

46
26
J



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"POSIBLE PERDIDA DE NUTRIENTES POR SOLUBILIZACIÓN Y
OXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN DIETAS PARA TRUCHAS"**

T E S I S

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo
p r e s e n t a

MARTIN MACOUZET GARCIA

México, D. F.

**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Se elaboraron tres diferentes alimentos peletizados, uno sin grasa, y los otros dos con diferentes tipos de grasa (coco y bacalao), que se emplearon para alimentar trucha arcoiris (Salmo gairdnerii), para comparar el grado de oxidación de los lípidos y para evaluar la pérdida de vitaminas por lixiviación del alimento en agua. Las mismas pruebas se hicieron también para una dieta comercial.

A los organismos alimentados con las diferentes dietas, se les determinó la ganancia en peso promedio cada 15 días durante 10 semanas, y se observó que la mayor ganancia en peso la produjo la dieta comercial, seguida muy de cerca por el alimento adicionado de aceite de bacalao, las otras dos dietas produjeron ganancias en peso muy inferiores, especialmente la que no fué adicionada de grasa.

La prueba de solubilización se hizo manteniendo en agitación en agua, cantidades iguales de cada alimento, y tomando a diferentes tiempos muestras del agua para determinar la concentración de: ácido ascórbico, niacinamida, piridoxina y tiamina, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se encontró que la solubilización de vitaminas era rápida e independiente del tipo de grasa en la dieta, pero diferente para cada vitamina. Una mayor densidad del alimento comercial, afectó directamente la retención de las vitaminas.

Para comparar el grado de oxidación de los lípidos en las diferentes dietas, se aceleró la reacción, almacenándolas a 38°C durante 40 días, tomando muestras a diferentes tiempos para determinarles índice de TBA (ácido 2-tiobarbitúrico). Se elaboraron las curvas de oxidación para todas las dietas, observándose una oxidación mucho más intensa y rápida en la dieta comercial y en la adicionada de aceite de bacalao, que en las otras dos.

INDICE

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	6
ACUACULTURA	6
Fundamentos y situación actual	6
Alimentación de los peces	8
Pérdida de nutrientes por solubilización	12
VITAMINAS	14
Tiamina	16
Acido ascórbico	17
Niacina	18
Piridoxina	18
Métodos de análisis	19
HPLC	22
LIPIDOS	24
Importancia y requerimientos	24
Oxidación	26
Métodos para estimar el grado de oxidación	29
Método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)	30
MATERIALES Y METODOS	34
PREPARACION DE LAS DIETAS	35
Materias primas utilizadas	35
Desengrasado de la harina de pescado	35
Formulación de las dietas	36
Elaboración de los pellets	39
COMPARACION DEL GRADO DE OXIDACION DE LOS LIPIDOS	39
DETERMINACION DE LA PERDIDA DE VITAMINAS POR SOLU-	
BILIZACION	42
Elección de las vitaminas a evaluar	42
Elaboración de la curva patrón	43
Método de extracción de las vitaminas	44
Materia solubilizada total	45
Densidad aparente de las dietas	46
GANANCIA EN PESO DE LOS ORGANISMOS ALIMENTADOS	
CON LAS DIFERENTES DIETAS	46
RESULTADOS	47
OXIDACION DE LOS LIPIDOS	47
PERDIDA DE VITAMINAS POR SOLUBILIZACION	49
GANANCIA EN PESO DE LOS ORGANISMOS	59
DISCUSION	60
OXIDACION DE LOS LIPIDOS	60
PERDIDA DE VITAMINAS POR SOLUBILIZACION	61
GANANCIA EN PESO DE LOS ORGANISMOS	64
CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFIA	68
Apéndice I (cromatogramas de las vitaminas).	73

INTRODUCCION

En el marco de la crisis de la producción alimentaria que enfrenta nuestro país, el gobierno ha orientado su estrategia hacia el desarrollo de la acuicultura (Aguilera y Noriega, 1985).

La acuicultura es una actividad relativamente reciente en México, que ha empezado a desarrollarse en forma acelerada con un futuro prometedor (Almeyra, 1987).

El uso de alimentos concentrados ha incrementado el potencial para el cultivo de peces en todo el mundo. La composición de la dieta es muy importante para mantener una máxima eficiencia en la utilización de los nutrientes del alimento para la fijación o mantenimiento de tejidos. El primer requisito es una dieta completa con un contenido calórico adecuado, lo cual es fácil de lograr, ya que se conocen los requerimientos de nutrientes para algunas especies acuáticas, pero también se han encontrado numerosos problemas técnicos y biológicos que afectan los costos de producción en el cultivo de peces (Shepherd, 1974).

El suministro de los nutrientes esenciales es el propósito primordial de cualquier alimento, pero se ha demostrado la baja capacidad de alimentos convencionales para peces de retener los nutrientes hidrosolubles. Se ha encontrado que la pérdida de algunas vitaminas y aminoácidos libres es rápida e independiente de la estabilidad física del alimento (Goldblatt et al, 1979).

La solubilización de los nutrientes de la dieta es un

problema conocido desde hace tiempo, que reduce la ingesta de nutrientes por parte del pez, impidiendo su óptimo crecimiento además de causar problemas higiénicos serios al proveer un medio rico para el desarrollo microbiano (Valdez, 1982).

Las vitaminas son muy importantes y son comunmente añadidas en exceso a las dietas para contrarrestar las pérdidas (Valdez, 1982), lo cual encarece el producto, dado el alto costo de las vitaminas sintéticas (tabla 1).

Tabla 1. Costo de algunas vitaminas sintéticas

vitamina	costo (Dólares/Kg) ¹
tiamina	92.0
riboflavina	120.0
piridoxina	1850.0
ácido fólico	550.0
ácido pantoténico	65.0
niacinamida	20.5
ácido ascórbico	94.0
colina	11.6

1) precios de "SIGMA" 1987

Dado que la alimentación artificial representa del 60 al 80 % del total de gastos de operación en un acuacultivo, es obvia la importancia de optimizar los costos en este concepto

(Flores y Márquez, 1984), por lo tanto, se requiere del desarrollo de alimentos completos elaborados con materia prima barata, que gocen de buena estabilidad y que presenten una máxima retención de los nutrientes hidrosolubles una vez que hayan entrado en contacto con el agua.

Actualmente, diferentes grupos de investigación están enfocando su atención a la prevención de la solubilización por varios métodos, como son, cubriendo los componentes solubles con compuestos insolubles, utilizando agentes ligantes y por microencapsulación (Goldblatt et al, 1980).

Hasta la fecha no se han ideado técnicas estandar para medir la estabilidad en agua de alimentos para peces y cada investigador usa técnicas diferentes (Gatesoupe y Luquet, 1977).

Cada vez es más urgente la necesidad de métodos rápidos y precisos para determinar nutrientes en este tipo de alimentos, tanto para investigación como para control de calidad, ya que los métodos clásicos y oficiales aceptados por la AOAC para el análisis de vitaminas hidrosolubles suelen ser tediosos y tardados además de que en muchos casos utilizan reactivos muy tóxicos o inestables (Toma & Tabekhia, 1979).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) nos brinda los medios para una determinación rápida y precisa de vitaminas, lo cual se ha demostrado en numerosas investigaciones recientes (Kamman et al, 1980).

Otros componentes de los alimentos concentrados para peces que requieren especial atención son los lípidos, estos

son nutrientes indispensables en la dieta de los animales, ya que representan la forma mas concentrada de las calorías en los alimentos. Además de su valor nutritivo, los lípidos contribuyen en muchos aspectos a la textura de los alimentos, sirven como vehículo a las vitaminas liposolubles e influyen en el sabor del alimento (Badui, 1982).

Los peces utilizan los lípidos como fuente de energía y para mantener la estructura e integridad de las membranas celulares (Valdez, 1982). La mayoría de las especies parecen ser capaces de sintetizar ácidos grasos de las series $\omega 7$ (palmitoleico) y $\omega 9$ (oleico) pero no de las series $\omega 6$ (linoleico) u $\omega 3$ (linolénico), por lo tanto ácidos grasos de dichas series deben ser incorporados en la dieta (Covey & Roberts, citado por Valdez, 1982).

El enranciamiento por autooxidación es un gran problema en estos alimentos, ya que se presenta comunmente en lípidos con un alto contenido de ácidos grasos insaturados. Los lípidos oxidados forman compuestos tóxicos y reaccionan con las proteínas del alimento, disminuyendo su valor nutritivo y destruyendo las vitaminas (Karel, 1975).

Mientras otras reacciones deteriorativas tales como ataque microbiano o enzimático pueden ser controladas en gran medida disminuyendo la temperatura, esto es particularmente inútil para prevenir la oxidación dado el bajo nivel de energía que se requiere para que se lleve a cabo (Gray et al, 1975).

En base a los problemas ya expuestos, se plantean los siguientes objetivos para la realización de este trabajo:

1) Evaluar la pérdida de algunas vitaminas (ácido ascórbico, niacinamida, tiamina y piridoxina) por solubilización, de alimentos para trucha preparados con diferentes fuentes de grasa (aceite de bacalao y grasa de coco) mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

2) Comparar la estabilidad de estos alimentos durante el almacenamiento, determinando la producción de malonaldehído mediante el método del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

Todas las pruebas se corrieron también para un alimento comercial.

Este trabajo fué paralelo a la manipulación de las dietas utilizando grasa de coco y aceite de hígado de pescado en truchas arcoiris, con el objeto de concentrar ácidos grasos polinsaturados de la serie w3 (Best, 1988).

GENERALIDADES

ACUACULTURA

Fundamentos y situación actual

El hombre ha utilizado siempre al pescado como alimento y la pesca intensiva que ha realizado ha provocado que la población de peces se encuentre por debajo de sus niveles naturales. La despoblación de ríos, lagunas y mares debida a la pesca excesiva y a la contaminación nos guía a la necesidad de cultivar peces para restaurar las fuentes de suministro de los mismos (Rardach et al, 1972, citado por Valdez, 1982).

La acuicultura puede ser definida en terminos generales como la provisión de las condiciones favorables para el crecimiento de especies acuáticas. En la acuicultura se asume que un mantenimiento apropiado y controlado de los sistemas de cultivo, permitiendo uso óptimo del alimento y la energía pueden proveer rendimientos mayores a los que serían posibles en sistemas naturales no controlados (Watson, 1979).

En la última década ha habido una dramática proliferación del interes por el cultivo de peces, con una creciente atención al entendimiento de las condiciones de cultivo que pueden determinar la viabilidad económica de una operación particular (Meyers, 1978).

El cultivo de peces se ha dividido en dos tipos: extensivo e intensivo, términos que hablan por si mismos, el primero se lleva a cabo en las regiones menos avanzadas

tecnologicamente; el segundo, generalmente automatizado requiere de gran inversión de capital y se utiliza para cultivar peces de gran valor comercial como trucha y salmón. Los policultivos también son posibles, así por ejemplo, en la India, son cosechadas seis especies diferentes en un policultivo a razón de 9 o 10 toneladas por hectarea anualmente, lo que representa 5 veces la cosecha del más eficiente de los métodos tradicionales (Shepherd, 1977).

China cuenta con la mayor producción de peces por cultivo, así pues, la ciudad de Pekin produce lo suficiente para que sus habitantes consuman pescado cultivado tres veces a la semana (Sepherd, 1977).

La acuicultura se encuentra bien establecida en muchos países europeos así como en Estados Unidos y Canadá por el método intensivo. En muchos países asiáticos por el método extensivo, pero en el resto del mundo apenas empieza a desarrollarse, con estupendos resultados en algunos países como México en donde se utilizan ambos métodos. México cuenta con todos los recursos necesarios para el cultivo de peces, y el gobierno ofrece facilidades para fomentar dicha actividad, dado los amplios beneficios que esta puede traer consigo.

Mientras el cultivo de especies herbívoras (como tilapia, carpa, etc.) es el más eficiente, existe, sin embargo, una creciente demanda por especies carnívoras como trucha, salmón, camarón, etc. pagándose precios muy altos por estas, por lo que los acuicultores se inclinan por el cultivo de este tipo de peces. Aunque el beneficio económico

ha sido el mayor estímulo hasta la fecha, la necesidad de alimento puede llegar a ser en el futuro la principal motivación para el desarrollo de la acuicultura (Watson, 1979).

Alimentación de los peces

Los alimentos destinados al cultivo de peces pueden ser clasificados en dos tipos: naturales y artificiales. Entre los alimentos naturales comunmente utilizados, se encuentran insectos o sus larvas, pequeños crustaceos, rotíferos, etc. los cuales pueden suministrarse tanto vivos como en forma seca. Muchos crustaceos que se utilizaban comunmente como alimento para peces han escaseado de los reservorios naturales debido a la alta demanda de los mismos para dicha actividad alcanzando precios inaccesibles. También son muy utilizados desperdicios de pesquerías y la fauna de acompañamiento de la pesca de camarón. Entre los vegetales utilizados se encuentran algunas especies de leguminosas. El uso de vísceras animales ha disminuido debido a la creciente demanda para consumo humano.

En general el manejo de alimentos naturales suele ser muy problemático y en ocasiones muy costoso, además de la gran variación que presentan en su valor nutritivo y por lo tanto las dificultades para lograr una alimentación balanceada, por lo que ha surgido la necesidad de desarrollar alimentos artificiales.

Frecuentemente las dietas artificiales son mezcladas con alimento vivo, incrementando a menudo índices de supervivencia y mejorando el crecimiento larvario. A diferencia de los alimentos convencionales o naturales, las dietas artificiales no están sujetas a variaciones en su composición y más aún, idealmente se pueden elaborar bajo un estricto control de calidad (Meyers, 1978).

El suministro de los nutrientes indispensables es el propósito primordial de cualquier alimento. Dados los altos requerimientos de proteínas por parte de algunas especies como la trucha, ésta suele ser la porción más abundante y cara de la dieta. La fuente de proteínas más comúnmente utilizada es harina de pescado. Desde el punto de vista biológico y de la escasez de alimento para consumo humano, no se justifica plenamente suministrar pescado como alimento para otro pez, sin embargo económicamente sí puede resultar rentable, además de que el pescado suministrado como alimento no es apto para consumo humano por diversas razones.

Para el desarrollo de alimentos artificiales, se deben considerar además del valor nutritivo, una serie de criterios de gran importancia como: estabilidad en el agua, densidad, tamaño, color, aroma, aspecto físico, forma y la incorporación de materiales que estimulen la ingestión (Meyers, 1978).

Mientras que la estabilidad del alimento en el agua es esencial, es de igual importancia que la partícula tenga buenas propiedades de rehidratación, de manera que se alcance una textura tal, que permita una ingestión aceptable. El

rechazo de partículas no flexibles por parte del pez es un fenómeno común (Meyers, 1978).

La percepción visual de la partícula de alimento puede ser significativo cuando se logra que el pez vea este material como una presa. Cuando el color es lo suficientemente refringente se logra impartir una sensación de movimiento a la partícula (Meyers, 1978).

La inclusión de compuestos organolépticamente favorables en la dieta es de gran importancia. Un efecto quimiotáctico positivo ayuda al pez a una mejor localización de la partícula y a reconocerla como un alimento aceptable y deseable. Como atrayente se suele usar polvo de *Artemia* o desperdicios de camarón en la dieta. Se ha demostrado el valor de compuestos específicos tales como glucosamina y glicina como atrayentes para varias especies (Meyers 1978).

En cualquier sistema al que se incorporen dietas artificiales, el flujo de introducción de las partículas del alimento debe ser cuidadosamente regulado. Idealmente la cantidad introducida debería estar balanceada por el consumo, pero debe evitarse una sobresaturación del sistema con alimento sin consumir (Meyers, 1978).

Actualmente existen diversas presentaciones de alimentos artificiales, pueden encontrarse en polvo o pasta cuando están destinados a la cría de larvas o alevinos. También existen en forma de hojuelas o de alimento extrudido (pellets) seco o húmedo y congelado (Valdez, 1982).

Los alimentos en hojuelas se preparan fácilmente por secado en tambor. Se suelen usar gomas vegetales

metabolizables para impartir la estabilidad necesaria y optimizar su tiempo de residencia en el sistema acuoso. Una reducción en el tamaño de las hojuelas no afecta las características de estabilidad del alimento (Meyers, 1978)

La aplicación de la extrusión ofrece algunas innovaciones en el desarrollo de alimentos . Se puede lograr una excelente estabilidad en el agua utilizando gomas vegetales. El proceso puede llevarse a cabo a temperaturas menores de 100°C, lo que permite una mejor conservación de componentes termolábiles . Mediante la extrusión se pueden producir partículas de diferentes formas y densidades. Se puede buscar que la forma de la partícula sea tal que al hundirse lo haga con movimientos irregulares que simulen el movimiento de una presa (Meyers, 1978).

Dado que altos niveles de grasa reducen la estabilidad de alimentos peletizados, muchos fabricantes reducen el contenido de grasa sin importarles los requerimientos del pez (Andrews y Davis, 1979). El ácido ascórbico, entre otros nutrientes, es muy inestable durante la extrusión y durante el almacenamiento. Se han detectado pérdidas del 90% del ácido ascórbico durante la extrusión del alimento (Andrews y Davis, 1979). Para reducir las pérdidas de ácido ascórbico y mantener la estabilidad del alimento peletizado, Andrews y Davis (1979) prepararon el alimento sin grasa para luego cubrirlo con grasa y ácido ascórbico, pero se obtuvieron pérdidas de más del 50% del ácido ascórbico en 10 minutos de contacto con el agua.

En todos los casos, los alimentos ya preparados deben

ser cuidadosamente almacenados controlando la humedad y temperatura para lograr una vida de anaquel aceptable.

Pérdida de nutrientes por solubilización

La solubilización de los nutrientes de la dieta es un problema conocido desde hace tiempo, que reduce la ingesta de nutrientes por parte del pez impidiendo su óptimo crecimiento además de causar problemas higiénicos serios al proveer un medio rico para el desarrollo microbiano.

La pérdida de nutrientes hidrosolubles es consecuencia de un fenómeno de transferencia de masa por difusión estimulado por un gradiente de concentración, obedeciendo así a la segunda ley de la termodinámica en la que se afirma que todos los sistemas tienden a aproximarse espontáneamente al equilibrio (Castellan, 1976).

Los nutrientes más susceptibles de solubilizarse son las vitaminas hidrosolubles y los aminoácidos libres, así, en dietas para truchas suplementadas con ácido pantoténico se perdió el 50% de éste en solo 10 segundos de contacto con el agua, después de un minuto no había ácido pantoténico remanente en la dieta (Matty, 1981; citado por Valdez 1982).

Se ha demostrado la baja capacidad de alimentos convencionales para camarón, de retener los nutrientes hidrosolubles. Se encontró que la pérdida de riboflavina, colina, vitamina C, aminoácidos libres y potasio era rápida e independiente de la estabilidad física del alimento (Goldblatt et al, 1979).

Según Valdez (1982) la fortificación de la dieta con mezclas vitamínicas sintéticas no es un proceso viable, tanto desde el punto de vista nutritivo como financiero, debido a la poca capacidad de retención presentada por el alimento hacia este tipo de compuestos una vez que ha entrado en contacto con el agua.

Varios grupos de investigadores han probado diferentes métodos para prevenir la solubilización, utilizando todo tipo de polímeros naturales o artificiales; cubriendo las dietas con materiales insolubles o mediante la microencapsulación, sin obtener resultados convincentes (Goldblatt et al, 1979; Goldblatt et al, 1980; Valdez, 1982; Gatesoupe y Luquet, 1977).

Cubrir el suplemento vitamínico de la dieta con grasa de coco no presenta ningún efecto en la reducción de la solubilización de vitaminas hidrosolubles (Andrews y Davis, 1979; Valdez, 1982).

Podría pensarse que a tamaños menores de partícula, la pérdida de nutrientes por solubilización sería mayor dado el aumento en la superficie de contacto, sin embargo, no existen evidencias claras que demuestren una correlación entre pérdida de nutrientes hidrosolubles y el tamaño de partícula del alimento.

Los mejores resultados para reducir la lixiviación, se han obtenido mediante la encapsulación. Goldblatt et al (1979; 1980) demostraron que era más eficiente la encapsulación de la partícula de alimento que la de sus componentes hidrosolubles por separado. La encapsulación

puede ser considerada como un tipo de empaquetamiento miniatura, en el cual, se atrapan ciertos materiales con una pared especialmente diseñada (Meyers y Butler 1971). Es importante que la pared de la cápsula permita el paso de las sustancias atrayentes o estimulantes del apetito. Las dietas encapsuladas permiten un mejor control sobre la calidad del agua, minimizando la solubilización de compuestos orgánicos que provocan cambios adversos en el sistema como la modificación de los niveles de oxígeno y variación de pH. Esto es especialmente importante en cultivos intensivos en donde la calidad del agua es determinante (Meyers, 1978).

VITAMINAS

Las funciones metabólicas de las vitaminas son similares en todos los animales, actuando generalmente como coenzimas (NAS, 1973). Las fuentes de vitaminas mas comunmente utilizadas en alimentos concentrados para peces son: levadura, cereales, o premezclas vitamínicas.

Las premezclas vitamínicas utilizadas para suplementar alimentos, pueden no satisfacer los requerimientos del pez, ya que pueden existir pérdidas durante el procesamiento, almacenamiento y suministro del alimento (NAS, 1973). Siempre es necesario agregar un ligero exceso de vitaminas ya que estas pueden ser destruidas por: antimetabolitos en la dieta, calor, luz, humedad o lípidos rancios, además de la solubilización al contacto con el agua (NAS, 1973).

Conociendo todas las formas por las que pueden perderse

las vitaminas, se pone en duda la veracidad de los requerimientos establecidos mediante la adición de diferentes concentraciones a las dietas para muchas especies acuáticas, además de que generalmente se utiliza el crecimiento del pez para determinar los requerimientos de algunas vitaminas, lo cual es erróneo, ya que muchos otros sistemas bioquímicos pueden dejar de funcionar antes de que se vea afectado el crecimiento.

En esta sección únicamente se analizarán las vitaminas a las que se les determinó la pérdida por solubilización en los diferentes tratamientos. Estas vitaminas se seleccionaron por su alta solubilidad en agua y por su fácil detección con luz ultra violeta, según se indica en la sección de materiales y métodos. Las características antes mencionadas son evidentes en su fórmula molecular (fig. 1).

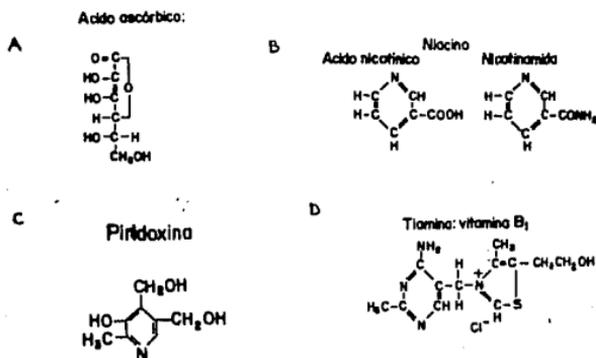


Fig. 1, fórmula molecular de: a) ácido ascórbico, b) niacinamida, c) piridoxina, d) tiamina.

Tiamina

La forma activa de la tiamina es el pirofosfato de tiamina, coenzima que interviene en el metabolismo de carbohidratos, es esencial para la digestión, reproducción y para un buen funcionamiento del sistema nervioso central y periférico (AVC, 1979).

Las curvas de respuesta a diferentes niveles de tiamina en trucha, indican que requieren de 10-15 mg. de tiamina / Kg de dieta seca para alcanzar una ganancia en peso máxima (Covey et al, 1975).

Los signos de deficiencia comienzan a aparecer despues de que el pez se ha alimentado con una dieta deficiente en tiamina durante 8-10 semanas, estos signos son: escaso crecimiento, falta de apetito y desordenes nerviosos como pérdida del equilibrio (Covey et al, 1975).

Los requerimientos de tiamina para trucha son mayores que los de los mamíferos omnívoros, lo cual es muy extraño, dado que la vitamina sirve como coenzima en el metabolismo de carbohidratos y la trucha es carnívora, por lo que casi no come carbohidratos y los metaboliza lentamente (Covey et al, 1975).

La tiamina se destruye rápidamente en soluciones neutras o alcalinas, sin embargo en solución ácida (pH 3.5) la vitamina resiste la esterilización a 121°C por 30 min. La vitamina seca es muy estable y no es sensible a la oxidación atmosférica, en cambio en solución es muy fácilmente oxidada o reducida (AVC, 1979).

Acido ascórbico

Muchos animales son capaces de sintetizar ácido ascórbico, a partir de varias hexosas, pero el hombre y los primates son excepciones. Se ha demostrado esta capacidad en carpas, sin embargo, parece que muchos peces requieren de ácido ascórbico en la dieta para lograr un máximo crecimiento.

No se conoce ningún sistema bioquímico en el que el ácido ascórbico actúe como una coenzima específica. Sin embargo, se sabe que interviene en la biosíntesis de colágeno y mucopolisacáridos. En animales con deficiencia de ácido ascórbico se observa mucho menos colágeno presente en el tejido fibroso que en animales normales. Estudios con isótopos radiactivos muestran que el 90% de la vitamina C ingerida se localiza en áreas en donde existe una síntesis de colágeno en trucha arcoiris. También se ha encontrado cierta influencia del ácido ascórbico en el metabolismo de tirosina y en la síntesis de hormonas adrenocorticoides en algunos peces.

La consecuencia más notable de deficiencia de ácido ascórbico en salmonoides es el desarrollo de deformidades espinales, como son la escoliosis (curvatura lateral de la espina) y lordosis (curvatura hacia adelante) (NAS, 1973).

Los cristales secos de ácido ascórbico no se alteran por la acción del aire y de la luz solar a temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo. En soluciones acuosas a

pH menor a 7.6, no se oxida al ser expuesto al aire, a menos que existan trazas de cobre u otros materiales que catalicen la reacción (AVC, 1979).

Niacina

El término niacina comprende más de un compuesto, pues puede presentarse como ácido nicotínico o como nicotinamida. La forma activa es nicotinamida adenina dinucleótido y como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato. Ambos actúan como coenzimas en sistemas de oxidación-reducción transfiriendo hidrógenos.

En algunos peces como la trucha arcoiris no se observan síntomas aparentes de deficiencia de niacina, mientras que en otros como la carpa, se observa: hemorragia cutánea, alta mortalidad y crecimiento retardado.

Los requerimientos de niacina no se han logrado definir en muchas especies dada la variación que presentan dependiendo del método utilizado, así pues, en trucha arcoiris se encuentran reportados valores desde 0.02-0.1 hasta 3-4 mg./Kg de peso corporal por día.

Tanto el ácido nicotínico como la nicotinamida son estables en forma seca y en soluciones acuosas y no son afectados por la luz o el pH (AVC, 1979).

Piridoxina

El término vitamina B₆ comprende un grupo de derivados

de la piridina estrechamente relacionados como son: piridoxina, piridoxal y piridoxamina. La forma activa de esta vitamina es el fosfato de piridoxal.

Un gran número de enzimas esenciales en el metabolismo de aminoácidos requieren de fosfato de piridoxal como coenzima. Entre las reacciones que interviene se encuentran descarboxilaciones, transaminaciones y deshidroxilaciones de aminoácidos.

Como son tantas las enzimas que requieren de esta vitamina, ocurren muchas lesiones como consecuencia de su deficiencia. En salmonoides se observa entre otras cosas: anemia, desordenes nerviosos, ataques epileptiformes e hiperirritabilidad. La piridoxina tiene marcados efectos en la transaminasa hepática, así pues, en carpa se demostró el aumento del tamaño del hígado al aumentar los niveles de piridoxina en la dieta.

Los requerimientos de vitamina B₆ de los diferentes peces, cae entre 0.10-0.43 mg/Kg de peso corporal por día.

La piridoxina es sensible a la luz y estable frente al calor, ácidos y álcalis (AVC, 1969).

Métodos de análisis

Los métodos de análisis de vitaminas pueden dividirse en tres tipos: animales, microbiológicos y químicos. Las determinaciones animales fueron las que primero se desarrollaron, pero son muy costosas y sobre todo tardadas, además de la variabilidad que presentan dependiendo del

animal y de la técnica aplicada. Comparados con estos análisis biológicos que usan animales de laboratorio o humanos, los microbiológicos poseen las ventajas de ser más rápidos y tener menores necesidades de espacio, trabajo y materiales. Comparten al igual que los análisis con animales la ventaja de la especificidad biológica. Sin embargo ninguno de estos es apto para análisis rutinarios. Los análisis químicos son más rápidos y económicos además de tener mayor aplicación para determinaciones rutinarias.

Muchos de los métodos químicos comunmente usados para determinar vitaminas son muy precisos, sin embargo, son complicados y requieren de mucha atención en la preparación de reactivos (debido a su inestabilidad o características cáusticas) para obtener resultados válidos (Kirchmeier 1978).

Para la tiamina se usa principalmente el método del tiocromo, o la medida del color producido acoplando una amina como la p-aminoacetofenona con la tiamina. El método del tiocromo tiene mayor aplicación para alimentos que los métodos colorimétricos, que requieren altas concentraciones de tiamina para obtener resultados fidedignos.

El método del tiocromo consiste en oxidar la tiamina en condiciones alcalinas y el tiocromo producido fluoresce al ser irradiado con luz ultravioleta a 365 nm. y transmite a 435 nm. La fluorescencia producida es proporcional a la tiamina presente en la muestra.

Los métodos químicos disponibles para analizar niacina son poco sensibles y poco específicos. Estos métodos se basan en que la niacina reacciona con el bromuro de cianógeno

para dar un compuesto piridinio, que por reajustes, da lugar a derivados que se conjugan con aminas aromáticas dando compuestos colorido . En condiciones adecuadas la densidad de color es proporcional a la concentración de niacina. En los productos naturales la niacina está normalmente ligada a otros compuestos químicos y tiene que ser liberada por hidrólisis con ácidos o alcalis fuertes o por tratamiento enzimático antes de poder aplicar los métodos analíticos.

Las numerosas reacciones que son posibles con la piridoxina , aparentemente deberían ofrecer muchos métodos de análisis, pero debido a su falta de especificidad y de aspectos cuantitativos, dichas reacciones no son apropiadas para análisis. Con frecuencia se utilizan dos reacciones: la prueba del indofenol y el acoplamiento con 2,6-dicloroquinonacloroimida, sin embargo, ninguno de estos métodos es totalmente satisfactorio.

El ácido ascórbico presenta menos dificultades para su análisis que las otras vitaminas. Muchas de las técnicas para determinarlo tienen su fundamento en la oxidación de éste con el colorante 2,6-diclorofenolindofenol, el cual pierde su color azul, y la cantidad decolorada es proporcional a la cantidad de vitamina C presente. El valor de este reactivo se ve limitado por la presencia de sustancias reductoras, como sales ferrosas, sulfito, compuestos sulfhidrúlicos y del tipo de la glucosamina. Además de no ser sensible al ácido dehidroascórbico, sin embargo existen muchos otros métodos (aunque no tan sencillos) para determinar vitamina C total.

HPLC

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento ha emergido en los últimos años como una efectiva herramienta analítica en la determinación de nutrientes en diversos alimentos (Kamman et al, 1980). Velocidad, especificidad, detección de concentraciones muy bajas, precisión y rápida preparación de la muestra son características del análisis por HPLC (Conrad, 1975).

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento utiliza varios mecanismos de separación que son seleccionados dependiendo de la naturaleza de la muestra por analizar. En todos los casos, una solución de la muestra se inyecta en el cabezal de un tubo empacado (columna), y es transportada por el disolvente adecuado (fase móvil) al ser bombeada por todo el sistema cromatográfico. Sus componentes pueden permanecer en la fase móvil o pueden interactuar por medio de diferentes mecanismos con el empaque (fase estacionaria), de esta manera la mezcla es separada por la columna y los componentes salen (eluyen) a diferentes tiempos, siendo cada tiempo característico de un componente en particular, permitiendo así su identificación. Conforme van eluyendo, los componentes pueden ser detectados y cuantificados por diferentes métodos, como son, medición de índice de refracción, absorción de luz, fluorescencia y conductividad eléctrica. Se utiliza el método de detección que mas se

adecue a las propiedades de los componentes.

El uso de HPLC se ha ido incrementando para la separación y determinación de compuestos no volátiles. Tiene la ventaja sobre otros métodos de tener un gran poder de resolución que permite diferenciar compuestos muy semejantes químicamente. Existen muchos reportes del uso de HPLC para determinación de vitaminas, sin embargo, la mayoría han sido desarrollados para productos farmacéuticos y premezclas vitamínicas que contienen altos niveles de vitaminas en forma pura (Kirchmeier & Upton, 1978; Sood et al, 1977).

Mediante una elección acertada del eluyente y la columna, es posible separar tanto vitaminas hidrosolubles como liposolubles simultáneamente (Conrad, 1975).

Las primeras técnicas para la determinación de vitaminas hidrosolubles se desarrollaron con columnas de intercambio iónico (Williams et al, 1973), pero actualmente se prefiere la aplicación de la cromatografía de partición utilizando columnas de fase inversa y adicionando reactivos de apareo iónico (PIC) en la fase móvil.

Los bajos niveles de vitaminas y la gran cantidad de otras sustancias interferentes en muchos alimentos hacen que la determinación cromatográfica en los extractos sea casi imposible (Ang y Moseley, 1980).

Para mejorar los límites de detección y evitar interferencias Ang y Moseley (1980) convirtieron la riboflavina a luminiflavina y la tiamina a tiocromo antes de la separación cromatográfica y detectaron los productos por fluorescencia en diferentes productos cárnicos. Aunque es

posible utilizar detección fluorométrica para algunas vitaminas, estas técnicas requieren de una manipulación adicional reduciendo las ventajas sobre los métodos tradicionales (Kamman et al, 1980).

Kamman et al (1980) determinaron tiamina y riboflavina en alimentos fortificados utilizando una columna de fase inversa, pero además de que solo se separan estas dos vitaminas no obtienen una buena resolución.

Toma y Tabekhia (1979) usaron reactivos PIC en la fase móvil para separar tiamina, riboflavina y niacina de extractos acuosos de arroz y productos de arroz con una columna de fase inversa y detector de U.V.

La verdadera dificultad del análisis de vitaminas por HPLC se encuentra en determinarlas simultáneamente, debido principalmente a que un mismo método de detección no siempre es aplicable en forma satisfactoria a todas las vitaminas, sin embargo se está avanzando mucho en este campo.

LIPIDOS

Importancia y requerimientos

En alimentos naturales el contenido de grasa varía desde 2% hasta 20%. Una característica del aceite de pescado es la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados que contienen de 20 a 22 átomos de carbono con 5 o 6 dobles ligaduras en la cadena (NAS, 1973).

El aceite de pescado se encuentra formado principalmente de fosfolípidos. Los fosfolípidos en todas las formas animales, incluyendo los peces, son particularmente ricos en ácidos grasos de cadena larga (NAS, 1973).

La familia del ácido linoleico (w3) es esencial para la trucha arcoiris y presenta una pequeña necesidad por la serie (w6) del ácido linoléico. Los requerimientos de ácidos grasos de la serie w3 pueden ser cubiertos con 5% de aceite de pescado en la dieta (NAS, 1973).

Un alto nivel de ácidos grasos polinsaturados en la dieta puede producir rancidez de la grasa durante el almacenamiento, por lo que debe ser protegida con antioxidantes (NAS, 1973).

Las grasas líquidas son rápidamente digeridas y utilizadas por el pez (por su naturaleza poiquilotérmica), en cambio, difícilmente logra digerir las grasas sólidas de alto punto de fusión (NAS, 1973).

Algunos de los síntomas de deficiencia de ácidos grasos de la serie w3 en trucha arcoiris son: escaso crecimiento, tejidos con un contenido elevado de ácidos grasos de la serie w9, necrosis de la aleta caudal, respiración acelerada, falta de pigmentación de la piel, estrés y miopatía cardíaca (NAS, 1973).

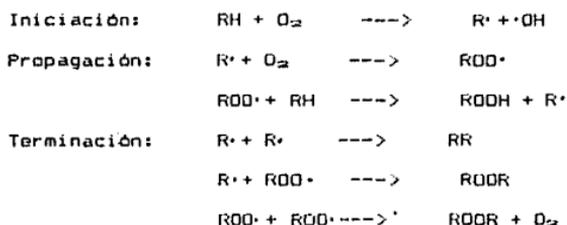
Niveles elevados de lípidos en el cuerpo de la trucha arcoiris, generalmente son consecuencia de una dieta con alto contenido de grasa.

Oxidación de lípidos

Los lípidos se enrancian como resultado de la oxidación, y esta rancidez oxidativa es la causa principal de deterioro de los alimentos concentrados (Gray, 1978).

Mientras otras reacciones deteriorativas tales como ataques microbianos o enzimáticos pueden ser controladas en gran medida disminuyendo la temperatura, esto es particularmente inútil para prevenir la oxidación, dado el bajo nivel de energía que se requiere para que ésta se lleve a cabo (Gray, 1977). La susceptibilidad de oxidación de los ácidos grasos aumenta en forma geométrica al aumentar el grado de insaturación.

La deterioración oxidativa de los lípidos, comienza con reacciones de autooxidación, las cuales son acompañadas de varias reacciones secundarias con carácter oxidativo y no oxidativo. El mecanismo de la autooxidación es una reacción en cadena por radicales libres, que consta de 3 etapas:



En donde RH es cualquier ácido graso insaturado en el cual el H (hidrógeno) es lábil por estar en un átomo de carbono adyacente a un doble enlace (Gray, 1978).

Los hidroperóxidos (ROOR) son el product. principal de

las reacciones de ácidos grasos con oxígeno. Las reacciones de peroxidación de lípidos tienen importancia biológica, dado que se producen compuestos tóxicos en los alimentos y además pueden producir una peroxidación in vivo (Karel et al 1975).

Entre los efectos de la peroxidación de lípidos sobre las proteínas están la pérdida de actividad enzimática, pérdida de la solubilización y pérdida de aminoácidos específicos, de los cuales, los más susceptibles son: cisteína, lisina, histidina y metionina (Karel et al, 1975).

La peroxidación de los lípidos in vivo ha sido identificada como una reacción deteriorativa básica en los mecanismos celulares del proceso de envejecimiento (Tappel, 1973)..

La acción de los peróxidos sobre los lípidos del organismo provoca un daño de las membranas subcelulares, lo cual termina afectando a toda la célula (Tappel, 1973). Estudios en partículas subcelulares aisladas muestran que puede ocurrir una peroxidación de los lípidos de la membrana, causando daños funcionales serios (Karel et al, 1975).

Se ha visto que existe una fuerte similitud entre los efectos de la radiactividad y las reacciones de peróxidos con las proteínas (Tappel, 1973).

Además de los hidroperóxidos existen productos secundarios de la oxidación de lípidos (fig. 2) tan tóxicos o más que los mismos hidroperóxidos (Tovar y Kaneda, 1977).

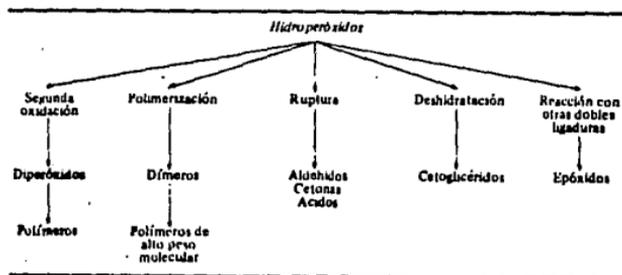


Fig.2 Rutas de descomposición de hidroperóxidos

Dado el alto contenido de ácidos grasos polinsaturados en el aceite de pescado, la oxidación de éste en los alimentos concentrados representa un serio problema para el acuicultor. Cuando se utiliza alimento molido, se incrementa la superficie de contacto con el aire, lo cual facilita la oxidación de los lípidos (Gokalp et al 1983).

Los metales presentes en las dietas, necesarios para cubrir los requerimientos del pez, contribuyen a la oxidación de los lípidos actuando como catalizadores de la reacción.

Se han observado en truchas y salmones alimentados con dietas en las que parte de los lípidos se habían enranciado, síntomas patológicos de acumulación de grasa en el hígado y por lo tanto un malfuncionamiento del mismo (Covey y Roberts 1978, citado por Valdez, 1982).

Métodos para estimar el grado de oxidación

Aunque el análisis sensorial es uno de los métodos más sensibles, no es práctico para análisis rutinarios y generalmente carece de reproducibilidad, consecuentemente, con el objeto de correlacionar los datos con el desarrollo del sabor, se han desarrollado una serie de métodos químicos y físicos para cuantificar la deterioración oxidativa.

No hay un método ideal que se correlacione bien con los cambios en las propiedades organolépticas de lípidos oxidados durante todo el proceso de la oxidación. Entre los principales métodos químicos comunmente utilizados se encuentran el índice de peróxidos y el método del ácido 2-tiobarbitúrico (Gray, 1978).

El índice de peróxidos emplea la concentración de peróxidos como índice de oxidación. Debido a que los peróxidos están sujetos a reacciones secundarias de degradación, este método está limitado solo a las primeras etapas de la oxidación de la grasa (Badui, 1982).

El método del Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), que es uno de los más usados en alimentos se discute ampliamente en la siguiente sección.

Diversos estudios fundamentados en análisis estadísticos indican que la rancidez de alimentos animales se relaciona mejor con el contenido de TBA que con la determinación de peróxidos (Zipser et al, citado por Tomas y Funes, 1987).

Dentro de los métodos físicos, los más importantes son los de fluorescencia, espectroscopia infrarroja, polarografía,

refractometría y cromatografía de gases. Muchos de estos análisis son muy elaborados y lentos, por lo que se usan poco en la industria alimentaria.

Método del Ácido 2-tiobarbitúrico

Los productos de descomposición de los hidroperóxidos se encuentran distribuidos entre las fases lipídica, acuosa y gaseosa de los alimentos de acuerdo con sus características químicas. El malonaldehído es un producto de descomposición de los lípidos, soluble en agua, que ha sido usado ampliamente como un indicador del grado de deterioración oxidativa de los lípidos (Gray, 1978).

El malonaldehído se produce durante la autooxidación de ácidos grasos polinsaturados y es un compuesto dicarbonílico altamente reactivo. Debido a su reactividad, la mayor parte del malonaldehído presente en alimentos grasos se encuentra ligado a otros componentes de los alimentos, y una pequeña porción se encuentra en forma libre (Buttkus y Bose, citado por Kakuda et al, 1981).

Únicamente los peróxidos que posean insaturaciones $\beta\gamma$ al grupo peróxido son capaces de ciclizarse para formar el malonaldehído, tales peróxidos solo pueden producirse a partir de ácidos grasos que contengan tres o más dobles enlaces (Dahle et al, citado por Gray, 1978).

El principio del método de TBA esta basado en la reacción de condensación entre dos moléculas de TBA y una de malonaldehído (Fig.3), que forma un compuesto cromógeno de

color rojo, cuya concentración se puede determinar espectroscópicamente a 532 nm. Sin embargo se han observado otros pigmentos amarillos con un máximo de absorción a 452 y 453 nm que corresponden a los productos de reacción con TBA de aldehidos saturados y dienos respectivamente (Jacobson et al, citado por Gray 1978).

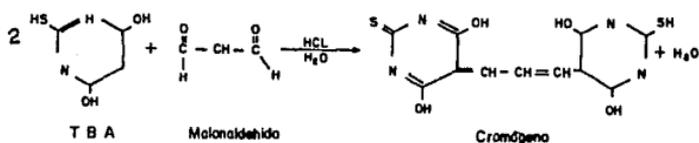


Fig.3 Reacción propuesta entre el TBA y el malonaldehído

Existe evidencia de que otros compuestos ajenos a la reacción de oxidación pueden reaccionar con el TBA para formar el pigmento característico. Esto se observa en productos ahumados, para los cuales se requiere de una corrección (Dugan, citado por Gray, 1978).

Mediante este método se pueden detectar cantidades extremadamente pequeñas de malonaldehído (1ppm) (Igene et al 1985)

Cuando en sistemas de oxidación existen proteínas, puede

presentarse una competencia por el malonaldehído, resultando en un bajo número de TBA. Estas reacciones de competencia son de mayor importancia en alimentos deshidratados, ya que el agua también compite por los sitios activos (Gray, 1978).

Conforme se van deteriorando los lípidos, van aumentando los valores de TBA hasta llegar a un máximo, a partir del cual empiezan a descender. La caída en los valores de TBA puede explicarse por una disminución en la rapidez de oxidación de ácidos grasos insaturados y la inestabilidad del malonaldehído producido (Gokalp et al, 1983).

La prueba de TBA se puede hacer de diferentes formas, las dos más comunes son: a) agregando el TBA en solución ácida al alimento y calentando, el pigmento es entonces extraído con un solvente (Sinnhuber y Yu, 1958); b) el alimento es sometido a una destilación en solución ácida, y una porción del destilado se mezcla con el TBA (Tarladgis et al, 1960), esta mezcla se calienta para formar un complejo colorido. Ambos métodos requieren de la presencia de ácido (pH 0.9-1.5) para liberar al malonaldehído de algunos precursores y catalizar la condensación con el TBA.

El método de destilación es el más empleado. Las ventajas del método de destilación son múltiples: el destilado es obtenido como una solución acuosa, evitando la etapa de la extracción; se destila rápidamente minimizando la oxidación durante el análisis; el destilado solo contiene los constituyentes volátiles, lo que reduce la posibilidad de interferencia (Williams et al, 1983).

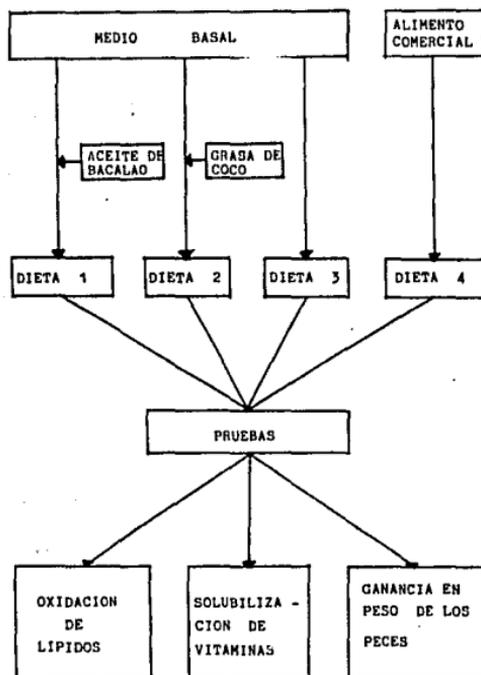
Mediante el uso de HPLC, es posible determinar el

malonaldehido directamente del destilado, evitando la formación del complejo colorido, y por lo tanto, cualquier interferencia de otros pigmentos, además de reducir el tiempo de análisis (Kakuda et al, 1981).

MATERIALES Y METODOS

Con el fin de presentar un panorama de las actividades que se realizaron, se elaboró en forma de diagrama un resumen del diseño experimental (Fig. 4).

Fig.4. DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



ELABORACION DE LAS DIETAS

Materias primas utilizadas

- Harina de pescado elaborada por " Productos Pesqueros Mexicanos" en Mazatlan Sin.
- Salvado forrajero de trigo.
- Grasa de coco.
- Aceite de bacalao de color rojo.
- Fibra no nutritiva tipo celulosa, (Teklad)
- Vitaminas sintéticas en polvo Merck (ver método de elaboración de las dietas).
- Carboximetilcelulosa (CMC). Macrocel 40 PBB
- Etoxiquina (como antioxidante).

Desengrasado de la harina de pescado

La harina de pescado se trató con cloroformo a razón de 2 l/kg durante una hora en garrafrones de vidrio. Pasado este tiempo, se filtró a través de una malla de tela de algodón y se esparció sobre papel, dejándose a la intemperie por un lapso de 48 hr para eliminar el cloroformo residual. Se le determinó el contenido de grasa (Bligh & Dyer, 1959), pero como aún era elevado para elaborar las dietas a las que no se les adicionaba aceite de pescado, se decidió tomar 2/5 del total de la harina (aproximadamente 14 Kg) y llevarla a la planta piloto del departamento de Tecnología de Alimentos del Instituto Nacional de Nutrición "Salvador Zubirán", para

trabajar con una planta de extracción líquido-sólido (APEX modelo SSE 43/ E1, con capacidad para 10 Kg) utilizando hexano como disolvente. El tiempo de extracción fué de 5 hr a una presión de 0.5 Kg/cm.

Formulación de las dietas

Las cantidades de cada uno de los ingredientes utilizados en las diferentes formulaciones, así como el número que se asigno a las mismas para facilitar su identificación se muestra en la Tabla 2.

La composición de la mezcla vitamínica se muestra en la Tabla 3.

Tabla 2. Formulación de las dietas

INGREDIENTES	Dietas		
	1	2	3
	g/kg de dieta (BS)		
Harina de pescado ^a	441.0	432.7	432.7
Salvado	390.5	389.4	389.4
Mezcla de vitaminas	14.5	14.5	14.5
Teklad	-----	-----	150.4
CMC	13.0	13.0	13.0
Grasa de coco	-----	150.4	-----
aceite de bacalao	141.0	-----	-----

a) Para la dieta 1 se utilizó la harina tratada únicamente con cloroformo (4.67% de grasa) mientras que para las otras dos dietas se utilizó la harina doblemente desengrasada con cloroformo y hexano (2.71% de grasa).

Tabla 2 Composición de la mezcla vitamínica

VITAMINAS	g/Kg de dieta base seca
Cloruro de colina al 100%	8.8260
Vitamina E	2.5217
Tiamina	0.0807
Riboflavina	0.1815
Niacinamida	0.6455
Biotina	0.0201
Pantotenato de calcio	0.3613
Piridoxina (HCl)	0.0605
Menadiona	0.0201
Vitamina B ₁₂	0.0668
Acido ascórbico	1.5130
Vitamina D ₂ (500,000 USP/g)	0.0100
Vitamina A (250,000 IU/g)	0.1260
Etoxiquina (como antioxidante)	0.0429

Elaboración de los pellets

Se mezcló la harina de pescado, el salvado y la CMC en un cubo mezclador de polvos (hecho en el departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química UNAM) durante 20 min. Se colocó entonces 1 kg de muestra en una batidora Dhaus, se le adicionó 1 l de agua de la llave a 60°C y el Teklad o la grasa según el caso. Se mezcló por un tiempo de 10 min, añadiendo posteriormente las vitaminas y mezclando por 5 minutos más. La masa obtenida se pasó a través de un molino para carne manual con perforaciones de 5 mm. Los churros (pellets) así obtenidos fueron recogidos en papel y se secaron a la intemperie durante 4 días. Las dietas se almacenaron en bolsas de polietileno a una temperatura de 5°C durante el transcurso del experimento.

Comparación del grado de oxidación de lípidos entre las diferentes dietas

Se tomaron aproximadamente 200 g de cada dieta en recipientes abiertos y se almacenaron a una temperatura de 38°C durante 40 días, con el fin de acelerar las reacciones de oxidación. Durante este tiempo se tomaron muestras de 2.5 a 5 g de cada dieta por duplicado, para determinar el grado de oxidación de los lípidos mediante el método de TBA en su variante de destilación. La metodología empleada para su determinación se describe a continuación (Echeverría, 1987):

Reactivos

- Solución de Acido 2-tiobarbitúrico (4,6-dihidroxi-2-tiopirimidina, Sigma pfs) en Acido acetico glacial a una concentración 0.025 M (2.8g/l).
- Butilhidroxianisol (BHA).
- Acido clorhídrico (HCl) 4 N.
- Acido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Método:

Después de tomar la muestra (5 g en las primeras etapas del experimento y 2.5 g en las etapas finales), esta se mezcló bien en un matraz bola de 500 ml de boca esmerilada (24/40) junto con 100 mg de BHA, 100 mg de EDTA, 95 ml de HCl 4N 100 ml de agua destilada y perlas de ebullición. La mezcla se agitó vigorosamente y el matraz se colocó entonces en el sistema de destilación, según se muestra en la figura 5. La destilación se llevó a cabo a máxima potencia del reóstato, hasta recolectar 50 ml de destilado (aproximadamente 15 min). Una vez terminada la destilación, se tomaron 5 ml de destilado y se mezclaron con 5 ml de la solución de TBA en un tubo de ensayo (16x150) con tapón de rosca, el cual se tapó perfectamente y se puso a calentar durante 40 min. en baño de agua a ebullición. Transcurrido el tiempo de calentamiento, se enfriaron los tubos con agua corriente y se leyó la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 538 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu Vis-U.V.-120-02. La concentración de Malonaldehído (MAL) en la muestra se calculó mediante la ley de Lambert & Beer (Skoog & West, 1984):

$$A = e \cdot l \cdot c$$

En donde "A" es la absorbancia, "l" la longitud de la celda (1 cm), "c" concentración de MAL en moles/l y "e" el coeficiente de extinción molar (1.56×10^4) (Echeverría, 1987).

$$\frac{\text{mg MAL}}{\text{Kg Alim.}} = \text{No. de TBA} = \frac{A(46.154)}{\text{g. de muestra}}$$

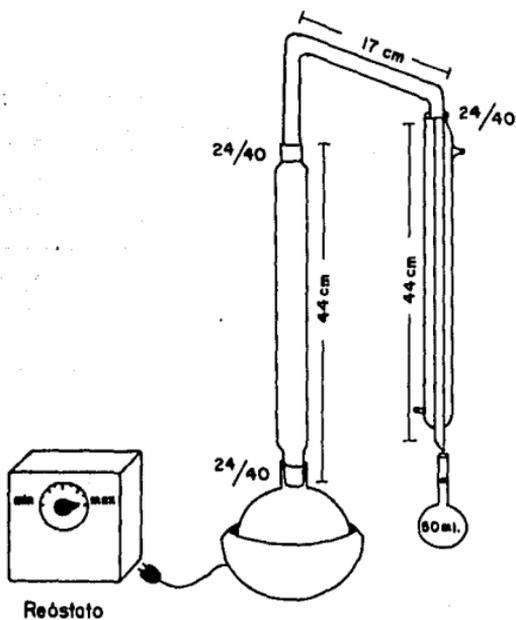


Fig. 5 Sistema de destilación de malonaldehído

Determinación de la pérdida de vitaminas por solubilización

Para estimar la solubilización de vitaminas del alimento al contacto con el agua, se corrió un experimento en el que se pretende simular las condiciones que se tendrían en un centro acuícola durante la alimentación de los peces. Terminados los diferentes tiempos de extracción a los que se corrió el experimento, se tomaron muestras del agua, cuantificando por HPLC las vitaminas solubilizadas.

Elección de las vitaminas a evaluar

Tomando en cuenta que las vitaminas de más alta solubilidad en agua y de mayor concentración en la dieta serían las más abundantes en el agua después de la lixiviación del alimento, se procedió a comparar dichas características para las diferentes vitaminas hidrosolubles presentes en la dieta. De las vitaminas elegidas, se prepararon soluciones de 100 mg/l y se ajustaron a un pH de 2.8 con ácido fosfórico (para prevenir la destrucción de la vitamina B₁ y C), entonces se hizo un barrido del espectro UV en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Lambda 3A UV/VIS), para determinar los máximos de absorción de cada una de las vitaminas. Aquellas vitaminas que no presentaron una absorción significativa, no fueron estudiadas. Las vitaminas así elegidas para su estudio son: tiamina, niacinamida, ácido ascórbico y piridoxina.

Elaboración de la curva patrón

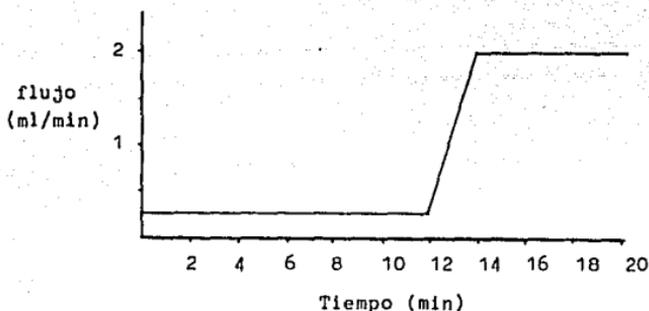
Para la elaboración de la curva patrón se utilizaron como estándares las mismas vitaminas que se habían usado en la elaboración de las dietas, con el fin de obtener la mayor semejanza posible entre los cromatogramas de las soluciones estándar y la de los problemas. Las concentraciones de las diferentes soluciones se eligieron de tal forma que cubrieran el rango de concentración en que pudieran encontrarse las vitaminas en los extractos de las dietas. Así pues, se prepararon 3 soluciones, conteniendo 12.5, 25 y 50 mg/l de cada vitamina. El pH de las soluciones quedó ajustado a 2.8 con ácido fosfórico. Las soluciones fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 micras de poro, para después ser inyectadas al sistema cromatográfico. Se utilizó un cromatógrafo Beckman equipado con un controlador 421 A, bomba de pistón 110B y detector de longitud de onda variable 183. Las condiciones en que se operó el cromatógrafo son las siguientes:

Volumen de inyección 20 microlitros.

Fase móvil: 9.5% de acetonitrilo en agua, conteniendo 0.4 ml/l de amoníaco (NH_4OH al 25%), 0.005 M de ácido hexanosulfónico y ácido fosfórico para ajustar el pH de la solución a 2.8 (la solución se filtró por un filtro Millipore de 0.45 micras de poro antes de ser utilizada).

Se utilizó un flujo variable respecto al tiempo, para lograr una mejor resolución de cada vitamina (fig.6).

Fig. 6 Programa de flujos



Atenuación: variable según la vitamina y la concentración de la solución. La atenuación en cada caso, se indica en el cromatograma correspondiente (Apéndice I).

La longitud de onda del detector fué variable de acuerdo a la vitamina, y se describe en la sección de resultados.

Se graficó altura del pico contra concentración de la vitamina correspondiente.

Método de extracción de las vitaminas

Para cada una de las dietas se siguieron los pasos que se indican a continuación. El experimento no se corrió por duplicado, por falta de fase móvil.

- En tres matraces erlenmeyer de 250 ml se colocaron 10 g del alimento íntegro.
- Se agregaron 100 ml de agua destilada a una temperatura de 18°C a cada matraz.

- Se agitaron inmediatamente a 100 rpm en un incubador provisto de agitación y atmósfera controlada New Brunswick Scientific durante 5, 15 y 30 min.
- Inmediatamente despues de retirar cada matraz, se filtró el contenido por vacío a través de un papel filtro de poro mediano.
- Parte del filtrado se filtró nuevamente a través de un filtro de 0.45 micras de poro Millipore.
- El filtrado se recibió en tubos de ensayo (16x150) con tapón de rosca cubiertos con papel aluminio, para evitar una posible descomposición de la piridoxina por acción de la luz.
- Se inyectaron 20 μ l de este último filtrado al cromatógrafo de líquidos, el cual se operó exactamente en las mismas condiciones que con las soluciones estandar.

Las alturas de los picos correspondientes a cada vitamina se interpolaron en la curva patrón y se calculó la concentración de estas en los diferentes extractos. El dato del total de la vitamina en forma libre presente en la dieta, se obtuvo pesando 10 g del alimento despues de haberlo molido en un mortero, entonces fue introducido en un matraz erlenmeyer de 250 ml y tratado de la misma manera que las muestras en forma íntegra, con la única variación de que la agitación se llevó a cabo a 300 rpm durante 30 minutos.

Materia solubilizada total

Para saber la fracción en peso solubilizada de cada dieta a los diferentes tiempos de contacto con el agua, se recuperó el residuo de la primera filtración de la prueba de

solubilización de vitaminas y se secó a 60°C durante 3 horas, para después ser pesado y comparado con el peso original.

Densidad aparente de las dietas

Tomando en cuenta la posibilidad de un efecto de la compactación de las dietas en la lixiviación en agua de las mismas, se les determinó la densidad aparente, pesando un volumen de 100 ml de cada dieta, medidos en una probeta de dicho volumen.

Ganancia en peso de los organismos alimentados con las diferentes dietas:

Este estudio se realizó en la sala de incubación del centro piscícola "El Zarco", dependiente de la secretaría de pesca, en el estado de México. Los organismos utilizados fueron truchas arcoiris (*Salmo gairdnerii*).

Los peces se seleccionaron de acuerdo a un rango de talla entre 15-20 cm. Se tomaron 10 peces para cada tratamiento y se pesaron en bloque. Se colocaron en tinas de fibra de vidrio de 3.20 x 0.40 x 0.40 m. Cada tina estaba provista de agua corriente, recibiendo un flujo aproximado de 4 l/min. La temperatura del agua fue de 18°C durante el experimento. Los peces fueron alimentados con el 3% de su peso en base seca. Los organismos se pesaron cada 15 días durante 10 semanas y la mortalidad se registró diariamente. Transcurridas las 10 semanas, se calculó la ganancia en peso de los organismos alimentados con las diferentes dietas.

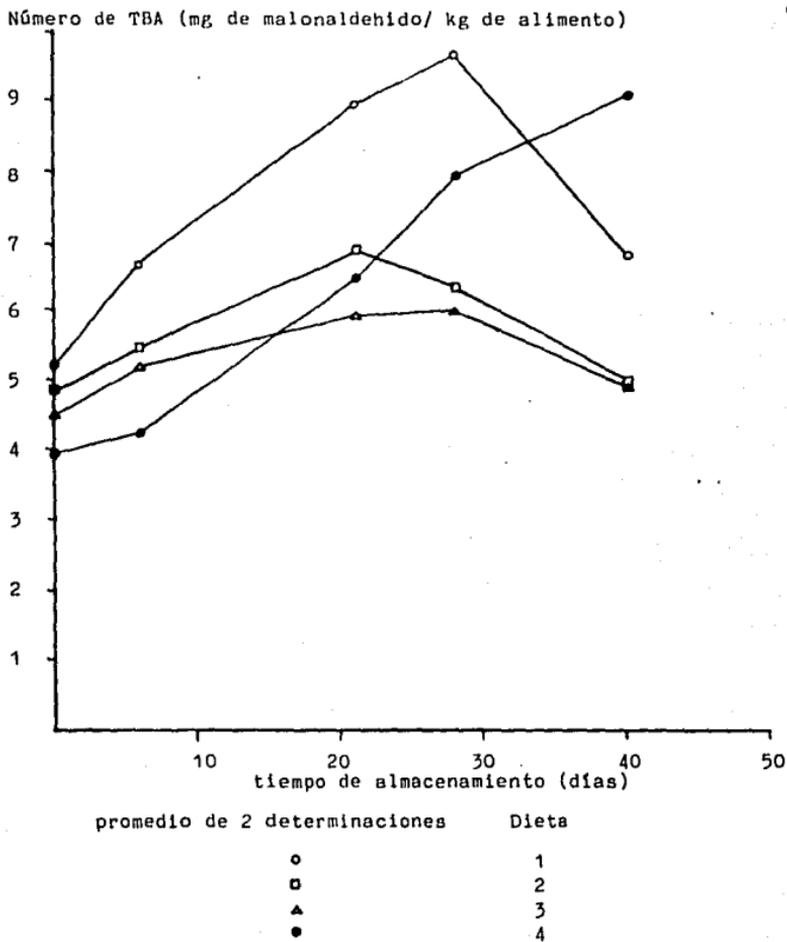
RESULTADOS

OXIDACION DE LIPIDOS

La concentración de grasa residual en la harina de pescado desengrasada únicamente con cloroformo, y la doblemente desengrasada, primero con cloroformo y después con hexano fue de 4.67 ± 0.26 % y 2.71 ± 0.16 % respectivamente.

El contenido de malonaldehído a diferentes tiempos durante el almacenamiento de las dietas a 38°C se muestra en la Figura 7.

Fig. 7 CONTENIDO DE MALONALDEHIDO EN LAS DIETAS ALMACENADAS A 38° C



PERDIDA DE VITAMINAS POR SOLUBILIZACION

La longitud de onda de máxima absorción para cada vitamina, obtenida de sus respectivos espectros (Fig. 8) se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Longitud de onda de máxima absorción de las vitaminas elegidas.

Vitamina	longitud de onda (nm)
ácido ascórbico	244
niacinamida	262
piridoxina	292
tiamina	254

La colina y el ácido pantoténico, que son muy solubles en agua, fueron descartados por su baja absorción a lo largo de todo el espectro UV.

Después de interpolar las alturas de los picos de los cromatogramas (Apéndice I) correspondientes a cada vitamina, en sus respectivas curvas estándar (Fig. 9), se graficó la concentración de cada una de las vitaminas en las diferentes dietas contra el tiempo de extracción (Fig. 10 a 13).

En la Tablas 5 se hace una comparación del contenido teórico de las vitaminas en forma libre y el total extraído.

Así también, en la Tabla 6, se hace una comparación de los requerimientos de vitaminas de la trucha, con las vitaminas ingeridas.

Los resultados de la densidad aparente de las dietas se muestran en la Tabla 7

FIG. 8 A

ESPECTROS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE LAS VITAMINAS

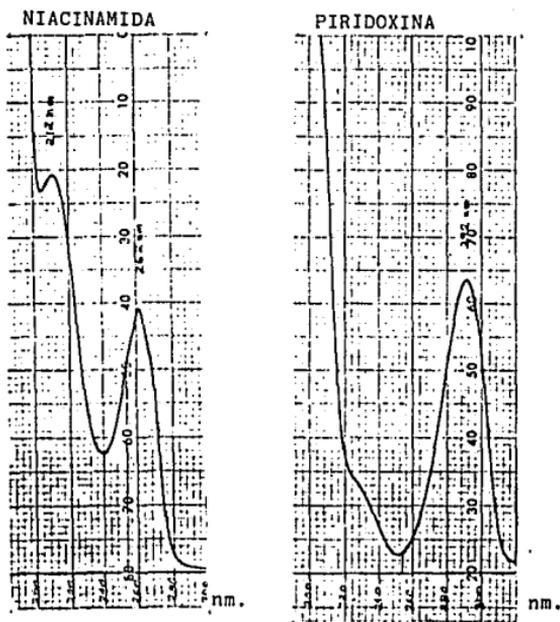
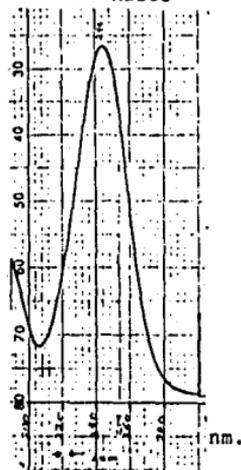


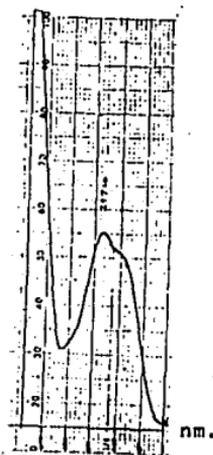
FIG. 8 B

ESPECTROS DE ABSORCION ULTRAVIOLETA DE LAS VITAMINAS

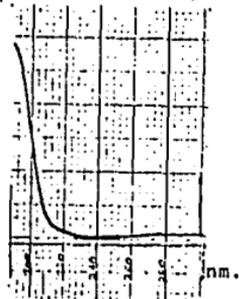
ACIDO ASCORBICO



TIAMINA



ACIDO PANTOTENICO



COLINA (cloruro)

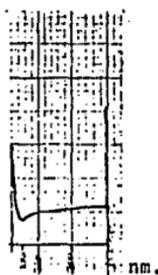
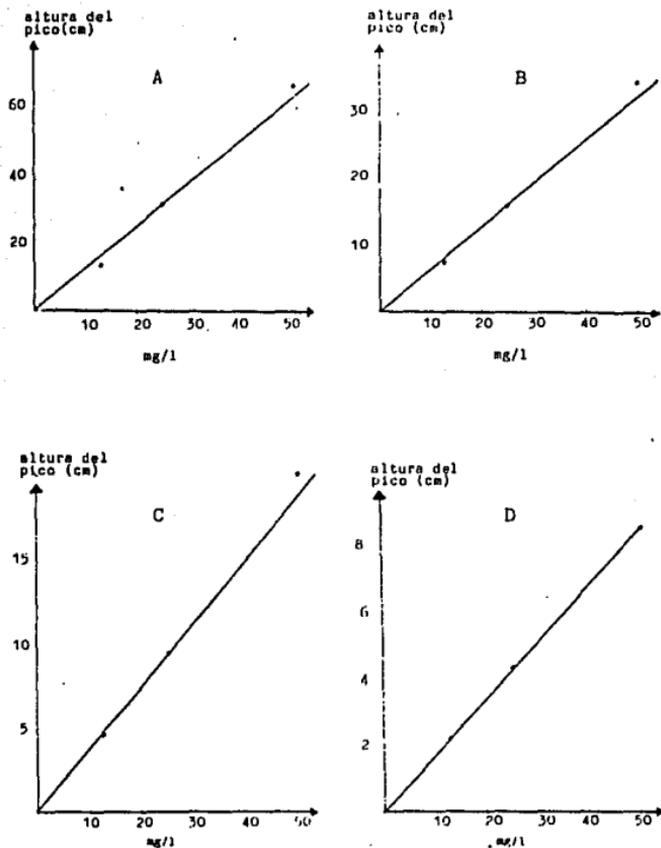


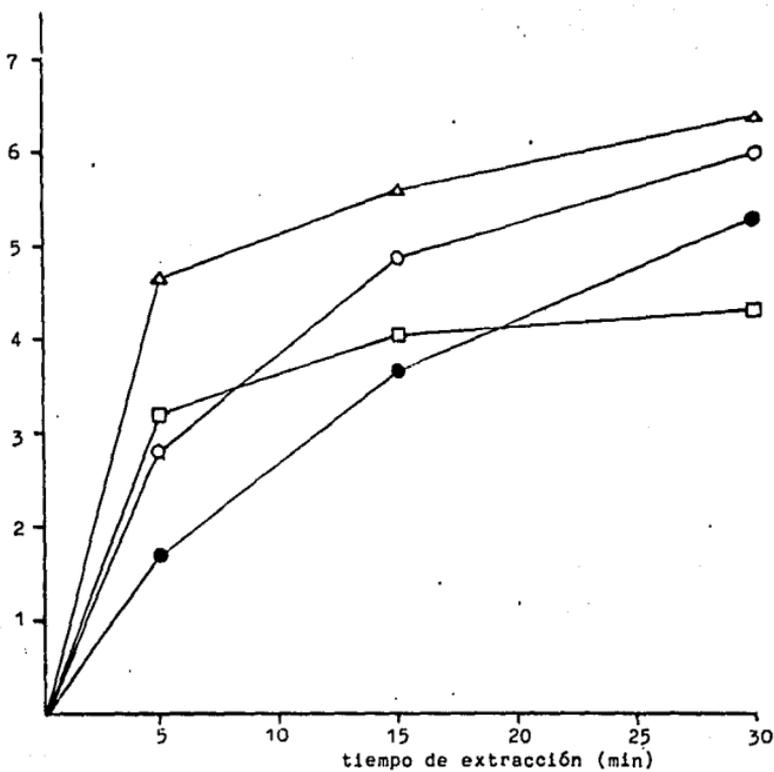
Fig. 9 Curva estandar de vitaminas



- A) ácido ascórbico
- B) niacínamida
- C) piridoxina
- D) tiamina

Fig. 10 Solubilización del
ácido ascórbico

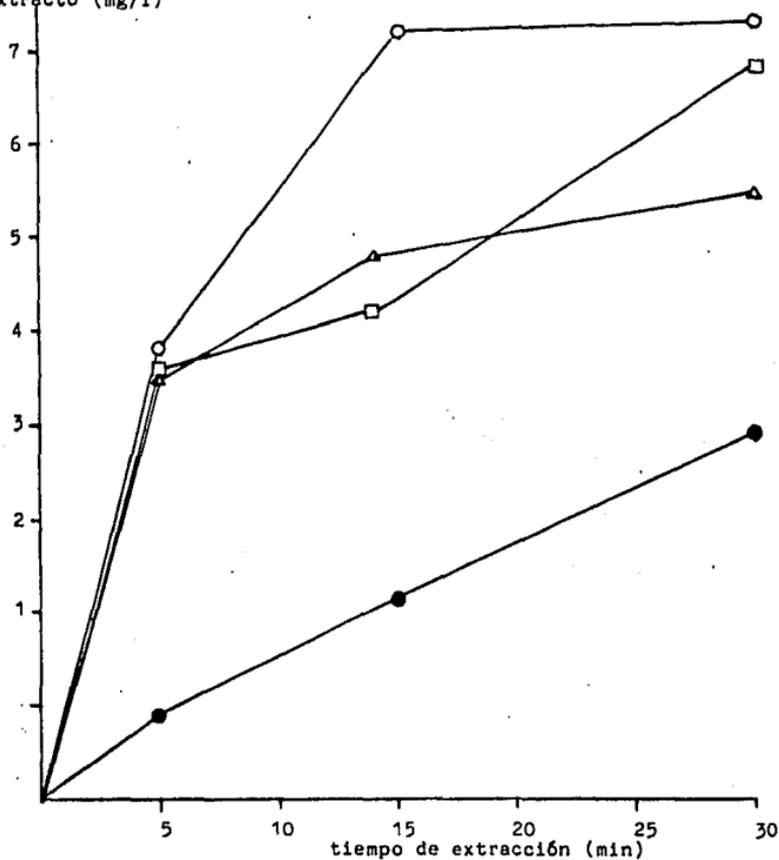
concentración en
el extracto (mg/l)



Dieta

○	1
□	2
△	3
●	4

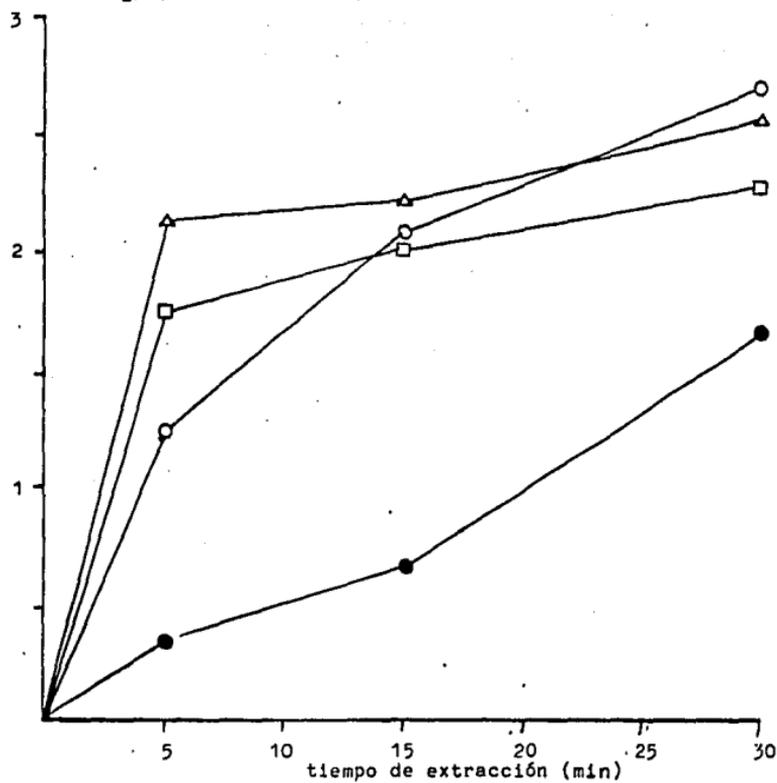
Fig. 11

solubilización de la
niacinamidaconcentración en
el extracto (mg/l)

Dieta

- 1
- 2
- △ 3
- 4

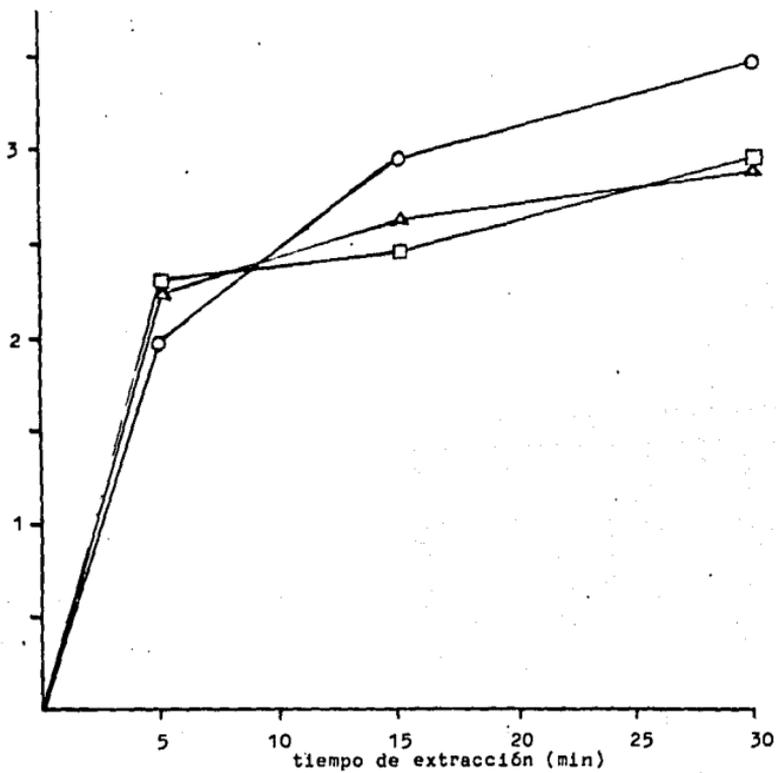
Fig. 12

solubilización de la
piridoxinaconcentración en el
extracto (mg/l)○
□
△
●

Dieta

1
2
3
4

Fig. 13

solubilización de la
tiaminaconcentración en
el extracto (mg/l)

Dieta

○
□
△1
2
3

Tabla 5 Comparación entre el contenido teórico y el real de vitamina libre en las dietas elaboradas.

vitaminas	conc. teórica (mg/l) suponiendo 100 % de solubilización.	% de la conc. teórica a que corresponde la conc. real en el extracto intensivo.*			
		Dietas			promedio
		1	2	3	
ácido ascórbico	151.30	4.13	2.94	5.05	4.04
niacinamida	64.55	65.84	48.41	57.12	57.12
piridoxina	6.05	52.72	43.95	52.72	49.79
tiamina	8.07	43.22	43.22	43.22	43.22

* Extracción por 30 min a 300 rpm del alimento molido. Se considera que la concentración en este extracto corresponde al la de la vitamina libre total.

Los valores de materia solubilizada total, son muy similares en todas las dietas y en los diferentes tiempos de extracción, siendo en todos los casos menor al 10 %.

Tabla 6 Comparación de los requerimientos de vitaminas de la trucha, con las vitaminas ingeridas

vitaminas	requerimiento diario (mg/kg de peso corporal)	Ingesta diaria (mg/kg de peso corporal)		
		teórica *	tomando el ^f remanente despues de la lixiviación	tomando a la ^g vitamina libre como 100 %
ácido ascórbico	3 a 5	45.9	44.04	1.86
niacinamida	3 a 7	19.36	8.3	11.06
piridoxina	0.2 a 0.4	1.81	0.91	0.9
tiamina	0.15 a 0.2	2.42	1.37	1.05

* Segun composición teórica, suponiendo que no hay solubilización.

^f Concentración teórica menos concentración en el extracto intensivo (30 min, 300 rpm, alimento molido).

^g Considerando que la vitamina libre es la presente en el extracto intensivo, y suponiendo que no hay pérdidas por solubilización.

Tabla 7 Densidad aparente de las dietas

Dieta	Densidad aparente (g/100 ml)
1	21.6
2	22.8
3	20.3
4	60.52

Los resultados de la ganancia en peso de las truchas, despues de ser alimentadas con las diferentes dietas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

GANANCIA EN PESO PROMEDIO DE LOS ORGANISMOS ALIMENTADOS CON LAS DIFERENTES DIETAS.

SEMANAS	DIETAS			
	1	2 gramos	3	4
2	15.8	16.0	-4.5	15.7
4	26.9	20.5	11.2	25.5
6	47.1	34.5	17.7	33.7
8	54.7	46.4	33.5	55.9
10	63.5	57.3	35.7	69.1

Los peces alimentados con la dieta 3 (sin grasa añadida), se mostraron muy nerviosos durante el experimento y presentaron una notable disminución del apetito.

DISCUSION

OXIDACION DE LIPIDOS

El método utilizado para evaluar el grado de oxidación, resultó ser de fácil aplicación en este tipo de alimentos, además de gozar de una reproducibilidad aceptable. Mediante este método se pueden hacer estudios para el desarrollo de alimentos, así como control de los ya existentes, dada la gran importancia que tiene la oxidación de lípidos del alimento en el cultivo de peces.

En la dieta 1 se observa un rápido aumento en el índice de TBA, esto se debe al alto grado de insaturación del aceite de bacalao, lo cual lo hace muy propenso a la oxidación. La caída de los valores de TBA puede explicarse por una disminución en la rapidez de oxidación de ácidos grasos insaturados y la inestabilidad del malonaldehído producido.

En las dietas 2 y 3, se observa una gran similitud en los valores de TBA y no se aprecia un cambio notable en dichos valores, dada la escasez de lípidos insaturados que pudieran oxidarse, sin embargo se observa una tenue tendencia de la curva que puede explicarse por la presencia de aceite de pescado residual en la harina de pescado.

Los altos valores de TBA en la dieta 4 demuestran la presencia de lípidos insaturados en la dieta, pudiéndose inferir que esta fue elaborada con aceite de pescado, lo cual se confirma en los resultados de los análisis de ácidos grasos realizados por Best (1988). A pesar de los altos valores de TBA finales, el cambio es muy pequeño en los

valores iniciales, además de ser menores a los de las otras dietas, esto puede deberse a la presencia de antioxidantes mas efectivos y a que la mayor compactación del alimento disminuye la superficie de contacto con el oxígeno, y dificulta la penetración del mismo.

Los valores iniciales de TBA son un poco elevados y muy parecidos en todas las dietas, debido a que las condiciones de obtención de la harina de pescado favorecen una rápida oxidación de los lípidos presentes.

Los altos índices de oxidación obtenidos para las dietas 1 y 4, implican la formación de sustancias tóxicas, repercutiendo de esta manera en la prueba de ganancia en peso de los organismos alimentados con dichas dietas.

PERDIDA DE VITAMINAS POR SOLUBILIZACION

La utilización de HPLC para determinar la pérdida de vitaminas por lixiviación del alimento, nos ofrece grandes ventajas sobre los métodos utilizados por otros investigadores. Este método resultó ser rápido, preciso y sencillo, además de ser muy objetivo, ya que la determinación de la solubilización de vitaminas se hace directamente sobre el extracto, sin más tratamiento que una filtración previa a la inyección, de esta manera se asegura que la vitamina medida fue realmente la solubilizada, lo cual no podría asegurarse de haberlo calculado indirectamente midiendo la vitamina residual en el alimento.

El uso de flujos variables, ajuste de la longitud de

onda y atenuaciones específicas para la detección de cada vitamina, permitieron obtener un mayor poder de resolución y mejorar los límites de detección de los métodos reportados para análisis simultáneos de vitaminas hidrosolubles, mediante los cuales hubiera sido imposible el análisis de este tipo de alimentos.

La pérdida de vitaminas resultó ser rápida independientemente del tipo de grasa utilizado en la elaboración del alimento. Sin embargo, se observan diferencias en la pérdida de las diferentes vitaminas en una misma dieta, obteniéndose así una pérdida muy rápida para las vitaminas más solubles, como es el caso de el ácido ascórbico y la niacinamida, mientras que la piridoxina y la tiamina, que son menos solubles, se perdieron a una velocidad ligeramente menor.

En la dieta 4 se observó una mayor retención de vitaminas, y esto se debe a una mayor compactación del alimento, retardando la humectación del mismo, sin embargo tiene la gran desventaja de que dicha compactación le confiere una densidad tal que le impide permanecer a flote, llegando así una importante proporción de partículas del alimento al fondo del estanque, lugar en donde ya no son consumidas por el pez.

El hecho de que no se haya detectado pérdida de tiamina en la dieta 4, no significa que no la contenga, pues la tiamina puede estar presente en materiales biológicos en varias formas, con diferentes grados de solubilidad, entonces si se encuentra como un complejo proteico de pirofosfato de

tiamina será de muy difícil solubilización.

A pesar de que la pérdida de vitaminas en forma libre fue extremadamente rápida en todos los casos, quedan vitaminas ligadas en el interior de la partícula alimenticia, además, si se toma en cuenta que las truchas consumen casi inmediatamente el alimento flotante cuando es suministrado, es difícil pensar que en ese período pueda haber una pérdida significativa de vitaminas.

En todos los casos, la concentración de vitamina libre en la dieta fue considerablemente menor a la añadida, lo cual se puede explicar, más que por la combinación de vitaminas con macromoléculas, por la destrucción de las vitaminas debida a las condiciones adversas que prevalecieron durante la elaboración de las dietas, pues aunque el calentamiento a que fueron sometidas, difícilmente tuvo un efecto significativo en la destrucción, si pudo haber un claro efecto destructivo durante el secado, en donde se conjugaron: la exposición al sol, al oxígeno y una humedad elevada durante mucho tiempo (4 días), dada la falta de equipo apropiado para dicha operación. Los peróxidos producidos durante la oxidación de los lípidos, también pudieron haber afectado a las vitaminas. Toda posible acción de antimetabolitos, queda totalmente descartada, pues son inactivados con las altas temperaturas que se registran durante el proceso de elaboración de la harina de pescado.

Fue tal el exceso de vitaminas que se agregó a las dietas, que aunque estas se hayan destruido parcialmente, se cubren perfectamente los requerimientos del pez, con

excepción del ácido ascórbico, el cual se destruyó casi en su totalidad. En el caso de que las vitaminas no se hubieran destruido y quedaran atrapadas en el alimento, lo cual es poco probable, los requerimientos de vitaminas para la trucha estarían excedidos con el remanente después de la lixiviación.

GANANCIA EN PESO DE LOS ORGANISMOS

Los resultados obtenidos son muy claros y se correlacionan perfectamente con los resultados de las pruebas de pérdida de vitaminas y de oxidación de lípidos. Así pues, la máxima ganancia en peso se obtuvo con los peces alimentados con las dietas que contenían los ácidos grasos esenciales (dietas 1 y 4), de estas dietas, se obtuvieron mejores resultados con la dieta 4, esto puede explicarse por su mayor capacidad de retención de micronutrientes hidrosolubles, sin embargo, la dieta 4 también ocasionó un índice de mortalidad bastante alto, lo cual puede deberse al alto nivel de oxidación del alimento.

Los peces alimentados con la dieta 2, presentaron una ganancia en peso media y un índice de mortalidad bajo, ya que los peces no tuvieron los ácidos grasos esenciales, pero lograron satisfacer sus requerimientos calóricos y no tuvieron el problema de una alta oxidación de lípidos.

Los peces alimentados con la dieta 3, terminaron en condiciones verdaderamente deplorables, su ganancia en peso fue mínima, observándose incluso una pérdida de peso al

inicio del experimento, debido al cambio radical a una alimentación deficiente tanto en ácidos grasos esenciales como caloricamente. En este tratamiento se registró el mayor índice de mortalidad.

CONCLUSIONES

Dado que el aceite de pescado contiene una elevada proporción de ácidos grasos polinsaturados, es muy susceptible a la oxidación y a una consecuente producción de compuestos tóxicos, por lo tanto, debe emplearse para elaborar alimentos concentrados para peces, a una concentración tal, que únicamente satisfaga los requerimientos de ácidos grasos esenciales. Los requerimientos calóricos deben ser cubiertos con una grasa menos insaturada.

El método de análisis de vitaminas por HPLC es perfectamente aplicable para determinar la pérdida de vitaminas por solubilización en alimentos para peces, presentando ventajas sobre los métodos comúnmente utilizados.

La suplementación de dietas para peces mediante la adición directa de vitaminas sintéticas, trae como consecuencia una pérdida rápida de dichas vitaminas por solubilización.

Las pérdidas de vitaminas por condiciones inadecuadas de elaboración del alimento, pueden ser de mayor importancia que las pérdidas por lixiviación.

La pérdida de vitaminas de la dieta es independiente del tipo de grasa utilizado en su elaboración.

Una mayor compactación puede retardar la lixiviación y

la oxidación de alimentos concentrados, pero reduce la flotabilidad.

A mayor solubilidad de una vitamina, mas rápida será la pérdida de la misma al entrar el alimento en contacto con el agua.

La naturaleza de los lípidos, su oxidación y la solubilización de vitaminas del alimento, son factores esenciales que afectan negativamente la eficiencia en un acuacultivo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Aguilera, H.P. y Noriega, C.P. (1985). La Trucha y su cultivo. Secretaría de Pesca, Fondepesca. pag. 7,26-31. Méx. D.F.
- 2.-Almeyra, G. (1987). La acuicultura en México. Agro-Síntesis 18(8), 38-39.
- 3.-Andrews, J.W. & Davis, J.M. (1979). Surface coating of fish feeds with animal fat and ascorbic acid. Feedstuffs 51, 33.
- 4.-Ang, C.Y. & Moseley, F.A. (1980). Determination of thiamin and riboflavin in meat and meat products by HPLC. J. Agr. Food Chem. 28 (3), 483-486.
- 5.-AVC. (1979). Métodos de Análisis de Vitaminas (The Association of Vitamin Chemists) Academia 3 ed., León Esp. pag 115, 159, 195, 265.
- 6.-Badui, S.D. (1982). Química de los Alimentos. Alhambra-Universidad, 2. ed., Méx. D.F., pag. 159-204.
- 7.-Bardach, J.E.; Ryther, J.H.; McLarney, W.O. (1972). Acuicultura, Willey-Interscience, New York.
- 8.-Best, E.G. (1988). Efecto de la dieta sobre el contenido de ácidos grasos polinsaturados C 20:5 y C 22:6 de la serie w 3 en trucha arcoiris (Salmo gairdnerii). Tesis de maestría F.Q. UNAM.
- 9.-Bligh, E.F. & Dyer, W.H. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 909-917.
- 10.-Castellan, G.W. (1976). Fisicoquímica. Fondo Educativo Interamericano. Méx. D.F.

- 11.-Conrad, E.C. (1975). Applying HPLC to rapid analysis of food nutrients. Food Prod. Dev. 9, 97-102.
- 12.-Covey, C.B.; Adron, J.W.; Knox, D. & Ball, G.T. (1975). Studies on the nutrition of marine flatfish. The thiamin requirement of turbot. Br. J. Nutr. 34, 383-390.
- 13.-Covey, C.B. & Roberts, R.J. (1978) In Fish Pathology (ed. Roberts, R.J.), pag, 216-226, Bailliere Tindall Great Britain.
- 14.-Echeverría, E.O. (1987). Aplicación de una metodología para determinar la vida de anaquéi de un producto de baja humedad a base de carne y grasa de pollo. Tesis, Universidad Iberoamericana. Méx. D.F. pag. 130-137.
- 15.-Flores, A. y Marquez, V.C. (1984). Formulación, producción y evaluación de alimento peletizado para acuicultura. Tecnología de Alimentos 19 (5), 20.
- 16.-Gatesoupe, F.J. & Luquet, P. (1977). Comparaison de quelques techniques destinees a ameliorer la stabilite a l'eau des aliments. 3rd. Meeting of the ICES Working Group. Actes de colloques du CNEXO, 4, 13-20.
- 17.-Gokalp, H.Y.; Ockerman, H.W.; Plimpton, R.F. & Harper, W.J. (1983). Fatty acids of neutral and phospholipids, rancidity scores and TBA values as influenced by packaging and storage. J. Food Sc. 48, 829-833.
- 18.-Goldblatt, M.J.; Conklin, D.E. & Brown, W. D. (1979). Nutrient leaching from pelleted rations. Proc. World Symp. on Finfish Nutrition and Fish Feed Technology. Hamburg, W. Germany vol. II, 117-129.

- 19.-Goldbaltt, M.J.; Conklin, D.E. & Brown, W.D. (1980).
Nutrient leaching from coated crustacean rations. *Aqua-culture* 19, 383-388.
- 20.-Gray, J.I. (1978). Measurement of lipid oxidation, a review. *J.A.O.C.S.* 55, 539-546.
- 21.-Igene, J.O.; Yamachi, K.; Pearson, A.M.; Gray, J.I. & Aust S.D. (1985). Evaluation of 2- thiobarbituric acid reactive substances in relation to warmed-over flavor development in cooked chicken. *J. Agr. Food Chem.* 33, 364-367.
- 22.-Kakuda, Y.; Stanley D.W. & Van de Voort, F.R.(1981). Determination of TBA number by HPLC. *J.A.O.C.S.* 58 (7) 773-775.
- 23.-Kamman, J.F.; Labuza, T.P. & Warthesen, J.J. (1980). Thiamin and riboflavin analysis by HPLC. *J. Food Sc.* 45, 1497-1499.
- 24.-Karel, M.; Schach, K. & Roy, R. (1975). Interaction of peroxidizing methyl linoleate with some proteins and amino acids. *J. Agr. Food Chem.* 23 (2), 159-163.
- 25.-Kirchmeier, R.L. & Upton, R.P. (1978). Simultaneous determination of niacin, niacinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin blends by Ion-Pair HPLC. *J. Pharm. Sc.* 67 (10), 1444-1446.
- 26.-Kosugi, H. & Kikugawa, K. (1985). Thiobarbituric acid reactive substances in chicken fat and unsaturated fatty acids *J. Food Sc.* 50, 1181-1182.
- 27.-Matty, A. (1981). *Proc. 1st. Int. Fish Farm. Conf. U. K.*, 130-142.
- 28.-Meyers, S.P. (1978). Formulation of water stable diets for larval fishes. *Proc. World Symp. On Finfish Nutrition and Fish Feed Technology. Hamburg, vol. II.*

- 29.-Meyers, S.P. & Butler, D.P. (1971). Encapsulation, a new approach to larval feeding. *The Amer. Fish Farmer*, Jul. 1971, 15-20.
- 30.-NAS. (1972). Nutrients requirements of trout, salmon and catfish. *Nutrient Requirements of Domestic Animals*, No. 11 pag. 1-26. National Academy Of Sciences. Washington D.C. 1973.
- 31.-Shepherd, C.J. (1977). Developments in fish farming. *Br. Food J.* 79 (876), 9.
- 32.-Skoog, D.A.; West, D.M. (1984). *Análisis Instrumental, Interamericana*, 2 ed. pag. 157-213.
- 33.-Sood, P.S.; Wiiner, D.P.; Ismaiel, S.A. & Haney, W.G. (1977). Simultaneous HPLC determination of niacin and niacinamide in multivitamin preparations. *J. Pharm. Sc.* 66 (1), 40-42.
- 34.-Tappel, A.L. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc., Fed. Amer. Chem. Soc.* 32, 1870.
- 35.-Tarladgis B.G.; Watts, B.M.; Younathan, M.T. & Dugan, L.R. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J.A.O.C.S.* 37, 44.
- 36.-Toma. R.B. & Tabekhia, M.M. (1987). HPLC analysis of B-vitamins in rice and rice products. *J. Food Sc.* 44 (1), 263-265.
- 37.-Tomas, M.C. y Funes, J. (1987). Aplicacion Of 2-tiobarbituric acid reaction to exudates of frozen and refrigerated meats. *J. Food Sc.* 52 (3) 575-579.

- 38.-Tovar, R.G. & Kaneda, T. (1977). Comparative toxicity of secondary oxidation products in autoxidized methyl linoleate. J. Jap. Soc. of Oil Chem. 26, 27-30.
- 39.-Valdez, S.M. (1982). PhD Food Sc. Thesis. University of Strathclyde. Eng.
- 40.-Watson, A. (1979). Aquaculture and Algae Culture. Food Tech. Rev. No. 53, Noyes Data Corp. N.J. USA, pp 1-12.
- 41.-Williams J.C.; Field R.A.; Miller, G.J. & Welke, R.A. (1983). Evaluation of TBA methods for determination of lipid oxidation in red meat from four species. J. Food Sc. & 8, 1776-1778.
- 42.-Yu, T.C. & Sinnhuber, R.O. (1957). 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. Food Tech. 11, 104-108.

APENDICE 1

CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DURANTE LA PRUEBA DE SOLUBILIZACION DE VITAMINAS. (Figs. 14 a 18)

Para identificar los picos correspondientes a cada vitamina se les asignaron las siguientes letras:

acido ascórbico	A
niacínamida	B
piridoxina	C
Tiamina	D

Las condiciones en que se corrieron los cromatogramas se indican en la sección de materiales y métodos.

El punto de la inyección se indica con la letra "I"

Los números en el extremo superior izquierdo del cromatograma indican el tiempo que el alimento estuvo en contacto con el agua. El extracto intensivo se representa por las letras "E.I."

Fig. 14

CURVA ESTANDAR DE VITAMINAS

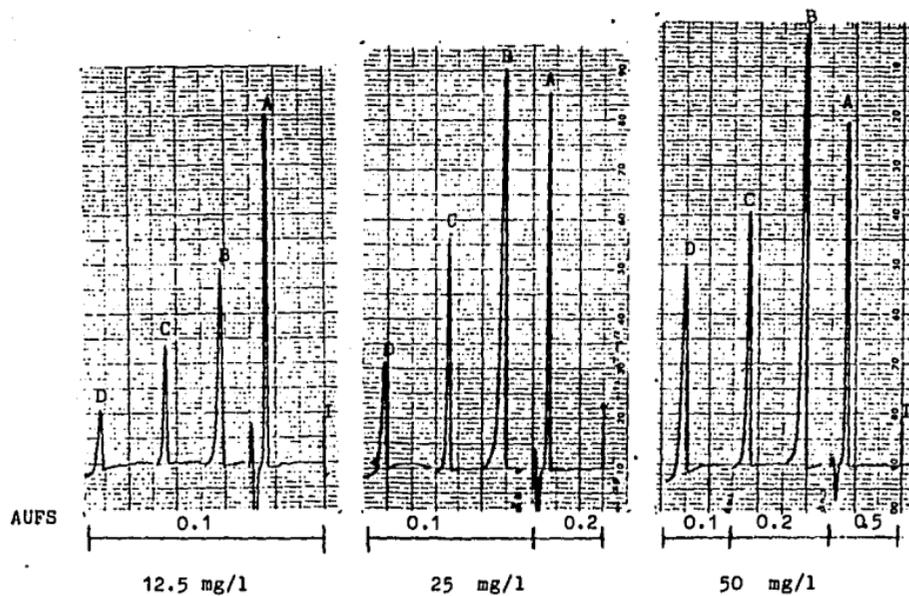


Fig. 15
CROMATOGRAMAS

DIETA I

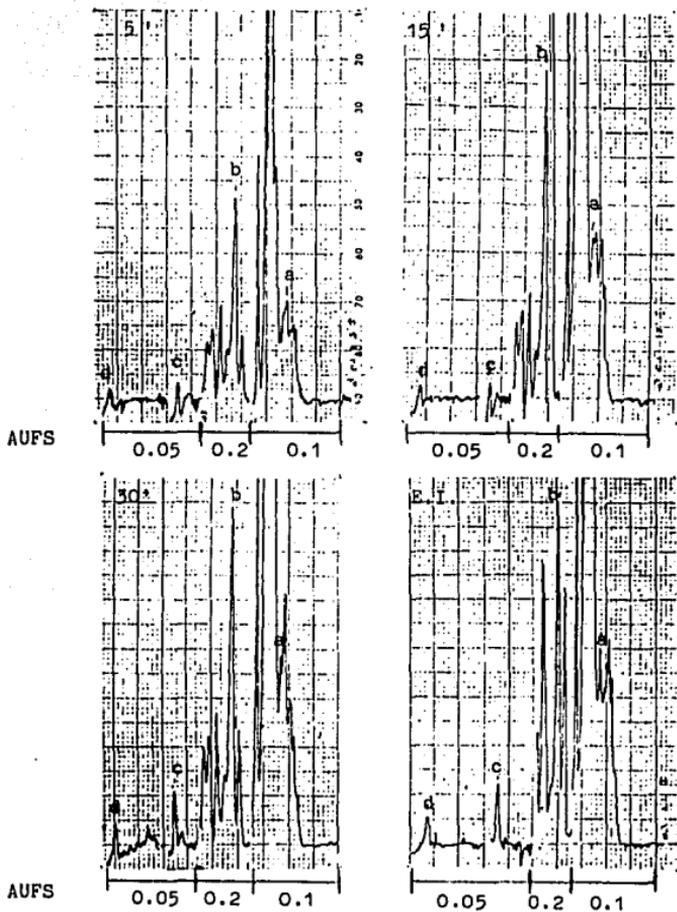


Fig. 16

CROMATOGRAMAS

DIETA 2

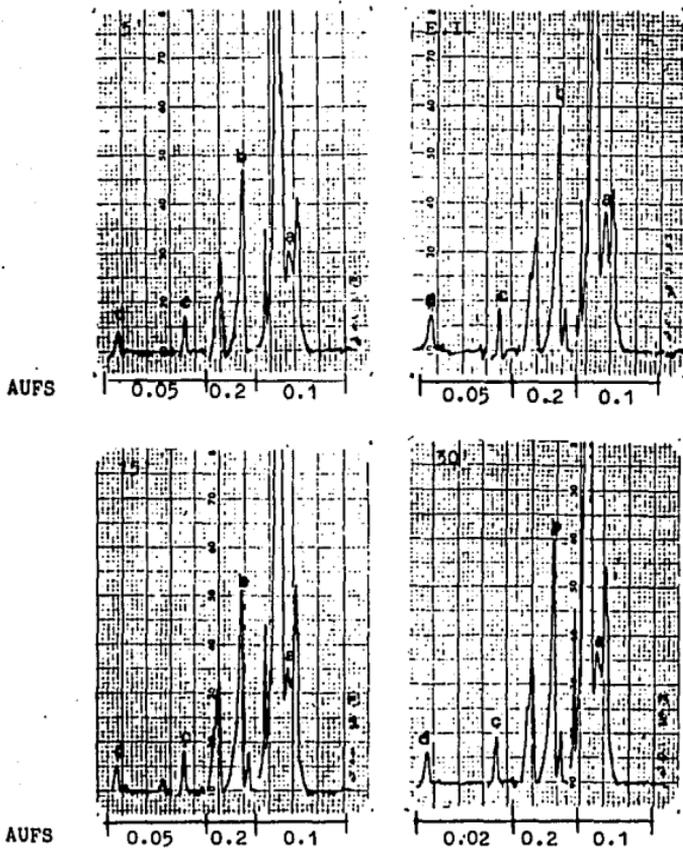


Fig. 17
CROMATOGRAMAS DIETA 3

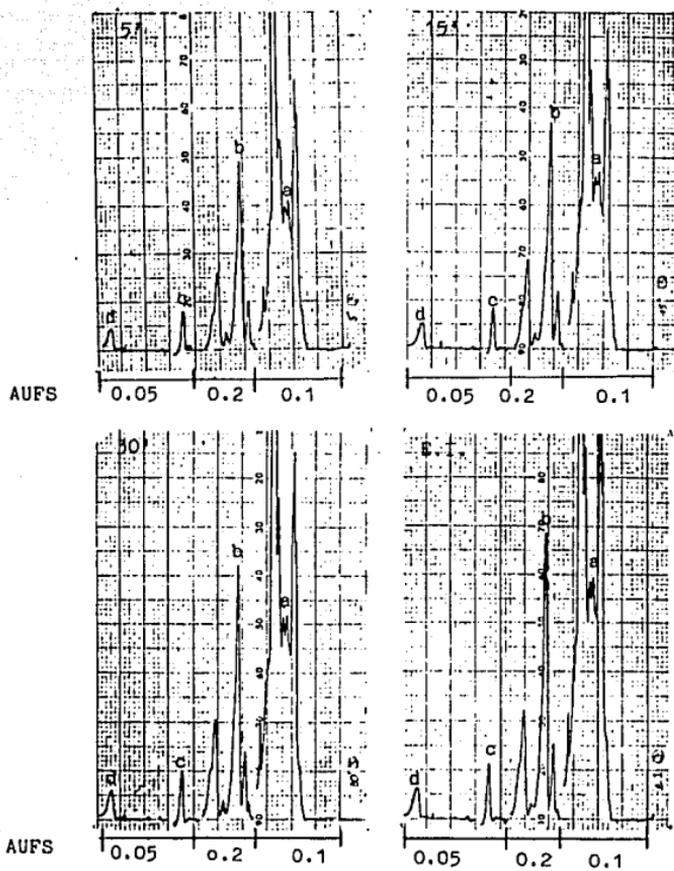


Fig. 18
Cromatogramas DIETA 4

