



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN
NUTRIMENTAL DE UN ENSILADO DE
PESCADO DIABLO (*Hypostomus plecostomus*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

EIMY RUIZ MEDINA



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Profa. ANGELA SOTELO LÓPEZ
Vocal	Prof. BERNARDO LUCAS FLORENTINO
Secretario	Profa. FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS
1er. Suplente	Prof. HERMILO LEAL LARA
2º. Suplente	Profa. LUCÍA CORNEJO BARRERA

Sitio en donde se desarrollo el tema:
Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E de la Facultad de Química,
UNAM.

Asesor del tema

M. en C. Angela Sotelo López

Supervisor técnico

M. en C. Rosa María Argote Espinosa

Sustentante

Eimy Ruiz Medina

Esta tesis forma parte del proyecto del Pez Diablo:

**“DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA EL APROVECHAMIENTO E
INDUSTRIALIZACIÓN DEL PEZ DIABLO EN LA REGIÓN DEL BAJO BALSAS EN
MICHOACÁN” CON CLAVE 37147, DEL FONDO MIXTO CONACYT.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi querida Facultad de Química por permitirme estudiar esta licenciatura, por formarme como profesional y por darme la oportunidad de superarme.

Agradezco de manera especial a la Coordinación de Superación Académica de la Facultad de Química por su interés en la formación de estudiantes en el campo de la investigación y por aceptarme en el Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación", gracias al cual pude realizar el presente trabajo de investigación y concluir mis estudios de licenciatura. De igual manera quiero agradecer a los responsables del Programa de Becas Alimentarias por todos los semestres en que me brindaron esta rica beca.

Quiero agradecer de manera muy atenta a la Maestra Angela Sotelo por su dirección a lo largo de la tesis, por aceptarme en su laboratorio, por el valor de sus conocimientos y por su apoyo y confianza para la realización de este proyecto.

También agradezco al Maestro Bernardo Lucas y a la Maestra Francisca Iturbe, por sus comentarios y aportaciones hechas sobre esta tesis, lo cual fue muy enriquecedor.

A los profesores miembros del jurado y a todos los profesores de la Facultad de Química por sus enseñanzas, paciencia y por transmitir el amor por su profesión.

A la Maestra Rosa María Argote por su ayuda técnica, las aportaciones hechas a esta tesis, por su constante apoyo, por su alegría y amistad.

A las Maestras Leticia Gil e Iliana González por su ayuda técnica y su amistad. A la Maestra Lucía Cornejo por las facilidades brindadas para la determinación de proteína, secado del ensilado y durante el ensayo biológico, por la atención y sus consejos que me brindo desde que la conocí.

A mis compañeros Marquelia Pérez y Pedro Gallardo por compartir tantos momentos gratos y otros difíciles a lo largo de este proyecto y sobre todo por su valiosa amistad. A la señora Vicky por darme ánimos en los momentos difíciles, por su optimismo y sabios consejos.

A todos mis compañeros del laboratorio 111 por hacer más amena la estancia en el laboratorio, me llevó recuerdos muy especiales de cada uno de ustedes.

A mis amigos de la Facultad, por todos los momentos que pasamos juntos y por que me brindaron su valiosa y sincera amistad.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir, por darme a una hermosa familia y por todas las bendiciones que me brinda.

A mis padres:

Por tenerme confianza, mucha paciencia, por su buen ejemplo y total apoyo. Los amo mucho y agradezco infinitamente todo lo que han hecho por mí.

A mis hermanos:

Por estar conmigo, escucharme y apoyarme y por creer en mí. En especial a Melina por compartir muchos momentos buenos y animarme en los malos. A todos los quiero profundamente.

Un problema es tu oportunidad para hacer tu mejor esfuerzo.

Duke Ellington

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE TEMÁTICO	Página
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
1. CARACTERÍSTICAS DEL PEZ DIABLO	3
2. EL PEZ DIABLO EN LA PRESA ADOLFO LÓPEZ MATEOS	5
3. ENSILADO	6
3.1. Métodos de producción	7
3.2. Ventajas y desventajas de la producción de ensilado de pescado	9
3.3. Composición química del ensilado de pescado	9
3.4. Cambios que ocurren durante el proceso de ensilado	11
3.4.1. Cambios químicos en las proteínas	11
3.4.2. Cambios químicos en los lípidos	16
3.5. Estabilidad del ensilado de pescado	20
3.6. Importancia de la producción de ensilado de pescado	21
3.6.1. El ensilado en la alimentación animal	21
4. DETERMINACIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEÍNAS	24
4.1. Métodos Biológicos	25
4.2. Métodos Químicos	27
4.3. Métodos Enzimáticos y Microbiológicos	28
OBJETIVOS	30
METODOLOGÍA	31
DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA	34
1. INFORMACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	34
2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PESCADO ENTERO	34
2.1. Determinación de humedad	34
2.2. Determinación de cenizas totales	34
2.3. Determinación de proteína cruda	35
2.4. Determinación de grasa	35
2.5. Determinación de carbohidratos totales	36
3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	36
3.1. Determinación de proteína soluble en el extracto	36

4. PRIMER ENSAYO DE PREPARACIÓN DE ENSILADO	37
4.1. Elaboración del ensilado	37
4.2. Monitoreo de parámetros durante el proceso de ensilado	37
5. SEGUNDO ENSAYO PARA OBTENER EL ENSILADO A NIVEL LABORATORIO	37
5.1. Preparación de los ensilados	37
5.2. Medición del pH, nitrógeno total (NT) y nitrógeno no proteínico (NNP)	38
5.3. Determinación del grado de oxidación en la grasa de los ensilados	38
6. OBTENCIÓN DEL ENSILADO PARA SU EVALUACIÓN NUTRIMENTAL	39
6.1. Elaboración del ensilado	39
6.2. Secado del ensilado	39
6.3. Preparación de las dietas para el estudio biológico	40
6.3.1. Materias primas	40
6.3.2. Dietas de estudio	40
6.4. Evaluación biológica del ensilado	41
6.4.1. Relación de Eficiencia Proteínica (REP)	41
6.4.2. Digestibilidad “in vivo”	41
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición de las dietas empleadas en la prueba biológica (g/100 g de dieta)	41
Tabla 2. Análisis proximal de pescado diablo (g/100g de muestra)	42
Tabla 3. Contenido de proteína de los extractos del pescado diablo	42
Tabla 4. Actividad proteolítica del pescado diablo	43
Tabla 5. Comportamiento del pH en el ensilado piloto	44
Tabla 6. NT y NNP en el ensilado obtenido con ácido fórmico	45
Tabla 7. Comportamiento del pH de los ensilados	46
Tabla 8. Índice de hidrólisis proteínica en los ensilados elaborados con ácido fórmico y ácido fórmico+sulfúrico	48
Tabla 9. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico	50
Tabla 10. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico+sulfúrico	50
Tabla 11. Composición proximal del ensilado en base húmeda y base seca	53
Tabla 12. Composición proximal de las materias primas en base húmeda	54
Tabla 13. Composición proximal de las materias primas en base seca	54
Tabla 14. Incremento del peso corporal de las ratas alimentadas con las dietas de ensayo	55
Tabla 15. Conversión alimenticia	56
Tabla 16. Valores de REP y REP ajustado	57
Tabla 17. Digestibilidad de las dietas de ensayo	58

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Pez diablo (<i>Hypostomus plecostomus</i>)	3
Figura 2. Comparación de los procesos de ensilado ácido y biológico	7
Figura 3. Principales aminas biogénicas y sus aminoácidos precursores	14
Figura 4. Proceso de autooxidación lipídica	17
Figura 5. Reacción entre el TBA y MDA	38
Figura 6. Evolución del NNP en la prueba piloto	45
Figura 7. Evolución del NNP en los ensilados elaborados	48
Figura 8. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico	50
Figura 9. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico y sulfúrico	51
Figura 10. Curva de crecimiento de los animales de prueba alimentados con las dietas de estudio y el control de caseína	55

RESUMEN

En este trabajo se propuso utilizar el pescado diablo (*Hypostomus plecostomus*) procesándolo en forma de ensilado para alimentación animal, a fin de aprovechar esta proteína que de otra manera puede ser desperdiciada por los pescadores de la Presa Adolfo López Mateos ubicada entre los estados de Michoacán y Guerrero.

Tres etapas involucran el desarrollo de este estudio: en la primera se llevó a cabo el análisis proximal de la materia prima y la determinación de la actividad proteolítica total de sus enzimas digestivas y musculares. Posteriormente se realizó una prueba piloto para determinar las condiciones adecuadas de producción del ensilado, las cuales fueron tomadas para los estudios posteriores. En la segunda etapa de preparación de ensilados se probó el uso de ácido fórmico solo y su combinación con ácido sulfúrico, además de la adición de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Se monitorearon los cambios fisicoquímicos desarrollados en el proceso de ensilaje: pH, contenido de nitrógeno no proteínico (NNP) y oxidación lipídica. La tercera etapa implicó la elaboración del ensilado de pescado para conocer su composición proximal y evaluar su calidad proteínica mediante un ensayo biológico de Relación de Eficiencia Proteínica (REP). En esta prueba se comparó la calidad proteínica de las dietas preparadas con las harinas de pescado, de ensilado y de ensilado con sorgo, determinándose también su digestibilidad “*in vivo*” como otro indicador de calidad.

Los resultados obtenidos indicaron que la actividad proteolítica de las enzimas endógenas permitió la licuefacción de los ensilados en 6 días, con un contenido de NNP superior al 90%. No se encontraron diferencias en el proceso de los ensilados con el uso de un ácido o la combinación de ácidos a partir del sexto día de incubación a 37°C bajo el mismo pH (3.8-4.0). El antioxidante adicionado fue efectivo en el control de la oxidación de lípidos, durante el tiempo de almacenamiento de los ensilados. El análisis proximal del ensilado de pescado presentó en base seca un contenido de proteína de 50.45%, 7% de grasa y 30.43% de cenizas, composición similar a la del pescado sin procesar. Los resultados de la prueba biológica mostraron que la calidad proteínica del ensilado disminuyó con respecto a la harina de pescado, sin embargo dicha calidad fue mejorada significativamente al adicionar sorgo.

Así el ensilado desarrollado constituye una interesante alternativa de utilización y conservación del pescado diablo para ser destinado como ingrediente en la alimentación animal.

INTRODUCCIÓN

El pez diablo (*Hypostomus plecostomus*) forma parte del orden *Siluriformes*, familia *Loricariidae*, a la cual pertenecen los peces acorazados de Sudamérica. Fue introducido en México en la Presa “El Caracol” en los 90’s aunque no se conoce la fecha exacta y se considera que llegó a la Presa de “El Infiernillo” (Presa Adolfo López Mateos, Michoacán-Guerrero) en 1998, donde se adaptó rápidamente y en la actualidad ha dañado la producción de especies nativas y comerciales (carpas, truchas y tilapias), al arrasar con buena parte de sus hueveras. Por su aspecto y carne oscura no se utiliza para consumo humano y además destruye las redes de los pescadores con sus placas externas armadas con espinas. Es así que el pez diablo ha causado un importante impacto negativo a nivel socioeconómico y ambiental en la región. El problema ya no es sólo para la presa, ya que este pez se ha extendido en todos los arroyos que desembocan al río Balsas e inclusive se le ha encontrado en el río Tepalcatepec. En consecuencia, es necesario instrumentar acciones para el control de esta especie invasora en los aspectos biológico y ecológico y con ello establecer mecanismos científicos para su manejo, control y aprovechamiento. Una posible forma de utilizar este pez y ayudar al control de su creciente población, es mediante la elaboración de ensilados para alimentación animal.

La conservación de forrajes empleando un ambiente ácido es una técnica que data de mucho tiempo y se le conoce como ensilado. El ensilado de pescado puede definirse como un producto semi-líquido, obtenido a partir de pescado entero o partes del mismo. Este estado se alcanza por efecto de las enzimas proteolíticas contenidas en el mismo pescado las cuales presentan su mayor actividad cuando el pH se reduce a valores cercanos a 4. A este pH se impide la descomposición del producto, siendo estable a temperatura ambiente hasta por 2 años. El ensilado se puede producir por dos métodos: adición directa de ácido (ensilado ácido) o mediante fermentación con bacterias ácido lácticas (ensilado biológico) y se puede usar seco, condensado o líquido al mezclarse con cereales en la elaboración de dietas balanceadas para animales.

Dentro de las ventajas que ofrece la elaboración de este producto se encuentran: disminución de desechos al medio ambiente, estabilidad al deterioro por microorganismos, escaso requerimiento de infraestructura y bajos costos comparado con la obtención de harina de pescado. Además su producción puede ser a nivel industrial o artesanal, por lo que puede ser realizado por los mismos pescadores para la alimentación de sus animales de granja.

Los ensilados de desechos de pescado, pescado entero y fauna de acompañamiento han sido evaluados con éxito en la alimentación de una gran variedad de animales como peces, aves y cerdos; representando una buena alternativa al uso de harina de pescado. A fin de garantizar la inocuidad y calidad de dicho producto como una

fuelle de proteína animal, es necesario probarlo biológicamente debido a que la calidad del ensilado depende del tipo de materia prima, el proceso de elaboración y las condiciones de almacenamiento.

El objetivo del presente trabajo fue establecer una forma de aprovechamiento de la especie invasora con una tecnología simple, de baja inversión y que permita una retribución económica. Con este propósito se elaboró ensilado de pescado diablo entero, determinándose algunos cambios químicos que ocurren durante su proceso y se evaluó la calidad del producto por métodos químicos y biológicos para conocer si es apropiado para consumo animal en dietas balanceadas.

ANTECEDENTES

1. CARACTERÍSTICAS DEL PEZ DIABLO.

El pez diablo forma parte del orden *Siluriformes*, familia *Loricariidae*, a la cual pertenecen los peces acorazados de Sudamérica; el género está formado por más de 50 especies y tiene su origen en la cuenca del río Amazonas. Sus características generales se describen a continuación:

Nombre científico: *Hypostomus plecostomus*

Clasificación

- Orden: *Siluriformes*.
- Familia: *Loricariidae*
- Subfamilia: *Hypostominae*.

Descripción

Cuerpo aplanado ventralmente, la cabeza es larga, amplia y plana; la boca en disposición ínfera, con un par de pequeños barbillones y característicos labios suctores que le permiten pegarse en superficies y obtener algas y otros organismos bénticos (figura 1). Presenta placas óseas recubriendo todo su cuerpo, excepto algunas zonas de las aletas caudal y dorsal principalmente. El tamaño máximo es de 50 cm a 60 cm; su coloración es variable dependiendo de la edad, especie y ambiente y va desde motas negras con fondo marrón rojizo a marrón claro presentándose algunas veces hasta negro, las aletas son del mismo color que el resto del cuerpo. Crece lentamente y tiene una vida longeva superior a 15 años.

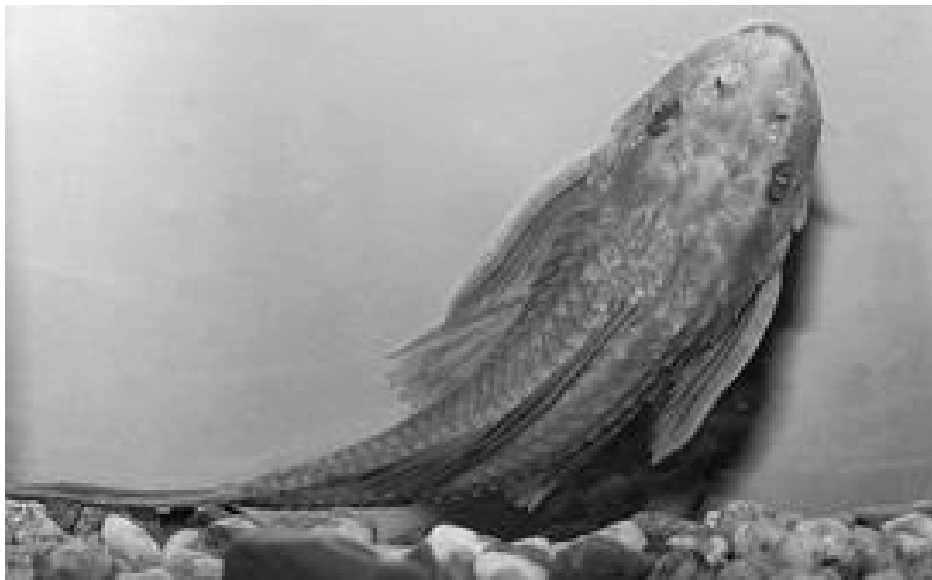


Figura 1. Pez diablo (*Hypostomus plecostomus*).

Hábitat

Demersal de agua dulce. Vive en zonas arenosas, rocosas y hasta pantanosas. Los peces adultos son típicamente encontrados en ríos rocosos, mientras los juveniles son más comunes en áreas ricas en vegetación.

Morfología

Espinas dorsales (total):1, radios blandos dorsales (total):7, espinas anales: 1, radios blandos anales: 3-5. El género *Hypostomus* se puede distinguir de sus primos muy cercanos del género *Pterygoplichthys* (antes *Glyptoperichthys*) ya que tiene 7 radios blandos en la aleta dorsal, sin contar el primer radio duro de su aleta dorsal.

Diferencias sexuales

Sólo en ejemplares adultos y es muy poco aparente; se describe al macho con un crecimiento odontal (de no gran escala) en la base y radio de las aletas pectorales; la hembra carece de ello.

Condiciones ambientales

Clima tropical, temperatura de 20°C a 28°C, agua con pH de 6 a 8, blanda a dura.

Tolerancia

Amplia tolerancia a la salinidad y temperatura. Puede almacenar aire en su intestino, esto le permite tolerar bajas concentraciones de oxígeno en el agua, incluso se ha sugerido que ocasionalmente puede migrar a la tierra.

Comportamiento

Se trata de un ejemplar muy variable en su etología, es territorial con su misma especie, debiendo contar con grandes escondrijos para él y sus posibles acompañantes. Es activo en la noche y en el día se oculta en troncos y rocas. Es inocuo e inofensivo.

Reproducción

Los peces desovan cuando tienen ya un tamaño considerable (hembras por encima de 30-40 cm) y para depositar los huevos excavan una galería horizontal en las paredes del río, en zonas de tierra arcillosa, donde el macho cuida de los huevos, los cuales eclosionan en 3-5 días.

Alimentación

Omnívoro, pero con una tendencia vegetariana en la mayor parte de su vida. Algas y detritus constituyen su principal alimento y en menor cantidad consume vegetales, gusanos, pequeños crustáceos, larvas de insectos y fruta.

Importancia

Pesquerías: pesquerías de subsistencia.

Acuarios: comercial.

Puede ser útil en el control de algas. Es una especie recomendada sólo para acuarios públicos o con una capacidad de 600-1000 litros mínimo con una buena filtración mecánica.

Distribución

El pez diablo y varias especies de su familia están ampliamente distribuidos por toda la Cuenca Amazónica, Costa Rica, Panamá, Venezuela y Uruguay. Estos peces han sido introducidos en varios países de Asia por comercio con acuarios y son criados en estanques grandes en Singapur, Florida y Hong Kong donde son muy populares. En los años 60's y 70's se introdujeron en Florida, Texas (en el río San Antonio) y Arizona. En México el pez diablo se introdujo en la Presa "El Caracol" en los 90's, extendiéndose en los cuerpos de agua vecinos como la Presa "El Infiernillo".

2. EL PEZ DIABLO EN LA PRESA ADOLFO LÓPEZ MATEOS.

El pez diablo fue introducido en la Presa "El Caracol" con la idea de limpiar sus aguas de las abundantes algas presentes. Esta Presa fue construida sobre un profundo cañón de la Sierra de Teloloapan, en el Medio Balsas y en las proximidades del poblado de Apaxtla (Guerrero) y es vecina de la Presa Adolfo López Mateos.

La presa Adolfo López Mateos "El Infiernillo" esta ubicada en los municipios de Arteaga, La Huacana y Churumuco del Estado de Michoacán y en el Municipio de Coahuayutla del Estado de Guerrero, coordenadas 18°16'30" N y 101°53'40" W. Es un embalse artificial construido en 1962 por la Secretaría de Recursos Hidráulicos, con el propósito de captar agua para la generación de energía eléctrica, aprovechamiento para el riego y como medio para el control de avenidas. Como actividad secundaria se le emplea en la producción de tilapia, carpa y bagre. Su longitud máxima es de 120 km y tiene una profundidad media de 35 m. Su superficie inundada en los niveles de máxima y mínima operación, fluctúa entre 34 600 y 14 100 ha (Juárez, 1989). Sus principales tributarios son el río Tepalcatepec que recibe las aguas de los ríos Cupatitzio y Marqués, el río Balsas que recibe las aguas de los ríos Huetamo, Tacámbaro, Cutzamala y San Antonio, además de varios arroyos entre los que destacan Churumuco y Pinzandarán.

En investigaciones realizadas por la Secretaría de Pesca y el Centro Regional de Investigación Pesquera en Pátzcuaro, Michoacán, perteneciente al Instituto Nacional de la Pesca, se determinó la existencia de las siguientes especies: tilapia (*Oreochromis aureus*, *Oreochromis mossambicus*, *Tilapia rendalli*), mojarra del Balsas (*Cichlasoma istlanum*), carpa común (*Cyprinus carpio*), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*),

carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), bagre del Balsas (*Ictalurus balsanus*), gupy (*Poeciliopsis balsas*), charal (*Atherinella balsana*) y godeido (*Ilyodon whitei*). Algunas de ellas, como las tilapias, fueron introducidas al embalse desde 1969, año a partir del cual se estableció una importante pesquería que ha ocupado un lugar relevante a nivel nacional. La carpa y el bagre forman también parte de la pesquería aunque sus aportes a los volúmenes de captura son notablemente inferiores en comparación con la producción de tilapia (NOM-027-PESC-2000).

La historia de las capturas anuales muestran que la pesquería esta constituida en un 90% por tilapia (*O. aureus*), soportando un nivel de esfuerzo en los últimos años de 3,000 a 4,000 pescadores artesanales, que en proporción operan a diario entre 8 y 50 redes agalleras por pescador (Orbe *et al.*, 1999).

De acuerdo con los estudios efectuados, en los últimos años el incremento del esfuerzo pesquero y la intensidad del mismo, ha generado problemas de sobreexplotación y por consiguiente reducción en los volúmenes de captura. Situación que se agravó cuando la Presa “El Caracol” abrió sus compuertas dejando pasar al pez diablo, que encontró en “El Infiernillo” las condiciones óptimas para su desarrollo: las aguas son cálidas y con baja salinidad y aunado con su gran adaptación y resistencia a enfermedades ha permitido su proliferación descontrolada en el embalse; frenando la reproducción de las especies comercializables antes mencionadas (carpas, truchas y tilapias) reduciendo su captura hasta en un 80%. Además su piel dura y espinosa se adhiere a las redes y es tan difícil desprenderlos, que se requiere muchas veces córtalas. Es así que el pez diablo ha provocado un importante impacto negativo a nivel socioeconómico y ambiental en la región.

El problema ya no es sólo para la presa, ya que este pez se ha extendido en todos los arroyos que desembocan al río Balsas e inclusive se le ha encontrado en el río Tepalcatepec. Ante esta situación y en respuesta a las demandas de los pescadores, la administración pública estatal instrumentó un programa emergente para su control y manejo que incluye el estudio de la biología del pez.

3. ENSILADO.

Ensilar es el proceso de guardar alimento en un silo tratando de conservar sus características nutritivas aunque no sus propiedades sensoriales. El proceso de ensilado de pescado no es nuevo; por el contrario, fue desarrollado en Finlandia en los años 20's y desde entonces se han sucedido variantes en cuanto al uso de las materias primas empleadas.

El ensilado de pescado puede definirse como un producto semi-líquido, obtenido a partir de pescado entero o partes del mismo los cuales son tratados con un ácido. La licuefacción es causada por enzimas endógenas

presentes en el pescado y se acelera por el ácido que da las condiciones óptimas para la actividad enzimática y limita el crecimiento y deterioro microbiano (Tatterson, 1982).

3.1. Métodos de producción.

Actualmente existen varias técnicas para la obtención del ensilado, ya sea por medios químicos o biológicos. La figura 2 muestra los diagramas de flujo para ambos procesos.

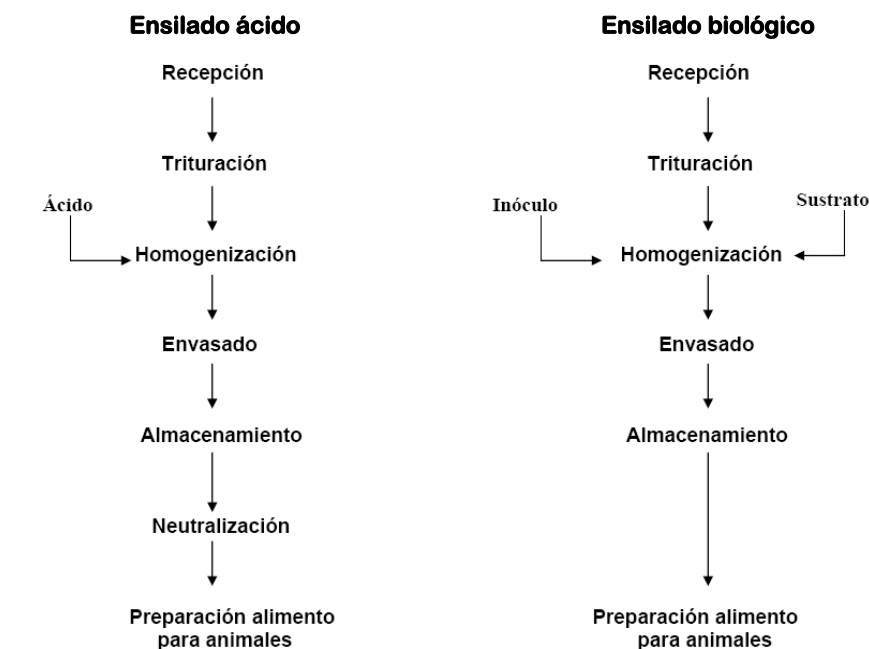


Figura 2. Comparación de los procesos de ensilado ácido y biológico (Montaner *et al.*, 1995).

El ensilado químico es elaborado por la adición de ácidos minerales y/u orgánicos al pescado. Se han utilizado el ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico y acético o combinaciones, como mezclas de acético, fórmico y fosfórico; fórmico y sulfúrico o propiónico y sulfúrico. La materia prima se tritura, se le agrega el o los ácidos y se mezclan completamente, para que las enzimas presentes en el mismo puedan digerirlo en las condiciones favorables que el medio ácido provee. Se prefiere la utilización de ácido fórmico ya que asegura la conservación sin descenso excesivo en el pH, lo que a su vez, evita la etapa de neutralización del producto antes de su empleo en alimentación animal (Tatterson, 1982; Windsor y Barlow, 1984).

En el ensilado microbiano o biológico, se agrega al pescado triturado una fuente de carbono y un microorganismo capaz de utilizar el sustrato y producir ácido láctico. Se han estudiado diferentes fuentes de carbono tales como harinas de maíz, harina de avena, cebada malteada, arroz, yuca, azúcar, melaza, etc. y

distintos organismos productores de ácido láctico, entre otros, *Lactobacillus plantarum*, *Hansenula montevideo*, bacterias lácticas del yogur y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como repollo, papaya, banana, piña, camote, yuca, etc. (Otatti *et al.*, 1990; Bello y Fernández, 1995).

La elaboración de ensilado biológico o químico puede llevarse a cabo tanto a nivel artesanal (barriles de 50 kg) como en escala industrial (una tonelada por día o más). El proceso puede ser manual, discontinuo o totalmente automatizado.

La molienda del pescado debe realizarse eficientemente tanto para el proceso biológico como para el químico, el tamaño de partícula no debe ser mayor de 10 mm de diámetro. Es necesario que la mezcla se agite regularmente para asegurar uniformidad hasta su completa homogeneización, al mismo tiempo que se acelera la licuefacción. La velocidad de licuefacción depende del tipo de materia prima y de la temperatura. Los pescados grasos y el pescado fresco se licúan más rápidamente que los desperdicios y cuanto más elevada es la temperatura del proceso, la hidrólisis es mayor, sin embargo no deben manejarse temperaturas mayores de 50°C ya que las enzimas presentes podrían inactivarse.

Durante el proceso de ensilado, después de una semana de almacenamiento el ensilado de pescado se separa en 3 fases: una capa lipídica en la superficie, una fase acuosa en medio y un sedimento de fragmentos de tejido insoluble y precipitado en el fondo. Raa y Gildberg (1982) observaron que la composición de aminoácidos en la fase soluble del ensilado de pescado fue diferente a los aminoácidos del sedimento. El sedimento no contuvo hidroxiprolina y sí un alto nivel de aminoácidos aromáticos y cisteína.

Después de la preparación del ensilado, continúa una etapa de extracción de aceite, que no es necesaria si la materia prima está compuesta de pescado magro, con un contenido en aceite menor del 2% en peso húmedo. La extracción de aceite a pequeña escala sería satisfactoria con una autosedimentación y decantación manual del aceite que flota. La inversión en equipos para extraer el aceite sólo puede ser viable económicamente, a pesar de las altas inversiones, si el grado de autólisis es alto. De no ser así, una alta proporción de aceite será retenido en la fase de lodos y el rendimiento de los solubles sin aceite será bajo (Windsor y Barlow, 1984).

El ensilado líquido puede ser combinado directamente dentro de dietas húmedas, condensado o secado para ser usado como un ingrediente en dietas para animales. Al agregar cereales se facilita el secado del ensilado, se mejora su textura y manejo y se crea la posibilidad de formular el valor nutricional y económico de los productos secos, por variación de la combinación y proporción de los ingredientes con los cuales el ensilado es secado (Raa y Gildberg, 1982; Windsor y Barlow, 1984; Tatterson y Windsor, 1974).

3.2. Ventajas y desventajas de la producción de ensilado de pescado.

Históricamente los alimentos para animales han sido formulados a base de harinas de pescado, sin embargo, existen razones económicas y operativas que han incentivado la producción del ensilado de pescado en muchos países. A continuación se presentan las ventajas y desventajas de la producción de ensilado de pescado con respecto a la harina de pescado:

- Las inversiones para una fábrica de harina son elevadas, mientras que las de fabricación de ensilado son escasas sobre todo si se trata de pescado magro.
- La fabricación de harina requiere el empleo de técnicos y personal especializado, mientras que el ensilado se puede realizar con personal no especializado.
- El ensilado de pescado aprovecha los desechos de plantas pesqueras y se recomienda su elaboración cuando no se cuenta con una fábrica de harina de pescado cercana y en lugares donde hay granjas.
- Los olores pueden suponer un problema en la fabricación de harina de pescado, en el ensilado los olores desarrollados son menores.
- La calidad nutricional de la harina de pescado se ve disminuida ya que durante su elaboración se llega a elevadas temperaturas (120-150°C) que producen una importante disminución del valor biológico de las proteínas. En cambio, en la producción del ensilado no se utilizan altas temperaturas.
- La fabricación de harina puede realizarse en unas horas, mientras que el ensilado requiere de 1 a 5 días y se precisan tanques de almacenamiento. El ensilado es cuatro o cinco veces más voluminoso que la harina de pescado, por lo que los gastos de almacenamiento y transporte son más caros, sin embargo puede ser secado fácilmente junto con cereales lo que permite mejorar su valor nutricional.
- La harina de pescado es un producto bien conocido en el mercado mundial y por lo tanto de fácil venta, el ensilado apenas se está introduciendo y aunque se cuenta con numerosos estudios exitosos en alimentación animal, se necesita de cierta publicidad que permita abrir un mercado para este producto (Windsor y Barlow, 1984).

4.3. Composición química del ensilado de pescado.

El ensilado de pescado posee prácticamente la misma composición que la materia prima de la que procede, pero presenta cambios como el aumento en el contenido de péptidos y aminoácidos libres. El aceite sufre cierto deterioro de forma que el contenido de ácidos grasos libres aumenta, sin embargo estos cambios no suponen un efecto importante sobre el valor nutritivo del ensilado (Tatterson y Windsor, 1974).

La composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año y están

estrechamente relacionadas con la alimentación, nado migratorio y cambios sexuales debidos al desove (Belitz, 1988). Los principales constituyentes del pescado son agua, proteínas y grasa.

Agua

Oscila dependiendo del pescado entre 63% a 83%, siendo prácticamente constante en peces magros y variable entre los peces grasos.

Proteínas

La proteína de pescado es de alto valor biológico debido a su composición en aminoácidos esenciales, además de tener una buena digestibilidad (Huss, 1999). El contenido de proteína bruta en la carne de pescado oscila entre un 17-20% (Belitz, 1988).

Otros compuestos nitrogenados

La proporción en que el nitrógeno no proteínico (NNP) forma parte del nitrógeno total es del 9-18% en los peces teleósteos y del 33-38% en los cartilagosos. Los principales componentes de esta fracción son: bases volátiles como el amoníaco y el óxido de trimetilamina (OTMA), creatina, aminoácidos libres y péptidos, nucleótidos y bases purínicas y, en el caso de peces cartilagosos, urea.

La concentración de bases volátiles nitrogenadas aumenta después de la muerte del pez, de acuerdo con el tiempo y condiciones de almacenamiento, constituyendo un parámetro indicativo del mayor o menor grado de frescura del pescado. El OTMA contribuye a la regulación de la presión osmótica en peces marinos, tras su muerte es reducido por acción bacteriana a trimetilamina (TMA) y por tanto se utiliza como un indicador del grado de descomposición bacteriana.

Cuantitativamente, el principal componente de la fracción NNP es la creatina. Cuando el pez está en movimiento, la mayor parte de la creatina es fosforilada y proporciona energía para la contracción muscular.

Entre los aminoácidos libres predominan la histidina, taurina, carnosina, alanina y glicina. La histidina puede descarboxilarse microbiológicamente a histamina. Especies activas, veloces, con músculo oscuro como el atún y la caballa, tienen un alto contenido de histidina.

Lípidos

La cantidad de grasa contenida en los peces es muy variable, hay peces muy magros con cifras de grasa del 0.1-0.3%, peces con tasas medias de grasa hasta peces muy grasos con 16-26%. De acuerdo a la especie la grasa se puede depositar en el músculo, el hígado y otras vísceras. Desde el punto de vista nutricional es una buena fuente

de ácidos grasos poliinsaturados ω -3, sin embargo plantea problemas referentes a técnicas de conservación debido a la facilidad con que se alteran estos lípidos (Belitz, 1988; Huss, 1999).

Vitaminas y minerales

En general, la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A y D; además están presentes las vitaminas E y K. De las vitaminas hidrosolubles la tiamina, riboflavina y niacina están en mayor cantidad, siendo escasa la presencia de las restantes. Respecto a los minerales, el pescado se considera una fuente valiosa de calcio, fósforo, hierro, magnesio y cobre. Los peces de mar tienen un alto contenido de yodo (Belitz, 1988; Huss, 1999).

Carbohidratos

El contenido de carbohidratos en el músculo de pescado es muy bajo, generalmente inferior al 0.5%. Esto es típico del músculo estriado, en el cual los carbohidratos se encuentran en forma de glucógeno (que es consumido durante la pesca) y como parte de los constituyentes químicos de los nucleótidos. Estos últimos son la fuente de ribosa liberada como una consecuencia de los cambios autolíticos *post mortem* (Huss, 1999).

3.4. Cambios que ocurren durante el proceso de ensilado.

Al ser el ensilado una técnica de conservación del pescado, éste sufre una serie de cambios fisicoquímicos que involucran a los componentes proteicos y lipídicos principalmente.

3.4.1. Cambios químicos en las proteínas.

El principal cambio que ocurre es la licuefacción llevada a cabo por enzimas endógenas que hidrolizan la matriz proteica incrementando la concentración de péptidos, aminoácidos y bases volátiles totales. Las enzimas más activas en las condiciones ácidas del ensilado son las proteasas digestivas, del tipo de la pepsina y ciertas enzimas lisosomales, como la catépsina D. Usualmente los peces sintetizan 2 tipos de pepsinas: Pepsina I y Pepsina II, dependiendo de la especie una u otra es más abundante. Las pepsinas de los peces tienen baja actividad sobre pequeños sustratos peptídicos, pero exhiben una gran actividad sobre la hemoglobina. La pepsina I hidroliza a la hemoglobina en un máximo de pH entre 3 y 4 y la pepsina II entre un pH de 2 y 3. La temperatura óptima de actividad de estas enzimas es a 37 °C (Castillo *et al.*, 2004).

Una medida de la hidrólisis proteica se obtiene de la razón de nitrógeno no proteico (NNP) con respecto al nitrógeno total (NT). Otros métodos se basan en la medición del líquido exudado liberado de los tejidos; o la consistencia que se vuelve más fluida al solubilizarse la estructura proteica. Estos parámetros muestran un aumento de hidrólisis proteica progresiva y rápida al inicio del proceso y posteriormente se hace más lenta durante el almacenamiento.

Viana *et al.* (1993) al elaborar ensilados de macarela con ácidos sulfúrico y acético, fosfórico y cítrico, observó que la solubilización de las proteínas cesa entre los 15 y 20 días de ensilado a una temperatura de 24°C. Muy parecido a lo encontrado por Backhoff (1976) en que la solubilización de las proteínas en un ensilado terminó antes de dos semanas de almacenamiento a una temperatura de 21 °C. En ensilados ácidos y biológicos de merluza almacenados a 20°C la solubilización procedió rápidamente durante los primeros 2 días, pero continuó hasta el final del experimento a los 15 días (Dapkevicius *et al.*, 1998).

Algunos factores que influyen en la licuefacción del ensilado son:

El tipo de material: Más de 90% del nitrógeno orgánico llega a solubilizarse en ensilados ácidos, sin embargo este porcentaje de solubilización depende del tipo de material con que se produce el ensilado. Materiales ricos en enzimas como las agallas y vísceras producen una mayor y más rápida solubilización que los materiales con menos enzimas endógenas a la misma temperatura de almacenamiento (Espe y Lied, 1999). La composición y la frescura del material también influyen en el grado de hidrólisis. Los pescados grasos suelen licuarse más rápidamente que los desperdicios de pescado blanco y el pescado fresco con mayor velocidad que el alterado (Windsor y Barlow, 1984).

La temperatura de incubación o almacenamiento: El tiempo de obtención del ensilado es dependiente de la temperatura de almacenamiento y esta estrechamente relacionado con la temperatura óptima de actividad proteolítica, alrededor de 37°C. Esta dependencia ha sido reportada en ensilados de capelin almacenados a 20°C y 37°C (Haaland y Njaa, 1989) y en ensilado biológico de vísceras de pescado almacenado a 26°C y 37°C (Ahamed y Mahendrakar, 1997). Windsor y Barlow (1984) indican que el ensilado de desperdicios de pescado blanco fresco puede licuarse en unos 2 días si la temperatura es de 25°C, pero tardará unos 5 a 10 días a 15 °C y más tiempo todavía si la temperatura es inferior.

Espe y Lied (1999) encontraron un mayor grado de hidrólisis en ensilados incubados a la temperatura de 20°C que a 4°C o 50°C. Estos ensilados fueron elaborados con diferentes materiales (arenque, caballa, vísceras de bacalao y desechos de bacalao) agregando ácido fórmico al 2.2% v/p y todos mostraron la misma tendencia de mayor hidrólisis a la temperatura de 20°C. La baja hidrólisis a altas temperaturas probablemente se debe a la parcial desnaturalización de las enzimas proteolíticas.

Cuando el material usado para la elaboración de ensilado es previamente sometido a calentamiento se reduce o elimina la actividad enzimática (dependiendo de la temperatura aplicada), dando como resultado una menor hidrólisis de las proteínas presentes en el ensilado, lo cual implica una disminución en la concentración de proteína soluble y aminoácidos libres (Viana *et al.*, 1993; Stone y Hardy, 1986; Espe y Lied, 1999).

El pH: La pepsina presenta un pH óptimo entre 3 y 4 cuando se utiliza hemoglobina como sustrato, mientras que en el pescado la tasa óptima de autólisis es a pH 4. De esta manera un ensilado con pH cercano a 4 alcanza un mayor grado de licuefacción que un ensilado con un pH mayor o menor a este (Dapkevicius *et al.*, 1998; Viana *et al.*, 1993).

Durante el proceso de ensilado se producen péptidos y aminoácidos debido a la hidrólisis llevada a cabo por las enzimas del mismo pescado. En general, la composición de aminoácidos en ensilados biológicos y ácidos no muestran diferencias considerables cuando se comparan con el perfil de aminoácidos de la materia prima (Dapkevicius *et al.*, 1998; Strom y Egum, 1981). Sin embargo, otros estudios revelan que puede haber pérdidas de aminoácidos, probablemente debida a la descomposición ocurrida al adicionar el ácido o al deterioro que ocurre durante el almacenamiento.

Así se ha reportado que durante el proceso de ensilado las concentraciones de triptofano, histidina y metionina son reducidos (Backhoff, 1976; Jackson *et al.*, 1984a). El principal aminoácido dañado por las condiciones ácidas del ensilado es el triptofano, estable a bajo pH cuando forma parte de proteínas, pero lábil en condiciones ácidas cuando esta en forma libre. De lo cual se deduce que, entre mayor porcentaje de solubilización, elevadas temperaturas y tiempo de almacenamiento del ensilado se obtiene una mayor pérdida de triptofano. Backhoff (1976) demostró que en el ensilado de arenque (pH 3.7) hubo una rápida pérdida de triptofano de 45% después de 6 semanas de almacenamiento a temperatura de 30°C y después de 3 años, esta cantidad sólo llegó a 50%. Vizcarra (1998) encontró pérdidas de 39% en el contenido de triptofano en ensilado químico elaborado de desperdicio de atún y almacenado por 20 días a 37°C. El uso de altas temperaturas para concentrar el ensilado también puede reducir el contenido de triptofano (Espe y Lied, 1999).

Vidotti *et al.* (2003) al comparar la composición aminoacídica de ensilados biológicos y ácidos de 3 materias primas (desechos de pescado marino, desechos de pescado de agua dulce, residuos de fileteo de tilapia) encontró un ligero incremento en histidina, treonina y serina para todos los ensilados; en contraste con la disminución de los niveles de valina, isoleucina y leucina. Las calificaciones químicas de los ensilados fermentados mostraron a la arginina como aminoácido limitante, mientras que, en los ensilados ácidos fue el triptofano.

La histidina también ha sido reportada como un aminoácido limitante en el ensilado, sin embargo esto se observó bajo condiciones tropicales usando pescado parcialmente descompuesto, lo cual significa que algo de histidina podría haber sido degradada a histamina por actividad bacteriana antes del proceso de ensilado. El uso de materia prima no fresca y la insuficiente cantidad de ácido añadido para disminuir el pH por debajo de 4.5 son las principales condiciones para la producción de aminas biogénicas y la consecuente destrucción de los aminoácidos correspondientes.

En la figura 3 se muestran las principales aminas biogénicas formadas por descarboxilación de aminoácidos. Dapkevicius *et al.* (2000) reportaron que las aminas biogénicas son formadas a partir de aminoácidos libres por descarboxilación autolítica o microbiana y por tanto son de interés en relación a la disminución de la calidad proteínica del material para alimentación animal y sus posibles implicaciones toxicológicas.

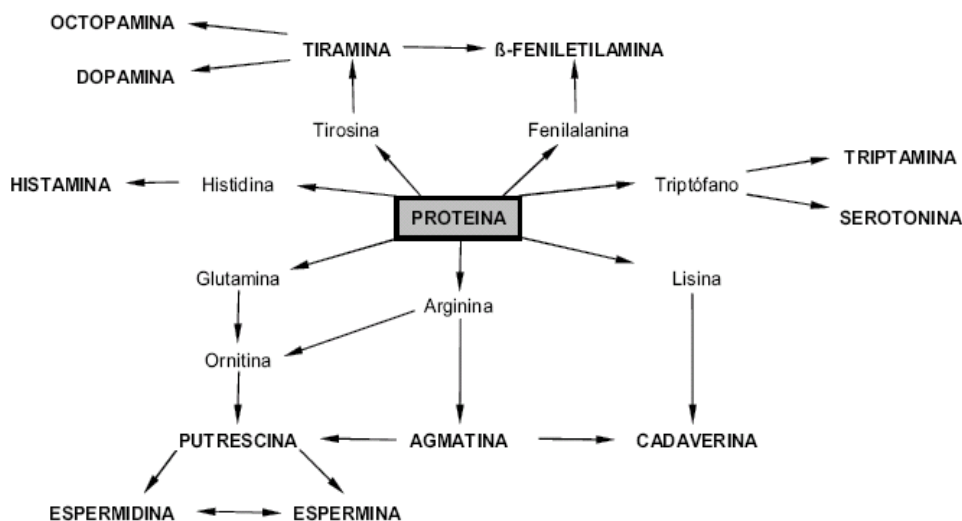


Figura 3. Principales aminas biogénicas y sus aminoácidos precusores.

En el sistema digestivo de los rumiantes se considera que una rápida liberación de amoníaco reduce el valor nutricional de un alimento como fuente de proteína. Por esta razón se evaluó la adición de formaldehído al ensilado de pescado en relación a la producción de amoníaco en líquido ruminal *in vitro*. Husain y Offer (1987) encontraron que la adición de formaldehído limitaba la autólisis posiblemente a un efecto sobre las enzimas proteolíticas, presentándose además una reducción en la formación de amoníaco *in vitro*, estos efectos pueden mejorar la utilización de la proteína del ensilado. Estos autores determinaron que 5 ml de formalina (40%) agregados a un kilogramo de ensilado ácido, mejoró el valor proteico para rumiantes y proporcionó un producto de fácil manejo para su incorporación en las dietas; en cambio la adición de 10 ml produjo un material inadecuado para alimentación animal. Este descubrimiento es importante, debido a los efectos indeseables de una cantidad excesiva de formaldehído en raciones para rumiantes, tales como disminución en la ingesta y pérdida en la eficiencia de utilización de fibra y nitrógeno (Haard *et al.*, 1985).

Stone y Hardy *et al.* (1986) con el fin de obtener un ensilado poco hidrolizado, incubaron el pescado a temperaturas elevadas (60°C) por cortos períodos de tiempo a condiciones fisiológicas (pH 6.0-6.2), sometiéndolo a una pasteurización y adición de ácido a pH 4. Este producto presentó polipéptidos de cadena intermedia los cuales fueron estables durante el almacenamiento (por la inactivación de los sistemas enzimáticos durante la pasteurización).

En el proceso de ensilado también se producen compuestos volátiles a los que se les denomina bases volátiles totales (BVT). La determinación de bases volátiles totales es uno de los métodos más ampliamente usados en la evaluación de la calidad de los productos pesqueros. Es un término general que incluye la medición de trimetilamina (producida por deterioro bacteriano), dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) y otros compuestos nitrogenados volátiles asociados con el deterioro de los productos pesqueros.

Haaland y Njaa (1989) evaluaron la calidad de ensilados de pescado sierra (*Scomber scombrus*) y capelin (*Mallotus villosus*) mediante la determinación de nitrógeno volátil total (NVT). Encontraron que en ensilados preservados adecuadamente (suficiente adición de ácido), los niveles de NVT y amoníaco se incrementaron moderadamente durante el almacenamiento y el nitrógeno amínico de la glutamina y asparagina decrecieron en el mismo grado, sin efectos negativos en la composición del resto de los aminoácidos. Como la asparagina y glutamina son aminoácidos dispensables, no se afectó el valor nutricional del ensilado. En cambio en ensilados a los que no se adicionó la cantidad suficiente de ácido, el pH aumentó durante el almacenamiento y hubo incrementos grandes en nitrógeno volátil total y amoníaco, pero un decremento pequeño de nitrógeno amínico, similar al encontrado en otros ensilados. Sin embargo, la composición de aminoácidos fue afectada siendo la arginina y tirosina los aminoácidos más vulnerables.

Dapkevicius *et al.* (1998) propone que la fuente de NVT en varios tipos de ensilados estudiados no es la misma. En ensilados biológicos ocurre una desaminación a pequeña escala de todos los aminoácidos; mientras que en ensilados ácidos la degradación de cisteína es la que permite la formación de amoníaco y aminas volátiles. Esto es muy importante ya que, mientras una desaminación a pequeña escala de los aminoácidos puede no afectar el valor nutritivo de los ensilados, altas pérdidas en uno o varios de los aminoácidos esenciales cambiará la composición del ensilado y su valor nutricional.

A pesar de los daños a ciertos aminoácidos en el ensilado, el valor nutricional no se ve afectado cuando el contenido de aminoácidos cubre los requerimientos del animal al que será destinado (Vidotti *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 1984b); particularmente cuando es utilizado como ingrediente en dietas balanceadas y se mezcla con otros ingredientes que permitan una suplementación de aminoácidos.

Por todo lo anterior, en la elaboración de ensilado es deseable la licuefacción del pescado que permite obtener un producto líquido y predigerido que será de fácil absorción para los animales. Sin embargo, si se permite que la hidrólisis continúe por mucho tiempo la calidad nutricia puede disminuir debido a la formación de amoníaco y NVT, compuestos que no son absorbidos y finalmente serán excretados. Es por ello que el proceso de ensilado

debe tener un buen control desde la materia prima y elaboración, hasta el almacenamiento del producto a temperatura ambiente.

3.4.2. Cambios químicos en los lípidos.

En los lípidos del pescado ocurren dos reacciones diferentes, de importancia en el deterioro de la calidad: la lipólisis y la autooxidación. Estas dan como resultado la producción de una serie de sustancias, de las cuales algunas tienen sabores y olores desagradables (rancio). Las reacciones pueden ser enzimáticas o no enzimáticas.

Lipólisis

Los lípidos del pescado sufren una ruptura hidrolítica durante el proceso de ensilado, por la actividad de las enzimas lipasas contenidas en el tracto gastrointestinal del pescado, que conduce a la liberación de los ácidos grasos libres. Las lipasas son activas en un amplio rango de temperatura de -20°C a 65°C , pero el rango más usual es de 30°C a 45°C . El pH óptimo de la mayoría de las lipasas está entre 7 y 9, sin embargo hay excepciones (Shahidi *et al.*, 2001).

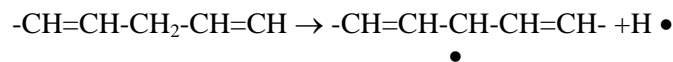
Reece (1980) encontró que las lipasas de la sardineta (*Sprattus sprattus*) tienen una actividad óptima en la región alcalina de alrededor de 9 con un ligero pico de actividad a pH 4 a una temperatura de 25°C , cuando se utiliza aceite de oliva como sustrato. No obstante, usando el aceite de la misma sardineta como sustrato, el pH óptimo de actividad lipolítica fue de 4.6 a 25°C . Este autor indica que el incremento de ácidos grasos libres está influido por el tipo de ácido usado, el pH, la temperatura de incubación, la hidrólisis proteica ocurrida en el ensilado y si se realiza un tratamiento térmico previo a la materia prima. Encontró que hay un mayor aumento en los ácidos grasos libres en ensilados elaborados con ácido propiónico, que usando diferentes proporciones de ácido sulfúrico combinado con ácido fórmico, resultados que estuvieron relacionados con el pH al que se llegó con estos ácidos. Así a un pH de 3.8 (en ensilados con ácido propiónico) se presentó un nivel mayor de ácidos grasos libres que con pHs más ácidos de 1.3 a 3 (en ensilados elaborados con ácido sulfúrico y ácido fórmico). Esto a su vez se relaciona con una mayor solubilización proteica a pH 3.8, lo cual disminuye la cantidad de lípidos en el sedimento, aumentando su cantidad en la superficie donde son más susceptibles a la acción enzimática.

Espe y Lied (1999) al comparar ensilados elaborados con diferentes materiales crudos y cocidos (arenque, caballa, subproductos del fileteo del bacalao y vísceras de bacalao) almacenados a diferentes temperaturas (4°C , 20°C y 50°C), encontraron que el contenido de ácidos grasos libres se incrementó en todos los ensilados; debido a que la lipólisis se produjo por acción enzimática en el material crudo o por calentamiento en presencia de agua en el material cocido. Y en contraste con la proteólisis, los ensilados almacenados a 50°C mostraron una mayor lipólisis que los almacenados a 20°C y 4°C .

Autooxidación

La gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en los lípidos del pescado les hace altamente susceptibles a la oxidación mediante un mecanismo autocatalítico el cual se resume en la Figura 4.

El proceso es iniciado mediante la escisión de un átomo de hidrógeno del átomo de carbono central de los ácidos grasos con más de un doble enlace:



Contrario a las moléculas nativas, los radicales lipídicos (R•) reaccionan muy rápidamente con el oxígeno atmosférico formando radicales peróxidos (ROO•), los cuales captan un hidrógeno de otra acilcadena produciendo hidroperóxidos (ROOH) y nuevos radicales R•; que a su vez reaccionan con el oxígeno repitiéndose la secuencia.

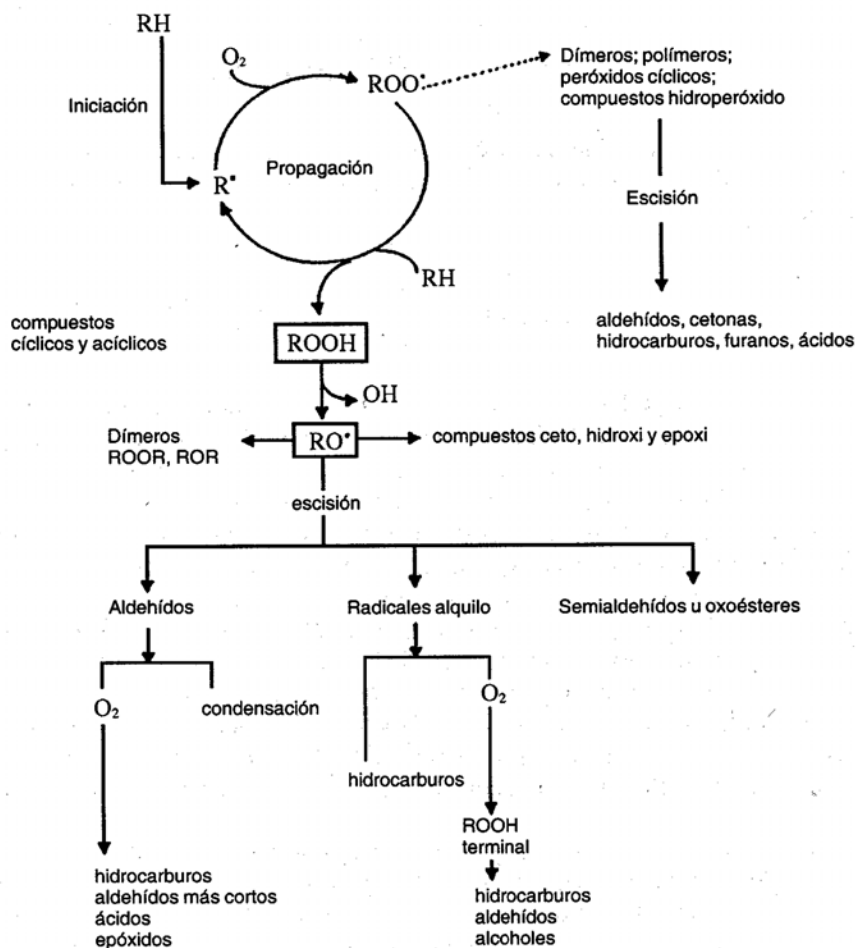


Figura 4. Proceso de autooxidación lipídica (Fennema, 1993).

Los hidroperóxidos, productos primarios de la autooxidación lipídica, son producidos en cantidades relativamente grandes durante la propagación, son insípidos y, por lo tanto, el "valor de peróxido" generalmente guarda escasa correlación con las propiedades sensoriales.

Los hidroperóxidos son relativamente inestables, se rompen en varias etapas hasta la formación de cadenas carbonadas más cortas: aldehídos, cetonas, alcoholes, pequeños ácidos carboxílicos y alquenos principalmente; denominados productos secundarios de la autooxidación. Estos productos originan un extenso espectro de olores y en algunos casos coloración amarillenta. Algunos de los aldehídos formados pueden ser determinados como malonaldehído mediante el método del ácido tiobarbitúrico.

El grado de oxidación está relacionado con el tipo de materia prima y su manipulación antes del ensilado, el tiempo y temperatura de almacenamiento y la formación de ácidos grasos libres.

La producción de ensilado y su secado conduce a un rompimiento y rápida oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. En la oxidación lipídica se forman productos altamente reactivos que afectan la palatabilidad y pueden resultar inseguros para el ganado, afectando también el valor nutricional al disminuir la cantidad de ácidos grasos esenciales, dañar a la proteína e inducir deficiencias a través de la destrucción de vitaminas o incrementando sus requerimientos vitamínicos (Haard *et al.*, 1985).

Varios antioxidantes han sido usados para prevenir la oxidación de la fracción lipídica de ensilados, entre los que se encuentran TBHQ (Santana, 2004), BHT (Machin *et al.*, 1990; Vizcarra, 1998) y etoxiquin (Ahamed y Mahendrakar, 1997; Jackson *et al.*, 1994a). La mayoría de estos ensayos han tenido éxito en el control de la oxidación lipídica como lo demuestran los valores de peróxido, anisidina y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) empleados para estimar la oxidación de los lípidos en estos estudios.

Jackson *et al.* (1984a) en ensilados ácidos elaborados de sardineta fresca (*Sprattus sprattus*), evaluó el efecto de la temperatura (10°C y 20°C) y la presencia o ausencia de antioxidante (etoxiquin) sobre los cambios ocurridos en el ensilado durante el almacenamiento. Encontraron que el incremento de ácidos grasos libres de 2.04% a 6.0% expresados como % de ácido oleico, fueron menores a los reportados por Tatterson y Windsor (1974), autores que también trabajaron con sardineta y observaron que el nivel de ácidos grasos libres del ensilado almacenado a 23°C se incrementó de 6% a 18% en 80 días de almacenamiento. Las fracciones lipídicas de los ensilados sin etoxiquin, desarrollaron rápidamente hidroperóxidos y productos de degradación secundaria medidos con la prueba de anisidina. Con respecto al efecto de la temperatura sobre los lípidos observaron que el valor de peróxido fue más alto (190 meq/kg) en el ensilado almacenado a 10°C que a 20°C; mientras el valor de

anisidina (86.9) fue mayor en el ensilado almacenado a 20°C que a 10°C. Esto como resultado de la degradación de los peróxidos a productos secundarios medidos por el valor de anisidina.

Por su parte en la producción de ensilados, Tatterson (1982) recomienda el desengrasado de materiales con alta cantidad de lípidos. Este aceite recuperado puede ser vendido si la calidad es mantenida, lo cual se puede verificar determinando el contenido de ácidos grasos libres presentes en el aceite, esto da una medida de la extensión con la cual los lípidos han sido deteriorados y es usado como un criterio de calidad comercial. Con menos de 3% de ácidos grasos libres (expresado como % de ácido oleico) el aceite se considera de alta calidad.

La remoción de aceite se debe realizar tan pronto empiece la licuefacción del ensilado, debido a que el incremento en ácidos grasos libres puede ocurrir muy rápidamente durante la primera semana de almacenamiento, particularmente a temperaturas de 20°C y superiores (Tatterson y Windsor, 1974). Strom y Eggum (1981) encontraron que el valor nutricional del ensilado es mejorado al remover los lípidos, ya que aumenta el contenido proteico, coincidiendo con el incremento en la cantidad de lisina en la fase acuosa y por tanto el valor biológico de la proteína es mayor comparado con el ensilado no desengrasado. Sin embargo, el proceso de remoción de lípidos es un proceso caro, sólo costeable para la producción de ensilado a gran escala; por lo que se prefiere la utilización de materia prima con bajo contenido de aceite cuando el ensilado se hace a pequeña escala o bien se puede remover el aceite que flota en la superficie de manera manual.

Reece (1980) al abordar el tema de la formación de ácidos grasos libres, propone un tratamiento de precalentamiento (50°C, 8 min) de la materia prima antes del ensilado, este proceso previo inactiva sistemas enzimáticos del pescado y reduce la formación de ácidos grasos libres y su oxidación aún en almacenamiento prolongado, conservando una alta calidad del aceite. Esto resulta muy útil al permitir la elaboración de ensilados a bordo de barcos pesqueros, para después someterlos a un proceso de remoción del aceite en la planta de producción.

Otros trabajos han informado que la adición de formaldehído puede contribuir a la inhibición de la oxidación lipídica en ensilados ácidos (Haard *et al.*, 1985). No obstante, Dapkevicius *et al.* (1998) encontró que el aceite obtenido de ensilados ácidos, a los cuales se les agregó 0.25% y 0.43% v/p de formalina (40%), presentaron valores elevados de peróxidos comparados con el control sin formaldehído. Así, concluyeron que el formaldehído aumento la descomposición de las moléculas lipídicas en sus monómeros, incrementando la posibilidad de oxidación. Sin embargo explican que la materia prima ya tenía altos niveles de peróxido, lo que permitió la reacción en cadena de radicales libres y la correspondiente formación de peróxidos.

Es conocido que altas concentraciones de peróxido de hidrógeno pueden desnaturalizar a la proteína y oxidar a los ácidos grasos libres. Sin embargo Reece (1981), encontró que la adición de esta sustancia al ensilado en pequeñas cantidades (2% de peróxido de hidrógeno 1.75 mM) reduce el contenido de ácidos grasos libres y el índice de peróxidos, además el color del aceite recuperado del ensilado es más claro. También encontró que, al adicionar peróxido de hidrógeno y un antioxidante oleosoluble como el BHT, se reducen aún más los valores de peróxido en el ensilado.

En la oxidación lipídica los principales ácidos grasos afectados son los poliinsaturados. Machin *et al.* (1990) indicaron una reducción en C18:3, C18:4, C20:3, C20:4, C20:5, C22:5 y C22:6 en ensilados elaborados con peces grasos y una reducción en el contenido de ácidos grasos, similar pero en menor magnitud, en ensilados elaborados con peces magros. A su vez Jackson *et al.* (1984a) encontraron que el perfil de ácidos grasos no muestra diferencias entre los aceites de ensilados con y sin etoxiquin almacenados por 2 y 8 semanas a 20 °C, pero si a las 24 semanas. En estos últimos ensilados se encontraron decrementos en el contenido de ácidos grasos C18:3, C18:4, C20:5, C22:5 y C22:6, mientras que se presentaron incrementos en ácidos grasos saturados (18:0 y 14:0) y monoinsaturados (18:1, 20:1, 22:1). En este mismo estudio se observó un rápido desarrollo de hidroperóxidos en ensilados sin antioxidante. Al evaluar estos ensilados como ingredientes dietarios para el salmón, Jackson *et al.* (1984b) encontraron que el ensilado rancio no inhibió la ingesta y el crecimiento del salmón, aún con altos niveles de hidroperóxidos y productos secundarios de descomposición. Sin embargo, al realizar estudios histopatológicos a estos peces, se encontró que la presencia de ácidos grasos oxidados y sus productos en las dietas resultan en cambios celulares los cuales son asociados a la respuesta inmune del pez. Aunque enfatiza, que mayores estudios se necesitan para saber si estos productos de oxidación pueden causar serios problemas clínicos en el pez.

3.5. Estabilidad del ensilado de pescado.

La estabilidad y calidad del ensilado depende de varios factores que deben ser regulados con el fin de obtener un producto estable y de buena calidad nutricional para alimentación animal. El ensilado de pescado de adecuada acidez, guardado a temperatura ambiente, es estable microbiológicamente y se mantiene al menos dos años sin putrefacción. La proteína se hace más soluble y la cantidad de ácidos grasos libres aumenta durante el almacenamiento, pero estos cambios no son significativos desde el punto de vista nutricional.

No obstante, se aconseja usar ensilados frescos mezclados con cereales para una mejor calidad nutricional de la dieta elaborada y suspender su uso en la alimentación unas semanas antes del sacrificio del animal, con el fin de evitar sabores indeseables en la canal. El ensilado comercial generalmente no es almacenado por más de 6 meses.

3.6. Importancia de la producción de ensilado de pescado.

Uno de los factores más importantes en la producción animal es la alimentación, pues representa entre el 50% y el 80% de los costos de producción. El abasto suficiente de alimentos para los animales, es entonces, de suma importancia para la cría de éstos; donde un problema a resolver es la provisión de proteínas, debido a la limitada disponibilidad de insumos proteicos y su relativo alto costo. Por esta razón desde hace tiempo se ha tenido un gran interés en los productos pesqueros por su gran contenido proteico. La harina de pescado es una fuente proteica muy completa, sin embargo su fabricación es costosa, por lo que se ha buscado otra forma de conservación del pescado más barata. En tal sentido un gran auge en la técnica de ensilado se ha dado en diversos países, este proceso es más amigable al ambiente, seguro, tecnológicamente más flexible y económicamente más eficiente que la producción de harina de pescado (Raa y Gildberg, 1982). Por tanto es un producto de fácil elaboración y de bajo costo, que además aprovecha:

- ❖ Los residuos de desechos de la industria pesquera. El proceso industrial de pescado para consumo humano produce alrededor de 60% de subproductos y únicamente 40% de carne comestible.
- ❖ Pescado entero no apto para consumo humano. Las pérdidas post-captura de pescado ascienden al 10% de la captura total de pescado y se producen por descarte de las faunas acompañantes. Además, existen otras pérdidas por la manipulación, almacenamiento, distribución, procesamiento y comercialización.

Así, mediante un simple proceso de acidificación controlada, se obtiene un producto estable, con buenas cualidades nutritivas y antimicrobianas contra bacterias patógenas y putrefactivas, que puede ser de gran utilidad en alimentación animal.

3.6.1. El ensilado en la alimentación animal.

El ensilado de pescado ha sido usado para alimentar toda clase de especies animales tales como rumiantes, cerdos, pollos, animales de pieles y peces; empleándolo del mismo modo que la harina de pescado en los alimentos para animales. La aplicación inmediata es para los sistemas de alimentación líquida y también se ha probado el secado conjunto, con harinas de diversos cereales y de soya para producir productos secos de mayor manejabilidad y mejor valor nutricional.

En Uruguay el ensilado de pescado ha sido ampliamente experimentado para alimentación de cerdos en crecimiento y engorde, dado que el ganado porcino se adapta muy bien a la alimentación pastosa. La calidad y el sabor de la carne porcina no se alteran y los costos de explotación son sensiblemente menores, comparados con otros concentrados de proteína animal en raciones comerciales. En estudios con cerdos se concluyó que el ensilado necesita menos pescado y menos unidades forrajeras para producir 1 kg de carne (Avdalov *et al.*, 1992); encontrándose que la tasa de crecimiento de los cerdos fue mayor cuando el contenido de ensilado en la ración era del 5% y mejor su composición nutricional. Al alimentar a cerdos con ensilados de pescado se recomienda

que la dieta tenga un bajo contenido graso, que no exceda el 1% del total de la dieta, esto debido a que los ensilados producidos con pescados grasos (como desechos de arenque), pueden producir carnes manchadas con grasa de color amarillento.

En estudios realizados con cerdos de engorde, Ward *et al.* (1985) ofrecieron el ensilaje de pescado a niveles dietéticos de 0, 10 y 15% en base seca y observaron un incremento en el consumo de alimento y una peor conversión alimenticia en los animales alimentados con 15% de ensilaje de pescado en comparación con las otras dietas. No se observaron diferencias en el espesor de la capa de grasa dorsal ni en la calidad de la canal atribuible al consumo del ensilaje de pescado. Estos autores concluyeron que 10% es el nivel óptimo de inclusión en dietas para cerdos en engorde. En otros estudios con cerdos, Kjos *et al.* (1999) probaron la aportación de 9% de la proteína dietética total en forma de ensilaje de pescado y no observaron efectos negativos sobre el crecimiento corporal, las características de la canal, ni la calidad de la carne.

La utilización del ensilado químico como fuente energético-proteica alternativa en la preparación de raciones para aves está comprobada por los resultados alcanzados tanto para ponedoras como para pollos, con costos menores cuando la proporción del ensilado es del 3.7%, menor que el límite máximo de 5% recomendado. Pollos alimentados con raciones de 5% de ensilado biológico de pescado presentaron un mejor índice de conversión alimenticia y crecimiento, sin ningún gusto extraño en la carne ni lesiones en los órganos estudiados y la producción de huevos por las gallinas fue más alta (Guevara *et al.*, 1991).

Espe *et al.* (1992) al evaluar en pollos las cantidades de proteína proveniente de la harina de pescado que pueden ser reemplazadas por proteínas del ensilado (0, 50, 100, 200, 400 g/kg), encontraron que el crecimiento y eficiencia alimentaria fueron las mismas o mejores cuando algunas de las proteínas son del ensilado. Además evaluaron el tiempo de almacenamiento de los ensilados (2 semanas, 2 meses y 5 meses) con el fin de conocer el efecto del grado de autólisis en la eficiencia alimentaria de los pollos, los resultados no mostraron diferencias significativas entre las eficiencias alimentarias. Concluyendo que puede ser ventajoso tener algo de proteína en la dieta de forma soluble, ya que esta puede ser rápidamente absorbida y utilizada para síntesis proteica en pollos.

Bello y Fernández (1995) elaboraron ensilados por vía microbiana a partir de una mezcla de tres especies de pescado de bajo costo. Los ensayos biológicos de aceptabilidad, realizados en pollos de engorde, indicaron la preferencia por niveles del 5 al 50% de ensilado. Las pruebas de incremento de peso y consumo de alimento, al igual que la evaluación de los órganos viscerales y la evaluación sensorial, indicaron que con 5-20% de inclusión de ensilado en las dietas se obtienen rendimientos muy satisfactorios, no se observaron trastornos en los animales que los consumen, ni se detectaron cambios sensoriales en la carne de los pollos después de la cocción. En otro estudio realizado por Rodríguez *et al.* (1990b), en los que evaluaron 2 niveles de inclusión (2.5% y 5%)

de ensilado ácido en las dietas para pollos, encontraron que la mejor respuesta biológica había sido la de los pollos alimentados con la dieta de ensilado de pescado a un nivel de inclusión de 5% en las raciones alimenticias y las pruebas sensoriales revelaron que la carne de pollos alimentados con las dietas experimentales son perfectamente aceptables por los consumidores.

La inclusión de ensilado en dietas para rumiantes demostró que con una cantidad mínima se incrementaba la ganancia en peso, pero son necesarios mayores ensayos sobre la digestibilidad (Nicholson y Johnson, 1991). Así los estudios realizados con 30 becerros durante 90 días, alimentados con una dieta de 2 kg diarios a base de harina de soya, harina de maíz, sal y minerales y suplementada con ensilado biológico de pescado (0, 100, 200 y 300 g como materia seca por día), indicaron un incremento en peso vivo mayor en los animales suplementados con 100 g de ensilado por día. A pesar de estos resultados se hace necesario ampliar los estudios en rumiantes.

En Marruecos, bloques de ensilado de pescado se han usado para alimentar camellos. La ración basal usada por 100 kg de peso vivo fue de 1.5 kg de cebada y 0.5 kg de paja. Cuando 0.5 kg de ensilado fue usado para sustituir un cantidad equivalente de cebada en la ración, la digestibilidad de la materia seca y el crecimiento mejoraron en un 2% y 17% respectivamente.

En estudios con otras especies, Winter y Feltham (1983), encontraron que la utilización de ensilaje de pescado en la alimentación de animales destinados a la producción de pieles debe ser limitada, debido a que los visones y las zorras son muy sensibles a las dietas ácidas con pH menores de 5.8. Estos autores recomendaron la utilización de ensilaje de pescado a niveles dietéticos de 10% a 30% en base seca durante el período de crecimiento, pero este uso debe suspenderse durante el período de apareamiento.

El uso experimental de ensilado de pescado como una alternativa de ingrediente proteico en acuicultura ha sido ampliamente reportada (Raa and Gildberg, 1982; Jackson *et al.*, 1984b). Estudios sobre alimentación, digestibilidad y crecimiento en especies tropicales incluidas la tilapia *Oreochromis aureus* (Goddard *et al.*, 2003) y pacu *Piriacetus mesopotamicus* (Vidotti *et al.*, 2002) han mostrado que el ensilado es altamente digestible y puede reemplazar a la harina de pescado en dietas para acuicultura hasta en un 75%.

En la dieta de los salmónidos, como crecen mejor con raciones de alto contenido energético, es posible utilizar el ensilado con hasta un 20% de lípidos (base seca), evitando el proceso de extracción del aceite que encarece su producción. Para proteger los aceites fue agregado al ensilado un antioxidante (etoxiquin) el cual no mostró signos de pérdidas nutricionales en un período de 24 semanas. Sólo se observó una pérdida del 60% del triptofano inicial; no obstante el nivel de este aminoácido cumple los requisitos de los contenidos mínimos de las dietas de los salmónidos (Jackson *et al.*, 1984a, 1984b).

Cuando son correctamente elaborados, los ensilados son productos inócuos en los cuales no se han detectado hasta el presente microorganismos patógenos, ni efectos perjudiciales por causa alguna en los animales en los que se han experimentado (FAO, 1990).

4. DETERMINACIÓN DEL VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEÍNAS.

Al ser el pescado una buena fuente de proteína, dicho macronutriente es el de mayor interés para utilizar en alimentación animal, por tanto es de importancia conocer el valor nutritivo de dicha proteína. El valor nutritivo de un alimento como fuente proteica refleja su aptitud para satisfacer las necesidades de nitrógeno y aminoácidos del consumidor, asegurando un crecimiento y mantenimiento adecuados, lo cual depende de varios factores:

1. Contenido proteico.

2. **Calidad de la proteína.** Depende del tipo y cantidad de aminoácidos y representa una medida de la eficacia con que puede ser utilizada por el organismo. Las proteínas de origen animal son de calidad superior que las de origen vegetal.

3. **Disponibilidad de los aminoácidos.** Los aminoácidos de las proteínas presentes en la dieta no son siempre enteramente disponibles, dado que la digestión de la proteína o la absorción de los aminoácidos, pueden resultar incompletas. La baja utilización de ciertas proteínas puede ser debida a varios factores:

- Conformación de la proteína.
- Fijación de metales, lípidos, ácidos nucleicos, celulosa u otros ingredientes polisacáridos a las proteínas, lo que puede dificultar su digestión.
- Presencia de factores antinutricionales.
- El tamaño y el área superficial de las partículas proteicas.
- El procesado a elevadas temperaturas, pHs alcalinos, o en presencia de carbohidratos reductores, suelen disminuir la digestibilidad proteica y limitar la disponibilidad de varios aminoácidos especialmente la lisina.
- Diferencias biológicas entre los distintos individuos, que influyen en su capacidad de digestión de proteínas y absorción de aminoácidos (Cheftel, 1989; Fennema, 1993).

La evaluación de la calidad proteica de un alimento se puede determinar por diversos métodos como se describe a continuación:

4.1. Métodos biológicos.

Se basan en la determinación del crecimiento o la retención de nitrógeno en animales experimentales como la rata, en función del consumo de proteína. Para obtener datos fiables se deben utilizar varios animales en cada ensayo, analizar los resultados estadísticamente y estandarizar las condiciones de ensayo (Fennema, 1993).

Para este tipo de ensayos se utiliza la rata Wistar debido a que es poco sensible a los factores ambientales e infecciosos, acepta regímenes sintéticos y es fácil acostumbrarla a sabores muy diversos. Pero la ventaja más evidente es su carácter omnívoro y sobre todo, la sensibilidad de su respuesta a las condiciones nutricionales: por el simple seguimiento de su consumo diario es posible, en pocos días pronosticar la calidad nutricional del constituyente estudiado.

Relación de eficiencia proteínica (REP)

Osborne, Mendel y Ferry (1919) introdujeron el concepto de Relación de Eficiencia Proteínica (REP), el cual es el método más comúnmente utilizado en la evaluación del valor nutritivo de proteínas. En este método se asume que el incremento en peso de ratas alimentadas con una dieta, bajo condiciones estandarizadas, es una medida confiable del valor nutritivo de una proteína dietética. La REP se define como el peso en gramos ganado por las ratas por cada gramo de proteína consumida.

Existen numerosos factores que ejercen influencia sobre el valor experimental de REP como son: edad, sexo, cepa, calidad de la proteína, otros componentes de la dieta y las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad, jaulas). Por tanto se han estandarizado las condiciones del ensayo: se emplean ratas macho, destetadas entre los 21-23 días de edad, el intervalo de peso no debe exceder los 10 gramos, la prueba dura de 3 a 4 semanas. El nivel de inclusión de la proteína en la dieta es de 10%, las dietas de prueba y la dieta control deben ser isoproteicas e isocalóricas.

Relación Neta de Proteína (RNP)

Cuando en el cálculo de REP, se incluye la pérdida de peso experimentada por un grupo de ratas sometidas a una dieta carente de proteínas, se puede estimar la proteína utilizada para el crecimiento y también el mantenimiento; obteniéndose el valor conocido como Relación Neta de Proteína (RNP). En esta prueba se mide la pérdida de peso de un grupo control sin proteína, que es sumada a la ganancia en peso del grupo de prueba y dividida entre la proteína consumida por el último grupo. Se asume que la proteína requerida para prevenir la pérdida de peso de las ratas alimentadas con la dieta libre de nitrógeno, es equivalente a las necesidades proteínicas para su mantenimiento.

Digestibilidad

En principio, la medida de la digestibilidad es simple: un alimento se convierte en el intestino delgado, en nutrientes que atraviesan la membrana intestinal, con la excepción de un pequeño porcentaje. Como la medida directa de la fracción absorbida resulta difícil, habitualmente la digestibilidad se establece de manera indirecta determinando la cantidad no absorbida presente en la excreta fecal.

La determinación del consumo de nitrógeno y las pérdidas del mismo por las heces permite calcular el porcentaje de nitrógeno ingerido que se absorbe. Este valor es un indicador inicial de la calidad nutritiva de un alimento y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Digestibilidad} = \frac{N_{\text{absorbido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

La digestibilidad aparente considera que el nitrógeno excretado es únicamente de origen alimentario, sin embargo en el organismo hay mecanismos de excreta endógenos (recambio proteico del tubo digestivo, secreciones, etc.), que deben ser incluidos para conocer el valor real de digestibilidad de una proteína alimentaria. Por lo tanto en el ensayo biológico se puede incluir un lote de animales sin aporte de proteína. El nitrógeno en las heces de estas ratas constituye la pérdida endógena de nitrógeno y con esto se puede determinar la cantidad de nitrógeno alimentario que fue absorbido.

Utilización Proteica Neta (UPN)

Es el porcentaje del nitrógeno dietético ingerido que es retenido en el organismo para formación de tejidos. Para obtener valores verdaderos (no aparentes) es necesario tener en cuenta las pérdidas fecales y urinarias endógenas:

$$UPN = \frac{N_{\text{ingerido}} - [(N_{\text{fecal}} - N_{\text{fecalo}}) + (N_{\text{urinario}} - N_{\text{urinarioo}})]}{N_{\text{ingerido}}}$$

Donde N_{fecalo} y $N_{\text{urinarioo}}$ se refieren al nitrógeno fecal y urinario provenientes del grupo de la dieta libre de nitrógeno.

Cuando se trata de animales pequeños, el nitrógeno retenido se debe determinar directamente mediante análisis del canal.

Ventajas de los métodos biológicos:

- ✓ No requieren de equipo analítico sofisticado o demasiado caro.
- ✓ Se pueden analizar estadísticamente los resultados.

- ✓ Se pueden ensayar en diversos organismos en crecimiento, incluso en niños (cuando se utilizan alimentos convencionales).
- ✓ Se pueden hacer ordenaciones jerárquicas del valor nutritivo de las proteínas.
- ✓ Permiten detectar el deterioro de la calidad proteica durante el procesado, siempre que el proceso afecte al aminoácido limitante.
- ✓ La biodisponibilidad de un aminoácido en la proteína sometida a ensayo se determina transformándolo en el nutricionalmente limitante, añadiendo a la dieta cantidades adecuadas del resto de los aminoácidos esenciales, en forma de aminoácidos libres.
- ✓ Utiliza modelos biológicos y dietas preparadas como serán consumidas, por lo que permite conocer la respuesta de un organismo con la dieta a evaluar.

Desventajas de los métodos biológicos:

- × El peso ganado por los organismos de ensayo no siempre se debe a la proteína retenida, hay determinadas dietas que pueden provocar retención de agua y/o depósitos.
- × El resultado depende de la cantidad de alimento ingerido, y la ingesta a su vez depende de la palatabilidad de la dieta.
- × Algunas proteínas administradas al 10% no producen crecimiento e incluso pueden causar descenso de peso, por tanto no se obtiene ningún resultado del experimento.
- × No identifican al aminoácido limitante de la proteína o dieta de estudio, a menos que se lleven a cabo varios experimentos adicionales, en presencia de aminoácidos libres añadidos.
- × Son caros y exigen mucho tiempo.

4.2. Métodos químicos.

En estos métodos se estima el valor nutritivo de una proteína basándose en su contenido de aminoácidos esenciales y en la comparación del mismo con las necesidades del hombre (Fennema, 1993).

El método más usado es la determinación de la calificación química (chemical score). La calificación química de una proteína es el valor más bajo de la comparación que se lleva a cabo entre el contenido de aminoácidos de la proteína de estudio, con el contenido de aminoácidos de la proteína patrón de la FAO (basada en las necesidades de aminoácidos esenciales de los niños). El aminoácido del que se obtenga la calificación química de la proteína es también, el aminoácido limitante de la misma. Las proteínas con calificaciones químicas cercanas a 100 son las de mejor calidad.

Para calcular la calificación química se utiliza la siguiente fórmula:

$$CQ = \frac{(aa_{muestra} / total\ aa_{muestra})}{(aa_{patrón} / total\ aa_{patrón})} \times 100$$

Donde aa significa aminoácidos. Los resultados se expresan como g de aminoácidos/16 g de Nitrógeno.

Ventajas:

- ✓ Si se conoce la puntuación química (para todos los aminoácidos esenciales) de varias proteínas se puede calcular el valor de complementación de las diferentes proteínas de una mezcla.
- ✓ Las calificaciones químicas, basadas en el patrón de la FAO, permiten predecir correctamente la cantidad de una proteína (o de una mezcla de proteínas) necesaria para satisfacer las necesidades de aminoácidos para el crecimiento.
- ✓ Son más rápidos que los métodos biológicos.
- ✓ Permite conocer el perfil de aminoácidos de una proteína y por tanto conocer el aminoácido limitante.

Desventajas:

- × Puede subestimar la calidad de una proteína para los adultos, dado que está basado en las necesidades de aminoácidos de los niños de corta edad.
- × Requiere el uso de técnicas especiales para determinar el triptofano y los tioaminoácidos.
- × No tiene en cuenta los efectos negativos de los aminoácidos presentes en exceso, ni de los factores antinutritivos que el alimento contenga.
- × No establece compensaciones para las diferencias en la digestibilidad de las proteínas o en la biodisponibilidad de aminoácidos específicos.

4.3. Métodos enzimáticos y microbiológicos.

Los métodos enzimáticos utilizados para valorar la calidad de una proteína están basados en la determinación de los aminoácidos esenciales liberados de una proteína ensayada, cuando se expone a la acción de una o más proteasas, en condiciones normalizadas (Fennema, 1993).

Ventajas:

- ✓ Estos métodos permiten estimar la digestibilidad proteica, el valor proteico y/o la disponibilidad de algunos aminoácidos específicos.
- ✓ Son métodos rápidos, así que su empleo es útil para valorar los daños sufridos a las proteínas de los alimentos durante tratamientos industriales y el almacenamiento.
- ✓ Son más baratos y menos laboriosos que los métodos biológicos.

Desventajas:

- x Se requiere del empleo de proteasas específicas y purificadas.
- x No toma en cuenta los efectos negativos de los aminoácidos en exceso, ni de los factores antinutritivos del alimento.
- x Simulan las condiciones y reacciones fisiológicas que se llevan a cabo dentro del organismo, por lo tanto sólo se puede estimar la digestibilidad de una proteína, ya que la digestibilidad real depende de varios factores relacionados con el alimento y el organismo que lo ingiere.

Los microorganismos como el protozooario *Tetrahymena pyriformis* y las bacterias *Streptococcus zymogenes* y *Streptococcus lactis* se emplean para establecer el valor nutritivo de las proteínas, así como su contenido en aminoácidos disponibles. Estos microorganismos necesitan aminoácidos en proporciones similares a las necesitadas por el hombre y los animales de experimentación y sus velocidades de multiplicación sirven de medida del valor nutritivo proteico (Fennema, 1993).

Ventajas:

- ✓ Son procedimientos rápidos (2-3 días) y los resultados se correlacionan bien con los alcanzados con otros métodos.
- ✓ Estos microorganismos poseen enzimas proteolíticas, por lo que también se emplean para determinar la cantidad de aminoácidos disponibles de una proteína (sin tener que llevar a cabo la hidrólisis ácida que libera tanto los aminoácidos disponibles como los no disponibles).

Desventajas:

- x Se necesitan cepas puras de microorganismos específicos.
- x Para el cultivo de estos microorganismos se necesitan de adecuadas condiciones (medios con los sustratos necesarios, condiciones de esterilidad, etc.).
- x Se puede requerir de un tratamiento previo de las proteínas, para que el proceso hidrolítico por parte del microorganismo no sea lento.

Conocer la composición de aminoácidos, así como estimar la digestibilidad *in Vitro* de una proteína nos da una buena idea de la calidad de dicha proteína. Sin embargo, hay factores como la preparación del alimento o la presencia de factores antinutricionales que afectan la biodisponibilidad de los aminoácidos en el organismo. Es así, que la calidad de la proteína se puede evaluar de mejor manera mediante bioensayos, en los que se utilizan organismos experimentales alimentados con dietas preparadas de la forma en que serán consumidas posteriormente.

OBJETIVOS

GENERAL:

Desarrollar un ensilado de pescado diablo (*Hypostomus plecostomus*) y evaluar su calidad nutrimental por métodos químicos y biológicos, con el fin de establecer una alternativa de aprovechamiento de éste recurso.

ESPECÍFICOS:

- Determinar la composición proximal y la actividad proteolítica del pez diablo.
- Evaluar algunos cambios fisicoquímicos que se presentan durante el proceso de producción de los ensilados.
- Determinar la composición química del ensilado elaborado.
- Evaluar la calidad proteínica del ensilado de pescado producido, mediante la prueba biológica de Relación de Eficiencia Proteínica (REP).
- Determinar si la calidad proteínica del pescado se ve afectada por el proceso de ensilado.
- Evaluar si la calidad proteínica del ensilado se puede mejorar mediante la adición de sorgo.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se dividió en tres etapas:

En vista de que la calidad de la materia prima es fundamental para la obtención de un buen producto; en la primera etapa se realizó el análisis proximal al pescado, así como la determinación de la actividad proteolítica total de sus enzimas. Además se consideró de utilidad conocer previamente las condiciones adecuadas de producción del ensilado.

Durante la segunda etapa, con las condiciones para elaborar el ensilado ya establecidas, se probó la efectividad de un ácido orgánico y su combinación con un ácido inorgánico para conservar el producto. Evaluándose también la eficacia de un antioxidante en el control de la oxidación lipídica y monitoreándose algunos cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso.

Finalmente en la tercera etapa se realizó la evaluación biológica de la calidad proteica del ensilado, mediante el método de Relación de Eficiencia Proteínica (REP). Comparándose en ésta prueba la calidad proteica de la materia prima, del ensilado elaborado y el efecto de la adición de sorgo al ensilado. Estas etapas se encuentran detalladas en las páginas siguientes.

DIAGRAMA ETAPA 1: Primer ensayo de elaboración del ensilado.

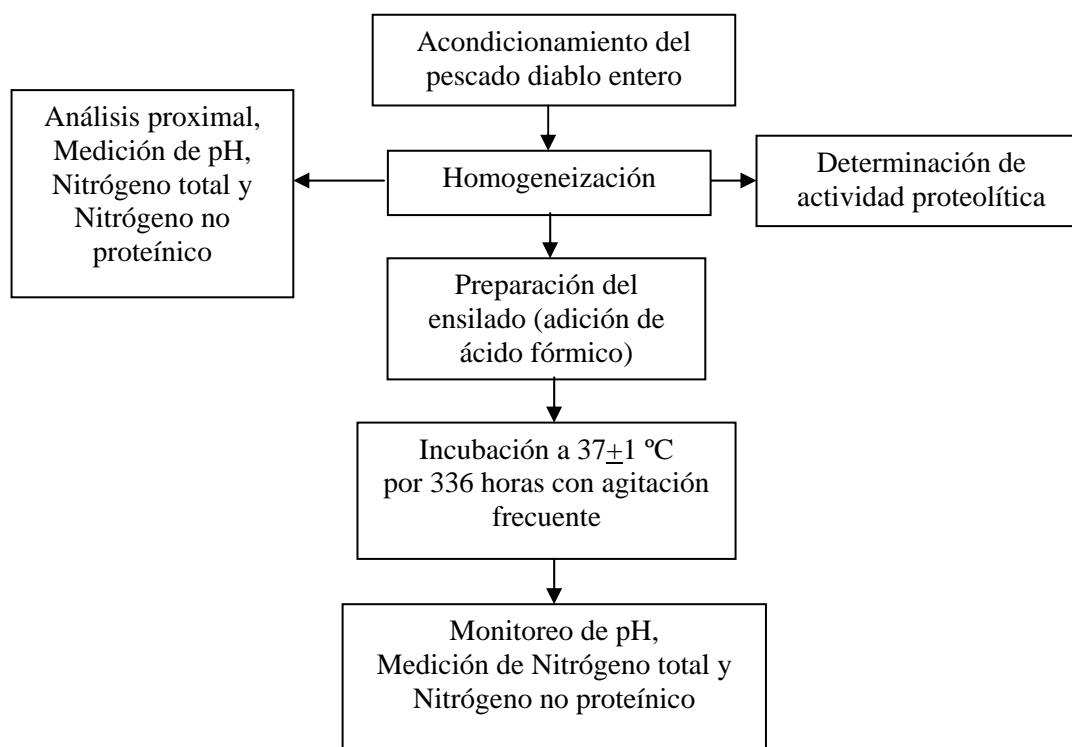


DIAGRAMA ETAPA 2: Segundo ensayo para obtener el ensilado a nivel laboratorio.

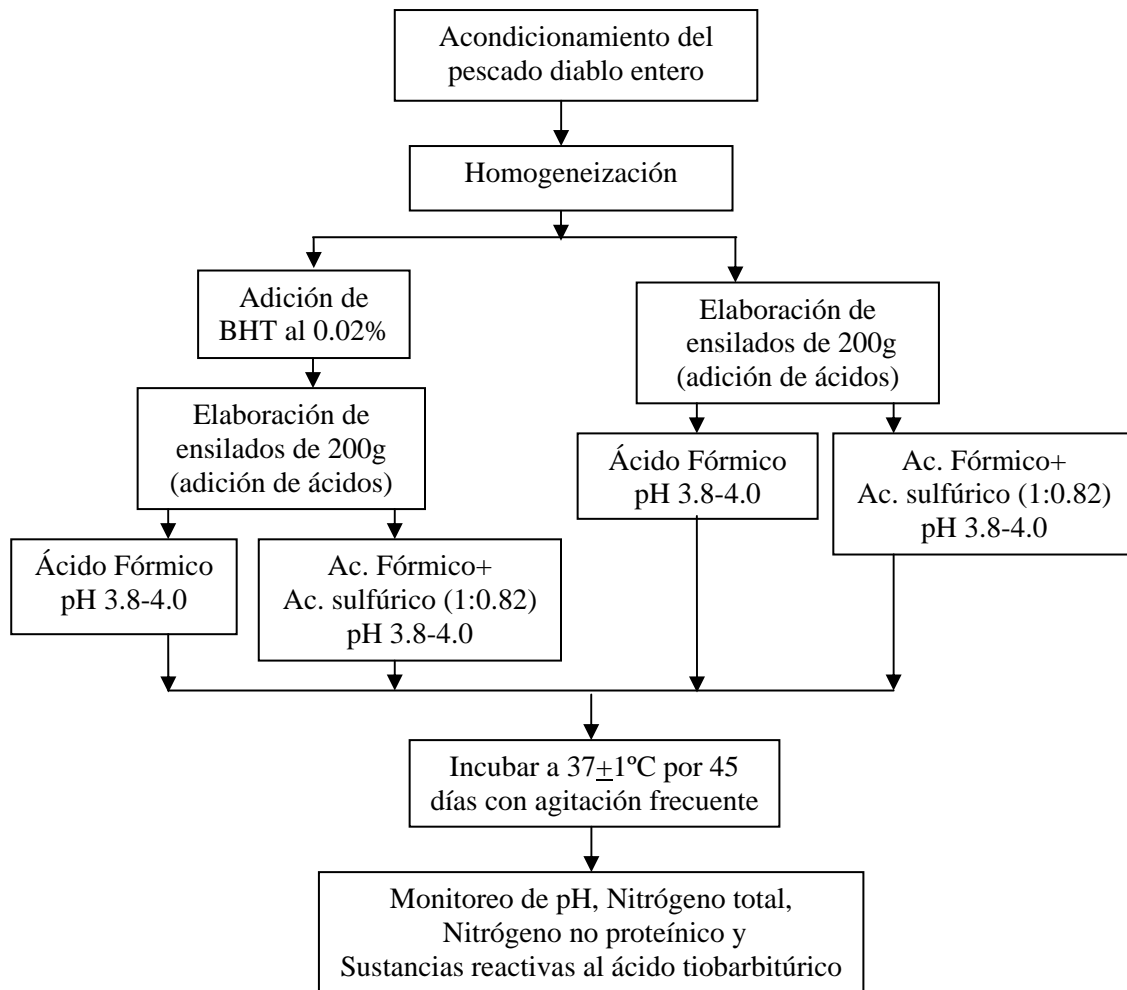
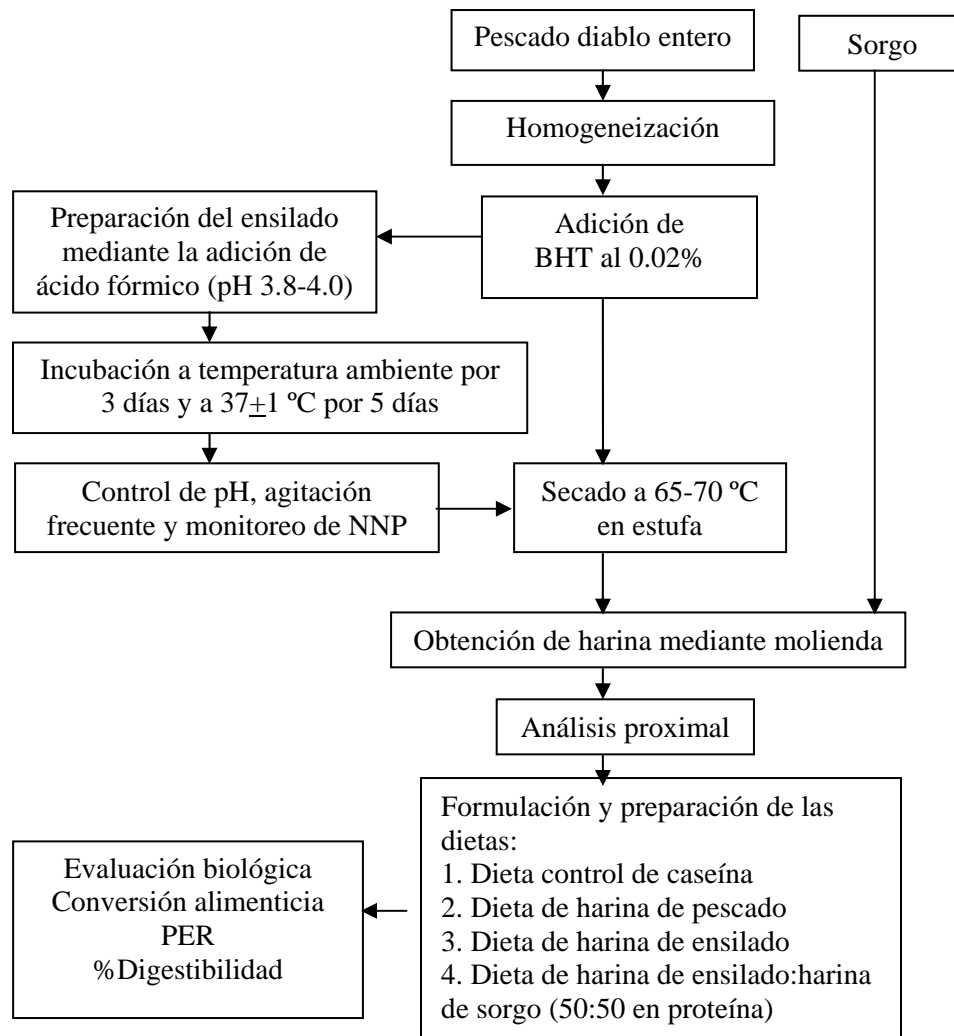


DIAGRAMA ETAPA 3: Evaluación nutricional del ensilado.



DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

1. INFORMACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

El pescado diablo se obtuvo a través del Instituto Nacional sobre la Investigación de Recursos Naturales (INIRENA), Morelia, Michoacán. Los organismos completos procedentes de la Presa Adolfo López Mateos (Presa “El Infiernillo”) fueron trasladados en hieleras al laboratorio 111 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM en Septiembre del 2005.

Se recibieron 5.0 kg de pescado entero, de los cuales 4200 g se almacenaron inmediatamente a -50°C en un ultracongelador REVCO y 800 g fueron homogenizados en una licuadora industrial marca Momat L-10, para lo cual se adicionó 500 ml de agua desionizada. Se distribuyó el homogenizado en 3 frascos de plástico opaco y se almacenó a -50 °C hasta su utilización.

2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL PESCADO ENTERO.

Para el análisis proximal de la materia prima (determinación de proteína cruda, lípidos y cenizas) se secaron 317.4 g del homogeneizado previamente obtenido, en una estufa LAB-LINE Imperial III a 65°C. Los procedimientos que se realizaron se basan en las técnicas de la AOAC (1990) y se describen en el **Anexo 1**.

2.1. Determinación de humedad.

Fundamento:

Se basa en la determinación de la pérdida de peso debida a la evaporación del agua en el punto de ebullición o a temperaturas cercanas a él. La proporción de agua pérdida aumenta al elevar la temperatura; por lo tanto es importante comparar sólo los resultados obtenidos usando las mismas condiciones de secado, sobre todo, si por el tipo de muestra es factible que ocurra alguna descomposición. A su vez la pérdida de peso depende de diversos factores como son: el tamaño de la partícula, el peso de la muestra y las variaciones de temperatura entre una y otra charola en el horno.

Para secar la materia prima homogeneizada, se llevó a cabo un secado grueso en una estufa de corriente forzada esto debido al gran contenido de humedad, y posteriormente se realizó el secado en estufa de vacío, como se describe en el **Anexo 1**.

2.2. Determinación de cenizas totales.

Fundamento:

Las cenizas de los productos alimentarios están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de que la materia orgánica se ha incinerado a 500°C. Las cenizas, normalmente, no son las mismas sustancias

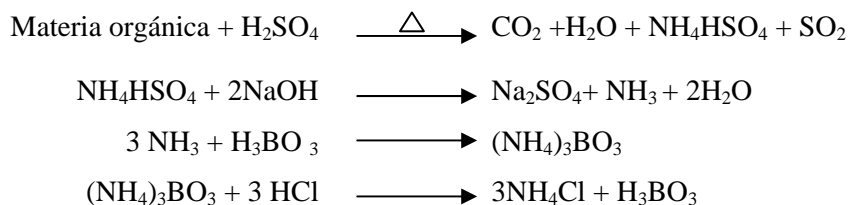
inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes (Kirk *et al.*, 2005).

2.3. Determinación de proteína cruda.

Fundamento:

Se utilizó el método de Kjeldahl, que determina el nitrógeno total contenido en una matriz alimenticia. Este método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos y de otro tipo, para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El producto de la digestión, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoníaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico y es posteriormente titulado con ácido clorhídrico (Kirk *et al.*, 2005).

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:



Los factores comúnmente usados para convertir el nitrógeno total en proteína cruda, se basan en el contenido promedio de nitrógeno de las proteínas, que en general es de 16%. Para el pescado y otros alimentos el contenido de proteína es 6.25 veces el contenido de nitrógeno.

2.4. Determinación de grasa.

Fundamento:

El contenido de lípidos libres, que básicamente consiste en grasas neutras (triglicéridos) y ácidos grasos libres, se determina sin mayor problema en los alimentos por extracción del material seco y molido con una fracción ligera de petróleo o con éter etílico en un aparato de extracción continua.

Para la determinación de la grasa cruda se utilizó el método de Goldfish, en el cual el material seco y molido se coloca en un aparato de extracción continua en el que las gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente. Así el disolvente esta en contacto continuo con la muestra lográndose la extracción total de la grasa. Al eliminar el disolvente, el extracto etéreo se determina gravimétricamente.

2.5. Determinación de carbohidratos totales.

Se determinaron por diferencia restando al 100% la suma de los porcentajes de humedad, cenizas totales, grasa y proteína crudas, mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{Carbohidratos} = 100\% - (\% \text{humedad} + \% \text{proteína} + \% \text{grasa} + \% \text{cenizas})$$

3. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA.

Fundamento:

Uno de los procedimientos más empleados para la determinación de la actividad proteolítica de las proteasas ácidas es el método modificado de Anson (1938). En este ensayo, se hidroliza hemoglobina desnaturalizada con una cierta cantidad de la proteasa problema a pH=3, 37°C y durante 10 min. La hemoglobina no hidrolizada se precipita con ácido tricloroacético y al sobrenadante, después de filtrar, se le añade reactivo fenólico, que produce color azul con tirosina y triptofano que son liberados durante la hidrólisis, cuya absorbancia se mide a 750 nm.

En el presente estudio se utilizó el método de Anson (1938) con las modificaciones propuestas por Rick y Fritsch (1974) para medir la actividad proteolítica total proveniente de las enzimas activas en condiciones ácidas (principalmente la pepsina y catepsina D). Empleando como sustrato proteico una solución de hemoglobina desnaturalizada al 2% y las condiciones óptimas para su actividad. Esta determinación se realizó al pescado entero homogeneizado con el fin de conocer el estado inicial de actividad enzimática proteolítica.

3.1. Determinación de proteína soluble en el extracto

Fundamento:

Se determinó mediante el método de Lowry *et al.* (1951), este método está basado en 2 fenómenos: la formación de un complejo colorido de cobre debido a la presencia de enlaces peptídicos y la reducción del ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico por los aminoácidos aromáticos. Este método da resultados reproducibles y es 20 veces más sensible que el método UV y 100 veces más sensible que el método de Biuret. Para determinar la cantidad de proteína soluble se prepara una curva de calibración usando albúmina sérica bovina como estándar de referencia. Tanto la curva como las muestras se leen en el espectrofotómetro a 750 nm.

La estimación de la proteína se realizó a partir de una alícuota del extracto de pescado soluble en agua (al que se le denominará extracto enzimático) obtenido previamente para la determinación de la actividad proteolítica.

4. PRIMER ENSAYO DE PREPARACIÓN DE ENSILADO

Se realizó un ensayo piloto del ensilado a fin de conocer si las condiciones a usar (temperatura, pH, agitación y la homogeneización del pescado) son adecuadas para la obtención de los ensilados y con base en los resultados, poder elaborar los demás ensilados de estudio.

4.1. Elaboración del ensilado

Para preparar el ensilado se emplearon 50 g de pescado entero previamente homogeneizado, midiéndose el pH inicial. Se adicionó lentamente ácido fórmico concentrado (88% de pureza) hasta llegar a un pH entre 3.8 y 4. El ensilado se preparó en un frasco de vidrio color ámbar de 500 ml de capacidad y se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 14 días, con agitación frecuente. En los días 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12 y 14 se monitoreo el pH y en caso de ser necesario se agregó más ácido fórmico concentrado para mantenerlo al pH deseado.

4.2. Monitoreo de parámetros durante el proceso de ensilado

Se determinó el pH del ensilado mediante el uso de potenciómetro durante un período de 14 días. Además se midió el nitrógeno total (NT) usando el método de Kjeldahl y el nitrógeno no proteínico (NNP) mediante precipitación con ácido tricloroacético al 20% seguido por digestión y destilación de acuerdo al método de Kjeldahl (el procedimiento se describe en el **Anexo 1**). Estas mediciones se realizaron tanto en la materia prima como en el ensilado a las 48, 120, 168 y 216 horas de elaborado, con el fin de conocer el grado de hidrólisis proteínica durante el proceso de ensilado.

5. SEGUNDO ENSAYO PARA OBTENER EL ENSILADO A NIVEL LABORATORIO

5.1. Preparación de los ensilados

Se prepararon 4 ensilados de 200 g de pescado homogeneizado:

1. Con ácido fórmico
2. Con ácido fórmico y BHT
3. Con ácido fórmico y ácido sulfúrico
4. Con ácido fórmico y ácido sulfúrico añadiendo BHT

Esto con el propósito de conocer la efectividad de un sólo ácido (orgánico) y la combinación de dos ácidos (orgánico e inorgánico) en la conservación de los ensilados y además determinar, en estos mismos ensilados, la eficacia del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) al 0.02% en el control de la oxidación de las grasas.

El procedimiento de elaboración se describe a continuación:

Ensilados utilizando ácido fórmico. Se midió el pH inicial de la materia prima homogeneizada y se fue agregando ácido fórmico concentrado (88% de pureza) hasta llegar a un pH entre 3.8 y 4. En el caso del ensilado con BHT, el antioxidante se agregó en una cantidad de 0.02% del contenido lipídico de la muestra, antes de la adición del ácido. Se monitoreo el pH durante el período de incubación y de ser necesario se agregó más ácido para mantener el pH menor a 4. La proporción total de ácido añadido fue de 1.85% y 1.95% v/p para el ensilado control y el ensilado con BHT respectivamente.

Ensilados utilizando ácido fórmico y ácido sulfúrico. Se siguió el procedimiento anterior sólo que se adicionó ácido fórmico concentrado (88% de pureza) y ácido sulfúrico concentrado (96.7% pureza). La concentración final de ácido fórmico y sulfúrico utilizados fue de 0.85% y 0.7% v/p respectivamente, tanto en el ensilado control y con BHT.

5.2. Medición de pH, nitrógeno total (NT) y nitrógeno no proteínico (NNP).

A la materia prima se le determinó el pH, NT y NNP para conocer las condiciones iniciales al proceso de ensilado. A los 4 ensilados se les midió el pH los días 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 22, 30 y 45; para conocer el desarrollo de la hidrólisis proteica se determinó por triplicado el contenido de NT y NNP los días 1, 3, 6, 8 y 45.

5.3. Determinación del grado de oxidación en la grasa de los ensilados.

Se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico basado en la reacción de malonaldehído con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para obtener un pigmento rojo que resulta de la condensación de dos moléculas de TBA con una molécula de malonaldehído (MDA) y la probable eliminación de 2 moléculas de agua (figura 5).

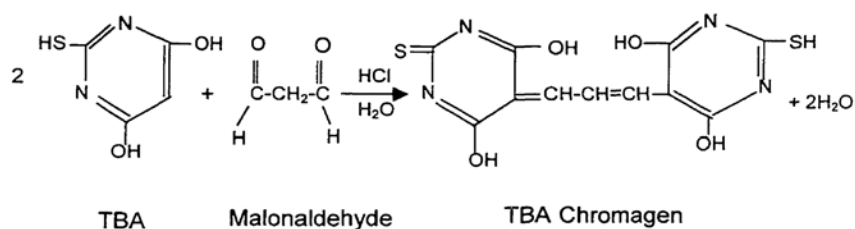


Figura 5. Reacción entre el TBA y MDA.

La intensidad del color rojo desarrollado es una medida de la concentración de MDA, esta se mide espectrofotométricamente a 538 nm. Los resultados se expresan como aldehído malónico por referencia a una gráfica estándar que se prepara usando 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), que produce aldehído malónico por hidrólisis ácida.

Dentro de las variantes de este método se utilizó la técnica de Vyncke (1970) la cual esta basada en una extracción ácida de la muestra con ácido tricloroacético antes de la reacción con TBA. Esta técnica puede ser considerada como la mejor para estimar el contenido de MDA en muestras cárnicas, porque la carne no es expuesta a un tratamiento térmico, además es más rápida y fácil de realizar que el método de destilación, con el que guarda una alta correlación (Fernández *et al.*, 1997).

Esta medición se llevó acabo tanto a la materia prima homogeneizada como a los ensilados durante los días 6, 15, 30 y 45.

6. OBTENCIÓN DEL ENSILADO PARA SU EVALUACIÓN NUTRIMENTAL.

En esta etapa se evaluó la calidad nutrimental del producto obtenido y se comparó con el pescado sin procesar con el objetivo de conocer si durante el proceso de ensilado hay alguna afectación de las características nutricias del pescado. También fue examinada la adición de sorgo al ensilado para determinar si hay una mejora de la calidad nutricia. Se escogió este cereal debido a que en México es generalmente usado para alimentación animal (Serna, 1996), además de no ser deficiente en triptofano, aminoácido que ha sido encontrado como principal limitante en ensilados ácidos de pescado (Vizcarra, 1998; Vidotti *et al.*, 2003).

6.1. Elaboración del ensilado.

El pescado entero almacenado a -50 °C fue descongelado y homogeneizado en una licuadora industrial marca Momat L-10. Se utilizaron 2017 g de este pescado homogeneizado, al cual se le añadieron 200 ml de agua desionizada para facilitar su agitación y ayudar a una mejor distribución del antioxidante y de los ácidos adicionados. Se utilizó como antioxidante BHT al 0.02% con respecto al contenido lipídico del pescado y ácido fórmico diluido (1:4) para mantener el pH entre 3.8-4, la proporción total de ácido diluido añadido fue de 11.68% v/p. La incubación del ensilado se realizó a temperatura ambiente ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$ en el día) los primeros 3 días del proceso y posteriormente se incubó 5 días más a 37°C, se incluyó agitación manual frecuente durante todo el período de incubación.

6.2. Secado del ensilado.

El ensilado se sometió a secado empleando una estufa con corriente de aire Lab-Line Mod. Imperial III a una temperatura de entre 65 y 70 °C por aproximadamente 8 horas. Ya secó el producto se molió en un molino Thomas-Wiley Mod. No.4, hasta obtener una harina homogénea con un tamaño de partícula de 0.5 mm.

6.3. Preparación de las dietas para el estudio biológico.

6.3.1. Materias primas.

Para la posterior elaboración de las dietas a evaluar en el ensayo biológico las materias primas se obtuvieron de la siguiente forma:

Ensilado

Se realizó de la manera en que se indica en las secciones 6.1 y 6.2.

Harina de pescado diablo

Se licuó pescado entero que había sido almacenado a -50°C en una licuadora industrial marca Momat L-10 y se agregó BHT en una cantidad de 0.02% con respecto al contenido de grasa. Enseguida se extendió en charolas y se seco a una temperatura de entre 65 y 70°C por aproximadamente 4 horas en una estufa con corriente de aire Lab-Line Mod. Imperial III. Una vez secó el producto se molió en un molino Thomas-Wiley mod. No.4, hasta obtener una harina homogénea con un tamaño de partícula de 0.5 mm.

Harina de sorgo

Se utilizó sorgo entero (*Sorghum vulgare*) el cual se molió en un molino Thomas-Wiley mod. No.4, hasta obtener una harina homogénea con un tamaño de partícula de 0.5 mm.

A estas harinas se les realizó el análisis proximal (contenido de humedad, proteína cruda, grasa cruda y cenizas totales) con los procedimientos de la AOAC (1990) descritos en el **Anexo 1**, con la finalidad de poder preparar las dietas de ensayo isoproteínicas e isocalóricas, guardando la misma proporción de ingredientes respecto a la dieta de referencia.

6.3.2. Dietas de estudio.

Las dietas que se utilizaron en el bioensayo fueron:

- A. Dieta control de caseína (10% de proteína)
- B. Dieta de harina de pescado (10% de proteína)
- C. Dieta de harina de ensilado de pescado (10% de proteína)
- D. Dieta de harinas de ensilado de pescado más sorgo (10% de proteína, 50:50)

La formulación de éstas dietas se muestra en la tabla 1 y el procedimiento para prepararlas se describe en el **Anexo 2**.

Tabla 1. Composición de las dietas empleadas en la prueba biológica (g/100 g de dieta).

Ingrediente	Caseína, dieta control	Harina de pescado	Harina de ensilado	Harina de ensilado:harina de sorgo
	10% proteína			10% proteína, 50:50
Caseína (90%)	11.11	-	-	-
Harina de pescado	-	19.81	-	-
Harina de ensilado	-	-	21.55	10.77
Harina de sorgo	-	-	-	56.88
Sacarosa	22.00	21.43	21.20	7.24
Dextrina	25.00	24.35	24.09	8.22
Dextrosa	19.00	18.51	18.31	6.25
Manteca vegetal	8.00	7.31	7.21	6.69
Aceite de maíz	6.00	5.49	5.40	5.02
Mezcla de sales	4.00	-	-	0.17
Mezcla de vitaminas	2.00	2.00	2.00	2.00
Celulosa	2.89	1.10	0.24	-

6.4. Evaluación biológica del ensilado.

6.4.1. Relación de Eficiencia Proteínica (REP).

Se realizó el método biológico de REP que se utiliza para evaluar la calidad de una fuente proteínica y se basa en que, el incremento en peso de las ratas alimentadas con una dieta bajo condiciones estandarizadas, provee una medida confiable del valor nutritivo de la proteína. El procedimiento realizado se describe en el **Anexo 2**.

6.4.2. Digestibilidad “in vivo”.

Como otro indicador de la calidad proteínica del producto se determinó la digestibilidad “in vivo” de cada una de las dietas en los días 13 al 17 del ensayo. La digestibilidad de una proteína se puede considerar como un índice de su calidad y se refiere a la biodisponibilidad de los aminoácidos constituyentes de la proteína para ser absorbidos por el organismo de ensayo. El procedimiento que se llevó a cabo se describe en el **Anexo 2**.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos del ensayo de TBA se empleó la *prueba t de student* para establecer la existencia de diferencias significativas entre la prueba control y el ensayo con antioxidante de los ensilados elaborados. Para la evolución del NNP se utilizó análisis multivariado y para la evaluación biológica se realizó *análisis de varianza ANOVA de una vía*, con una *prueba de rangos múltiples de Tukey* con una probabilidad $p < 0.05$, haciendo uso del programa estadístico MINITAB 14, este análisis se muestra en el **Anexo 5**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

COMPOSICIÓN PROXIMAL DEL PESCADO

En la tabla 2 se observa que el pez diablo (al igual que otros peces) proporciona más del 50% de proteína en base seca, por lo que se le considera una importante fuente proteínica. Presenta un valor medio de grasa comparado con el 0.1% a 0.3% que muestran los peces muy magros y el 16% a 26% que contienen los peces grasos (Belitz, 1988). Su contenido de cenizas es alto y se debe a que se utilizó el pez completo, el cual tiene placas óseas recubriendo casi todo su cuerpo. Otros peces presentan un 9% a 45% de cenizas si la fracción ósea no ha sido extraída. Las cenizas se relacionan con una importante fuente de minerales entre ellos calcio, fósforo, sodio y potasio (Peralta, 2003). El contenido de carbohidratos puede provenir del alimento que ingirió el pez antes de su captura, ya que en el músculo del pescado la cantidad de carbohidratos generalmente es inferior al 0.5%.

Tabla 2. Análisis proximal de pescado diablo (g/100g de muestra)¹.

Componente	Base húmeda	Base seca
Humedad	74.50±0.02	-
Proteína	13.07±0.13	51.26±0.51
Grasa	1.34±0.05	5.26±0.18
Cenizas	8.16±0.04	31.99±0.15
Hidratos de carbono ²	2.93	11.49

1. Promedio de triplicado±desviación estándar; C.V.<5%.

2. Calculados por diferencia.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS ENZIMAS DEL PESCADO

En el ensilado se aprovechan las enzimas propias del pescado para que se lleve a cabo la licuefacción, de ahí la importancia de conocer el estado inicial de actividad de estas enzimas. El contenido de proteína de los extractos enzimáticos, analizados por el método de Lowry (1951), se muestra en la tabla 3. Con estos valores se calculó la actividad específica de las enzimas proteolíticas del pez diablo (tabla 4), la cual se da principalmente por las proteasas digestivas del tipo de la pepsina, debido a las condiciones ácidas de evaluación.

Tabla 3. Contenido de proteína de los extractos del pescado diablo.

Extracto ¹	mg proteína/ml extracto
1	6.21±0.19
2	7.04±0.17
Promedio	6.63

1. Promedio de triplicado±desviación estándar.

Tabla 4. Actividad proteolítica del pescado diablo.

Extracto ¹	Actividad enzimática U/ml extracto	Actividad específica U/mg proteína
1	0.118±0.009	0.019±0.001
2	0.127±0.004	0.018±0.001
Promedio	0.1225	0.0185

1. Promedio de triplicado±desviación estándar.

2. Unidad de Actividad (U)= μmol Tirosina/min

La actividad específica promedio de las enzimas proteolíticas fue de 0.0185 U/mg proteína del extracto enzimático, donde una unidad de actividad (U) es la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de tirosina a partir del sustrato hemoglobina por minuto. Este resultado es semejante al encontrado por Stoknes *et al.* (2005) en el músculo de bacalao, ya que presentó una actividad proteolítica específica de 0.0120 U/mg proteína, utilizando un método similar de evaluación de actividad enzimática. Así mismo, Uys y Hetch (1987) al evaluar la actividad proteolítica total del estómago del pez gato *Clarias gariepinus*, mediante el método de Anson (1938) modificado por Walter (1984), determinó que la actividad de las proteasas gástricas era de 0.0179 U/mg de estómago.

La actividad proteolítica encontrada en este estudio corresponde a la del pez diablo completo, y por tanto se podría esperar una actividad mayor si se utilizará sólo las vísceras del pescado; de manera similar al trabajo realizado por Vizcarra (1998). Este autor encontró una actividad proteolítica específica en vísceras de atún 10 veces mayor a la actividad observada en este trabajo (0.1844 U/mg proteína), utilizando el mismo método modificado de Anson (1938), lo cual se puede deber a la rica fuente de enzimas proteolíticas en el tracto digestivo del pescado.

Otros estudios nos pueden dar una idea de la actividad proteolítica en peces (Viana *et al.*, 1993; Chong *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 1999), sin embargo no se pueden comparar cuantitativamente las actividades enzimáticas, debido a diferencias en muestreo, preparación del extracto enzimático de los tejidos y los métodos empleados para la evaluación de dichas actividades.

Por tanto se puede concluir que la actividad proteolítica del pescado diablo no se considera baja, si se toma en cuenta que se utilizó pescado entero en la determinación, ya que permitió la rápida licuefacción del pescado y por tanto la obtención del ensilado líquido como se discutirá más adelante.

PRIMER ENSILADO ELABORADO A NIVEL LABORATORIO

Este primer ensilado fue una prueba piloto que tenía por finalidad establecer las condiciones óptimas para elaborar el ensilado. Por lo cual se siguió el desarrollo de pH y nitrógeno no proteínico (NNP) en el ensilado bajo las condiciones ensayadas.

pH

El pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier cambio que puede afectar al producto. El pH de la materia prima antes de ensilar fue de 6.5, se ha informado que uno de los índices de calidad del pescado es el pH, el cual si es fresco debe estar entre 6 y 6.5, cuando llega a 7 o más se considera descompuesto (Belitz, 1988).

El pH de la materia prima se bajo mediante la adición de ácido fórmico concentrado y se mantuvo en un rango de 3.8-4, esto para dar las condiciones óptimas de actividad proteolítica haciendo que la licuefacción del ensilado se dé en el menor tiempo posible; por esta misma razón se incubó a 37 ± 1 °C y se agitó frecuentemente. Además el bajo pH ayuda al control microbiológico y a la conservación del producto. Se utilizó ácido fórmico para la elaboración de este primer ensilado porque es uno de los más utilizados y efectivos en la preparación de ensilados de pescado (Raa y Gildberg, 1982; Espe y Lied, 1999, Espe *et al.*, 1992). En la tabla 5 se presenta la evolución y control de pH en el ensilado, este parámetro se mantuvo prácticamente constante a partir de las 48 h y se llegó a un pH final de 3.8 con la adición de 1.5% v/p de ácido fórmico.

Tabla 5. Comportamiento del pH en el ensilado piloto.

Tiempo (h)	pH
0	3.50 ¹
24	4.20
24	3.85 ²
48	4.05
48	3.90 ³
96	3.90
120	3.80
144	3.95
168	4.00
168	3.85 ⁴
192	3.65
216	3.85
288	3.85
336	3.80

1. Adición de 0.50 ml de ácido fórmico.

2 y 3. Adición de 0.10 ml de ácido fórmico.

4. Adición de 0.05 ml de ácido fórmico.

Nitrógeno total (NT) y Nitrógeno no proteínico (NNP)

Durante el ensilado la autólisis toma lugar y el pescado gradualmente se licúa como resultado de que la matriz proteica es parcialmente solubilizada, debido a la hidrólisis producida por enzimas endógenas. Una de las formas de seguir la evolución de la proteólisis es mediante el nitrógeno no proteínico (NNP), es por ello que se realizó en cada punto de monitoreo (0, 48, 120, 168 y 216 h) la determinación del NNP y además el NT para evitar

algún error por la evaporación de agua a 37°C, lo que podría hacer variar su concentración relativa. De la relación entre estos dos parámetros (NNP/NT) se obtuvo el índice de hidrólisis que indica la cantidad de NT que es hidrolizado durante el desarrollo del ensilado.

Como se observa en la tabla 6 la materia prima presentó una proteólisis de 28.29% y este valor aumentó rápidamente, observándose que a las 120 horas alcanza su valor máximo de 95.84% el cual se mantiene sin diferencia significativa ($p < 0.05\%$) hasta el final del ensayo a las 216 horas (figura 6). Este resultado concuerda con el encontrado por Haard *et al.* (1985), en el que reporta que más del 90% del nitrógeno orgánico llega a solubilizarse en ensilados ácidos; a diferencia de los ensilados biológicos en los que se obtiene una solubilización de alrededor de 60-70%.

Tabla 6. NT y NNP en el ensilado obtenido con ácido fórmico (%)¹.

Tiempo(h)	NT	NNP	Índice de hidrólisis
0	1.44	0.41	28.29
48	1.49	0.48	32.32
120	1.43	1.37	95.84
168	1.61	1.56	96.51
216	1.65	1.58	95.70

1. Por duplicado.

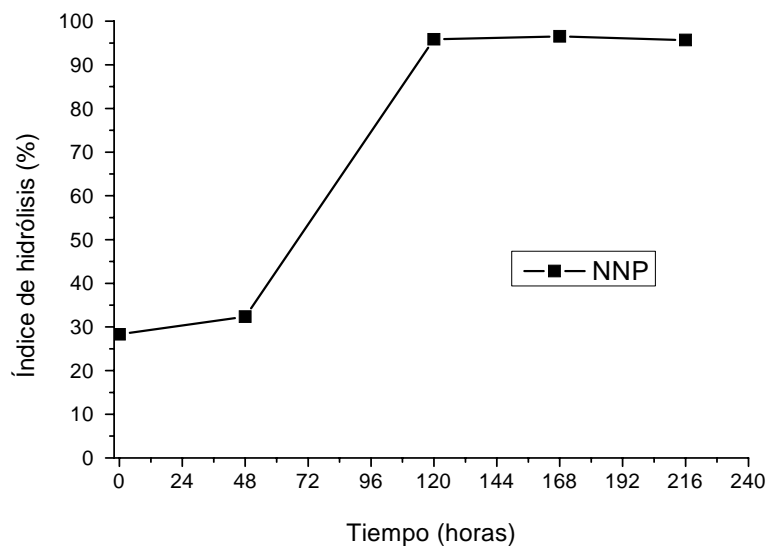


Figura 6. Evolución de la hidrólisis proteica en la prueba piloto.

Con esta prueba piloto se puede concluir que las condiciones experimentales usadas: temperatura de incubación a 37°C, reducción del pH a 3.8-4.0, homogeneización del pescado y agitación periódica fueron adecuadas para la obtención de un ensilado estable, con buenas características y en un corto período de tiempo. Por tal motivo, estas mismas condiciones fueron empleadas para trabajar en las siguientes etapas de estudio.

SEGUNDO ENSAYO DE ELABORACIÓN DE ENSILADOS

En esta prueba se estudiaron ensilados elaborados con dos tipos de ácidos. Se utilizó ácido fórmico estudiado anteriormente pero ahora con la adición de un antioxidante (BHT) y se comparó con su control sin antioxidante. Además se evaluó una combinación de ácidos fórmico y sulfúrico (1:0.82) también con BHT y su respectivo control.

Desarrollo de pH

A la materia prima homogeneizada se le midió el pH el cual varió de 6.55 a 6.60 confirmando un buen grado de frescura para utilizarse en la elaboración de los ensilados. La calidad de la materia prima es importante para la obtención de un producto con buenas características, así en Malawi, encontraron que un ensilado elaborado de pescado descompuesto se digirió muy rápido y con una formación considerable de gas con respecto a un ensilado control hecho de pescado fresco, concluyendo que el primero no era apto para consumo animal (Neave, 1986).

El comportamiento del pH de los ensilados elaborados se presenta en la tabla 7. Se adicionó ácido fórmico a la materia prima para elaborar los dos primeros ensilados (con y sin antioxidante) bajando el pH a 3.8. Se siguió controlando el pH los días subsecuentes, ya que si llega a estar por arriba de 4 la conservación del producto durante el almacenamiento puede afectarse debido al crecimiento microbiano. A partir de las 48 h de ensilado el pH se mantiene prácticamente sin cambios, presentando un valor final de 3.75 después de un almacenamiento de 45 días.

Tabla 7. Comportamiento del pH de los ensilados.

Día	Fórmico sin BHT	Fórmico con BHT	Fórmico+sulfúrico sin BHT	Fórmico+sulfúrico con BHT
0	6.60	6.55	6.55	6.55
0	3.80 ¹	3.85 ⁵	3.40 ⁹	3.30 ¹³
1	4.30	4.10	4.30	4.30
1	3.90 ²	3.90 ⁶	3.80 ¹⁰	3.80 ¹⁴
2	4.05	4.00	4.00	4.00
2	3.85 ³	3.90 ⁷	3.80 ¹¹	3.80 ¹⁵
3	4.20	4.10	4.10	4.20
3	3.85 ⁴	3.80 ⁸	3.80 ¹²	3.70 ¹⁶
6	3.80	3.80	3.80	3.70
7	3.75	3.70	3.70	3.70
8	3.55	3.45	3.50	3.45
9	3.70	3.65	3.70	3.60
10	3.70	3.65	3.65	3.60
15	3.70	3.65	3.70	3.65
22	3.70	3.65	3.70	3.65
30	3.70	3.75	3.80	3.75
45	3.75	3.75	3.80	3.75

1, 2, 3, 4 es la adición de 1.7, 0.5, 0.3, 1.2 ml de ácido fórmico

5, 6, 7, 8 es la adición de 2, 0.5, 0.2, 1.2 ml de ácido fórmico

9, 13 es la adición de 0.5 ml fórmico+1.0 ml sulfúrico

10, 14 es la adición de 0.5 ml fórmico

11, 15 es la adición de 0.3 ml fórmico

12, 16 es la adición de 0.4 ml fórmico+0.4 ml sulfúrico

Al agregar los dos tipos de ácidos (ácido fórmico y ácido sulfúrico), el pH de los ensilados descendió a 3.4 y 3.3, valores más bajos de lo que se deseaba (3.8-4.0), sin embargo a las 24 h el pH subió a 4.3 debido probablemente por un lado a la generación de bases volátiles y compuestos nitrogenados que incrementan el pH y por el otro a la neutralización de carbonatos presentes en la materia mineral del pescado (Bello *et al.*, 1992; Haaland y Njaa, 1989; Viana *et al.*, 1993). Lo que ayudó a regular el pH dentro del rango previsto, en el cual se evita el crecimiento microbiano y se dan buenas condiciones de licuefacción, además de que posiblemente se disminuye el daño a los aminoácidos inestables en medio ácido. El pH se mantuvo sin cambios a partir de las 72 horas y su valor final en los ensilados control y con antioxidante fue de 3.8 y 3.75 respectivamente.

La utilización de una mezcla de ácido fórmico y ácido sulfúrico ha sido evaluada en ensilados a partir de fauna de acompañamiento del camarón (Rodríguez *et al.*, 1990 a,b) y usando desperdicios de atuneras (Vizcarra, 1998). Estudios que indicaron al igual que en este trabajo, que el proceso de ensilado fue adecuado y factible, obteniéndose un producto estable y de buena calidad. La elaboración de ensilados con esta mezcla de ácidos disminuye los costos de producción, ya que en general los ácidos orgánicos son más caros que los inorgánicos; sin embargo, al ser un ácido mineral puede aumentar el contenido de cenizas en el producto elaborado.

Nitrógeno total (NT) y Nitrógeno no proteínico (NNP)

La licuefacción del ensilado usualmente se mide a través de NNP aunque hay otras formas de hacerlo, como es mediante el líquido exudado o la viscosidad. En este caso se determinó el NNP y además el NT de la materia prima y de los ensilados en los días 1, 3, 6, 8 y 45 (los resultados se muestran en el **Anexo 3**). La determinación conjunta de estos dos parámetros fue con el objetivo de evitar algún error por la posible evaporación de agua en los ensilados a 37°C, lo cual podría hacer variar la concentración relativa de nitrógeno y afectar los valores del %NNP.

Como se muestra en la tabla 8, el contenido de NNP en la materia prima y su desarrollo en los ensilados es similar al encontrado en el primer ensayo, mostrándose un proceso de ensilado reproducible. La evolución del NNP se lleva a cabo rápidamente y a las 24 horas se tiene un 71.18% y 74.37% de hidrólisis en los ensilados elaborados con ácido fórmico, sin diferencias significativas entre el ensilado con antioxidante y su control. Sin embargo la hidrólisis en los ensilados elaborados con la mezcla de ácidos fue menor, con un 61.77% y 63.98 % para el ensilado con antioxidante y su control respectivamente, sin diferencias significativas entre estos dos ensilados.

Tabla 8. Índice de hidrólisis proteínica en los ensilados elaborados con ácido fórmico y ácido fórmico+sulfúrico¹.

Día	Fórmico sin BHT	Fórmico con BHT	Fórmico+sulfúrico sin BHT	Fórmico+sulfúrico con BHT
0	26.34±1.26	26.34±1.26	26.34±1.26	26.34±1.26
1	71.18±2.61	74.37±2.89	63.98±2.08	61.77±1.99
3	76.99±2.50	76.29±1.67	79.51±0.60	76.82±2.60
6	92.00±2.68	91.85±2.36	93.40±2.28	93.75±1.79
8	89.26±1.80	92.64±2.17	92.44±1.26	90.65±3.69
45	91.79±1.06	90.17±2.48	93.78±1.53	92.30±1.03

1. Expresado como % de nitrógeno no proteínico del nitrógeno total. Promedio de triplicado±desviación estándar. CV < 5%.

En el día 6 todos los ensilados presentaron una hidrólisis superior al 90% sin diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$), este resultado se repitió en los días 8 y 45, mostrando que no hay una relación significativa entre el tipo de ácido usado y el antioxidante añadido, con el porcentaje de hidrólisis desarrollado, a partir del día 6 del proceso de ensilado (figura 7). De tal modo que el uso del mismo lote de pescado y condiciones iguales de elaboración de los ensilados, resultan en un proceso reproducible y que fue independiente de la adición de un ácido o una mezcla de ácidos.

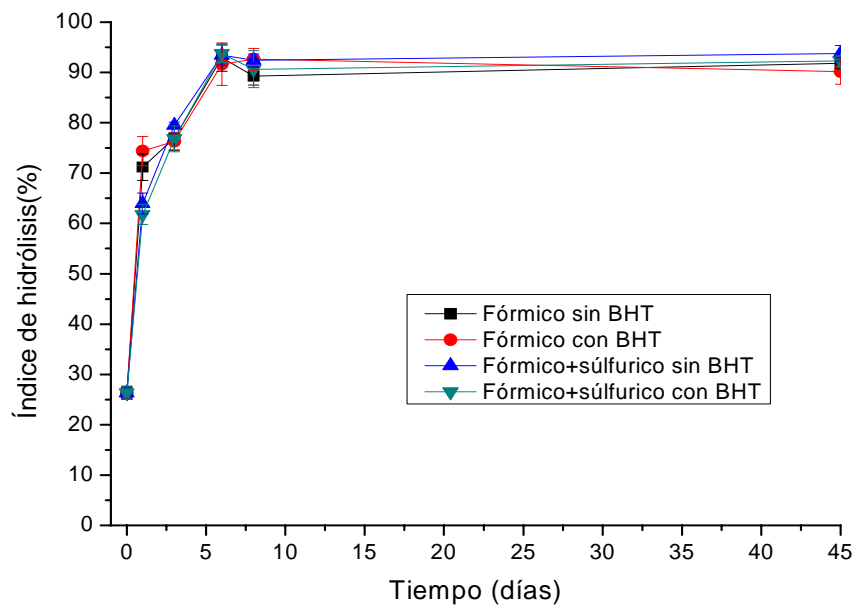


Figura 7. Evolución de NNP en los ensilados.

La licuefacción en los ensilados ensayados es comparable al obtenido con ensilados de merluza utilizando ácido fórmico al 3% y almacenados a 20°C por 15 días. En donde se alcanzó una hidrólisis de 84% expresada como %NNP (Dapkevicius *et al.*, 1998). En otras publicaciones se ha informado que para diferentes ensilados más del 70% del nitrógeno presente puede solubilizarse en una semana, pero esto es dependiente de la temperatura.

El índice de hidrólisis es resultado de la actividad de las enzimas proteolíticas presentes en el músculo y las vísceras del pescado. Esta actividad se manifestó desde el inicio del proceso de ensilado, ya que al adicionar ácido (pH de 3.8-4.0) e incubar a 37 °C se dieron las condiciones óptimas de proteólisis y que explican la alta solubilización proteica en las primeras 24 horas del proceso (figura 7); obteniendo el producto completamente licuado a los 6 días.

En relación a la importancia de la actividad proteolítica para la producción de ensilados, es necesario destacar que la hidrólisis depende del tipo de materia prima utilizada, aún en las mismas condiciones de temperatura y pH; ya que el contenido de enzimas así como el estado de las mismas pueden afectar la hidrólisis. Como lo encontraron Espe y Lied (1999) al almacenar a 20°C, ensilados elaborados con diferentes materiales (arenque entero, caballa entera, vísceras de bacalao y desechos del fileteo de bacalao) agregando ácido fórmico (85% pureza) al 2.2% v/p.

La alta solubilización proteica que se obtuvo en los ensilados probablemente indica elevados contenidos de aminoácidos libres y péptidos de cadena corta. Lo que puede resultar ventajoso, ya que esta proteína digerida puede ser rápidamente absorbida y conducir a la síntesis de proteínas, como se presentó en estudios realizados con pollos (Espe *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1985), salmón (Jackson *et al.*, 1984 a,b) y cerdos.

Oxidación lipídica

Un control cuidadoso del grado de proteólisis y oxidación lipídica es requerido para producir ensilados con alto valor nutricional, es así que además del monitoreo de NNP se siguió la oxidación de los lípidos mediante el método del ácido tiobarbitúrico, técnica muy utilizada para medir el deterioro de lípidos en alimentos cárnicos.

Los valores del ácido tiobarbitúrico para los ensilados elaborados con ácido fórmico y su combinación con ácido sulfúrico se muestran en las tablas 9 y 10 respectivamente. La materia prima empleada no presentó una rancidez importante, ya que su valor inicial de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresado como malonaldehído fue de 2.36 mg/kg de pescado. Valor menor al encontrado por Vizcarra (1998) de 7.58 mg/kg en vísceras de atún y por Santana (2004) de 23.04 mg/kg en pescado sierra, autores que utilizaron la misma técnica de evaluación de la oxidación lipídica usada en este trabajo. Sin embargo, el contenido de lípidos de las materias primas en los trabajos de estos autores, fueron superiores al del pez diablo; lo que puede justificar el mayor contenido de aldehído malónico reportado.

Tabla 9. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico^{1,2,3}.

Días	Sin BHT	Con BHT
0	2.36±0.06 ^a	2.36±0.06 ^a
6	3.95±0.20 ^a	2.05±0.04 ^b
15	4.22±0.21 ^a	1.91±0.11 ^b
30	3.15±0.11 ^a	1.74±0.03 ^b
45	1.88±0.05 ^a	1.56±0.04 ^b

1. Expresadas como malonaldehído mg/kg muestra.
 2. Promedio de triplicado±desviación estándar. CV < 5%.
 3. Promedios con diferentes letras dentro de la misma hilera son significativamente diferentes (p<0.05).
- BHT: Butilhidroxitolueno

Tabla 10. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico+sulfúrico^{1,2,3}.

Días	Sin BHT	Con BHT
0	2.36±0.06 ^a	2.36±0.06 ^a
6	4.06±0.06 ^a	3.38±0.09 ^b
15	3.47±0.04 ^a	2.83±0.15 ^b
30	3.43±0.16 ^a	2.94±0.01 ^b
45	1.91±0.09 ^a	1.83±0.02 ^a

1. Expresadas como malonaldehído mg/kg muestra.
 2. Promedio de triplicado±desviación estándar. CV < 5%.
 3. Promedios con diferentes letras dentro de la misma hilera son significativamente diferentes (p<0.05).
- BHT: Butilhidroxitolueno

El ensilado con ácido fórmico sin antioxidante presenta un rápido incremento en el contenido de malonaldehído (MDA), teniendo su máximo al día 15 y posteriormente presenta un descenso. El ensilado con BHT en cambio tiene valores casi constantes durante todo el almacenamiento (figura 8).

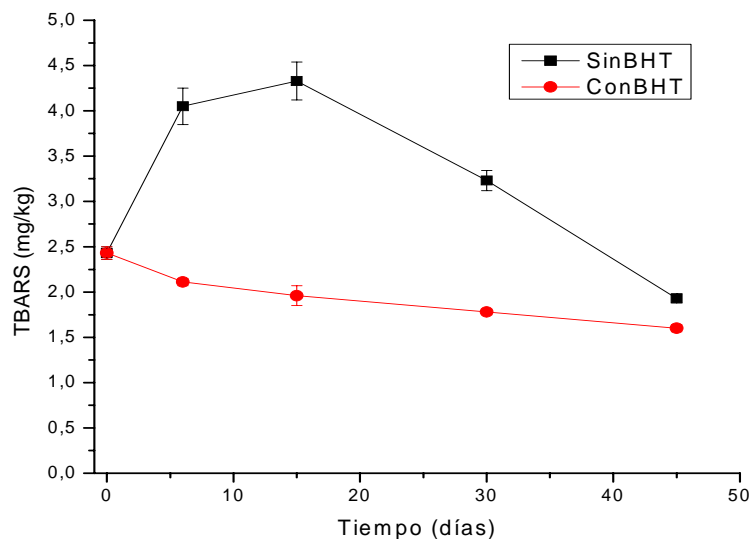


Figura 8. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico.

Para los ensilados elaborados con una combinación de ácidos, se observan valores menores de malonaldehído (MDA) en el ensilado con antioxidante comparado con el control (figura 9), sin embargo en el día 45 no se presentan diferencias significativas en el contenido de MDA entre estos dos ensilados ($p < 0.05$).

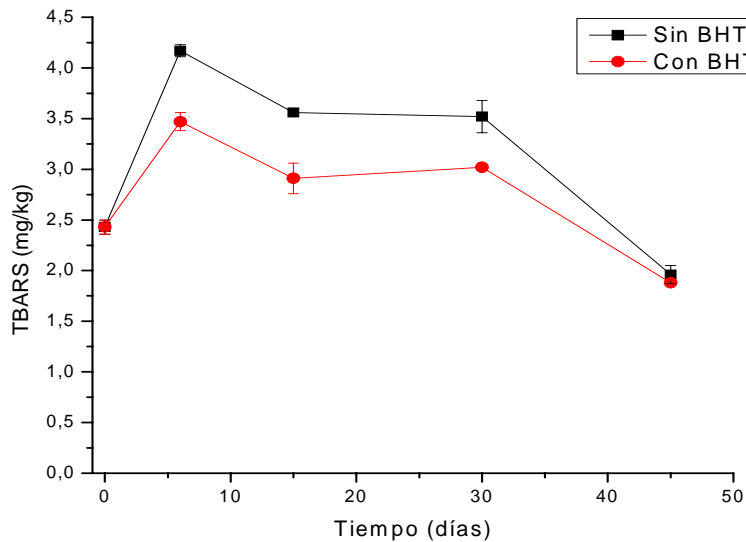


Figura 9. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los ensilados elaborados con ácido fórmico y sulfúrico.

Conforme pasan los días de almacenamiento de los ensilados (sobre todo en los ensilados sin antioxidante) se observa un ligero decremento en los valores de MDA, hecho que ha sido explicado por Buttkus y Bose (1972). Estos autores indican que el MDA (producto final de la descomposición oxidativa) es un producto que reacciona paulatinamente con las proteínas y aminoácidos (el grupo amino de la lisina se considera entre los más susceptibles), resultando en bajos desarrollos de color. Con respecto a estas interferencias Fernández *et al.* (1997) mencionan que el MDA puede formar enlaces con fracciones proteicas solubles en agua (1.3-2.6 g MDA/mg de proteína), reaccionando preferentemente con histidina, arginina, tirosina y metionina. Por tal motivo en los ensilados, donde se sabe hay abundancia de proteínas solubles en agua, péptidos y aminoácidos libres; se pueden observar interferencias en la formación del pigmento rojo, lo que puede justificar los resultados obtenidos.

Resultados similares al comportamiento de los valores de MDA observados en el presente estudio, fueron encontrados por Santana (2004) en ensilados elaborados con pez sierra y almacenados por 2 meses, usando TBHQ como antioxidante. También Machin *et al.* (1990) en ensilados ácidos preparados de pescado con alto y bajo contenido en grasa, encontraron un comportamiento semejante en los valores de rancidez, medidos con el método del ácido tiobarbitúrico. Estos presentaron un rápido incremento al día 3, una caída en el décimo día y a partir del día 14 permanecieron constantes hasta el día 88 de almacenamiento. Reportando valores iniciales de

malonaldehído de 3.3 y 77.3 mg/ kg de materia seca en los pescados con bajo y alto contenido en grasa respectivamente, hasta un valor máximo de 25.0 y 271.3 mg/kg de ensilado seco en el tercer día de almacenamiento. Al igual que en el presente trabajo utilizaron BHT a 200 ppm del contenido de grasa, usando un control sin antioxidante, pero a diferencia de lo obtenido en este estudio, no encontraron diferencias en los valores de MDA entre ensilados con antioxidante y sin antioxidante.

Al usar el método de ácido tiobarbitúrico propuesto por Vynke (1970) en ensilados de desperdicios de atuneras, Vizcarra (1998) reportó que no se detectaron adecuadamente los niveles de rancidez expresados como malonaldehído al cabo de 15 días, ya que los valores encontrados en la materia prima descendían drásticamente a partir de la primera quincena de almacenamiento. Sin embargo hay que considerar que la materia prima ya presentaba signos de deterioro lipídico por las condiciones y tiempo de almacenamiento.

Los valores encontrados de MDA indican el buen estado del aceite en los ensilados elaborados y son comparables a los reportados por Farkas *et al.* (1997) de 6 mg de malonaldehído por kg de aceite de pescado recién extraído, llegando a un máximo de 1700 mg de malonaldehído por kg del aceite después de 50 días de almacenamiento, utilizando TBHQ al 0.02% como antioxidante.

En general para los ensilados con antioxidante se observa una clara diferencia en el menor contenido de malonaldehído con respecto a sus controles sin BHT, lo que indica la efectividad del antioxidante como protector de los lípidos presentes en los productos preparados y almacenados por mes y medio.

El alto nivel de lípidos insaturados en el aceite de ensilado de pescado lo hacen susceptible a la oxidación. Es así que un inadecuado control en la oxidación de lípidos produce ensilados con olor y sabor rancio, características que pueden afectar la palatabilidad y consumo del producto. Además los productos de descomposición lipídica pueden resultar inseguros y se les ha relacionado con el reducido crecimiento reportado en algunos bioensayos. Es por ello, que como en el presente trabajo, se debe adicionar un antioxidante al pescado fresco antes de ensilar con el fin de evitar la rancidez de lípidos y sus indeseables consecuencias.

EVALUACIÓN NUTRIMENTAL DEL ENSILADO

Obtención del ensilado

El ensilado destinado para su evaluación nutricional mediante una prueba biológica se elaboró de manera similar a los otros ensayos, sin embargo debido a que, por cuestiones de tiempo no se podía controlar su agitación y en general su hidrólisis, se decidió que los primeros 3 días del proceso transcurrieran a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) y los días restantes a 37°C. Esta modificación puede explicar que al día 7 y 8 del proceso se presentara un índice de hidrólisis de 84.09% y 83.44% de NNP, menor al obtenido en los estudios previos. El pH final del ensilado fue de 3.85 mediante la adición de 11.68% v/p de ácido fórmico diluido (1:4).

Secado y análisis proximal del ensilado

En la tabla 11 se muestra el análisis proximal del ensilado, el cual presenta un elevado contenido de agua debido al uso de pescado fresco y adición de ácido. Es por ello que se necesitó secarlo para la elaboración de las dietas.

El secado se realizó al ensilado solo a una temperatura de 65-70 °C en estufa de corriente de aire, a fin de poderlo manejar fácilmente y preparar las dietas a evaluar. Durante el secado se pierde parte del ácido fórmico contenido en el producto (Machin *et al.*, 1990), lo que es deseable para que las dietas preparadas no tengan un gusto ácido, que podría afectar su consumo en la prueba biológica con ratas. Comercialmente el secado del ensilado tiene la ventaja de reducir los costos de transporte y almacenamiento y su manejo para la elaboración de dietas resulta más sencillo.

Tabla 11. Composición proximal del ensilado en base húmeda y base seca¹ (g/100 g muestra).

Componente	Base húmeda	Base seca
Humedad	80.24±0.31	-
Proteína cruda	9.97±0.13	50.45±0.68
Grasa cruda	1.38±0.05	7.00±0.28
Cenizas totales	6.01±0.03	30.43±0.14
Hidratos de carbono ²	2.40	12.13

1. Promedio de triplicado±desviación estándar.

2. Calculados por diferencia.

Análisis proximal de las materias primas para la elaboración de dietas

Para preparar las dietas de ensayo se elaboraron las harinas de pescado, ensilado y sorgo, cuya composición proximal se muestra en la tabla 12. Todas las harinas presentaron menos del 10% de humedad como debe ser en una harina para su conservación.

Tabla 12. Composición proximal de las materias primas en base húmeda¹ (g/100 g muestra).

Componente	Harina de sorgo	Harina de ensilado	Harina de pescado
Humedad	9.63±0.02	7.99±0.33	5.17±0.07
Proteína cruda	8.79±0.08	46.41±0.62	50.49±0.37
Grasa cruda	2.81±0.13	6.44±0.25	6.08±0.36
Cenizas totales	1.42±0.02	28±0.13	29.65±0.31
Fibra cruda	1.58 ²	-	-
Hidratos de carbono ³	75.76	11.16	8.61

1. Promedio de triplicado±desviación estándar.

2. Se obtuvo de tablas de composición de alimentos (INNSZ, 1996).

3. Calculados por diferencia.

Con el fin de comparar el contenido de macronutrientes de las harinas analizadas se presentan los valores en base seca (tabla 13). Se observa que la composición del ensilado y del pescado es esencialmente la misma, como se ha reportado en numerosos estudios (FAO, 1990). Estas dos harinas ofrecen un contenido de proteína superior al 50% y un alto contenido de cenizas mayor al 30%, en comparación con el sorgo, que sólo aporta 9.73% de proteína, siendo en cambio, una fuente rica en carbohidratos (83.84%).

Tabla 13. Composición proximal de las materias primas en base seca¹ (g/100 g muestra).

Componente	Harina de sorgo	Harina de ensilado	Harina de pescado
Proteína	9.73±0.08	50.45±0.68	53.24±0.39
Grasa	3.11±0.14	7.00±0.28	6.41±0.38
Cenizas	1.58±0.03	30.43±0.14	31.27±0.33
Fibra ²	1.75	-	-
Hidratos de carbono ³	83.84	12.13	9.08

1. Promedio de triplicado±desviación estándar.

2. Se obtuvo de tablas de composición de alimentos (INNSZ, 1996).

3. Calculados por diferencia.

Conociendo la composición química de las materias primas se formularon (ver tabla 1) y prepararon las dietas de estudio (ver **Anexo 2**) isoproteínicas e isocalóricas con respecto a la dieta control de caseína. Las dietas preparadas con ensilado presentaron un pH menor a 6 (pH que tuvo la dieta control), por lo que se ajustó su pH para evitar el posible rechazo o menor consumo de la dieta por parte de las ratas, debido a la palatabilidad del alimento.

Resultados de la prueba biológica

Crecimiento de las ratas

Los cambios de incremento en peso corporal promedio que tuvieron las ratas durante el tiempo de experimentación se muestran en la tabla 14. Los animales alimentados con la dieta de ensilado con sorgo presentaron un mayor incremento de peso que los alimentados con las dietas de harina de pescado y ensilado como única fuente proteica, sin embargo este incremento no fue superior al observado en el control de caseína.

Tabla 14. Incremento del peso corporal de las ratas alimentadas con las dietas de ensayo¹.

Tiempo (Días)	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	1.07±1.08	1.49±0.44	1.67±0.68	2.14±0.47
3	6.93±0.49	3.46±0.58	2.46±0.75	4.21±0.79
6	13.76±1.21	8.51±1.57	6.33±0.74	9.27±1.68
8	21.56±1.79	11.31±1.76	8.06±0.94	13.91±1.71
10	27.71±3.23	15.10±2.03	11.59±1.49	18.90±2.10
13	37.44±4.98	18.96±1.55	15.00±2.08	25.36±3.02
15	43.30±6.30	21.10±0.96	16.31±2.42	29.57±3.08
17	49.33±6.73	24.97±1.29	16.90±2.96	34.94±3.72
20	60.56±7.81	31.09±1.24	20.13±3.50	43.59±4.43
21	64.34±7.78	32.91±1.31	19.36±3.67	46.87±4.88

1. Promedio del incremento de peso en el lote de ratas en gramos±error estándar de la media.

Las ratas de todos los lotes aumentaron gradualmente de peso, pero con diferente magnitud y velocidad (figura 10). El menor peso se presentó en el lote alimentado con la dieta de ensilado, posiblemente por el daño de aminoácidos esenciales como el triptofano que ocurre en este tipo de producto ácido, sin embargo con la dieta de ensilado con sorgo las ratas ganaron el doble de peso que con la dieta de ensilado solo.

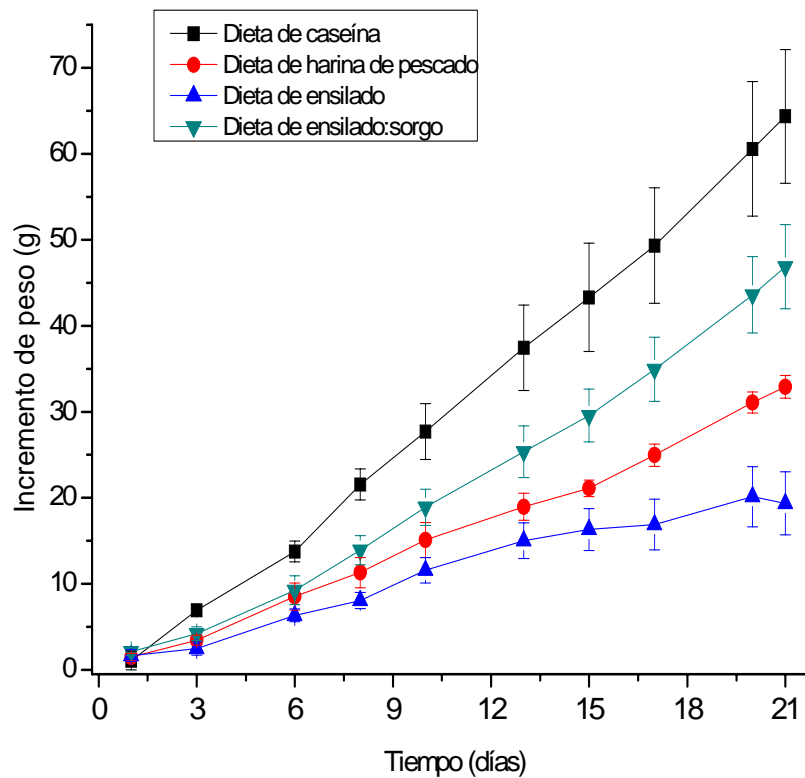


Figura 10. Curva de crecimiento de los animales de prueba alimentados con las dietas de estudio y el control de caseína.

Las ratas alimentadas con la dieta de harina de pescado presentaron, como se esperaba, un mayor incremento en peso que las ratas alimentadas con la dieta de ensilado, debido al daño de aminoácidos en este último producto. No obstante, este aumento de peso fue menor comparado con el lote al que se le suministro una dieta de ensilado con sorgo; hecho que puede ser atribuido a la posible complementación de aminoácidos de las proteínas de estos dos ingredientes, especialmente del triptofano, que en el sorgo se encuentra en una cantidad de 1.22 g/100 g de proteína (FAO, 1970) y que tiene como resultado la mejora de la calidad proteica de la dieta y como consecuencia la mayor ganancia de peso. Esto se podrá comprobar cuando se conozca el perfil de aminoácidos en el ensilado.

Conversión alimenticia

En la tabla 15 se muestran los valores de conversión alimenticia, este parámetro indica la cantidad de alimento ingerido por los animales para subir 1 g de peso durante el ensayo. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las ratas alimentadas con las dietas de caseína y ensilado con sorgo y de esta última con el lote alimentado con harina de pescado (**Anexo 5**). En cambio las ratas sometidas a la dieta de ensilado necesitaron consumir 6.61 g de alimento (el doble del consumido en la referencia), convirtiendo a esta dieta en la menos eficiente para que los animales suban de peso.

Lo que se desea en la alimentación animal es una conversión alimenticia pequeña, que indica una alta ganancia en peso con una baja ingesta de alimento. De acuerdo a lo anterior la dieta de ensilado con sorgo sería una mejor alternativa para la alimentación de animales productores de carne, que la dieta de ensilado solo.

Tabla 15. Conversión alimenticia¹.

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	2.81	3.73	7.80	3.75
2	2.70	3.83	6.96	3.64
3	2.86	4.46	6.62	3.45
4	3.53	5.41	5.49	3.69
5	3.30	5.20	7.95	5.60
6	3.95	4.95	6.05	4.36
7	3.09	4.82	5.41	3.82
Promedio+DE	3.18+0.45 ^C	4.63+0.65 ^B	6.61+1.03 ^A	4.05+0.74 ^{BC}

1. Se calcula como el alimento ingerido acumulado/peso acumulado ganado de los animales al día 21 (en gramos).
 Los valores promedio dentro de la fila con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).
 Los valores individuales del peso de las ratas y el alimento que ingirieron se muestran en el **Anexo 4**.

Relación de Eficiencia Proteínica (REP)

En la tabla 16 se presentan los valores de REP obtenidos de la relación del peso en gramos que aumentaron las ratas por cada gramo de proteína ingerida. La mejor calidad proteínica fue encontrada en la dieta control de

caseína con un valor de REP de 3.07 y el menor valor corresponde al ensilado de pescado (1.56), no obstante la dieta de ensilado de pescado con sorgo mejoró visiblemente su calidad (2.43) y esta última no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con la dieta de harina de pescado (**Anexo 5**).

El bajo valor de REP del ensilado probablemente se debe a que en medio ácido hay pérdidas de triptofano como lo han encontrado diversos autores (Vizcarra, 1998; Santana, 2004; Vidotti *et al.*, 2003). Sin embargo al agregar sorgo, un cereal no deficiente en este aminoácido esencial y cuyo REP promedio es de 1.78 (FAO, 1970), se logra una dieta de mejor calidad proteínica que la encontrada de manera individual en el ensilado y en el sorgo.

Tabla 16. Valores de REP y REP ajustado (g).

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	3.42	2.57	1.30	2.56
2	3.55	2.50	1.45	2.63
3	3.35	2.15	1.53	2.78
4	2.72	1.77	1.84	2.60
5	2.91	1.84	1.27	1.71
6	2.42	1.94	1.67	2.20
7	3.11	1.99	1.87	2.51
Promedio±DE	3.07±0.41 ^A	2.11±0.31 ^B	1.56±0.24 ^C	2.43±0.36 ^B
REP ajustado	2.50	1.72	1.27	1.98

Los valores promedio dentro de las filas con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los valores individuales de incremento en peso y alimento acumulado se muestran en el **Anexo 4**.

En cuanto al REP ajustado presentado en la tabla 16, se utiliza para expresar los valores de las proteínas de estudio en proporción a los obtenidos con la proteína caseína a fin de tener valores comparables con los encontrados en la bibliografía.

La caseína es catalogada como una proteína de buena calidad y de acuerdo con los valores de REP obtenidos, se demuestra que la harina de pez diablo y el ensilado de pescado con sorgo contienen proteínas de regular calidad. Esto podría explicarse debido a que se utilizó el pescado diablo entero, lo que significa que se incluyó la proteína de todos los tejidos presentes en el pescado, cuya calidad varía. En el tejido óseo (abundante en este pescado), la principal proteína presente es el colágeno, resistente a las enzimas digestivas y rica en aminoácidos no esenciales como glicina, prolina e hidroxiprolina (Fennema, 1993); los cuales podrían haber reducido la calidad proteínica de los productos evaluados, debido a que su composición de aminoácidos es relativamente uniforme.

El resultado de REP para la dieta de ensilado podría también estar relacionado con la alta solubilización proteica encontrada en el ensilado (alrededor de 84% NNP), ya que una elevada cantidad de aminoácidos libres ha sido relacionada como la responsable de un decremento del valor nutricional en experimentos con ratas (Strom y Eggum, 1981). Sin embargo este decremento se observa en ensilados viejos y se debe a que, una rápida absorción de proteína autolizada (aminoácidos libres) anula las rutas sintéticas y en cambio más aminoácidos son

catabolizados. De acuerdo a lo anterior Espe *et al.* (1989) al realizar una serie de determinaciones biológicas en ratas como el peso ganado, REP, Valor Biológico (VB) y Utilización Neta de Proteína (UNP) encontraron una mejora en estos parámetros al utilizar ensilados frescos con respecto a los almacenados por más de 90 días y por tanto sugieren el uso de ensilados frescos sobre los ensilados viejos, para alimentación animal.

Los resultados de REP son semejantes a los encontrados por Rodríguez *et al.* (1990) y Mederos (2004) en ensilados de otros peces, donde se observa una menor calidad proteínica en el ensilado de pescado, comparado con su respectiva harina de pescado; mostrando que el proceso de ensilado afecta negativamente la calidad proteica de la materia prima. Mederos (2004) también encontró una mejora de la calidad del ensilado de pez sierra al agregar sorgo, aunque no fue tan significativa como en este estudio.

Digestibilidad

En la tabla 17 se muestran los valores de digestibilidad “*in vivo*” de cada dieta. Este parámetro indica cuánta de la proteína ingerida fue absorbida por las ratas. La dieta de caseína fue la que tuvo un mayor porcentaje de digestibilidad, a su vez la dieta de harina de pescado tuvo una mayor digestibilidad que la dieta de ensilado con sorgo y la del ensilado solo. Sin embargo no existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la dieta de ensilado con sorgo y las dietas de harina de pescado y ensilado, indicando que sus aminoácidos son igualmente absorbidos por la rata (**Anexo 5**).

Tabla 17. Digestibilidad de las dietas de ensayo.

No. de muestra	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	92.91	78.85	74.13	76.20
2	93.04	78.95	74.07	78.08
3	93.55	77.45	71.84	71.48
Promedio±DE	93.17±0.34 ^A	78.42±0.84 ^B	73.35±1.30 ^C	75.25±3.40 ^{BC}

Los valores promedio dentro de las filas con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los datos utilizados para realizar los cálculos de digestibilidad se muestran en el **Anexo 4**.

La digestibilidad aparente de la proteína del pescado y su ensilado es en general buena, como corresponde a los alimentos de origen animal y esta dentro del rango reportado para la carne de pescado, de 72.1% a 100% (FAO, 1970).

Aunque la digestibilidad es un indicador de la calidad, no constituye un medio definitivo para la determinación de la calidad nutricia de una proteína, ya que puede presentarse una alta digestibilidad sin que se alcance un nivel de crecimiento aceptable, debido al perfil de aminoácidos esenciales y a su cantidad en la proteína. Es por ello que aunque la digestibilidad de la dieta de ensilado con sorgo no presenta diferencias significativas con la dieta de ensilado, no se tiene la misma calidad nutricional, como lo demuestran los otros parámetros biológicos

determinados (REP, conversión alimenticia). En cambio la calidad nutricia de la dieta de ensilado con sorgo y harina de pescado fueron estadísticamente iguales, debido a que los parámetros evaluados de conversión alimenticia, REP y digestibilidad que tuvieron las ratas sometidas a estas dietas no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

No obstante que la calidad proteínica del ensilado elaborado se considera regular, puede constituir una buena alternativa de conservación y aprovechamiento del pez diablo, útil para elaborar dietas balanceadas para animales y, que puede competir por sus características de producción y bajos costos con dietas comerciales.

CONCLUSIONES

- La composición proximal y la calidad proteínica del pez diablo fueron buenas para utilizar este pez en la elaboración de ensilados.
- La actividad proteolítica de las enzimas presentes en el pez diablo permitió, bajo las condiciones ensayadas, su rápida licuefacción desde las primeras horas de ensilado, obteniendo un producto con un porcentaje elevado de hidrólisis (superior al 90% de NNP).
- La adición de un antioxidante como el BHT permitió conservar los lípidos de los ensilados con niveles bajos de oxidación.
- El uso de ácido fórmico y la mezcla de ácido fórmico y ácido sulfúrico fueron adecuados para preservar los productos y obtenerlos en un período de 6 días a 37°C manteniendo un pH entre 3.8 y 4.0.
- El pez diablo y su ensilado tienen una composición proximal semejante y el alto contenido de cenizas se debe a que se utilizó el pez completo con huesos y a las placas óseas que recubren casi todo su cuerpo.
- La dieta de ensilado de pescado con sorgo tuvo un mejor valor de calidad proteínica que la del ensilado solo, lo que significa que aunque la calidad proteínica del ensilado se ve afectada negativamente debido a las condiciones ácidas del proceso, esto se corrige al agregar sorgo, lo que permite obtener un producto de mejor calidad.
- Por todo lo anterior el ensilado de pescado es un producto relativamente inocuo, estable y de regular calidad nutricional que al ser mezclado con cereales no deficientes en triptofano; constituye una buena alternativa para el aprovechamiento del pez diablo, como ingrediente en la elaboración de alimentos balanceados para animales.

RECOMENDACIONES

Para posteriores estudios se recomienda eliminar la cabeza del pescado para reducir el contenido de minerales y al mismo tiempo aumentar la concentración relativa de proteína, lo que podría favorecer su utilidad como alimento para animales. Además esta disminución de minerales probablemente puede abaratar el costo de elaboración del ensilado, al requerir la adición de menos ácido para su preservación.

A su vez este subproducto (cabeza del pescado) puede ser analizado para conocer el tipo de minerales presentes y con base en ello encontrar una manera de aprovecharlos, ya sea como fuente de minerales para alimentación animal, en la fabricación de fertilizantes o en otras aplicaciones.

Puesto que la calidad proteínica del pescado disminuyó con el proceso de ensilado, para complementar lo encontrado en este trabajo se necesitaría realizar un perfil de aminoácidos. A fin de saber el tipo y cantidad de aminoácidos esenciales presentes en el pescado y su ensilado, determinando cuáles y en qué magnitud fueron dañados en el proceso; de manera que se pueda conocer con exactitud que aminoácidos u otros alimentos deben ser adicionados a las dietas para mejorar su calidad.

El secado en estufa realizado en este estudio fue eficiente, sin embargo podría eliminarse este costo si se realizará al aire libre junto con algún cereal o alimento que facilite su secado.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahamed J. y Mahendrakar N.S. 1997. Chemical and microbial changes in fish viscera during fermentation ensiling at different temperatures. *Bioresource technology* 59:45-46.
- Anson M.L. 1938. The estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiology* 22:79-89.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition, Arlington. Vol.1. Pp.17-18, 69-70, 79.
- Avdalov N., Barlocco N., Bauza R., Bertullo E., Corengia C., Giacommeti L. y Panucio A. 1992. Evaluación del ensilado biológico de pescado en la alimentación de cerdos en engorde. *FAO Informe de Pesca*, #441, pp.88-98.
- Backhoff H.P. 1976. Some chemical changes in fish silage. *Journal of Food Technology* 11:353-356.
- Belitz H.D. 1988. *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España. Ed. Acribia. Pp. 491-502.
- Bello R.A., Gutiérrez M., Ottati M. y Martínez A. 1992. Estudio sobre la elaboración de ensilado de pescado por vía microbiana en Venezuela. *FAO Informe de Pesca*, #441, pp.1-17, Supl. Roma, FAO.
- Bello R.A. y Fernández Y. 1995. Evaluación del ensilado biológico de pescado en pollos de engorde. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 45(2):134-139.
- Buttkus H., Bose R.J. 1972. Amine malonaldehyde condensation products and their relative color contribution in the TBA test. *Journal of the American Oil Chemists Society* 49:440-443. Citado por Vizcarra (1998).
- Castillo Y.F.J., Pacheco A.R., García C.F.L. y Navarrete D.T. 2004. Characterization of acid proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry* 85:343-350.
- Cheftel J.C. 1989. *Proteínas alimentarias*. Zaragoza, España. Ed. Acribia. Pp. 115-124.
- Chong A., Hashim R., Chow-Yang L., Ali A. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203:321-333.
- Dapkevicius M.E., Batista I., Nout M.J., Rombouts F.M., Houben J.H. y Wymenga W. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 57:107-114.
- Dapkevicius M.E., Batista I., Nout M.J., Rombouts F.M. y Houben J.H. 1998. Lipid and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromisistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. *Food Chemistry* 63(1):97-102.
- Díaz H.L. 2004. Efecto de la suplementación con ensilaje de residuos de una planta procesadora de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre el consumo voluntario y la digestibilidad de nutrientes de heno de

- gramíneas y leguminosas tropicales. Tesis Maestría, Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez.
- Espe M. y Lied E. 1999. Fish silage prepared from different cooked and uncooked raw materials: Chemical changes during storage at different temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:327-332.
 - Espe M., Haaland H. y Njaa L.R. 1992. Substitution of fish silage protein and a free amino acid mixture for fish meal protein in a chicken diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 58:315-319.
 - FAO. 1970. Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO, *Estudios sobre nutrición*. Roma. Pp. 42-43, 181.
 - FAO. 1990. Informe de la segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina. Montevideo, Uruguay, 11-15 de diciembre. FAO *Informe de Pesca*. No.441. Roma, FAO, 29 p.
 - Farkas J.K., Floros J.D., Lineback D.S., Watkins B.A. 1997. Oxidation kinetics of menhaden oil with TBHQ. *Journal of Food Science* 62(3):505-507.
 - Fennema, O.R. 1993. *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España. Ed. Acribia. Pp. 358-365.
 - Fernández J., Pérez A.J., Fernández L.J. 1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* 59(3):345-353.
 - Goddard J.S., McLean E., Wille K., 2003. Co-dried sardine silage as an ingredient in tilapia, *Oreochromis aureus*, diets. *Journal of Aquaculture Tropical* 18 (3): 257–264.
 - Guevara J., Bello R. y Montilla J. 1991. Evaluación del ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica como suplemento proteínico en dietas para pollos de engorde. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 41(2):247-256.
 - Haaland H. y Njaa L.R. 1989. Total Volatile Nitrogen a Quality Criterion for Fish Silage? *Aquaculture* 79:311-316.
 - Haard N.F., Kariel N., Herzberg G., Feltham L.A.W. y Winter K. 1985. Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminant feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:229-241.
 - Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170:267-283.
 - Husain R.A.K. y Offer N.W. 1987. Effect of formaldehyde treatment on the degradation of acid-preserved fish silage protein in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 16:297-304.
 - Huss H.H. 1999. *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. Dinamarca. FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Caps. 4, 5 y 8.
 - INNSZ. 1996. Tablas de composición de alimentos. México, D.F. Instituto de Nacional de Nutrición

- Salvador Zubirán. Pp. 3, 11, 12, 166, 167.
- Jackson A.J., Kerr A.K. y Cowey C.B. 1984a. Fish silage as a dietary ingredient for salmon. I. Nutricional and storage characteristics. *Aquaculture* 38: 211-220.
 - Jackson A.J., Kerr A.K. y Bullock AM. 1984b. Fish silage as a dietary ingredient for salmon. II. Preliminary Growth findings and Nutricional pathology. *Aquaculture* 40: 283-291.
 - Johnson R.J., Brown N., Easeon P. y Summer J. 1985. The nutritional quality of two types of fish silage for broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:1051-1056.
 - Juárez P.R. 1989. Presa Adolfo López Mateos “El Infiernillo”. Caracterización. Informe preliminar. Secretaría de Pesca, México, D.F. 62 p.
 - Kirk R.S., Sawyer R. and Eagan H. 2005. *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. México, D.F. Ed. CECSA. 2ª edición. Pp. 19-35, 199.
 - Kjos N.P., A. Skrede y M. Overland. 1999. Effects of dietary fish silage and fish fat on growth performance and sensory quality of growing-finishing pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 79: 139-147. Citado por Díaz (2004).
 - Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
 - Machin DH, Panigrahi S., Bainton J y Morris TR. 1990. Performance of Broiler Chicks Fed on Low and High Oil Fish Silages in Relation to Changes Taking Place in Lipid and Protein Components. *Animal Feed Science and Technology* 28:199-223.
 - Mederos M.M. 2005. Evaluación biológica de la calidad proteínica de harina y ensilado de pescado sierra (*Scomberomorus sierra*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
 - Montaner I., Parín A., Zugarramurdi A. 1995. Comparación técnico-económica de ensilados químicos y biológicos de pescado. *Alimentaria* 43: 43-51.
 - Neave V.H. 1986. *Introducción a la tecnología de productos pesqueros*. México, D.F. Ed. CECSA. Pp. 305-310.
 - Nicholson J.W.G y Johnson D.A. 1991. Herring silage as a protein supplement for young cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71: 1187-1196. Citado por Díaz (2004).
 - Norma Oficial Mexicana. NOM-027-PESC-2000. Pesca responsable en la Presa Adolfo López Mateos “El Infiernillo”, Michoacán y Guerrero. Especificaciones para el aprovechamiento de los recursos pesqueros.
 - Orbe Mendoza, A., Romero Acosta, A.C. y Acevedo Acosta, J. 1999. Producción y rendimiento pesquero en la presa Lic. Adolfo López Mateos (El Infiernillo) Michoacán-Guerrero, México. *Hidrobiol.* 9(1):1-8.
 - Osborne T.B., Mendel L.B., y Ferry E.L. 1919. A method of expressing numerically the growth promoting value of proteins. *J. Biol. Chem* 37:223-229.

- Ottati M., Gutiérrez M., Bello R. 1990. Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40(3):409-425.
- Peralta M. 2003. Evaluación del valor nutricional de tres pescados enteros comerciales de bajo costo. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Raa J. y Gildberg A. 1982. Fish silage: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science Nutrition* 16:383-419.
- Reece P. 1980. Control and Reduction of Free Fatty Acid Concentration in Oil Recovered from Fish Silage prepared from Sprat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31:147-155.
- Reece P. 1981. Recovery of high quality Oil from Mackerel and Sprat by the silage process. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32:531-538.
- Rick W. y Fritsch P. 1974. Pepsin in: *Methods of enzymatic analysis*. Washington, D.C.,USA. Hans Ulrich Bergmeyer. Academic Press, Inc. Second edition. Pp. 171-179, 1046-1050.
- Rodríguez T., Montilla J.J. y Bello R. 1990a. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. I. Elaboración y evaluación biológica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40(3):426-438.
- Rodríguez T., Montilla J.J. y Bello R. 1990b. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. II. Prueba de comportamiento en pollos de engorde. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 40(4):548-559.
- Santana Delgado H.J. 2004. Desarrollo de un alimento para pollos de engorda a partir de ensilaje de pescado sierra (*Scomberomorus maculatus*). Tesis Maestría, UNAM, México, D.F.
- Serna S. 1996. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. México, A.G.T. Editor. Pp. 14-18.
- Shahidi F. y Kamil J. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* 12: 435-464.
- Stoknes I.S., Walde P.M. y Synnes M. 2005. Proteolytic activity in cod (*Gadus morhua*) muscle during salt curing. *Food Research International* 38:693-699.
- Stone E.F. y Hardy RW. 1986. Nutritional Value of Acid Stabilized Silage and Liquefied Fish Protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 37:797-803.
- Strom T. y Eggum B.O. 1981. Nutritional value of fish viscera silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32:115-120.
- Tatterson I.N. y Windsor M.L. 1974. Fish silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25:369-379.
- Tatterson I.N. 1982. Fish silage-Preparation, properties and uses. *Animal Feed Science and Technology* 7:153-159.

-
- Uys W. y Hecht T. 1987. Assays on the digestive enzymes of sharpooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Aquaculture* 63:303-313.
 - Viana M.T., Nava L.C. y Solana S.R. 1993. Ensilajes ácidos de pescado. Efectos del precalentamiento y adición de ácidos fosfórico y cítrico sobre la calidad bioquímica. *Ciencias Marinas* 19(4):415-433.
 - Vidotti R.M., Dalton J.C., Viegas E.M.M. 2002. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for pacu, *Piriacetus mesopotamicus*. *J. World Aqua. Soc.* 33 (1): 57–62.
 - Vidotti R.M., Viegas E.M.M., Dalton J.C. 2003. Aminoacid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology* 105:199-204.
 - Vizcarra-Magaña L.A. 1998. Desarrollo de un alimento para aves a base del ensilaje de desperdicios de atuneras. Tesis Maestría, UNAM, México, D.F.
 - Vyncke W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in tricloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette seifen anstrichmittel*, (72):Jargang, Nr. 12, 1080-1087. Citado por Vizcarra (1998).
 - Walter H.E. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol.5. H.U. Bergmeyer (Editor). Pp. 270-277.
 - Ward W.J., G.A. Parrott, and D.G. Iredale. 1985. Fish waste as silage for use as a feed supplement. *Canadian Industry Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 158: 4-10. Citado por Díaz (2004).
 - Windsor M. y Barlow S. 1984. *Introducción a los subproductos de pesquería*. Zaragoza, España. Editorial Acribia. Cap. 5, pp. 8-116.
 - Winter K. and L. Feltham. 1983. Fish silage: The protein solution. *Agriculture Canada Research Branch Contribution*. Ottawa, Canada. 112 p. Citado por Díaz (2004).

ANEXO 1**MATERIALES Y MÉTODOS PARA ANÁLISIS PROXIMAL Y PRUEBAS FISICOQUÍMICAS**

Determinación de humedad. AOAC (1990)^{934.01} con modificaciones.

Materiales:

- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Desecador de vidrio
- Pesafiltros o charolas de aluminio
- Estufa con corriente forzada (LAB-LINE Mod. IMPERIAL III)
- Estufa de vacío (LAB-LINE Duo Vac Oven Mod. 3620)

Procedimiento:

Se pusieron a peso constante los pesafiltros y se registró su peso. Se pesaron 20 gramos de homogeneizado en los pesafiltros y se introdujeron en la estufa de corriente forzada a 65°C por 5 horas. Posteriormente se trasladaron a la estufa de vacío a una temperatura de 60-65°C con una presión de por lo menos 12 in de Hg, hasta peso constante, es decir, hasta que se presente en la pesada únicamente una variación en la cuarta cifra decimal. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{P_i - P_f}{m} \right) \times 100$$

Donde:

P_i = peso del pesafiltros con la muestra húmeda en gramos

P_f = peso del pesafiltros con la muestra seca en gramos

m = peso de la muestra húmeda en gramos

Determinación de cenizas totales. AOAC (1990)^{942.05}

Materiales:

- Mufla THERMOLYNE Mod.1500
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Mechero Bunsen
- Crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio
- Campana de extracción

Procedimiento:

Los crisoles se pusieron previamente a peso constante, colocándolos en mufla a una temperatura de 500°C. Se colocó 2 gramos de la muestra previamente secada en cada crisol y se carbonizaron a la flama del mechero Bunsen, bajo una campana ya que se desprende una gran cantidad de humo.

Cuando ya no se desprende humo se meten los crisoles a la mufla a una temperatura de 500°C hasta obtener las cenizas. Se sacaron los crisoles de la mufla colocándose en un desecador y se pesaron los crisoles fríos con las cenizas, se realizaron pesadas periódicas hasta que alcanzaron peso constante, el cual fue registrado para calcular el % de cenizas totales. La determinación se realizó por triplicado.

Cálculos:

El cálculo de cenizas en términos de porcentaje es el siguiente:

$$\% \text{ Cenizas totales} = \left(\frac{Pf - Po}{m} \right) \times 100$$

Donde:

Pf= peso del crisol con la muestra después de incineración en gramos

Po= peso del crisol a peso constante en gramos

m= peso de la muestra en gramos

Determinación de proteína cruda. AOAC (1990)^{955.04} con modificaciones

Materiales y reactivos:

- Digestor (Tecator Mod. Ab-20/40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto Analyzer Tecator Mod. 1030)
- Tubos de digestión Tecator de 75 ml
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Mezcla digestiva (3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50ml de H_3PO_4 y 430 ml de H_2SO_4 concentrado)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40% p/v (40g de NaOH en 100 ml de agua destilada)
- Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)
- Solución de HCl 0.01N valorada hasta la cuarta cifra decimal

Procedimiento:

Se pesó aproximadamente 40 mg (la cantidad a pesar depende del contenido de proteína esperado) de la muestra previamente secada en los tubos de digestión y se adicionaron 0.5 g de K_2SO_4 y 3 ml de mezcla digestiva,

colocándolos en el digestor a una temperatura de 340°C. Después de 15 minutos en el digestor se sacaron los tubos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 1.5 ml de H₂O₂ al 30% y se colocaron de nuevo en el digestor a 370°C, hasta que la mezcla de digestión fue transparente, con una coloración verdosa. Se realizó la destilación en el equipo de microdestilación, el amoníaco liberado se recibió en ácido bórico con indicadores y fue valorado con HCl 0.01N en el mismo equipo. Se utilizó como blanco sacarosa, la cual se sometió al mismo tratamiento que las muestras. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(M - B) \times N \times meq}{m} \times 100$$

$$\% \text{Proteína} = \% \text{Nitrógeno} \times F$$

Donde:

M= ml de titulación de la muestra

B= ml de titulación del blanco

N= Normalidad de la solución de HCl

meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m= peso de la muestra en gramos

F= factor de conversión (se utilizó el valor de 6.25)

Determinación de grasa cruda. AOAC (1990)^{920,39}

Materiales y reactivos:

- Aparato de extracción Goldfish (Labconco Mod. 35001-00CV)
- Cartuchos de celulosa
- Portadedales de vidrio
- Tubos colectores de disolvente
- Anillos metálicos con rosca
- Vasos de borde esmerilado
- Bomba de recirculación (Little Grant pump Mod. 1)
- Estufa de vacío (LAB-LINE Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)

Procedimiento:

Los vasos esmerilados se colocaron a peso constante en una estufa. Dentro de cartuchos de celulosa se pesaron aproximadamente 4 gramos de muestra previamente secada (la cantidad depende del contenido de grasa

esperado). Los cartuchos de celulosa se colocaron en los portadedales y éstos a su vez en el seguro metálico del aparato de extracción. Se colocaron aproximadamente 50 ml de éter en los vasos de borde esmerilado a peso constante y se aseguraron al aparato de extracción con ayuda de los anillos metálicos. Se prendió el aparato de recirculación con agua helada y se subieron las parrillas de calentamiento hasta que estuvieron en contacto con los vasos, se trabajó con el control de calentamiento en la posición de LOW por 2 horas, tiempo en el cual se extrajo toda la grasa. Se cambiaron los portadedales por tubos colectores y se calentaron de nuevo los vasos para recuperar el éter. Cuando los vasos estuvieron casi libres de disolvente, se retiraron del aparato y se colocaron en una campana de extracción por unos minutos para eliminar el resto de disolvente. Finalmente se colocaron en la estufa de vacío hasta alcanzar el peso constante. La determinación se hizo por triplicado.

Cálculos:

$$\% \text{Grasa total} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= peso del vaso después de la extracción, sin disolvente y con grasa extraída

Po= peso del vaso vacío antes de la extracción en gramos

m= peso de la muestra seca en gramos

Determinación de la actividad proteolítica***Materiales y reactivos:***Obtención de extracto enzimático

- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Vasos de precipitados de 50 ml
- Potenciómetro
- Matraces aforados de 50 ml
- Centrífuga fría
- Charola con hielo
- HCl 0.06N
- Agua acidulada (pH 3)

Determinación de actividad proteolítica

- Tubos de centrifuga de 20 ml
- Centrífuga Sorvall (Modelo Super T21)
- Pipetas automáticas de 100-1000µl y 1-5ml
- Tubos de ensaye

- Gradilla
- Celdas de 1 cm
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner mod.340)
- Incubadora
- Vortex (LAB LINE Mod.1290)
- Hemoglobina bovina (Bioxon Cat.217500) al 2% en HCl 0.06 N

Disolver 2 g de hemoglobina en HCl 0.06 N y aforar a 100 ml

- Ácido tricloroacético al 5% (m/v)

Disolver 5 g de ácido tricloroacético en agua destilada y aforar a 100 ml

- NaOH 0.5N

Disolver 2 g de NaOH en agua destilada y aforar a 100 ml

- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel de México)

Diluir 1 ml del reactivo con 2 ml de agua destilada

- Tirosina L(-1) Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O., USA.

Preparar soluciones estándar de 0.2 y 2 μ mol de tirosina/ml en HCl 0.2 N

NOTA: Todos los reactivos deberán ser grado analítico y el agua deberá ser destilada.

Procedimiento:

Preparación del extracto enzimático

Durante este procedimiento se mantuvo el material sobre hielo. Se pesaron 100 g de pescado entero previamente homogeneizado y se llevó a cabo un segundo proceso de homogeneización. De este material se pesan 10 g y se homogeneiza completamente con HCl 0.06N llevándose a pH de 3 con el fin de activar el pepsinógeno y se afora a 50 ml con agua acidulada a pH 3. Después de 20 minutos, tiempo en el cual se agitó ocasionalmente, el contenido del matraz se centrifuga a 16000 rpm a 4°C durante 20 minutos y se recupera el sobrenadante. Se hicieron 2 extractos para ver la reproducibilidad de este proceso de extracción y a éstos se les determinó por triplicado la actividad proteolítica por el método de Anson (1938) modificado y el contenido de proteína por el método de Lowry (1951).

Determinación de actividad proteolítica

Reacción enzimática

En tubos de centrifuga se mezclaron 0.5 ml del extracto enzimático con 2.5 ml de sustrato (solución de hemoglobina bovina al 2%) previamente llevados a 37°C, se agitaron e incubaron a 37°C por exactamente 10 min. Posteriormente se agregaron 5 ml de ácido tricloroacético al 5% para detener la hidrólisis y se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min.

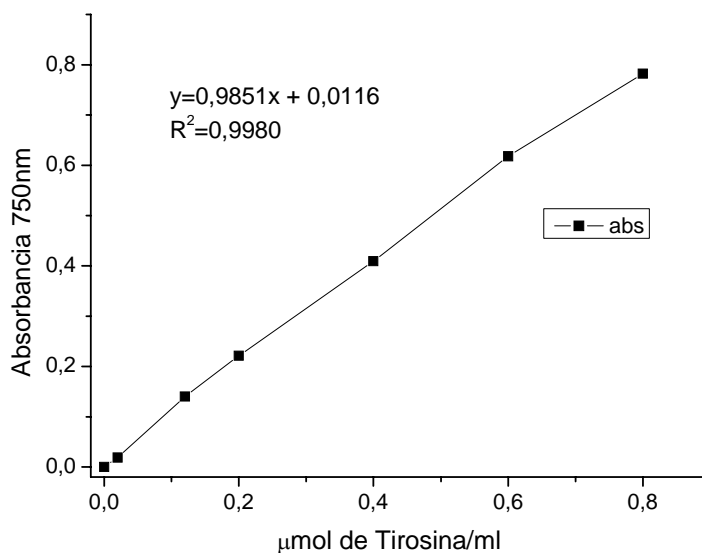
Reacción calorimétrica

Se tomaron 2.5 ml del sobrenadante y se mezclaron con 5 ml de NaOH 0.5 N y 1.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1 ml de reactivo con 2 ml de agua), después de 10 min se midió la absorbancia a 750 nm contra un blanco de reactivos.

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar 5 ml de ácido tricloroacético a 2.5 ml de hemoglobina y entonces se adiciona 0.5 ml del extracto enzimático, se agita y centrifuga a 3000 rpm por 20 min para eliminar el precipitado. Se toman 2.5 ml de sobrenadante para la reacción colorimétrica. El blanco tiene como propósito corregir las lecturas al determinar la posible cantidad de tirosina libre presente en el extracto enzimático y en el sustrato.

Preparación de la curva patrón de tirosina

De las soluciones estándar de tirosina (0.2 y 2 $\mu\text{mol/ml}$) se preparan soluciones con concentraciones de 0.02, 0.12, 0.20, 0.40, 0.60 y 0.80 $\mu\text{mol/ml}$. A partir de estas soluciones estándar se procede con la metodología empleada para el extracto enzimático. El blanco de reactivos se obtiene al adicionar 2.5 ml de HCl 0.2 N en lugar de la solución estándar de tirosina. Se traza la gráfica de concentración de tirosina contra absorbancia.



Curva estándar de tirosina para la determinación de actividad enzimática.

Cálculos:

La cantidad de tirosina liberada ($\mu\text{mol/ml}$) en el ensayo enzimático se obtiene a partir de la curva de calibración. La actividad enzimática se expresa en términos de unidades (U). Donde una unidad de actividad proteolítica expresa la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1 μmol de tirosina del sustrato hemoglobina por

minuto bajo las condiciones de ensayo.

Con la siguiente fórmula se calculan los micromoles de tirosina producidos por las enzimas proteolíticas (1 ml del extracto) al actuar sobre el sustrato hemoglobina en 1 min (U/ml):

$$\text{Unidad de actividad enzimática (U)} = \frac{(\mu\text{mol Tyr / ml}) \times 2.5\text{ml}}{10 \text{ min} \times 0.5\text{ml}} = \text{U/ml extracto}$$

Donde 2.5 ml indican la cantidad de sustrato utilizado, 0.5 ml el extracto enzimático que actuó sobre el sustrato y 10 min el tiempo en minutos que dura la reacción enzimática.

Para el cálculo de actividad específica (U/mg de proteína) se determinó la concentración de proteína soluble de los preparados enzimáticos por el método de Lowry y se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica} = \left(\frac{\text{Unidad de actividad enzimática (U / ml)}}{\text{Concentración de proteína (mg / ml)}} \right) = \text{U / mg proteína}$$

Determinación de proteína por el método de Lowry

Material y reactivos

- Pipetas automáticas de 100-1000µl y 1-5ml
- Tubos de ensayo 13x100
- Gradilla
- Vórtex (LAB LINE Mod.1290)
- Celdas de 1 cm
- Matraces volumétricos de 10 ml y 50 ml
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner mod.340)
- NaOH 0.1N

Disolver 4 g de NaOH en agua destilada y llevarla a 1000 ml.

- Solución de sulfato cúprico (Solución 1)

50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 10 ml de agua destilada

- Solución de carbonato de sodio/ tartrato de sodio y potasio (Solución 2)

2 g de Na_2CO_3 anhidro y 20 mg de $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron y aforaron a 100 ml con NaOH 0.1 N

- Solución A

Mezclar 1 ml de la *solución 1* y 50 ml de la *solución 2*

- Solución B

Diluir 5 ml del Reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel de México) con 9 ml de agua destilada

- Solución estándar de albúmina sérica bovina (SIGMA A-3425)

Preparar solución estándar con concentración de 400 µg de albúmina/ml

NOTA: Todos los reactivos deberán ser grado analítico y el agua deberá ser destilada.

Procedimiento:

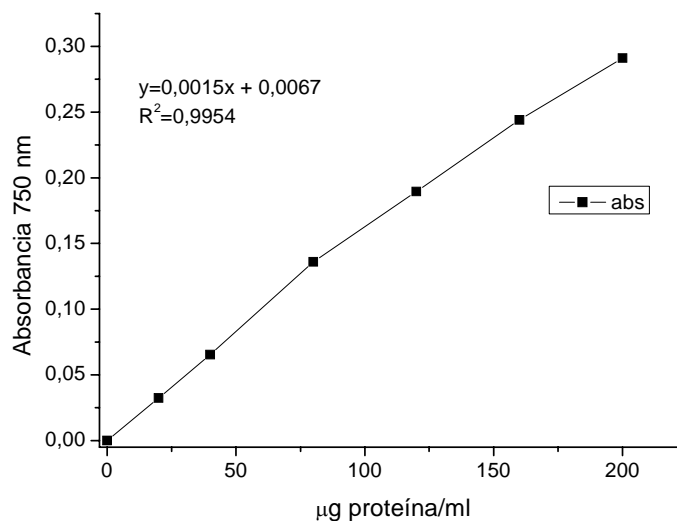
Se hace una dilución del preparado enzimático obtenido anteriormente (1:50) con el fin de tener una solución con 50 a 200 µg de proteína/ml. De esta dilución se tomó 1 y se mezcló con 5 ml de la solución A, agitándose en vórtex y dejándose exactamente 10 min a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0.5 ml de la solución B, se agitó y al cabo de 30 min se les midió la absorbancia a 750 nm. En el caso del blanco se utilizó 1 ml de agua destilada en vez del extracto diluido.

Curva estándar de albúmina sérica bovina

Se prepararon soluciones de trabajo con concentraciones de 20, 40, 80, 120, 160 y 200 µg/ml, a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina (400 µg/ml). A 1 ml de la solución de trabajo se añadió 5 ml de la solución A, se agitó en vórtex y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de la solución B, se agitó y al cabo de 30 min se les midió la absorbancia a 750 nm contra un blanco de reactivos.

Cálculos:

Se trazó la gráfica de absorbancia contra concentración de albúmina (µg/ml).



Curva estándar albúmina sérica bovina.

La concentración de proteína en el extracto se obtiene a partir de la curva de calibración y los resultados se expresan en $\mu\text{g/ml}$. El valor obtenido se multiplica por el factor de dilución y se convierte de μg de proteína a mg para reportar la concentración de proteína en mg/ml extracto y así poder calcular la actividad enzimática específica (U/mg proteína), como se indicó anteriormente.

Determinación de nitrógeno no proteínico (NNP)

Materiales y reactivos:

- Digestor (Tecator Mod. Ab-20/40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto Analyzer Tecator Mod. 1030)
- Tubos de digestión Tecator de 75 ml
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Centrifuga Sorvall (Modelo Super T21)
- Pipeta graduada de 5 ml
- Mezcla digestiva (3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50ml de H_3PO_4 y 430ml de H_2SO_4 concentrado)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40% p/v (40g de NaOH en 100 ml de agua destilada)
- Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)
- Solución de HCl 0.01N valorada hasta la cuarta cifra decimal
- Ácido tricloroacético al 20% (20g de ácido tricloroacético en 100 ml de agua destilada)

Procedimiento:

Se preparó una solución de la muestra al 4% p/v en ácido tricloroacético al 20%, se dejó precipitar la proteína por 2 horas y se centrifugó a 3000 rpm por 30 min. Del sobrenadante se tomaron 3 ml para determinar el contenido de nitrógeno por el método de micro-Kjeldhal.

Cálculos:

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{(M - B) \times N \times meq}{m \left(\frac{a}{s} \right)} \times 100$$

Donde:

M= ml de titulación de la muestra

B= ml de titulación del blanco

N= Normalidad de la solución de HCl
meq= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)
m= peso de la muestra en gramos
a= alícuota que se tomó para determinar el contenido de nitrógeno en ml
s= volumen total de la solución al 4% preparada en ml

Se pueden expresar los resultados en relación al nitrógeno total de la siguiente manera:

$$\% NNP = \frac{NNP}{NT} \times 100$$

Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Materiales y reactivos:

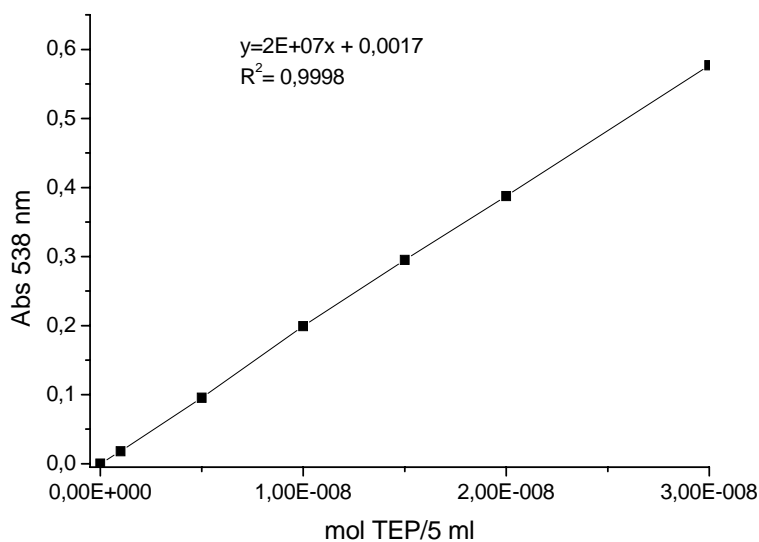
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Matraces aforados de 10 ml
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Gradilla
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 ml
- Baño de agua a temperatura de ebullición
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner Mod.340)
- Papel Whatman No.4
- Solución de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0.02M (Sigma Chemical Co., USA)
- Solución de ácido tricloroacético al 7.5% v/p
- Solución estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) 0.01 M (Sigma Chemical Co., USA)

Procedimiento:

Se preparó una solución de la muestra al 2% p/v en ácido tricloroacético al 7.5% v/p, se agitó y filtró en papel Whatman No. 4. En tubos con tapón de rosca se colocaron 5 ml de este filtrado y 5 ml de ácido tiobarbitúrico 0.02 M y se colocaron a baño María por 45 min. Después de este tiempo se enfrían y se leen dentro de los primeros 30 min a 538 nm contra un blanco preparado con 5 ml de agua en lugar de 5 ml de filtrado.

Curva estándar de TEP

Para elaborar la curva patrón se hizo una dilución 1:1000 de la solución estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) 0.01 M, para tener una solución de trabajo de 1×10^{-5} M. De esta última solución se tomaron alícuotas de 0.1 a 3 ml y se llevaron a 5 ml con agua destilada, añadiéndose 5 ml de ácido tiobarbitúrico y siguiendo con el mismo procedimiento que para las muestras. Se trazó la gráfica de Absorbancia contra mol de TEP/5 ml, la cual se muestra a continuación:



Curva estándar de TEP

Cálculos:

Se compara la absorbancia del complejo MDA-TBA con un estándar hecho de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), porque el malonaldehído (MDA) es obtenido por hidrólisis ácida de TEP en una reacción equimolecular. Así los moles de TEP que se determinan a partir de la curva estándar son equivalentes a los moles de MDA, estos se multiplican por el equivalente en mg del peso molecular del MDA (72.062 g/mol), para obtener los mg de MDA contenidos en la alícuota utilizada. Los resultados se expresan en mg de MDA/kg de muestra, los cuales se pueden calcular con las siguientes relaciones:

$$1 \text{ mol TEP} = 1 \text{ mol MDA}$$

$$\text{mg MDA} = \text{mol MDA} \times (72062 \text{ mg/mol MDA})$$

$$\text{mg MDA / kg muestra} = \frac{\text{mg de MDA} \left(\frac{\text{ml aforo}}{\text{ml alícuota}} \right)}{\text{kg muestra}}$$

ANEXO 2

MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL ENSAYO BIOLÓGICO

Preparación de dietas

Materiales y reactivos:

- Mezcladora mecánica HOBART Mod. N-50
- Recipientes de plástico de 3 y 5 L de capacidad
- Balanza
- Cucharas
- Caseína (de leche bovina SIGMA C-3400)
- Glucosa (grado técnico)
- Dextrina (grado técnico)
- Sacarosa (grado técnico)
- Aceite de maíz (comercial)
- Manteca vegetal (comercial)
- Mezcla de sales (ICN Pharmaceuticals No.Cat. 170760)
- Mezcla de vitaminas (ICN Pharmaceuticals No.Cat. 904654)
- Celulosa en polvo (grado técnico)
- Harina de pescado diablo
- Harina de ensilado de pescado
- Harina de sorgo

Procedimiento:

La fuente de proteína se homogeneizó en la mezcladora junto con todos los ingredientes sólidos excepto las vitaminas, posteriormente se adicionó la mezcla de lípidos (aceite y manteca fundida) y por último la mezcla de vitaminas. Las dietas se almacenaron en recipientes plásticos y en refrigeración durante todo el estudio.

NOTA: Las dietas que contenían ensilado fueron llevadas a pH de 6 (pH que presentó la dieta de referencia) mediante la adición y completa homogeneización de una solución de NaOH (40% p/v), esto con el fin de evitar el posible menor consumo de las dietas por parte de las ratas, debido a un ligero gusto ácido que presentó la harina del ensilado.

Evaluación biológica REP

Materiales:

- Balanza para pesar animales de laboratorio
- Balanza granataria de un platillo
- Comederos para ratas
- Bebederos con sujetador
- Jaulas individuales para ratas
- Ratas macho recién destetadas, cepa Wistar (20-23 días)
- Dietas de ensayo

Procedimiento:

Se emplearon 28 ratas macho de la cepa Wistar de 20 a 23 días de nacidas con un peso inicial de $47 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$. Al inicio del ensayo se pesaron las ratas de forma individual que corresponde al peso inicial (P_i). Se hicieron 4 lotes de 7 ratas cada uno y los animales se distribuyeron por el método de “culebra japonesa”, en el cual se ordenan de forma ascendente o descendente los pesos iniciales de las ratas y se distribuyen en los diferentes lotes de manera zigzagueante. La diferencia en el peso promedio entre los lotes fue menor a 1 g.

Cada rata se alojó en una jaula con piso de rejilla (debajo de esta se colocó una charola de papel para recuperar el alimento desperdiciado y así obtener el alimento ingerido por el animal) y se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura aproximada de 23°C . Las dietas y el agua se suministraron *ad libitum*. Se registro el peso de los animales y el alimento ingerido 3 veces por semana, siendo la última pesada el día 21 que correspondió al peso final del animal (P_f). Las pesadas se realizaron en el mismo horario con el fin de tener una menor variación en los resultados.

Cálculos:

El coeficiente REP se expresa como el peso en gramos ganado por las ratas por cada gramo de proteína consumida. Se calcula el REP para cada una de las ratas con la siguiente fórmula:

$$REP = \frac{\Delta P}{\sum AI \times F}$$

Donde.

ΔP = incremento de peso en gramos

$\sum AI$ = alimento total ingerido en gramos

F= % de proteína en la dieta/100

Con cada uno de los valores individuales, se calculó el REP promedio de cada lote en estudio, el coeficiente de variación (C.V.) debe ser menor a 15%, en caso de ser mayor se elimina el valor más alto y el más bajo calculándose el REP promedio con 5 datos.

$$C.V. = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{REP promedio}} \times 100$$

Para que se puedan comparar los resultados se calcularon los valores de REP ajustado, tomando como referencia el valor de 2.5 para la dieta de caseína.

$$REP_{ajustado} = REP(\text{dieta en estudio}) \times \frac{REP_{caseína(\text{referencia})}}{REP_{caseína(\text{experimental})}}$$

Donde:

$$REP_{caseína(\text{referencia})} = 2.5$$

Además del REP se calculó la conversión alimenticia, dividiendo los gramos de alimento ingerido entre el peso del animal en el último día de ensayo (día 21). Y se elaboró la curva de crecimiento (promedio del incremento de peso acumulado vs el tiempo de experimentación), en la cual se trazó el rango de variación de la ordenada como el error estándar de la media, que se calculó de la siguiente manera:

$$ESM = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}}$$

Donde:

σ = desviación estándar

n = número de datos de la muestra

Determinación de la digestibilidad “in vivo”

Materiales y reactivos:

- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Mortero con pistilo
- Digestor (Tecator Mod. Ab-20/40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto Analyzer Tecator Mod. 1030)
- Tubos de digestión Tecator de 75 ml
- Mezcla digestiva (3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50ml de H_3PO_4 y 430ml de H_2SO_4 concentrado)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40% p/v (40g de NaOH en 100 ml de agua destilada)
- Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)
- Solución de HCl 0.01N valorada hasta la cuarta cifra decimal

Procedimiento:

Las heces de los días 13 al 17 de la prueba de REP se recolectaron de las charolas de papel (colocadas debajo de cada jaula) separándolas del alimento desperdiciado, se juntaron las heces de 2 ratas de cada uno de los lotes, obteniéndose por cada lote 3 muestras. Las heces se secaron a temperatura ambiente, se pesaron y molieron finamente en un mortero.

Se midió el nitrógeno total a las tres muestras de heces de cada lote y a las dietas por el método de Kjeldahl anteriormente descrito y se determinó la cantidad de alimento ingerido por rata en el período de recolección.

Cálculos:

Para calcular la digestibilidad aparente, se requiere conocer el contenido de nitrógeno de las heces (NF) y el nitrógeno ingerido (NI) de los días de recolección de la materia fecal. Cabe hacer notar que, como se juntaron las heces de 2 ratas, se sacó el promedio del peso de éstas, así como del alimento ingerido para hacer los cálculos.

La forma de calcular el nitrógeno fecal (NF), el nitrógeno ingerido (NI) y la digestibilidad se presentan a continuación:

$$NI = \frac{\% N_{dieta} \times dieta\ ingerida(g)}{100}$$

$$NF = \frac{\% N_{heces} \times peso\ heces(g)}{100}$$

$$Digestibilidad = \frac{NI - NF}{NI} \times 100$$

ANEXO 3

**NITRÓGENO TOTAL (NT) Y NITRÓGENO NO PROTEÍNICÓ (NNP) DE LOS ENSILADOS
ELABORADOS EN LA SEGUNDA ETAPA DE ESTUDIO.**

%NT en los ensilados elaborados con ácido fórmico y ácido fórmico+sulfúrico¹.

Día	Fórmico sin BHT	Fórmico con BHT	Fórmico+sulfúrico sin BHT	Fórmico+sulfúrico con BHT
0	1.11±0.002	1.11±0.002	1.11±0.002	1.11±0.002
1	1.15±0.052	1.21±0.060	1.25±0.037	1.21±0.033
3	1.16±0.022	1.17±0.012	1.13±0.005	1.27±0.053
6	1.09±0.004	1.12±0.040	1.03±0.015	1.18±0.042
8	1.36±0.016	1.23±0.049	1.20±0.028	1.19±0.008
45	1.33±0.011	1.45±0.027	1.31±0.020	1.34±0.020

1. Promedio de triplicado±desviación estándar. CV < 5%

%NNP en los ensilados elaborados con ácido fórmico y ácido fórmico+sulfúrico¹.

Día	Fórmico sin BHT	Fórmico con BHT	Fórmico+sulfúrico sin BHT	Fórmico+sulfúrico con BHT
0	0.29±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01
1	0.82±0.01	0.90±0.04	0.80±0.01	0.75±0.01
3	0.90±0.03	0.89±0.02	0.90±0.01	0.97±0.01
6	1.00±0.02	1.03±0.01	0.96±0.03	1.10±0.04
8	1.21±0.01	1.14±0.03	1.11±0.01	1.07±0.05
45	1.22±0.02	1.30±0.02	1.22±0.01	1.24±0.01

1. Promedio de triplicado±desviación estándar. CV < 5%

ANEXO 4.
DATOS DEL ENSAYO BIOLÓGICO

Peso inicial de los animales, Pi (g).

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	37.7	36.6	37.1	37.6
2	39.7	40.3	40.3	40.0
3	42.4	40.6	40.8	41.4
4	48.0	50.0	49.3	48.7
5	51.1	50.5	50.9	51.0
6	54.9	56.0	55.9	55.0
7	56.9	56.6	56.7	56.8
Promedio	47.2	47.2	47.3	47.2
DE	7.5	8.0	7.9	7.6

Peso final de los animales, Pf (g).

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	109.3	71.1	51.5	78.2
2	134.3	77.2	55.6	83.6
3	115.9	70.0	58.4	94.4
4	93.1	80.0	67.7	109.2
5	99.8	82.5	67.5	76.7
6	98.5	86.6	84.9	101.2
7	130.2	93.6	90.9	115.3
Promedio	111.6	80.1	66.6	94.1
DE	16.0	8.4	15.4	15.2

Incremento de peso (ΔP) de los animales en el día 21 (g).

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	71.6	34.5	14.4	40.6
2	94.6	36.9	15.3	43.6
3	73.5	29.4	17.6	53.0
4	45.1	30.0	18.4	60.5
5	48.7	32.0	16.6	25.7
6	43.6	30.6	29.0	46.2
7	73.3	37.0	34.2	58.5
Promedio	64.3	32.9	20.8	46.8
DE	19.1	3.2	7.7	11.9

Alimento ingerido acumulado al día 21, ΣAI (g).

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	200.9	128.8	112.3	152.2
2	255.5	141.5	106.5	158.9
3	210.5	131.2	116.5	182.8
4	159.1	162.4	101.1	223.4
5	160.5	166.3	132.0	143.9
6	172.6	151.4	175.8	201.6
7	226.2	178.5	185.0	223.5
Promedio	197.9	151.4	132.7	183.8
DE	36.1	18.7	34.1	33.3

Cantidad de alimento ingerido por las ratas en los días 13-17 (g).

Rata	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	45.4	25.4	16.3	37.6
2	56.3	33.2	20.4	31.1
3	46.6	25.2	17.2	34.7
4	27.2	22.3	16.0	46.7
5	31.7	26.6	18.4	27.8
6	29.7	29.9	32.5	37.7
7	49.2	27.2	35.1	48.1

Porcentaje de nitrógeno en las dietas.

Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1.67	1.67	1.58	1.67

Nitrógeno ingerido (NI) por las ratas en los días 13-17 (g)¹.

Determinación	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	0.849	0.489	0.290	0.574
2	0.654	0.397	0.262	0.680
3	0.659	0.477	0.423	0.547

1. Cada valor se obtuvo del promedio de dos ratas.

Nitrógeno fecal (NF) eliminado por las ratas en los días 13-17 (g)¹.

Determinación	Dieta de caseína	Dieta de harina de pescado	Dieta de ensilado	Dieta de ensilado:sorgo
1	0.060	0.104	0.075	0.137
2	0.046	0.084	0.068	0.149
3	0.043	0.108	0.119	0.156

1. Cada valor se obtuvo del promedio de dos ratas.

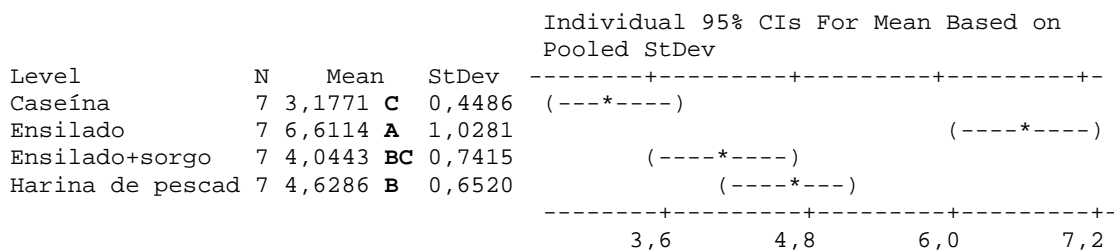
ANEXO 5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO BIOLÓGICO

Conversión alimenticia versus Dietas

Día 21

Source	DF	SS	MS	F	P
Dietas	3	44,653	14,884	26,66	0,000
Error	24	13,399	0,558		
Total	27	58,053			



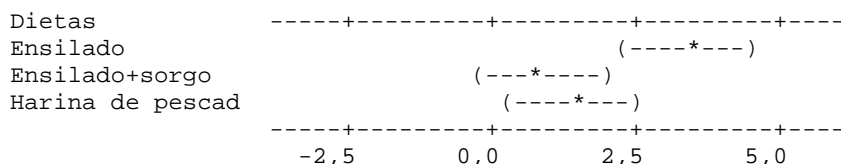
Pooled StDev = 0,7472

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Dietas

Individual confidence level = 98,90%

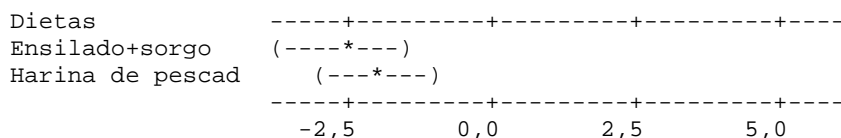
Dietas = Caseína subtracted from:

Dietas	Lower	Center	Upper
Ensilado	2,3329	3,4343	4,5357
Ensilado+sorgo	-0,2343	0,8671	1,9686
Harina de pescad	0,3500	1,4514	2,5529



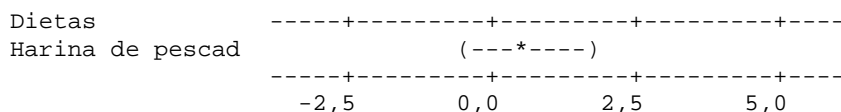
Dietas = Ensilado subtracted from:

Dietas	Lower	Center	Upper
Ensilado+sorgo	-3,6686	-2,5671	-1,4657
Harina de pescad	-3,0843	-1,9829	-0,8814



Dietas = Ensilado+sorgo subtracted from:

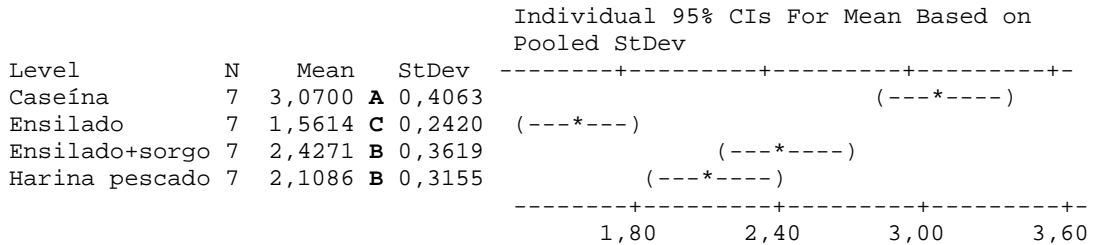
Dietas	Lower	Center	Upper
Harina de pescad	-0,5171	0,5843	1,6857



REP versus Dietas

Día 21

Source	DF	SS	MS	F	P
Dieta	3	8,336	2,779	24,47	0,000
Error	24	2,725	0,114		
Total	27	11,061			



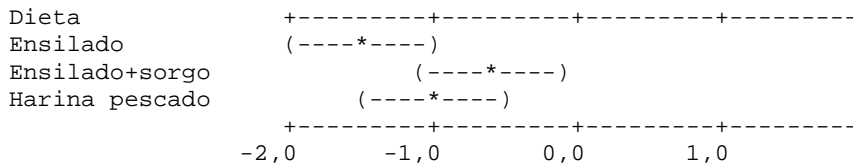
Pooled StDev = 0,3370

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Dieta

Individual confidence level = 98,90%

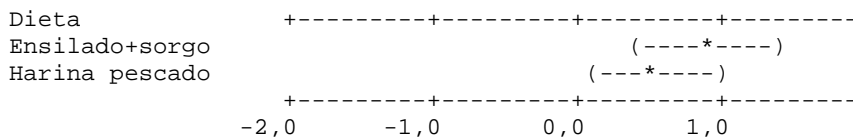
Dieta = Caseína subtracted from:

Dieta	Lower	Center	Upper
Ensilado	-2,0053	-1,5086	-1,0119
Ensilado+sorgo	-1,1395	-0,6429	-0,1462
Harina pescado	-1,4581	-0,9614	-0,4647



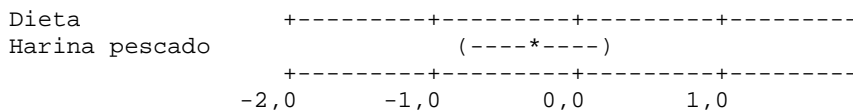
Dieta = Ensilado subtracted from:

Dieta	Lower	Center	Upper
Ensilado+sorgo	0,3690	0,8657	1,3624
Harina pescado	0,0505	0,5471	1,0438



Dieta = Ensilado+sorgo subtracted from:

Dieta	Lower	Center	Upper
Harina pescado	-0,8153	-0,3186	0,1781



Digestibilidad versus Dietas

Días 13-17

Source	DF	SS	MS	F	P
Dieta	3	727,97	242,66	68,92	0,000
Error	8	28,17	3,52		
Total	11	756,14			

S = 1,876 R-Sq = 96,27% R-Sq(adj) = 94,88%

Level	N	Mean	StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Caseína	3	93,167 A	0,338	(--*--)
Ensilado	3	73,347 C	1,305	(---*--)
Ensilado+sorgo	3	75,253 BC	3,400	(---*--)
Harina pescado	3	78,417 B	0,839	(---*--)

-----+-----+-----+-----+-----+
77,0 84,0 91,0 98,0

Pooled StDev = 1,876

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals
All Pairwise Comparisons among Levels of Dieta

Individual confidence level = 98,74%

Dieta = Caseína subtracted from:

Dieta	Lower	Center	Upper
Ensilado	-24,727	-19,820	-14,913
Ensilado+sorgo	-22,821	-17,913	-13,006
Harina pescado	-19,657	-14,750	-9,842

Dieta	Lower	Center	Upper
Ensilado	(---*---)		
Ensilado+sorgo	(---*---)		
Harina pescado	(---*---)		

-----+-----+-----+-----+-----+
-20 -10 0 10

Dieta = Ensilado subtracted from:

Dieta	Lower	Center	Upper
Ensilado+sorgo	-3,001	1,907	6,814
Harina pescado	0,163	5,070	9,978

-----+-----+-----+-----+-----+
-20 -10 0 10

Dieta = Ensilado+sorgo subtracted from:

Dieta	Lower	Center	Upper
Harina pescado	-1,744	3,163	8,071

-----+-----+-----+-----+-----+
-20 -10 0 10