquetas, hay cuatro zonas FAO en las que se capturaron las especies, representándose en la Figura 31 el número y el porcentaje de especies encuadradas en cada zona FAO.

Figura 31. Número de muestras y porcentajes para cada zona FAO.



Asimismo, las denominaciones comerciales que aparecen son: *Merluccius capensis*/*Merluccius paradoxus*, *Merluccius hubbsi*, *Merluccius merluccius* y *Merluccius spp.* En la Figura 32 aparece el número y porcentaje de individuos que aparecen para cada categoría.

Figura 32. Número de muestras y porcentajes para cada denominación comercial.



3.2. Metodología usada para la detección e identificación de las muestras

3.2.1. Extracción del ADN

El primer paso para ratificar la especie que se refleja en el etiquetado o para averiguarla, como ocurre en los casos en los que aparece *Merluccius spp.* o *Merluccius capensis*/*Merluccius paradoxus*, es la extracción del ADN. Esta técnica se realizó siguiendo el protocolo para la resina Chelex® de Estoup et al. (1996).

En primer lugar, se prepara el material que se va a emplear: tijeras, vaso de precipitado con agua destilada, pinzas, micropipeta de 1000 µl y una gradilla con un número de tubos Eppendorf igual al número de muestras, rotulándose igual que estas. Seguidamente, se enciende la incubadora y se pone la solución de resina de Chelex® a calentar con agitación, a unos 60°C. A continuación, con la ayuda de unas tijeras y unas pinzas, se coge una porción pequeña de tejido muscular y se introduce en los tubos Eppendorf correspondientes para cada especie. Hay que considerar que entre muestra y

muestra hay que lavar pinzas y tijeras en el vaso de precipitado que se preparó con agua destilada para eludir posibles contaminaciones.

Con una micropipeta se añaden 500 μl de Chelex [®], calentado previamente. Es importante para echar bien la solución de Chelex [®] que se corte un poco de la parte inferior de la punta desechable de la micropipeta. Una vez añadido se echan 7,5 μl de proteinasa K y se introducen las muestras en el horno a 55°C durante una hora y media, sacándolas cada quince minutos para agitarlas. Cuando finaliza la hora y media, se retiran las muestras, se sube la temperatura del horno a 100°C y se procede a reintroducirlas durante 20 minutos con el fin de desactivar la proteinasa K. Por último, se dejan enfriar los tubos y se guardan en la nevera hasta que sea necesario usarlos.

3.2.2. Amplificación del ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la amplificación de un fragmento de 436 pares de bases de la región control del ADN mitocondrial se usó la técnica PCR ejecutada en un termociclador Applied Biosystems, modelo 2720.

La amplificación se llevó a cabo para un volumen de 20 μl , por muestra, para lo que se añadió 2 μl de ADN, extraído en la etapa anterior, para cada ejemplar y 18 μl de mix de PCR preparado con diferentes volúmenes y concentraciones de: primer HK01, primer HK02, buffer, dNTPs, MgCl_2 , agua bidestilada y Taq ADN polimerasa (Tabla 2). Además, se preparó un control negativo con 18 μl de mix de PCR para comprobar la posible existencia de contaminaciones.

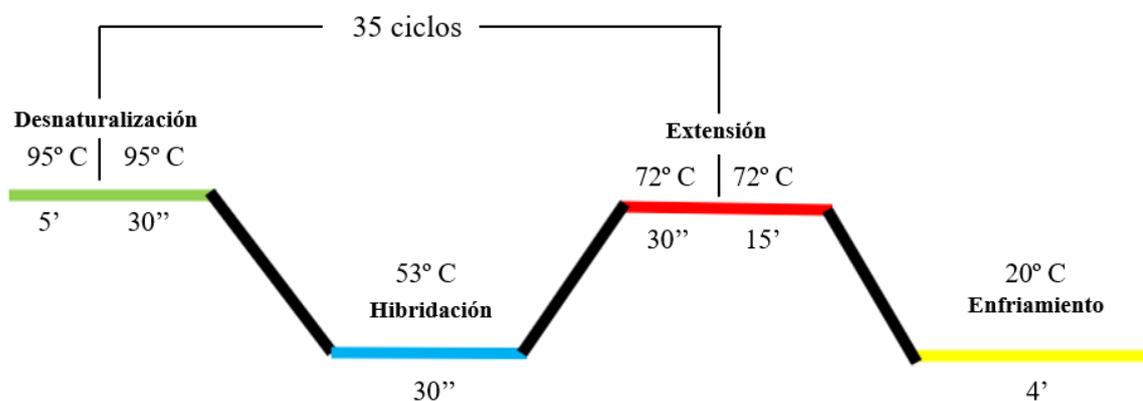
Tabla 2. Volúmenes y concentraciones para cada componente del mix de PCR.

Componentes	Volumen	Concentración
Cebador HK01	1 μl	20 pmol
Cebador HK02	1 μl	20 pmol
Buffer	4 μl	1x
MgCl₂	1,2 μl	2,5 mM
dNTPs	2 μl	0,25 mM
Agua bidestilada	8,65 μl	-
Taq ADN polimerasa	0,15 μl	1 U

El programa usado para las amplificaciones en el termociclador (Figura 33) consta de varias fases:

- Desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 5 minutos.
- 35 ciclos consecutivos de amplificación con las siguientes etapas:
 - Desnaturalización a 95°C durante 30 segundos.
 - Hibridación a 53°C durante 30 segundos (temperatura a la que hibridan los cebadores).
 - Extensión a 72°C durante 30 segundos.
- Elongación final a 72°C durante 15 minutos.
- Enfriamiento a 20°C durante 4 minutos.

Figura 33. Programa usado para la amplificación del marcador de la región control.



3.2.3. Visualización en gel de agarosa

Tras el paso de las muestras por el termociclador, se procede a observar los resultados de los productos de la PCR mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 %.

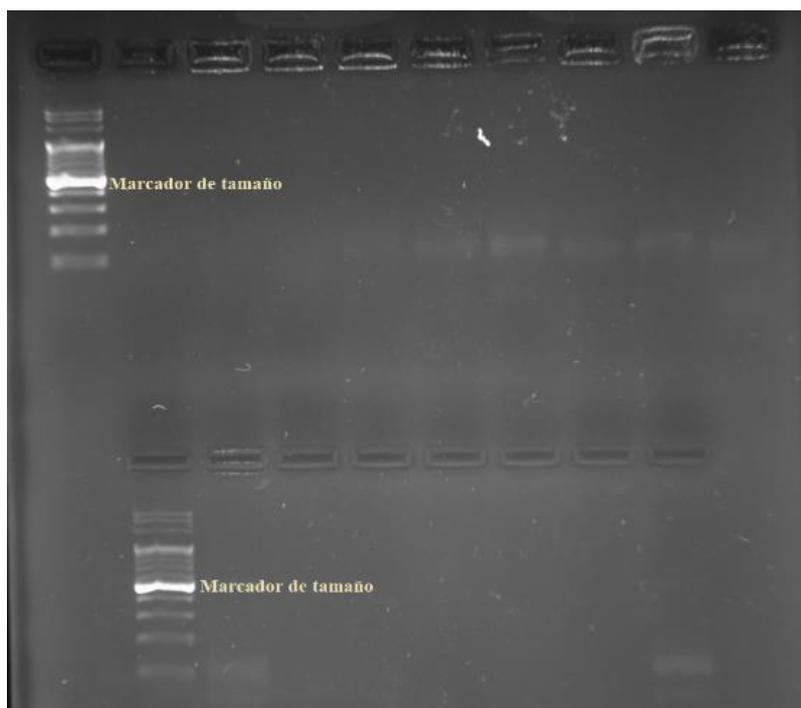
Para elaborar el gel de agarosa, se prepara un matraz con 1 gramo de agarosa y 50 ml de TBE 1x, se agita y se calienta en el microondas, unos segundos, hasta que quede una disolución homogénea y transparente. A continuación, se adicionan 2,5 µl al matraz del fluorocromo SimplySafe™, se colocan los peines en una placa molde, se vierte el contenido de la solución final en esta y se deja enfriar durante media hora para que se forme el gel de agarosa.

Una vez formado, se retiran los peines de la placa y se añaden 4 µl del marcador de tamaño, en el primer pocillo de cada fila, 4 µl del producto de la PCR en cada pocillo y

se deja el último pocillo libre para añadir 4 µl del control negativo. Consecutivamente, se sumerge el gel en una cámara de electroforesis horizontal con una carga eléctrica de 120 V, dejando que migren las moléculas de ADN durante unos 20 minutos aproximadamente.

Por último, se colocó el gel de agarosa en un transiluminador de luz UV para visualizar las bandas de ADN, no obteniéndose ningún resultado (Figura 34).

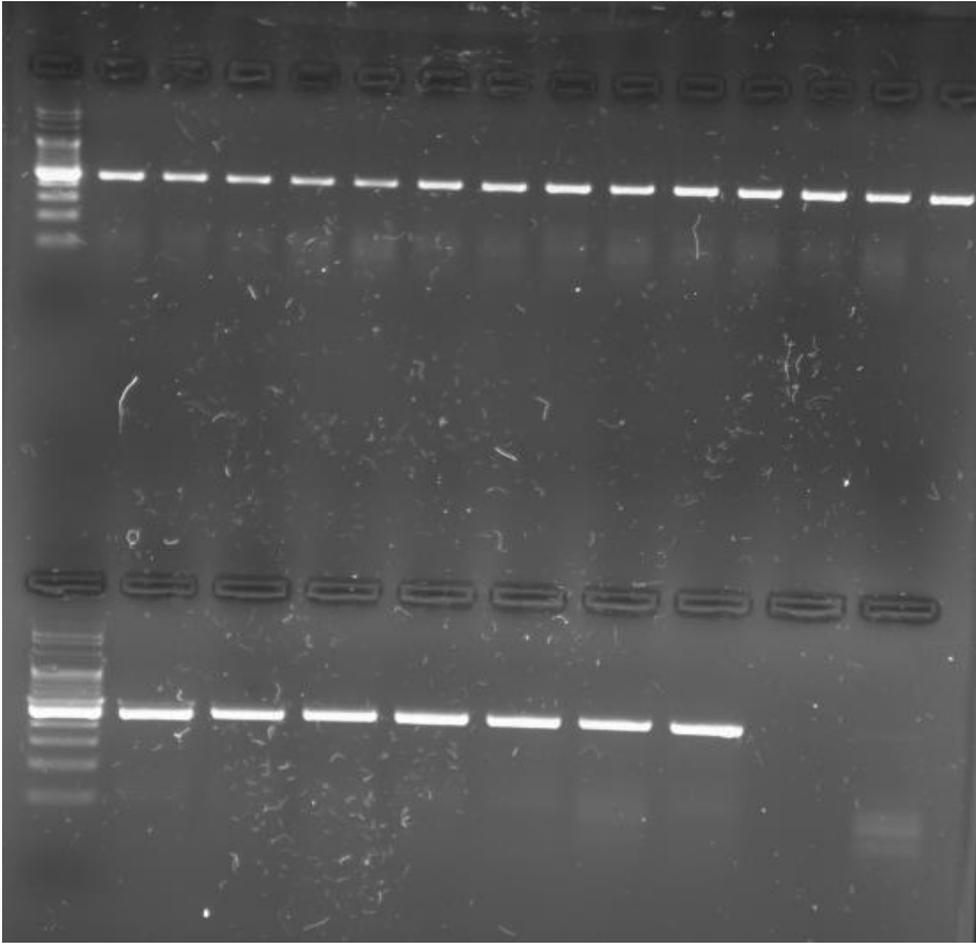
Figura 34. Uno de los geles que se prepararon para visualizar el producto de la PCR sin resultados.



La explicación de esto podría deberse a varias causas. Una de ellas podría ser que la concentración de ADN molde fuese lo suficientemente elevada para que se produjese el agotamiento de los cebadores, lo que impediría realizar la amplificación correctamente. Otra podría ser que tras la extracción quedase una concentración de productos residuales de los ejemplares (células, proteínas, etc) que interfiriese con la labor de los elementos del mix de PCR.

Con el fin de solucionar este problema, se probó a realizar una dilución 1/10 con los productos de la extracción de ADN. Para ello, se preparó para cada muestra un tubo Eppendorf con 4 µl de ADN y 36 µl de agua destilada y se repitieron todos los procesos anteriormente vistos. Esta vez, el resultado fue exitoso, observándose las bandas de ADN y, por ende, confirmando la amplificación correcta en el termociclador (Figura 35).

Figura 35. Uno de los geles que se prepararon para visualizar el producto de la PCR donde se observan resultados tras la dilución 1/10 de los productos de la extracción de ADN.

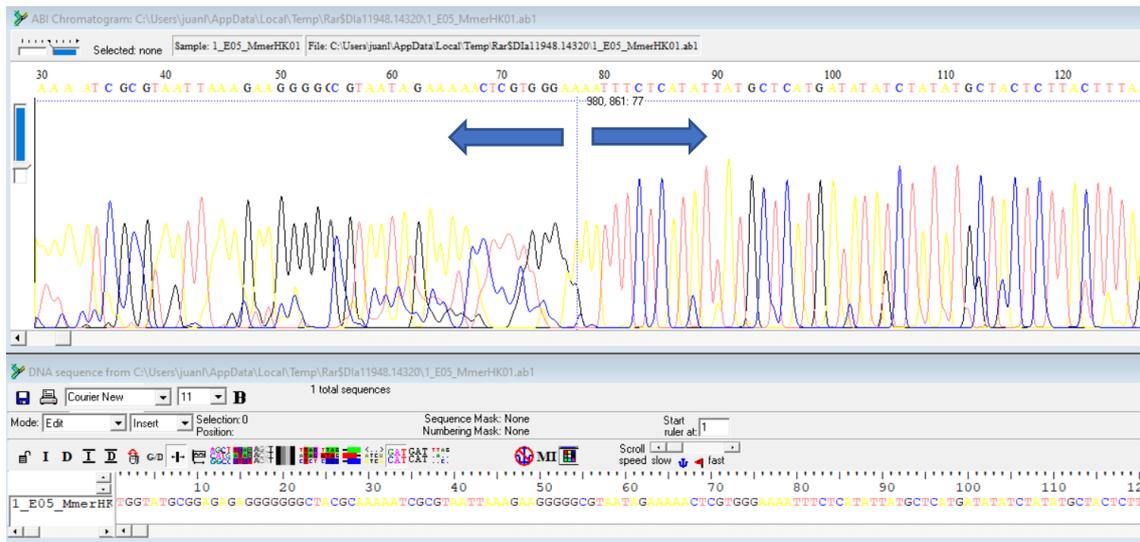


3.2.4. Secuenciación del ADN, alineamiento e identificación

Las muestras amplificadas y los 2 cebadores empleados se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen Spain, Inc (Madrid, España). Para ello, se preparó una placa de 96 pocillos con 4 µl de ADN por muestra.

Una vez recibidas las secuencias, se editaron manualmente con el software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) con el fin de, en los casos que sea necesario, enmendar transiciones y transversiones. Asimismo, se eliminaron las partes de la secuencia que se ven en el cromatograma con mucho ruido de fondo, es decir, con picos mal definidos y poco separados entre sí que hacen imposible leer la secuencia (Figura 36).

Figura 36. Cromatograma de una de las secuencias leídas en BioEdit. Se aprecia a la izquierda una parte de la secuencia con mucho ruido de fondo que habría que eliminar y a la derecha una parte bien definida.



Tras la corrección y limpieza de las secuencias, se usó el programa BLAST (*Basis Local Alignment Search Tool*) para comparar las secuencias definidas de las muestras con las existentes en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), y así poder identificar las especies (Figura 37).

Figura 37. Alineamientos de una de las secuencias del estudio (*Query*) con diferentes secuencias de la base de datos GenBank (*Sbjct*).

Merluccius capensis isolate Capensi-10 control region, partial sequence; mitochondrial					
Sequence ID: EF362865.1 Length: 434 Number of Matches: 1					
Range 1: 87 to 395 GenBank Graphics				▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Plus/Plus
488 bits(264)	1e-133	294/309(95%)	0/309(0%)	Plus/Plus	
Query 9	GAAAAATTTCTCATATATTATGCTCATGATATATCTATATGCTACTCTTACTTTAAGCCCTTC	68			
Sbjct 87	GAAAAATTTCTCATATATTATGCTCATGATATATCTATATGCTACTCTTACTTTAAGCCCTTC	146			
Query 69	TAACATGATATAAATTTTCTTACATACCAAGAGCAAGTTCAACCCGTGACGAGAACTACCGT	128			
Sbjct 147	TAACATGATATAAATTTTCTTACATACCAAGAGCAAGTTCAACCCGTGACGAGAACTACCGT	206			
Query 129	GTTCACTCTGGGATGCCAGATGAAAGGaaaaaaaaaaaaaaaaaCCCGTTGCCCTaaaa	188			
Sbjct 207	GTTCACTCTGGGATGCCAGATGAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAACCGTTGCCCTTAGA	266			
Query 189	aaaaaCCCCGGCATGCTGAAAAATTTGAATATTTGACTGCGAACTTTAAGAGAGGGACA	248			
Sbjct 267	GAGAACCGCCGGCATGCTGAGAAATTTGAATATATGACTGCGAACATTAAGAGATGGACA	326			
Query 249	AAAATGCAAGTTGTGAGCGGTTAAACGTTTATGGACTTGAAGCTAGGCGGGGATGCCAGG	308			
Sbjct 327	AAAATGCAAGTTGTGAGCTGTTAGACGTTTATGGACCTGAAGCTAGGCAAGGATGCCAGG	386			
Query 309	AATATTTCA	317			
Sbjct 387	AATAATTCA	395			

3.3. Metodología empleada para la cuantificación de metales pesados

3.3.1. Preparación y digestión de las muestras

En primer lugar, se preparó una gradilla con tubos Eppendorf con un contenido de 0,2-0,5 gramos de tejido muscular por cada muestra, con el fin de analizar el contenido de metales pesados en el Centro Científico-Tecnológico Severo Ochoa de la Universidad de Oviedo (Oviedo, España).

El procedimiento inicial consiste en la digestión ácida por microondas de las muestras, con el fin de descomponer el tejido en iones, agua y gases. Para realizar la digestión, se añadió a cada muestra 7 ml de HNO₃ al 65 % y 1 ml de H₂O₂ al 30 % y se depositaron en un microondas (Milestone HPR-FO-20), estableciendo un programa de media hora a 200°C con una potencia de 1500 W.

3.3.2. Cuantificación de las concentraciones de metales pesados

Después de la digestión por microondas, se determinaron las concentraciones de los ocho metales de interés (Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg y Pb) mediante ICP-MS, usando un espectrómetro Agilent 7900 (Figura 38).

Figura 38. Espectrómetro Agilent 7900 (Extraído de: https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/icp-ms-instruments/7900-icp-ms#zoomELIBRARY_881966).



Los patrones internos que se usan son: el ^{45}Sc para el Ni, Cr, Cu y Zn, el ^{103}Rh para el As y el Cd y el ^{193}Ir para el Hg y el Pb. Se usan estos patrones internos debido a que son los que presentan una masa más próxima a los metales de interés. Además, se emplea un patrón de pez muscular ERM®-BB422 (<https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/40455/40461/By-material-matrix/Animalmaterials/ERM-BB422-FISH-MUSCLE-trace-elements/ERM-BB422>) para la validez de las medidas.

3.4. Método de búsqueda de información

Para recabar la información necesaria para realizar este proyecto se han utilizado artículos procedentes de diferentes motores de búsqueda, principalmente de Google Scholar, y en menor medida de PubMed y Web of Science.

Para ello, se ha llevado a cabo el uso de la “búsqueda avanzada”, con el fin de realizar un rastreo selectivo que permita encontrar los artículos que más se ajustan a las necesidades del trabajo. Esta búsqueda se basó en las siguientes palabras claves en inglés: “mislabelling”, “hake”, “*Merluccius*”, “fish fraud identification”, “heavy metals”, “lead”, “*Merluccius capensis*”, “*Merluccius paradoxus*”, “*Merluccius hubbsi*”, “*Merluccius merluccius*”, “*Merluccius polli*”, “*Merluccius senegalensis*”, “arsenic”, “zinc”, “copper”, “mercury”, “cadmium”, “nickel”, “chromium”, “Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”. Asimismo, se tuvo en cuenta que la fecha de publicación no estuviera por debajo del año 2011 para ofrecer una revisión bibliográfica lo más actualizada posible de la última década, sin embargo, en algunos casos se emplearon artículos más antiguos ya que aportaban información apropiada que no era necesario que estuviese actualizada.

A parte, se han usado portales de internet de diferentes entidades que ofrecen información muy valiosa para el proyecto, como es el caso de la Secretaría General de Pesca, la FAO o AESAN.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados del etiquetado incorrecto

Tras el análisis de las secuencias de las muestras mediante el BLAST se identificaron todas las especies del estudio con diferentes parámetros que aporta este programa, adjuntándose en una tabla en el anexo II.

Se observa como los valores del parámetro e-valor se encuentran muy cercanos a 0, e incluso en algunos casos son 0, lo que indica que el alineamiento ha sido estadísticamente significativo, es decir, la probabilidad de que el alineamiento de nuestra secuencia con las existentes en la base de datos haya sido al azar es muy baja (e-valor < 0,05).

Así pues, los porcentajes de identificación de las especies son bastantes altos, situándose entre 94,63 % y 100 %, siendo la probabilidad de identificación incorrecta muy baja.

Haciendo hincapié en los resultados relativos al etiquetado incorrecto, se observa como 21 muestras presentan en la etiqueta una especie que no se corresponde con la especie original (Tabla 3), lo que representa un 32,81 % sobre la muestra total; incumpliendo la normativa del reglamento de la UE (UE 1379/2013).

Tabla 3. Muestras que no corresponden con la especie que se representa en el etiquetado.

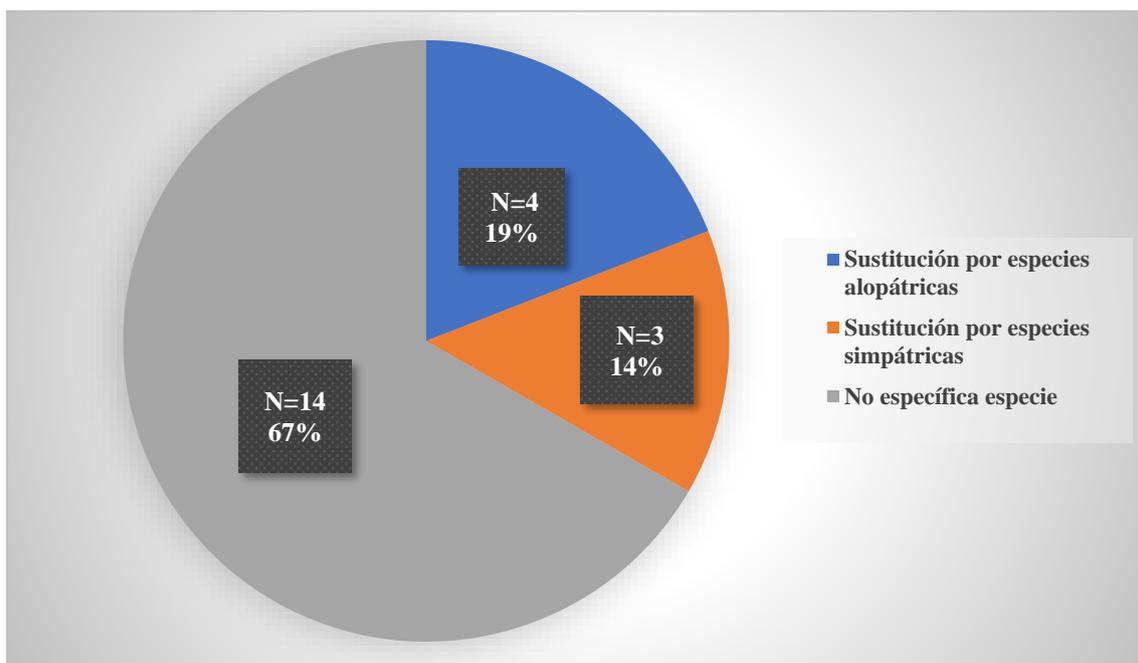
Nº de muestra	Nombre común etiqueta	Especie etiqueta	Especie real
6	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. hubbsi</i>
7	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. hubbsi</i>
8	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. hubbsi</i>
11	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
12	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>
13	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
14	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
15	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
20	Merluza del Cabo	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	<i>M. merluccius</i>
24	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
25	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
26	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>
27	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>
28	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
29	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>
30	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>

31	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>
32	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>
47	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. polli</i>
48	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. polli</i>
49	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. polli</i>

Es importante aclarar que para este estudio no se separa entre *M. capensis* y *M. paradoxus*, ya que son 2 especies simpátricas que se comercializan juntas, y así aparecen en el etiquetado comercial.

Se puede ver como el conjunto de muestras mal etiquetadas siguen 3 patrones distintos: especies que se sustituyen por especies alopátricas, por especies simpátricas y etiquetado en el que solo se especifica el género, pero no la especie (*Merluccius spp.*), es decir, un etiquetado incompleto; predominando este último (Figura 39).

Figura 39. Representación del número de especies y porcentajes de cada patrón de etiquetado incorrecto sobre las muestras mal etiquetadas



Analizando el patrón predominante de etiquetado incorrecto que no especifica la especie (*Merluccius spp.*), se puede ver como las especies que se incluyen son *M. polli* y *M. senegalensis*, predominando *Merluccius polli* en 9 de las 14 muestras.

En segundo lugar, se sitúa la sustitución por especies alopátricas. Se observa una sustitución de *M. capensis/M. paradoxus* por *M. hubbsi* en 3 casos y por *M. merluccius* en otro.

Finalmente, la sustitución por especies simpátricas se basa en la sustitución de *M. capensis/M. paradoxus* por *M. polli*.

El etiquetado incorrecto contribuye a la amenaza de especies, debida a la alteración de las estadísticas que monitorean las poblaciones de las diferentes especies y, además, supone un engaño para el consumidor.

En el primer caso analizado, el etiquetado no cumplía con el reglamento UE (UE 1379/2013) antes de este análisis. Además, los resultados muestran que los individuos que se incluyen son 2 especies simpátricas africanas que no se registraron, y, por ende, contribuye a que el análisis del estado de conservación de cada una pueda ser impreciso.

En el segundo caso, se ve claramente que la sustitución de una especie de merluza africana por una merluza argentina se ha realizado de forma deliberada, siendo muy probable que esto ocurra por falta de stock de *M. capensis/M. paradoxus*. También se da un caso poco común que es la sustitución de *M. capensis/M. paradoxus* por *M. merluccius*, que quizás pueda deberse a un fallo con las muestras ya que *M. merluccius* es una de las especies más cotizadas y uno de los principales motivos de la sustitución por especies alopátricas es el beneficio económico.

En el tercer caso, se sustituye *M. capensis/M. paradoxus* por *M. polli* dos especies con distintas zonas FAO, pero que son parcialmente simpátricas, lo que indica que quizás se trate de un etiquetado incorrecto realizado de forma accidental.

4.2. Resultados de metales pesados

Los resultados para cada muestra obtenidos tras el análisis con el ICP-MS se muestran en el anexo III. Al tratarse de especies simpátricas que se capturan en el mismo lugar y comparten hábitat se considera *M. capensis/M. paradoxus*, como un ensamblaje de especies para este estudio.

4.2.1. Validación de las medidas

Tras analizar el tejido de las distintas muestras en el ICP-MS se obtienen tres resultados:

- La concentración de metales pesados ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de cada individuo para cada metal.
- La desviación típica relativa (RSD), que es muy baja (por debajo del 15 %) para la media de cada especie, lo que indica una gran precisión en las medidas realizadas. En la Tabla 4 se muestran las concentraciones y la RSD media de los metales esenciales para cada especie y en la Tabla 5 para los metales no esenciales.
- Resultados de un individuo estándar (patrón muscular) que se usa como control, que presenta la cantidad exacta calibrada del contenido de algunos de los metales. Comparando las muestras del estudio con las del individuo estándar ERM®-BB422, que contempla algunos metales, se observa como existe mucha variación.

Tabla 4. Media del contenido de los distintos metales pesados esenciales, media de la RSD (%) para las diferentes especies y comparación con el músculo patrón ERM®-BB422.

	METALES ESENCIALES							
	Cromo		Níquel		Cobre		Zinc	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD
<i>M. hubbsi</i>	131,740	1,5	27,312	3,5	391,382	0,6	3148,677	1
<i>M. merluccius</i>	99,886	1,6	19,489	3,5	212,242	1,1	3386,498	0,8
<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	87,573	1,9	33,351	2,6	478,659	1,5	3700,748	1,4
<i>M. polli</i>	93,870	1,7	23,509	5,8	136,503	1,9	2702,951	1,2
<i>M. senegalensis</i>	78,270	1,3	25,795	3,1	103,697	1,6	2221,733	1,6
Patrón muscular	-	-	-	-	1429,05	2,5	15419,05	1,4

Tabla 5. Media del contenido de los distintos metales pesados no esenciales, media de la RSD (%) para las diferentes especies y comparación con el músculo patrón ERM®-BB422.

	METALES NO ESENCIALES							
	Arsénico		Cadmio		Mercurio		Plomo	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD
<i>M. hubbsi</i>	909,685	1,2	6,142	5,5	23,975	3,5	0,992	1,1
<i>M. merluccius</i>	3322,300	0,9	0,744	6,4	214,853	1,3	4,474	6,2
<i>M.capensis/M. paradoxus</i>	2143,341	1,2	1,006	7,2	103,904	2	2,481	4
<i>M. polli</i>	1958,480	0,8	1,343	8,8	188,042	1,7	5,699	4,6
<i>M. senegalensis</i>	1322,415	1,1	0,420	10,8	50,121	1,9	1,900	4
Patrón muscular	15054,28	0,1	7,4	2	652,63	2,4	-	-

4.2.2. Análisis de los resultados con PAST

En primer lugar, se observa el contenido medio de cada metal pesado frente a su desviación estándar (SD), que determina la variación o dispersión de las diferentes concentraciones de metales pesados respecto a la media. Lo anterior se muestra en la Tabla 6 para los metales esenciales y en la Tabla 7 para los metales no esenciales; indicando con un sombreado las SD que se encuentran por encima de la media, presentando un sesgo.

Tabla 6. Media del contenido de los distintos metales pesados esenciales y de la SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para las diferentes especies.

	METALES ESENCIALES							
	Cromo		Níquel		Cobre		Zinc	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD
<i>M. hubbsi</i>	131,740	74,903	27,312	34,170	391,382	240,165	3148,677	645,656
<i>M. merluccius</i>	99,886	92,501	19,489	26,742	212,242	213,206	3386,498	1587,746
<i>M.capensis/ M. paradoxus</i>	87,573	78,960	33,351	28,024	478,659	641,934	3700,748	2992,221
<i>M. polli</i>	93,870	75,392	23,509	29,927	136,503	104,505	2702,951	1014,313
<i>M. senegalensis</i>	78,270	35,065	25,795	15,978	103,697	27,121	2221,733	308,106

Tabla 7. Media del contenido de los distintos metales pesados no esenciales y de la SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para las diferentes especies.

	METALES NO ESENCIALES							
	Arsénico		Cadmio		Mercurio		Plomo	
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD	($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD
<i>M. hubbsi</i>	909,685	184,308	6,142	8,094	23,975	11,568	0,992	2,280
<i>M. merluccius</i>	3322,300	1812,487	0,744	0,969	214,853	90,025	4,474	9,986
<i>M.capensis/ M. paradoxus</i>	2143,341	809,607	1,006	1,145	103,904	83,352	2,481	1,782
<i>M. polli</i>	1958,480	583,618	1,343	1,852	188,042	249,996	5,699	11,732
<i>M. senegalensis</i>	1322,415	309,971	0,420	0,310	50,121	20,488	1,900	0,748

Se ve como las SD son muy elevadas, reflejando que las diferentes concentraciones de metales pesados son muy variables para cada especie.

Para ver si existen diferencias significativas entre las distintas especies de *Merluccius* para la media de cada uno de los metales se aplica un análisis ANOVA de un solo factor.

De los resultados obtenidos, nos vamos a fijar en dos parámetros en el valor F y en su valor p correspondiente. Cuanto más alto sea el valor F más relacionadas estarán las variables y si el valor p es menor de 0,05 significa que hay diferencias significativas entre las especies.

Tras el análisis de los valores F y p, se determina que hay diferencias significativas entre las especies para 3 de los metales pesados exógenos: mercurio, arsénico y cadmio (Tabla 8); siendo el arsénico el más diferente entre especies, ya que presenta los valores F y p más altos.

Tabla 8. Metales que presentan diferencias significativas entre especies.

MERCURIO		ARSÉNICO		CADMIO	
Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
5,475	0,000812	10,36	0,000002018	4,861	0,001864

Para los metales pesados esenciales no se observan diferencias significativas ya que, al ser especies del mismo género con un metabolismo similar, la concentración de cada metal no varía demasiado.

Tras observar que hay diferencias significativas para el mercurio, cadmio y arsénico, se aplica un método de comparaciones múltiples: la prueba Tukey. Esta prueba permite analizar si hay diferencias significativas entre dos especies para cada metal, analizando el valor p.

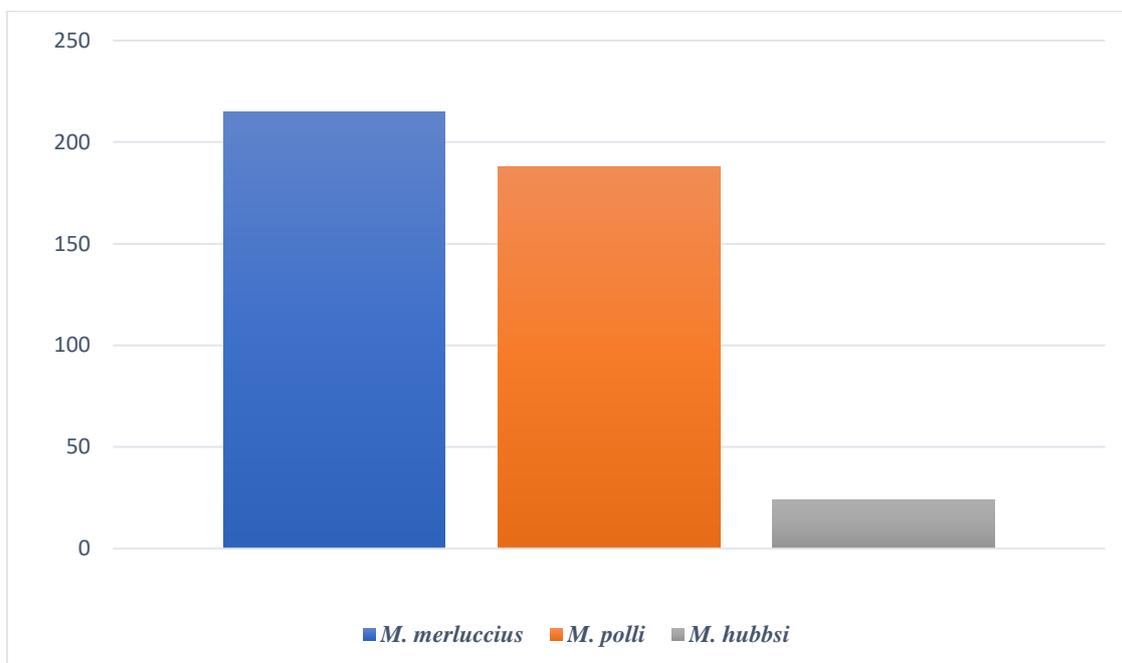
Los resultados para el **mercurio** (Tabla 9) muestran que *Merluccius hubbsi* presenta diferencias significativas con *Merluccius merluccius* y *Merluccius polli*.

Tabla 9. Diferencias significativas para el Hg entre cada par de especies tras la prueba Tukey con PAST.

	M. hubbsi	M. merluccius	M. cap/par	M. polli	M. senegalensis
M. hubbsi		0,00129	0,4129	0,01517	0,9947
M. merluccius	5,757		0,08902	0,9804	0,09127
M. cap/par	2,473	3,636		0,3846	0,9146
M. polli	4,615	0,7907	2,542		0,2497
M. senegalensis	0,5595	3,621	1,198	2,918	

Teniendo en cuenta estos resultados y las medias de cada especie para el mercurio se puede ver una gran diferencia significativa entre consumir *Merluccius hubbsi*, con un bajo contenido en mercurio, frente a *Merluccius merluccius* y *Merluccius polli*, que presentan una elevada concentración (Figura 40).

Figura 40. Comparación del contenido medio de Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de *M. hubbsi*, *M. merluccius* y *M. polli*.



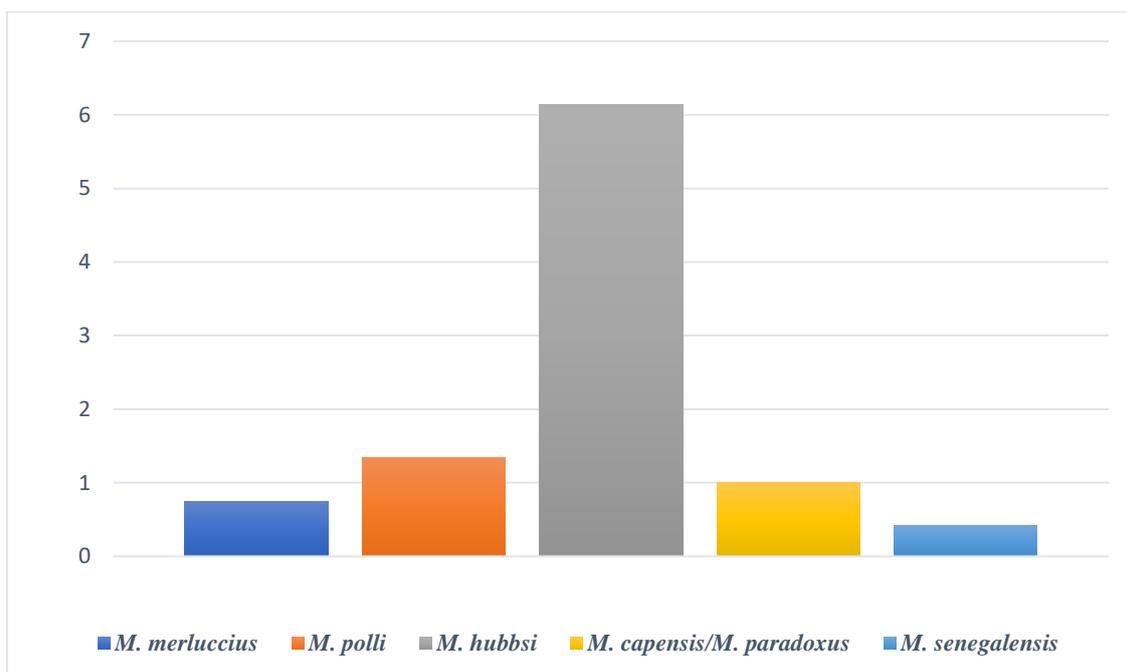
Para el **cadmio** se observa que *M. hubbsi* presenta diferencias significativas con el resto de las especies (Tabla 10).

Tabla 10. Diferencias significativas para el Cd entre cada par de especies tras la prueba Tukey con PAST.

	M. hubbsi	M. merluccius	M. cap/par	M. polli	M. senegalensis
M. hubbsi		0,003224	0,004262	0,02148	0,04609
M. merluccius	5,352		0,9996	0,9939	0,9998
M. cap/par	5,224	0,2815		0,9993	0,9981
M. polli	4,438	0,5804	0,3352		0,991
M. senegalensis	4,026	0,2345	0,429	0,6421	

La media del contenido de Cd para *M. hubbsi* es significativamente elevada en comparación con las demás especies, existiendo una gran diferencia entre consumir esta merluza y el resto (Figura 41).

Figura 41. Comparación del contenido medio de Cd ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de las especies de *Merluccius*.



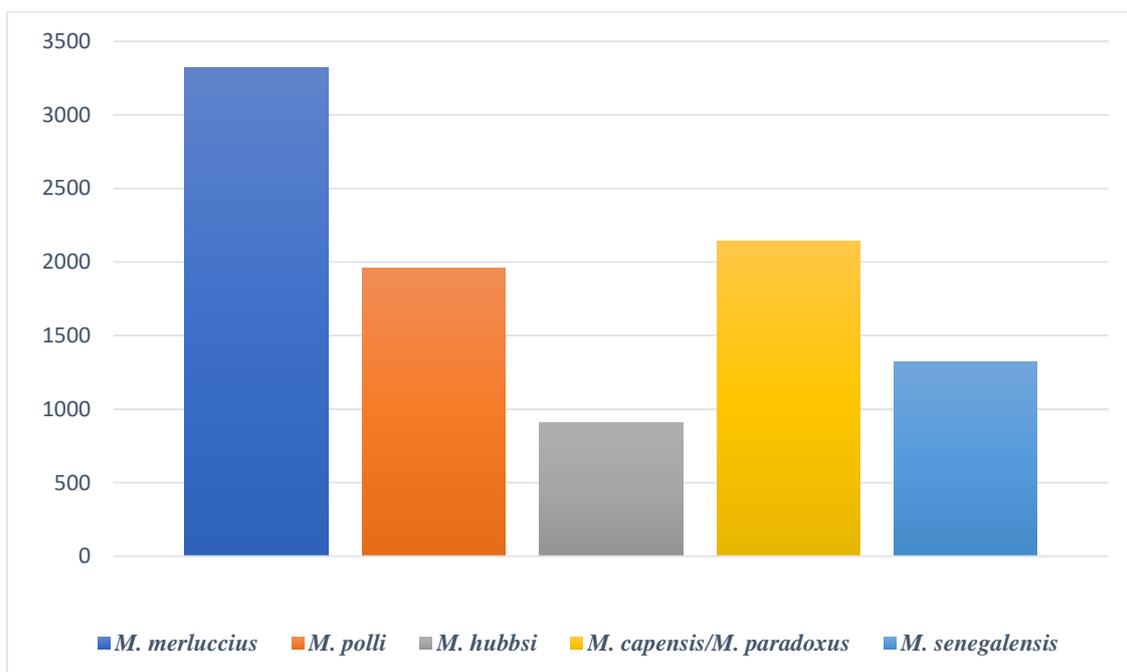
Atendiendo al **arsénico**, se observa para el caso de *M. hubbsi* diferencias significativas con *M. merluccius* y *M. capensis/M. paradoxus*, y para *M. merluccius* con las merluzas africanas: *M. capensis/M. paradoxus*, *M. polli* y *M. senegalensis* (Tabla 11).

Tabla 11. Diferencias significativas para el As entre cada par de especies tras la prueba Tukey con PAST.

	M. hubbsi	M. merluccius	M. cap/par	M. polli	M. senegalensis
M. hubbsi		6,946E-07	0,01666	0,1052	0,9442
M. merluccius	8,709		0,0149	0,01017	0,003936
M. cap/par	4,568	4,625		0,9895	0,5363
M. polli	3,531	4,813	0,6686		0,7853
M. senegalensis	1,057	5,261	2,189	1,611	

Analizando los resultados, se ve como la concentración media de As para *M. hubbsi* es significativamente más baja que la presente en *M. capensis/M. paradoxus* y *M. merluccius*, y la concentración de *M. merluccius* es significativamente más elevada que la presente en las especies de merluzas africanas (Figura 42).

Figura 42. Comparación del contenido medio de As ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de las especies de *Merluccius*.



4.2.3. Concentración de metales pesados frente a los límites máximos permitidos

En el apartado 2.2 se establecían los límites permitidos para los metales pesados, aplicables a las especies del género *Merluccius*, que se reflejan en legislaciones o en entidades fiables que aportan recomendaciones. Para el cromo, cobre y zinc no se encontraron valores máximos permitidos, ya que se tratan de metales esenciales de los que no puede saberse qué parte procede del propio metabolismo del individuo y cual de contaminación externa, siendo difícil establecer unos niveles máximos de ingesta; estando aún por determinar.

En la Tabla 12, se comparan las medias de cada metal pesado para las diferentes especies con el valor máximo establecido.

Tabla 12. Comparación del contenido medio de cada metal pesado ($\mu\text{g}/\text{kg}$) para las diferentes especies frente al límite máximo permitido (LM) en ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

	As		Cd		Hg		Pb		Ni	
	Media	LM	Media	LM	Media	LM	Media	LM	Media	LM
<i>M. hubbsi</i>	909,7	500	6,1	50	24	500	1	300	27,3	1300
<i>M. merluccius</i>	3322,3	500	0,7	50	214,9	500	4,5	300	19,5	1300
<i>M. capensis</i> / <i>M. paradoxus</i>	2143,3	500	1,00	50	103,9	500	2,5	300	33,4	1300
<i>M. polli</i>	1958,5	500	1,3	50	188	500	5,7	300	23,5	1300
<i>M. senegalensis</i>	1322,4	500	0,4	50	50,1	500	1,9	300	25,8	1300

Los resultados indican que los valores medios de arsénico para cada especie superan el valor máximo permitido, mientras que para el resto de los metales los valores medios se encuentran dentro de los límites permitidos.

Una vez visualizados los valores medios, se analiza la tabla presente en el Anexo III, donde se incluye la concentración de cada metal para cada muestra. En ella se observa que todas las muestras superan el valor máximo permitido para el arsénico y tres muestras de *M. polli* superan el límite para el mercurio, por lo que no deberían consumirse al representar un riesgo para la salud de los consumidores

Las merluzas analizadas actúan como bioindicadores de la calidad de los diferentes hábitats donde viven, por lo que se podría concluir que las merluzas de las zonas FAO examinadas presentan una elevada concentración de As y, además, aunque las especies de *M. polli* no se caracterizaban por presentar una concentración de Hg elevada tres de ellas sí superaban ese límite por lo que el hábitat, dentro de la zona FAO 34, donde se capturaron presenta una alta concentración en mercurio.

4.2.4. Ingesta semanal máxima tolerable

La ingesta semanal máxima tolerable se va a realizar para los 3 metales pesados, que daban diferencias significativas entre especies en la prueba ANOVA de un factor. Este parámetro realiza una estimación, por unidad de peso, para determinar la cantidad que se podría consumir de cada especie sin presentar efectos adversos para la salud.

Se calcula con la siguiente fórmula:

$$MWI = (PTWI \times BW) / MHM$$

- MWI (*The Maximum tolerable Weekly Intake*): representa la ingesta máxima tolerable.
- PTWI (*Provisional Tolerable Weekly Intake*): es la ingesta semanal tolerable provisional, aparece en el apartado 2.2 para cada metal.
- BW (*Body Weight*): es el peso medio, para este estudio se va a emplear un peso estándar de 70 kg.
- MHM (*Median concentration of the Heavy Metal*): es la concentración media para cada metal pesado en cada una de las especies de merluzas.

Los resultados de la ingesta máxima tolerable se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. Ingesta de pescado semanal máxima tolerable en kg, teniendo en cuenta cada metal y especie.

	Arsénico	Cadmio	Mercurio
<i>M. hubbsi</i>	1,15	28,69	11,67
<i>M. merluccius</i>	0,32	250	1,3
<i>M.capensis/M. paradoxus</i>	0,49	175	2,7
<i>M. polli</i>	0,54	134,62	1,49
<i>M. senegalensis</i>	0,79	437,5	5,59

Se observa, como el As se diferencia del resto de metales ya que la MWI es más baja, en especial para *M. merluccius* que es la que más contenido en arsénico presenta.

Para el Cd destaca *M. hubbsi* que es la que más contenido presenta, aun así la MWI es muy elevada por lo que el consumidor estaría fuera de riesgo.

Respecto al Hg se observa una MWI más baja en *M. merluccius* y *M. polli* ya que presentan una concentración en este metal más elevada que el resto, aun así el consumidor también estaría fuera de riesgo ya que la MWI es muy elevada, aunque no tanto como con el Cd.

5. CONCLUSIONES

En cuanto a las conclusiones que se pueden establecer a partir del análisis de etiquetado incorrecto, destaca que:

- Un 32,81 % de las muestras presentaban etiquetado incorrecto, predominando aquel en el que no es específica la especie (*Merluccius spp.*). Las principales especies substitutas son *M. polli*, principalmente, seguida de *M. senegalensis*.
- La sustitución por especies alopátricas se basa en el cambio de *M. capensis/M. paradoxus* por *M. hubbsi*. Los motivos pueden ser por falta de stock de *M. capensis/M. paradoxus* o la diferencia de precio entre ambas, siendo *M. hubbsi* más económica. Aunque no puede saberse con certeza, sea cual fuese el motivo, tendría lugar un beneficio económico.
- La sustitución por especies simpátricas se produce entre dos merluzas africanas: se sustituye *M. capensis/M. paradoxus* por *M. polli*, de lo cual podría inferirse un etiquetado incorrecto accidental, ya que no hay una diferencia en el precio.
- El etiquetado incorrecto contribuye en gran medida a que el control de las poblaciones sea impreciso, impidiendo conocer cuál es el estado de conservación exacto de cada especie. Además, en el caso de la sustitución por especies alopátricas se trata de un fraude para el consumidor que está pagando por una especie que realmente no está demandando, mientras que respecto al etiquetado en el que no se indica la especie, directamente no debería haberse comercializado por no cumplir con el reglamento UE (UE 1379/2013).

Las conclusiones para el análisis de metales pesados son:

- Existen diferencias significativas entre especies para tres de los metales esenciales: mercurio, arsénico y cadmio; mientras que no las hay para el plomo. En el caso de los metales esenciales que forman parte del metabolismo, no hay diferencias entre especies.
- Se observó una concentración significativamente más elevada de mercurio en *M. merluccius* y *M. polli*, en comparación con *M. hubbsi*.
- *M. hubbsi* presenta una concentración de cadmio significativamente mayor que el resto de las especies.

- *M. merluccius* se diferencia del resto de especies por albergar una mayor concentración de arsénico, siendo *M. hubbsi* la que menos presenta.
- La concentración media de arsénico supera el valor máximo permitido para todas las especies, suponiendo un riesgo para la salud del consumidor. El resto de los metales se encuentran por debajo de los valores máximos permitidos.
- Tres individuos de *M. polli* superan el valor máximo permitido de mercurio, siendo una posible explicación una mayor cantidad de mercurio presente en el hábitat en el que vivían.
- Analizando la ingesta semanal máxima tolerable (MWI) para el arsénico, se observa que es baja para todas las especies y en especial para *M. merluccius* cuya concentración es más elevada. Para el resto de los metales, la MWI sería más alta, con un riesgo para el consumidor muy bajo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AESAN. (2020a). *Arsénico*. Ministerio de Consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/FICHA_ARSENICO.pdf
- AESAN. (2020b). *Cadmio*. Ministerio de Consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Ficha_web_cadmio.pdf
- AESAN. (2020c). *Mercurio*. Ministerio de Consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/mercurio.htm
- AESAN. (2020d). *Níquel*. Ministerio de Consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/FICHA_NIQUEL.pdf
- AESAN. (2020e). *Plomo*. Ministerio de Consumo. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Plomo_ficha_tecnica.pdf
- Agnew, D. J., Pearce, J., Pramod, G., Peatman, T., Watson, R., Beddington, J. R., & Pitcher, T. J. (2009). Estimating the worldwide extent of illegal fishing. *PLoS ONE*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004570>
- Ansari, T. M., Marr, I. L., & Tariq, N. (2003). Heavy Metals in Marine Pollution Perspective—A Mini Review. *Journal of Applied Sciences*, 4(1), 1–20. <https://doi.org/10.3923/jas.2004.1.20>
- Baby, J., Raj, J., Biby, E., Sankarganesh, P., Jeevitha, M., Ajisha, S., & Rajan, S. (2011). Toxic effect of heavy metals on aquatic environment. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4(4). <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v4i4.62976>
- Barraza, M., Horacio, E. ;, Recavarren, M. ;, & Sanzano, P. (2018). *Análisis cuantitativo de metales pesados en pescados para exportación a la Unión Europea*. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Veterinarias. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1759>

- Bawuro, A. A., Voegborlo, R. B., & Adimado, A. A. (2018). Bioaccumulation of Heavy Metals in Some Tissues of Fish in Lake Geriyo, Adamawa State, Nigeria. *Journal of Environmental and Public Health*. <https://doi.org/10.1155/2018/1854892>
- Bjørklund, G., Dadar, M., Mutter, J., & Aaseth, J. (2017). The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. In *Environmental Research* (Vol. 159, pp. 545–554). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.051>
- Blanco-Fernandez, C., Garcia-Vazquez, E., & Machado-Schiaffino, G. (2021). Seventeen years analysing mislabelling from DNA barcodes: Towards hake sustainability. In *Food Control* (Vol. 123, p. 107723). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107723>
- Bonaventura, P., Benedetti, G., Albarède, F., & Miossec, P. (2015). Zinc and its role in immunity and inflammation. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 14, Issue 4, pp. 277–285). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.008>
- Campo, D., Machado-Schiaffino, G., Perez, J., & Garcia-Vazquez, E. (2007). Phylogeny of the genus *Merluccius* based on mitochondrial and nuclear genes. *Gene*, 406(1–2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.09.008>
- Castro-González, M. I., & Méndez-Armenta, M. (2008). Heavy metals: Implications associated to fish consumption. In *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Vol. 26, Issue 3, pp. 263–271). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.06.001>
- Cohen, D. M., & Scialabba, N. (1990). FAO SPECIES CATALOGUE VOL.10 GADIFORM FISHES OF THE WORLD (Order Gadiformes) An Annotated and Illustrated Catalogue of Cods, Hakes, Grenadiers and other Gadiform Fishes Known to Date prepared by Tadashi Inada Tomio Iwamoto FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. In *FAO Fisheries Synopsis No* (Vol. 125). <http://www.fao.org/3/T0243E/t0243e.pdf>
- Copat, C., Grasso, A., Fiore, M., Cristaldi, A., Zuccarello, P., Signorelli, S. S., Conti, G. O., & Ferrante, M. (2018). Trace elements in seafood from the Mediterranean sea: An exposure risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 115, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.001>

- Delpiani, G., Delpiani, S. M., Deli Antoni, M. Y., Covatti Ale, M., Fischer, L., Lucifora, L. O., & Díaz de Astarloa, J. M. (2020). Are we sure we eat what we buy? Fish mislabelling in Buenos Aires province, the largest sea food market in Argentina. *Fisheries Research*, *221*, 105373. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2019.105373>
- Djedjibegovic, J., Marjanovic, A., Tahirovic, D., Caklovica, K., Turalic, A., Lugusic, A., Omeragic, E., Sober, M., & Caklovica, F. (2020). Heavy metals in commercial fish and seafood products and risk assessment in adult population in Bosnia and Herzegovina. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70205-9>
- Estoup, A., Largiadèr, C. R., Perrot, E., & Chourrout, D. (1996). Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *5*(4), 295–298. <https://hal.inrae.fr/hal-02697475>
- FAO. (2018). Overview of food fraud in the fisheries sector. In *Fisheries and Aquaculture Circular No. 1165 (En)* (Vol. 1165, Issue 1165). <http://www.fao.org/3/I8791EN/i8791en.pdf>
- FAO. (2019). *FAO Pesca y Acuicultura - Búsqueda de la hoja informativa del FI*. <http://www.fao.org/fishery/area/search/es>
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAO. (2021a). *Merluccius capensis (Castelnau, 1861)*. FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets. <http://www.fao.org/fishery/species/3029/en>
- FAO. (2021b). *Merluccius hubbsi (Marini, 1933)*. FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets. <http://www.fao.org/fishery/species/3027/en>
- FAO. (2021c). *Merluccius merluccius (Linnaeus, 1758)*. FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets. <http://www.fao.org/fishery/species/2238/en>
- FAO. (2021d). *Merluccius senegalensis (Cadenat, 1950)*. FAO Fisheries & Aquaculture - Species Fact Sheets. <http://www.fao.org/fishery/species/3025/en>

- Feoktistova Victorava, L., & Clark Feoktistova, Y. (2018). El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Medisur*, 16(4), 579–587. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2018000400013
- Fernández-Peralta, L., Salmerón, F., Rey, J., Puerto, M. A., & García-Cancela, R. (2011). Biología reproductiva de las merluzas negras (*Merluccius polli* y *M. senegalensis*) en aguas de mauritania. *Ciencias Marinas*, 37(4 B), 527–546. <https://doi.org/10.7773/cm.v37i4B.1841>
- Francés-Monerris, A., Carmona-García, J., Acuña, A. U., Dávalos, J. Z., Cuevas, C. A., Kinnison, D. E., Francisco, J. S., Saiz-Lopez, A., & Roca-Sanjuán, D. (2020). Photodissociation Mechanisms of Major Mercury(II) Species in the Atmospheric Chemical Cycle of Mercury. *Angewandte Chemie*, 132(19), 7675–7680. <https://doi.org/10.1002/ange.201915656>
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Borrell, Y. J., & Garcia-Vazquez, E. (2016). PCR-based assessment of shellfish traceability and sustainability in international Mediterranean seafood markets. *Food Chemistry*, 202, 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.131>
- Galal-Khallaf, A., Ardura, A., Mohammed-Geba, K., Borrell, Y. J., & Garcia-Vazquez, E. (2014). DNA barcoding reveals a high level of mislabeling in Egyptian fish fillets. *Food Control*, 46, 441–445. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.016>
- García-Soto, B., Aubourg, S. P., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2013). Extension of the shelf life of chilled hake (*Merluccius merluccius*) by a novel icing medium containing natural organic acids. *Food Control*, 34(2), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.007>
- Garcia-Vazquez, E., Geslin, V., Turrero, P., Rodriguez, N., Machado-Schiaffino, G., & Ardura, A. (2021). Oceanic karma? Eco-ethical gaps in African EEE metal cycle may hit back through seafood contamination. *Science of the Total Environment*, 762, 143098. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143098>
- Garrigues, F. (2017). *Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación*. El Blog de Genotipia. <https://genotipia.com/sanger/>

- Ghidini, S., Varrà, M. O., & Zanardi, E. (2019). Approaching authenticity issues in fish and seafood products by qualitative spectroscopy and chemometrics. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 9, p. 1812). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24091812>
- Griffiths, A. M., Sotelo, C. G., Mendes, R., Pérez-Martín, R. I., Schröder, U., Shorten, M., Silva, H. A., Verrez-Bagnis, V., & Mariani, S. (2014). Current methods for seafood authenticity testing in Europe: Is there a need for harmonisation? *Food Control*, *45*, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.020>
- Guardone, L., Tinacci, L., Costanzo, F., Azzarelli, D., D'Amico, P., Tasselli, G., Magni, A., Guidi, A., Nucera, D., & Armani, A. (2017). DNA barcoding as a tool for detecting mislabeling of fishery products imported from third countries: An official survey conducted at the Border Inspection Post of Livorno-Pisa (Italy). *Food Control*, *80*, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.056>
- Hall, T. A. (1999). BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95–98. <https://www.academia.edu/download/29520866/1999hall1.pdf>
- Harada, M. (1995). Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, *25*(1), 1–24. <https://doi.org/10.3109/10408449509089885>
- Has-Schön, E., Bogut, I., & Strelec, I. (2006). Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *50*(4), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0047-2>
- Lee, S. R. (2018). Critical role of zinc as either an antioxidant or a prooxidant in cellular systems. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/9156285>
- Lewis, S. G., & Boyle, M. (2017). The Expanding Role of Traceability in Seafood: Tools and Key Initiatives. *Journal of Food Science*, *82*(S1), A13–A21. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13743>

- Lloris, D., Matallanas, J. & Oliver, P. (2005). Hakes of the World (Family Merlucciidae): an annotated and illustrated catalogue of hake species known to date. In *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes* (Issue 2). https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=c11vDAI9O0EC&oi=fnd&pg=PR4&dq=Hakes+of+the+world+.+An+annotated+and+illustrated+catalogue+of+hake+species+known+to+date&ots=tHaIzNO3qG&sig=Ij5Ugx B7D1N8aguV7uWNXAvE34g&redir_esc=y#v=onepage&q=Hakes of the world .
- Lloris, D., Matallanas, J., & Oliver, P. (2003). FAO Catálogo de especies para los fines de la pesca N° 2 MERLUZAS DEL MUNDO (Familia Merlucciidae) CATÁLOGO COMENTADO E ILUSTRADO DE LAS MERLUZAS CONOCIDAS por. *FAO Catálogo de Especies Para Los Fines de La Pesca.*, 2, 57. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=MAP-1GpAYosC&oi=fnd&pg=PA53&dq=Merluzas+del+Mundo+.+Catálogo+Comentado+e+Ilustrado+de+las+Merluzas+Conocidas&ots=7_DGTxNxGg&sig=FQwCbrTMOHBreHOIvu8_j0MYQZU&redir_esc=y#v=onepage&q=Merluzas del Mundo . Catálogo Co
- Lundy, C. J., Rico, C., & Hewitt, G. M. (2000). Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. *Molecular Ecology*, 9(12), 2067–2079. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.01120.x>
- Manning, L., & Soon, J. M. (2014). Developing systems to control food adulteration. *Food Policy*, 49(P1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2014.06.005>
- Mariani, S., Ellis, J., O'Reilly, A., Bréchon, A. L., Sacchi, C., & Miller, D. D. (2014). Mass media influence and the regulation of illegal practices in the seafood market. *Conservation Letters*, 7(5), 478–483. <https://doi.org/10.1111/conl.12085>
- Miao, X., Hao, Y., Liu, H., Xie, Z., Miao, D., & He, X. (2021). Effects of heavy metals speciations in sediments on their bioaccumulation in wild fish in rivers in Liuzhou— A typical karst catchment in southwest China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 214, 112099. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112099>

- Miller, D. D., & Sumaila, U. R. (2014). Flag use behavior and IUU activity within the international fishing fleet: Refining definitions and identifying areas of concern. *Marine Policy*, *44*, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2013.08.027>
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2009). *Estudio comparativo de las legislaciones de la R.P. China y de la UE o nacional aplicables a los productos de la pesca*.
- Molina Montoya, N., Aguilar Casas, P., & Cordovez Wandurraga, C. (2010). Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia & Tecnología Para La Salud Visual y Ocular*, *8*(1), 77–88. <https://doi.org/10.19052/sv.831>
- Morán, P., & Garcia-Vazquez, E. (2006). Identification of highly prized commercial fish using a PCR-based methodology. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *34*(2), 121–124. <https://doi.org/10.1002/bmb.2006.49403402121>
- Muñoz-Colmenero, M., Klett-Mingo, M., Díaz, E., Blanco, O., Martínez, J. L., & Garcia-Vazquez, E. (2015). Evolution of hake mislabeling niches in commercial markets. *Food Control*, *54*, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.006>
- Naccari, C., Cicero, N., Ferrantelli, V., Giangrosso, G., Vella, A., Macaluso, A., Naccari, F., & Dugo, G. (2015). Toxic Metals in Pelagic, Benthic and Demersal Fish Species from Mediterranean FAO Zone 37. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *95*(5), 567–573. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1585-6>
- Ocampo Reinaldo, M., González, R., & Romero, M. A. (2011). Feeding strategy and cannibalism of the Argentine hake *Merluccius hubbsi*. *Journal of Fish Biology*, *79*(7), 1795–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03117.x>
- Ozuni, E., Dhaskali, L., & Andoni, E. (2014). Concentration levels of heavy metals in muscle tissue of european hake (*Merluccius merluccius*). *Albanian j. Agric. Sci.*
- Pardo, M. Á., Jiménez, E., & Pérez-Villarreal, B. (2016). Misdescription incidents in seafood sector. In *Food Control* (Vol. 62, pp. 277–283). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.048>
- Pennino, M. G., & Bellido, J. M. (2012). Can a simple Pelagic-Demersal ratio explain ecosystem functioning? *Biodiversity Journal*, *3*(1), 69–78. www.fishbase.org

- Pérez de Castro, A. M. (2011). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/10700>
- Pérez, M., Santafé-Muñoz, A. M., Balado, M., & Presa, P. (2018). Methodological evaluation of DNA-based molecular keys to identify categories of mislabelling in commercial products from genus *Merluccius* spp. *Food Chemistry*, 239, 640–648. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.138>
- Phillips, K., McCallum, N., & Welch, L. (2012). A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100 ® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Science International: Genetics*, 6(2), 282–285. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.04.018>
- Pitcher, T. J., & Alheit, J. (1995). What makes a hake? A review of the critical biological features that sustain global hake fisheries. In *Hake* (pp. 1–14). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1300-7_1
- Quinteiro, J., Vidal, R., & Rey-Méndez, M. (2000). Phylogeny and biogeographic history of hake (genus *Merluccius*), inferred from mitochondrial DNA control-region sequences. *Marine Biology*, 136(1), 163–174. <https://doi.org/10.1007/s002270050019>
- Rajeshkumar, S., & Li, X. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicology Reports*, 5, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.01.007>
- Salvaggio, A., Pecoraro, R., Copat, C., Ferrante, M., Grasso, A., Scalisi, E. M., Ignoto, S., Bonaccorsi, V. S., Messina, G., Lombardo, B. M., Tiralongo, F., & Brundo, M. V. (2020). Bioaccumulation of metals/metalloids and histological and immunohistochemical changes in the tissue of the European Hake, *merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) (Pisces: Gadiformes: Merlucciidae), for environmental pollution assessment. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(9), 712. <https://doi.org/10.3390/jmse8090712>
- Schaumlöffel, D. (2012). Nickel species: Analysis and toxic effects. In *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (Vol. 26, Issue 1, pp. 1–6). Urban & Fischer. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.01.002>

- Secretaría General de Pesca. (2017). *El Mercado Del Merluza En España*.
www.ictioterm.es_
- Shehata, H. R., Bourque, D., Steinke, D., Chen, S., & Hanner, R. (2019). Survey of mislabelling across finfish supply chain reveals mislabelling both outside and within Canada. *Food Research International*, *121*, 723–729.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.047>
- Spencer, E. T., & Bruno, J. F. (2019). Fishy business: Red snapper mislabeling along the coastline of the southeastern United States. *Frontiers in Marine Science*, *6*(AUG).
<https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00513>
- Stamatis, C., Sarri, C. A., Moutou, K. A., Argyrakoulis, N., Galara, I., Godosopoulos, V., Kolovos, M., Liakou, C., Stasinou, V., & Mamuris, Z. (2015). What do we think we eat? Single tracing method across foodstuff of animal origin found in Greek market. *Food Research International*, *69*, 151–155.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.033>
- Stergiou, K. I., & Karpouzi, V. S. (2002). Feeding habits and trophic levels of Mediterranean fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *11*(3), 217–254.
<https://doi.org/10.1023/A:1020556722822>
- Strand, T., Lillegaard, I., Frøyland, L., Haugen, M., Henjum, S., Løvik, M., Stea, T., & Holvik, K. (2018). Assessment of Copper Intake in Relation to Tolerable Upper Intake Levels. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, *8*(4), 193–194.
<https://doi.org/10.9734/ejnfs/2018/42531>
- The Regents of the University of California. (2020). *BLAST: Compare & identify sequences - NCBI Bioinformatics Resources: An Introduction - Library Guides at UC Berkeley*. 1–16. <https://guides.lib.berkeley.edu/ncbi/blast>
- Tumolo, M., Ancona, V., De Paola, D., Losacco, D., Campanale, C., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). Chromium pollution in European water, sources, health risk, and remediation strategies: An overview. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 15, pp. 1–25). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17155438>

- Warner, K., Roberts, W., Mustain, P., Lowell, B., & Swain, M. (2019). *Casting a Wider Net: More Action Needed to Stop Seafood Fraud in the United States*. <https://doi.org/10.31230/osf.io/sbm8h>
- Wessels, I., Maywald, M., & Rink, L. (2017). Zinc as a gatekeeper of immune function. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 12, p. 1286). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9121286>
- Wilhelm, M. R., Kirchner, C. H., Roux, J. P., Jarre, A., Iitembu, J. A., Kathena, J. N., & Kainge, P. (2015). Biology and fisheries of the shallow-water hake (*Merluccius capensis*) and the deep-water hake (*Merluccius paradoxus*) in Namibia. In *Hakes: Biology and Exploitation* (pp. 70–100). wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118568262.ch3>
- Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>
- Witte, C. P., Tiller, S. A., Taylor, M. A., & Davies, H. V. (2002). Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 103–104. <https://doi.org/10.1023/A:1012966218478>
- World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2011). Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-second [72nd] and seventy- rd [73rd] reports of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives World Health Organization. <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1806>
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/44515>
- Zyadah, M., & Chouikhi, A. (2009). Heavy metal accumulation in *Mullus barbatus*, *Merluccius merluccius* and *Boops boops* fish from the Aegean Sea, Turkey. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/096374899100996*, 50(6), 429–434. <https://doi.org/10.1080/096374899100996>

ANEXOS

Anexo I. Información relativa al etiquetado de las muestras

Muestra	Nombre común etiquetado	Especie etiquetado	Zona FAO	Origen	Método de captura	Tipo
1	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sudoriental	Redes de arrastre	Filete
2	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sudoriental	Redes de arrastre	Filete
3	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sudoriental	Redes de arrastre	Filete
4	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sudoriental	Redes de arrastre	Filete
5	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sudoriental	Redes de arrastre	Filete
6	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Redes de arrastre	Filete
7	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Redes de arrastre	Filete
8	Merluza del Cabo	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Redes de arrastre	Filete
9	Merluza	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sudeste	Redes de arrastre	Filete
10	Merluza	<i>M.capensis, M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sudeste	Redes de arrastre	Filete
11	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
12	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
13	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
14	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
15	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
16	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
17	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
18	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
19	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
20	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
21	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
22	Merluza del Cabo H/G	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco

23	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Sedales y anzuelos	Tronco
24	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
25	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
26	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
27	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
28	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
29	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
30	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
31	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
32	Merluza	<i>Merluccius spp.</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Redes de arrastre	Tronco
33	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Sedales y anzuelos	Cabeza
34	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Sedales y anzuelos	Cabeza
35	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Sedales y anzuelos	Cabeza
36	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Sedales y anzuelos	Cabeza
37	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Sedales y anzuelos	Cabeza
38	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Redes de arrastre	Filete
39	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Sedales y anzuelos	Cabeza
40	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIa	Golfo de Vizcaya Norte	Redes de enmalle	Filete
41	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Redes de arrastre	Filete
42	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Redes de enmalle	Cabeza
43	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Redes de arrastre	Cabeza
44	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIa	Golfo de Vizcaya Norte	Sedales y anzuelos	Filete
45	Merluza/Pescadilla	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	Redes de arrastre	Filete
46	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sudoriental	Líneas y Anzuelo	Filete
47	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Pesca Extractiva	Filete
48	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	34	Atlántico Centro-Oriental	Pesca Extractiva	Filete
49	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sureste	Capturado	Filete
50	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete

51	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
52	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
53	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
54	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
55	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
56	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
57	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
58	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
59	Merluza argentina	<i>M. hubbsi</i>	41	Atlántico Suroeste	Redes de Arrastre	Filete
60	Merluza del Cantábrico	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	_	Tronco
61	Merluza del Cantábrico	<i>Merluccius merluccius</i>	27 VIIIc	Golfo de Vizcaya Sur	_	Tronco
62	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sudeste	Redes de arrastre	Tronco
63	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sudeste	Redes de arrastre	Tronco
64	Merluza del Cabo H/G	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	47	Atlántico Sudeste	Redes de arrastre	Tronco

Anexo II. Resultados BLAST

Muestra	Especie etiquetado	Especie real	Total score	Query cover	E-value	Per. ident	Acc. Len
1	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	237	99	1,00E-58	100,00%	EF362879.1
2	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	267	98	2,00E-67	98,68%	EF362879.1
3	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	250	100	2,00E-62	100,00%	EF362879.1
4	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	267	100	2,00E-67	100,00%	EF362879.1
5	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	263	100	3,00E-66	100,00%	EF362879.1
6	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. hubbsi</i>	255	100	4,00E-54	99,29%	EU860423.1
7	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. hubbsi</i>	636	99	4,00E-178	99,71%	EU860405.1
8	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. hubbsi</i>	575	100	7,00E-160	100,00%	EU860425.1
9	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	333	96	3,00E-87	95,26%	EF362879.1
10	<i>M.capensis, M. paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	315	100	1,00E-81	95,02%	EF362879.1
11	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	549	89	6,00E-12	95,11%	EF362877.1
12	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>	278	99	1,00E-70	96,97%	EF362881.1
13	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	248	99	7,00E-62	98,58%	EF362877.1
14	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	366	100	3,00E-97	96,80%	EF362877.1
15	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	215	99	6,00E-52	97,62%	EF362877.1
16	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	292	94	5,00E-75	96,59%	EF362879.1
17	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	710	93	0,00E+00	98,04%	EF362878.1
18	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	438	99	8,00E-119	97,66%	EF362879.1
19	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	658	91	0,00E+00	96,95%	EF362878.1
20	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. merluccius</i>	342	100	5,00E-90	98,45%	EF362872.1
21	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	379	99	4,00E-101	98,16%	EF362879.1
22	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. capensis</i>	305	88	7,00E-79	96,24%	EF362865.1
23	<i>M.capensis/M.paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	636	93	5,00E-178	96,15%	EF362878.1
24	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	344	99	1,00E-90	96,19%	EF362877.1

25	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	313	98	3,00E-81	98,31%	EF362877.1
26	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>	342	92	6,00E-90	96,17%	EF362881.1
27	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>	588	95	1,00E-163	96,86%	EF362880.1
28	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	361	96	1,00E-95	97,18%	EF362877.1
29	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>	368	100	9,00E-98	100,00%	EF362881.1
30	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	459	99	7,00E-125	97,07%	EF362877.1
31	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. senegalensis</i>	401	95	1,00E-107	95,29%	EF362881.1
32	<i>Merluccius spp.</i>	<i>M. polli</i>	344	100	1,00E-90	95,39%	EF362877.1
33	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	320	98	2,00E-83	99,43%	MT410897.1
34	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	315	98	9,00E-82	98,86%	MT410897.1
35	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	660	99	0,00E+00	94,63%	MT410897.1
36	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	523	100	3,00E-144	95,18%	MT410897.1
37	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	331	99	1,00E-86	96,95%	MT410897.1
38	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	318	100	7,00E-83	99,43%	MT410897.1
39	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	320	99	2,00E-83	98,88%	MT410897.1
40	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	320	98	2,00E-83	99,43%	MT410897.1
41	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	335	97	9,00E-88	95,69%	MT410897.1
42	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	313	100	3,00E-81	98,86%	MT410897.1
43	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	706	99	0,00E+00	95,69%	AF232846.1
44	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	619	97	4,00E-173	96,29%	MT410897.1
45	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	715	100	0,00E+00	95,94%	MT410897.1
46	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	723	100	0,00E+00	99,75%	EF362878.1
47	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. polli</i>	708	100	0,00E+00	100%	EF362877.1
48	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. polli</i>	763	100	0,00E+00	99,76%	EF362877.1
49	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. polli</i>	754	100	0,00E+00	99,52%	EF362876.1
50	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362869.1
51	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	664	100	0,00E+00	99,73%	EF362869.1
52	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362866.1

53	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362866.1
54	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362869.1
55	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	782	97	0,00E+00	100%	EF362867.1
56	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362869.1
57	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	98	0,00E+00	99,76%	EF362867.1
58	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362866.1
59	<i>M. hubbsi</i>	<i>M. hubbsi</i>	774	97	0,00E+00	99,76%	EF362869.1
60	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	765	100	0,00E+00	99,52%	AF232845.1
61	<i>Merluccius merluccius</i>	<i>M. merluccius</i>	728	100	0,00E+00	99,26%	AF232831.1
62	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	688	96	0,00E+00	99,73%	EF362878.1
63	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	706	97	0,00E+00	99,74%	EF362878.1
64	<i>M. capensis/ M. paradoxus</i>	<i>M. paradoxus</i>	682	96	0,00E+00	99,47%	EF362878.1

Anexo III. Resultados ICP-MS

Para metales metabólicos:

Muestra	Especie	Cr (µg/kg)	Cr RSD	Ni (µg/kg)	Ni RSD	Cu (µg/kg)	Cu RSD	Zn (µg/kg)	Zn RSD
1	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	5,7E+01	0,7	9,7E+00	3,1	1,4E+02	1,3	1,9E+03	2,4
2	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	3,6E+01	1,9	7,7E+00	0,3	1,5E+02	2,6	2,5E+03	2,0
3	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,5E+02	1,5	1,0E+01	1,0	1,1E+02	1,1	1,7E+03	2,0
4	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,3E+02	0,1	1,0E+01	3,2	9,5E+01	2,7	2,1E+03	3,0
5	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	5,0E+01	1,4	6,9E+00	6,5	1,0E+02	1,0	2,1E+03	0,9
6	<i>M. hubbsi</i>	1,7E+02	1,8	1,3E+02	1,1	1,9E+02	1,0	3,2E+03	2,1
7	<i>M. hubbsi</i>	1,7E+02	0,5	1,7E+01	1,9	1,6E+02	0,2	2,4E+03	0,1
8	<i>M. hubbsi</i>	2,6E+01	1,7	7,1E+00	1,0	1,4E+02	0,2	2,1E+03	0,8
9	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	4,7E+01	3,9	1,7E+01	2,1	1,7E+02	0,6	2,7E+03	1,1
10	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	7,9E+01	0,6	6,9E+01	2,7	4,7E+02	1,3	2,8E+03	2,0
11	<i>M. polli</i>	4,5E+01	2,2	1,4E+01	3,8	9,2E+01	1,6	2,2E+03	0,6
12	<i>M. senegalensis</i>	7,6E+01	0,8	2,5E+01	3,7	1,2E+02	1,5	2,8E+03	3,8
13	<i>M. polli</i>	5,7E+01	0,1	1,3E+01	7,0	8,3E+01	2,1	2,7E+03	1,5
14	<i>M. polli</i>	8,9E+01	0,4	2,3E+01	3,1	1,5E+02	1,7	2,3E+03	0,7
15	<i>M. polli</i>	6,2E+01	1,9	<0.000	N/A	8,8E+01	3,9	2,2E+03	1,7
16	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	3,2E+01	4,1	1,3E+01	1,1	1,4E+02	3,3	3,0E+03	2,6
17	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,7E+01	1,8	2,0E+01	4,4	1,0E+02	2,7	2,5E+03	0,9
18	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,9E+01	3,4	2,0E+01	1,8	1,5E+02	1,7	2,5E+03	1,4
19	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,5E+01	3,1	1,7E+01	0,4	1,4E+02	0,8	2,3E+03	0,7
20	<i>M. merluccius</i>	1,2E+01	1,9	5,1E+00	2,9	9,0E+01	1,6	1,9E+03	1,3
21	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	3,4E+01	2,1	6,3E+01	2,1	1,9E+03	1,2	3,0E+03	1,4
22	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,2E+01	0,9	2,7E+01	0,4	1,1E+02	1,7	2,3E+03	1,0
23	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,9E+01	1,0	8,5E+01	3,4	1,3E+02	2,1	2,4E+03	0,2

24	<i>M. polli</i>	1,6E+02	2,5	<0.000	N/A	9,2E+01	2,3	2,0E+03	1,5
25	<i>M. polli</i>	6,2E+01	3,9	5,8E+01	7,1	8,9E+01	0,6	2,0E+03	1,2
26	<i>M. senegalensis</i>	6,6E+01	0,8	4,1E+01	1,5	1,0E+02	0,8	2,0E+03	0,4
27	<i>M. senegalensis</i>	1,4E+02	1,2	3,7E+01	4,0	9,1E+01	0,3	2,2E+03	1,1
28	<i>M. polli</i>	6,0E+01	2,3	1,0E+01	10,7	9,7E+01	0,6	2,2E+03	1,2
29	<i>M. senegalensis</i>	5,4E+01	0,4	<0.000	N/A	1,4E+02	2,9	2,1E+03	1,3
30	<i>M. polli</i>	3,1E+01	0,4	<0.000	N/A	8,2E+01	2,5	2,1E+03	1,0
31	<i>M. senegalensis</i>	5,6E+01	3,1	2,6E+01	3,3	6,6E+01	2,3	2,1E+03	1,3
32	<i>M. polli</i>	1,5E+01	2,3	<0.000	N/A	7,0E+01	1,9	2,0E+03	1,0
33	<i>M. merluccius</i>	2,2E+02	0,8	2,0E+01	0,8	1,5E+02	1,3	3,2E+03	0,5
34	<i>M. merluccius</i>	1,0E+02	0,8	2,5E+01	1,0	9,7E+01	1,1	2,3E+03	0,8
35	<i>M. merluccius</i>	7,0E+01	2,0	1,0E+01	2,6	1,6E+02	0,1	2,3E+03	0,1
36	<i>M. merluccius</i>	1,8E+02	0,6	9,7E+00	6,5	1,0E+02	1,0	2,6E+03	0,3
37	<i>M. merluccius</i>	1,3E+01	3,1	4,8E+00	4,1	1,6E+02	0,7	3,2E+03	1,2
38	<i>M. merluccius</i>	6,3E+01	3,2	1,1E+01	5,2	1,2E+02	0,8	2,8E+03	1,3
39	<i>M. merluccius</i>	2,3E+02	1,6	1,2E+02	1,5	1,7E+02	0,5	3,3E+03	0,1
40	<i>M. merluccius</i>	1,2E+01	3,7	8,3E+00	0,2	2,1E+02	0,5	3,1E+03	0,7
41	<i>M. merluccius</i>	6,5E+01	0,7	1,1E+01	4,6	1,3E+02	2,0	2,4E+03	0,4
42	<i>M. merluccius</i>	6,1E+01	3,7	1,6E+01	2,8	1,3E+02	1,9	3,1E+03	0,9
43	<i>M. merluccius</i>	3,3E+01	0,3	1,8E+01	1,6	8,9E+01	1,8	2,4E+03	0,3
44	<i>M. merluccius</i>	1,5E+01	1,1	1,5E+01	0,9	1,9E+02	0,9	5,9E+03	1,3
45	<i>M. merluccius</i>	2,1E+01	1,5	7,1E+00	2,3	1,1E+02	2,0	2,5E+03	1,0
46	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,2E+02	2,1	6,6E+01	1,7	2,3E+03	0,8	2,6E+03	0,6
47	<i>M. polli</i>	2,5E+02	1,2	1,0E+02	3,9	4,5E+02	1,7	5,2E+03	1,4
48	<i>M. polli</i>	2,1E+02	2,0	3,3E+01	7,6	1,6E+02	1,7	4,0E+03	1,7
49	<i>M. polli</i>	7,4E+01	0,8	3,0E+01	3,5	1,8E+02	1,6	3,6E+03	0,8
50	<i>M. hubbsi</i>	2,9E+02	0,7	4,7E+01	5,8	6,5E+02	0,3	4,3E+03	0,7
51	<i>M. hubbsi</i>	1,2E+02	2,1	5,7E+01	2,0	9,2E+02	0,4	3,8E+03	1,1

52	<i>M. hubbsi</i>	1,8E+02	1,8	3,1E+01	1,3	5,2E+02	1,2	4,1E+03	1,2
53	<i>M. hubbsi</i>	8,7E+01	1,9	1,1E+01	4,6	1,8E+02	1,0	2,4E+03	1,4
54	<i>M. hubbsi</i>	9,0E+01	0,2	1,0E+01	9,2	4,3E+02	0,3	3,2E+03	1,3
55	<i>M. hubbsi</i>	1,8E+02	1,6	9,1E+00	4,3	2,1E+02	1,3	3,0E+03	1,8
56	<i>M. hubbsi</i>	3,2E+01	1,8	<0.000	N/A	6,2E+02	0,3	3,2E+03	0,1
57	<i>M. hubbsi</i>	1,7E+02	0,9	1,9E+01	3,9	3,4E+02	0,7	3,2E+03	1,0
58	<i>M. hubbsi</i>	1,6E+02	1,8	2,0E+01	3,0	4,9E+02	1,0	3,1E+03	1,0
59	<i>M. hubbsi</i>	4,3E+01	2,3	<0.000	N/A	2,3E+02	0,4	2,8E+03	0,7
60	<i>M. merluccius</i>	2,6E+02	0,7	1,9E+01	9,0	7,5E+02	1,4	5,9E+03	1,2
61	<i>M. merluccius</i>	2,3E+02	0,5	1,5E+01	9,7	7,5E+02	0,7	7,5E+03	1,3
62	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,0E+02	2,5	4,3E+01	1,9	6,6E+02	0,4	9,7E+03	0,6
63	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,6E+02	0,9	2,6E+01	7,1	1,0E+03	0,8	9,2E+03	1,6
64	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,8E+02	1,4	8,8E+01	2,8	8,2E+02	0,3	1,1E+04	0,6

Para metales no metabólicos:

Muestra	Especie	As (µg/kg)	As RSD	Cd (µg/kg)	Cd RSD	Hg (µg/kg)	Hg RSD	Pb (µg/kg)	Pb RSD
1	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,9E+03	0,5	<0.000	N/A	6,3E+01	2,8	2,0E+00	0,2
2	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,9E+03	1,4	6,1E-01	6,9	1,1E+02	2,1	2,8E+00	5,0
3	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,0E+03	1,3	5,8E-01	10,2	5,6E+01	1,3	1,5E+00	3,4
4	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,2E+03	2,4	5,1E-01	3,9	4,5E+01	1,1	1,4E+00	0,3
5	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,0E+03	0,8	6,6E-01	13,3	4,6E+01	1,9	1,2E+00	3,4
6	<i>M. hubbsi</i>	8,9E+02	2,5	3,2E+01	2,0	2,2E+01	2,2	4,5E+00	1,8
7	<i>M. hubbsi</i>	1,0E+03	0,8	2,6E+00	1,4	1,3E+01	2,1	7,3E+00	0,4
8	<i>M. hubbsi</i>	8,7E+02	0,9	2,0E+00	3,5	1,7E+01	2,4	1,1E+00	1,1
9	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,2E+03	0,6	4,8E-01	6,4	8,8E+01	1,1	4,6E+00	3,8
10	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,3E+03	0,4	8,4E-01	11,0	5,6E+01	0,1	3,9E+00	1,2

11	<i>M. polli</i>	3,4E+03	0,3	7,5E-01	13,4	4,9E+01	3,9	3,4E+00	2,3
12	<i>M. senegalensis</i>	1,5E+03	0,8	8,2E-01	8,2	6,8E+01	0,5	3,2E+00	2,3
13	<i>M. polli</i>	2,2E+03	0,2	8,7E-01	6,9	2,9E+01	2,2	4,1E+00	4,0
14	<i>M. polli</i>	2,2E+03	1,2	6,6E+00	6,9	3,0E+01	2,3	1,1E+00	7,1
15	<i>M. polli</i>	1,8E+03	0,7	<0.000	N/A	4,1E+01	3,3	1,5E+00	3,4
16	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	3,3E+03	3,6	<0.000	N/A	1,6E+02	1,8	5,7E+00	10,7
17	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	3,4E+03	1,2	<0.000	N/A	2,1E+02	1,1	4,2E+00	2,5
18	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,9E+03	0,6	1,3E+00	5,0	1,5E+02	0,5	3,0E+00	6,5
19	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,2E+03	1,0	1,1E+00	4,4	1,3E+02	2,0	3,6E+00	2,1
20	<i>M. merluccius</i>	2,0E+03	1,0	<0.000	N/A	3,3E+01	2,1	1,5E+00	0,8
21	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	7,4E+02	1,3	2,3E+00	2,6	9,3E+01	2,4	3,7E+00	8,6
22	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	9,1E+02	1,2	7,9E-01	7,0	7,7E+01	2,3	3,6E+00	1,2
23	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	3,5E+03	0,8	<0.000	N/A	8,1E+01	0,9	3,5E+00	6,7
24	<i>M. polli</i>	2,3E+03	0,8	4,7E-01	12,8	5,0E+01	1,6	1,7E+00	7,9
25	<i>M. polli</i>	1,3E+03	1,8	5,3E-01	6,6	6,1E+01	0,9	5,3E+00	3,0
26	<i>M. senegalensis</i>	1,2E+03	0,7	3,1E-01	13,6	4,8E+01	0,8	1,6E+00	0,6
27	<i>M. senegalensis</i>	1,6E+03	1,7	6,1E-01	8,7	3,3E+01	1,6	1,8E+00	4,4
28	<i>M. polli</i>	2,1E+03	0,3	<0.000	N/A	6,2E+01	1,4	5,0E+00	2,7
29	<i>M. senegalensis</i>	1,4E+03	1,5	3,6E-01	12,7	2,8E+01	3,7	1,5E+00	6,5
30	<i>M. polli</i>	1,8E+03	1,0	<0.000	N/A	7,9E+01	0,8	1,9E+00	2,7
31	<i>M. senegalensis</i>	8,3E+02	1,0	<0.000	N/A	7,4E+01	2,8	1,5E+00	6,0
32	<i>M. polli</i>	1,8E+03	1,4	4,4E-01	6,8	5,7E+01	1,6	1,9E+00	7,4
33	<i>M. merluccius</i>	3,5E+03	1,0	6,0E-01	8,8	1,6E+02	1,8	1,1E+00	9,2
34	<i>M. merluccius</i>	3,8E+03	0,4	<0.000	N/A	2,4E+02	0,2	3,9E+00	3,5
35	<i>M. merluccius</i>	2,4E+03	0,9	1,7E+00	1,3	1,6E+02	2,1	7,8E-01	12,5
36	<i>M. merluccius</i>	6,6E+03	1,2	4,2E-01	11,4	2,6E+02	1,4	5,5E-01	13,0
37	<i>M. merluccius</i>	3,3E+03	1,1	3,0E+00	3,3	3,1E+02	1,3	7,8E-01	7,6
38	<i>M. merluccius</i>	2,7E+03	1,2	1,3E+00	1,9	2,1E+02	1,0	7,1E+00	1,7

39	<i>M. merluccius</i>	3,7E+03	0,7	7,8E-01	8,5	2,2E+02	0,7	2,5E+00	6,0
40	<i>M. merluccius</i>	2,7E+03	2,2	<0.000	N/A	2,9E+02	0,8	1,3E+00	7,6
41	<i>M. merluccius</i>	1,6E+03	1,7	<0.000	N/A	4,5E+02	1,2	2,5E+00	1,8
42	<i>M. merluccius</i>	7,6E+03	0,2	<0.000	N/A	1,7E+02	1,6	4,6E+00	0,5
43	<i>M. merluccius</i>	5,6E+03	0,3	<0.000	N/A	1,9E+02	1,6	1,0E+00	10,8
44	<i>M. merluccius</i>	1,9E+03	0,7	6,0E-01	9,2	1,5E+02	2,2	1,9E+00	9,1
45	<i>M. merluccius</i>	1,3E+03	0,6	<0.000	N/A	2,4E+02	0,6	6,9E-01	7,7
46	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,7E+03	0,8	<0.000	N/A	3,8E+02	6,7	<0.000	N/A
47	<i>M. polli</i>	1,2E+03	0,3	2,5E+00	13,6	6,7E+02	0,9	4,3E+01	5,6
48	<i>M. polli</i>	1,9E+03	0,2	1,9E+00	5,5	5,8E+02	1,2	<0.000	N/A
49	<i>M. polli</i>	1,6E+03	1,4	2,0E+00	7,0	5,5E+02	0,5	<0.000	N/A
50	<i>M. hubbsi</i>	9,4E+02	1,4	2,8E+00	3,5	3,6E+01	1,5	<0.000	N/A
51	<i>M. hubbsi</i>	1,2E+03	1,7	9,3E+00	0,6	4,2E+01	2,1	<0.000	N/A
52	<i>M. hubbsi</i>	6,3E+02	2,0	8,2E+00	7,9	3,7E+01	4,8	<0.000	N/A
53	<i>M. hubbsi</i>	8,2E+02	0,1	3,6E+00	6,2	1,6E+01	5,0	<0.000	N/A
54	<i>M. hubbsi</i>	1,0E+03	0,8	4,2E+00	6,4	1,4E+01	5,9	<0.000	N/A
55	<i>M. hubbsi</i>	6,7E+02	2,0	3,0E+00	9,7	4,2E+01	1,8	<0.000	N/A
56	<i>M. hubbsi</i>	1,1E+03	0,4	2,7E+00	4,5	2,5E+01	4,7	<0.000	N/A
57	<i>M. hubbsi</i>	1,2E+03	0,7	2,8E+00	6,2	2,2E+01	6,0	<0.000	N/A
58	<i>M. hubbsi</i>	8,5E+02	1,2	4,8E+00	9,7	1,4E+01	3,9	<0.000	N/A
59	<i>M. hubbsi</i>	6,8E+02	0,6	1,9E+00	10,0	1,2E+01	3,6	<0.000	N/A
60	<i>M. merluccius</i>	1,6E+03	0,8	2,7E+00	3,0	1,6E+02	1,0	<0.000	N/A
61	<i>M. merluccius</i>	2,9E+03	0,4	8,8E-01	10,0	2,0E+02	0,8	4,1E+01	1,5
62	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,1E+03	1,8	3,5E+00	12,0	5,1E+01	1,6	<0.000	N/A
63	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	2,5E+03	0,8	1,6E+00	8,3	3,1E+01	3,4	<0.000	N/A
64	<i>M. capensis/M. paradoxus</i>	1,7E+03	1,4	3,8E+00	2,7	4,8E+01	2,0	<0.000	N/A