



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN NUTRIMENTAL DE UN ENSILADO DE
DESECHOS DE POLLO Y ALFALFA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

AILED BERENICE FLORES CHÁVEZ

MÉXICO, D. F.

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: LUCIA CORNEJO BARRERA
VOCAL: LETICIA GIL VIERA
SECRETARIO: ROSA MARIA ARGOTE ESPINOSA
1^{er} SUPLENTE: LUZ SANDRA SANCHEZ DEL ANGEL
2^{do} SUPLENTE: SANDRA PEREZ MUNGUIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA

M. EN C. ROSA MARÍA ARGOTE ESPINOSA

SUSTENTANTE

AILED BERENICE FLORES CHÁVEZ

*“Si vosotros permaneciereis en mi palabra,
Seréis verdaderamente mis discípulos;
y conoceréis la verdad,
y la verdad los hará libres”.*
Juan 8:31,32

**A nuestro Padre Dios con mucho amor.
Utilice la carrera para su servicio.**

**Con amor para mis padres Mario y María,
sea compensado todo su amor, esfuerzo y dedicación.**

**A la UNAM, como una semillita de mostaza para el
conocimiento y el crecimiento de nuestro país y del mundo.**

Gracias Padre por tu amor eterno, por llegar a mi vida a través de tu Hijo Jesús y haberme hecho tu hija.

***“Porque de tal manera amó Dios al mundo,
que ha dado a su Hijo unigénito,
Para que todo aquel que en él cree,
no se pierda, mas tenga vida eterna”.***
Juan 3:16

Gracias por mis padres, Mario y María, por todo su amor, esfuerzo, disciplina y paciencia.

Gracias por mis hermanos Mario y Yair, por su cariño, momentos agradables y paciencia.

Gracias por mis abuelitos Lupito-Juanita y Rodimiro-Aurelia, con mucho cariño.

Gracias por todos mis tíos y primos, en especial por mi tío Luis, su apoyo y cariño incondicional; tío Homero y tía Trini.

Gracias por permitirme entrar a la UNAM y utilizarlo como medio para conocer tu palabra. Gracias por el ministerio de UBF y colocar en mi camino a dos grandes madres: M. Edith y M. Cori, por su amor, fe y confianza. Gracias por el amor de tus misioneros Samuel Lee y madre Sara Berry, Abraham y Sara Hwan, David y Esther, Isidro e Isaac.

Gracias por mi otra familia: Chema, amor, fe y esperanza; Sra. Cristina, Kity, Norberto; Pato, Demetrio, Margarita, Alejandro, Miguel Ángel, Olimpia, Paulina y Víctor; por su amistad, apoyo y enseñanza; Susana y Dulce, amistad y gratos recuerdos; maestra Yolanda, amor, enseñanza y confianza; Erika y Oscar, tierno cariño y amistad; Sonia, amistad, fortaleza y confianza; Jessy, amistad, comprensión y confianza; Loana, amistad y confianza; Sra. Ruth, amor de mamá, confianza y amistad; Norma, preciosa vida y amistad; Ernestín, amistad incondicional y mucha paciencia; Xochitl, fe sencilla, amor y bonita amistad, Adriana, amistad y confianza; Isaac, alegría y confianza, Pablo, constancia y fortaleza; César, deseo de conocer la verdad y amistad; Azucena, esperanza, confianza y amistad; Ivete, tierno corazón y amistad; Karina, cariño y amistad, Gibran, fe, ánimo y alegría; Sandra, amistad y confianza; Azucena, Minka y Selene, inocencia, tierno corazón; Vania, fe y bonito corazón; Bety, amistad; Jesuitas, amistad y ejemplo; Laura, Paulina, Marisol y Rodrigo de odontología, amistad y alegría; Angélica, Verónica, gran apoyo; Denisse, Denis, Tía Rita, bonito corazón y amor; Idalia, consejo y apoyo, Silvia, Guillermo, Paloma, Laura, Sra. Marielena, Jennifer, Stefany, Wendy, Maribel, Yanerit, Hayde, Lisbeth, Rosalba, Alejandro, Marco, Oscar Cruz, Juanita, Mary Cruz, Álvaro, Adrián, Mara, Anahí, Laura, Gladys, Karina, Guillermo, Perla, Nataly, Ranferi, Aramis, Samuel, Carlos, Manuel Luis, Isabel, Carlos, Miguel, David.

Gracias por todos tus siervos: P. Nancy y P. Moisés, P. Ruth, P. Rosario, P. Rocío y P. Raúl P. Vero y P. Juan Carlos, P. Hayde y P. Lenin, P. Margarita y P. Ricardo, P. Rosa y P. Sergio, P. Rebeca y M. Pablo, P. Verónica y P. Jorge, P. Raúl y Ruth todo su amor y consejos.

Muchas gracias por mis hermanas en la fe: América, gran corazón y amistad; Ángeles, cariño y amistad; Lisette, fuerza y ejemplo; Gaby, cariño y enseñanza, Erendira apoyo incondicional y enseñanza; María, Martha, Carlita, Aurora, Irazú, Jazmín, Carla, Esmeralda, consejo y amistad.

Gracias porque en la carrera colocaste a varios angelitos que me alentaron a continuar: maestra Yolanda Quezada, gran apoyo y amistad; Doctor Carlos Rius, apoyo incondicional y gran ejemplo, maestra Josefina Montes Ayala, paciencia y enseñanza; maestra Rosita Argote, cariño, apoyo y mucha paciencia; maestra Lety Gil, gran apoyo; Sra. Vicky, apoyo y enseñanza incondicional; Sra. Jose, tierno cariño; Fabiolín, Laura y Pedro, amistad y ánimo.

Gracias la facultad de química, por el lab. 111 del Edif E, maestra Ángela, maestro Lucas, maestra Liliana, Argelia, Erika, Jazmín, Yesenia, Melany, Karla.

Gracias por la maestra Lucy Cornejo y Lulú Osnaya, ejemplo, apoyo y muy valiosa labor.

Gracias por cada maestro y compañero que intervino en mi formación, sobretodo al Comité de becas alimenticias, becas Pronabes y CONACYT.

Gracias por el INBA, sueño hecho realidad, maestra Bety, ejemplo y entrega; maestra Palmira, corazón generoso; maestra de música, sencillez de corazón; maestra Mireya, responsabilidad y disciplina; maestra Nayeli, apoyo.

Gracias por el CCH sur y por darme la oportunidad; en especial, gracias por Nancy, su amistad, apoyo, confianza y preciosa tarea; maestra Malú, confianza y respaldo; maestro Mauricio, alegría y apoyo maestro Mauricio, alegría y apoyo, maestro Efrén, humildad, paciencia y corazón noble; por cada maestro que me alentó y me apoyó.

Gracias por el programa 121, formación de profesores; gracias por la maestra Rosamaría González Muradas, apoyo y confianza.

Gracias por Cuauhtli, Nayar, Israel, Gisela, Paola, Enrique, Tania, Mariana, Guadalupe, Manuel, Frida, Emanuel, Fernanda, Arisbet, Jazmín, Ana Karen, Alberto, Marco, Eduardo, Edurne, Janis, Luis Miguel, Dante, Luis, Daniel, Carlos, Miguel, Javier, Liliana, Nestor, Itziar, Rodríguez y Viana; que les alcance tu palabra.

Gracias Padre por sostenerme todo este tiempo con tu amor y gracia, por bendecirme en gran manera y finalizar la carrera, sin ti nada es posible...

“Porque Jesús vive triunfaré mañana”

ÍNDICE GENERAL	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1. Subproductos de la industria avícola	4
3.2. Ensilado de subproductos de origen animal	5
3.3. Descripción de la alfalfa	9
3.4. Ensilado de especies forrajeras	11
3.5. Uso del ensilado en la alimentación animal	13
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Diagrama de trabajo	15
4.2. Materiales y método para la caracterización de las materias	16
4.2.1. Acondicionamiento de las materias primas	16
4.2.2. Análisis proximal de la alfalfa y el homogeneizado de pollo	16
4.3. Medición de la actividad enzimática de las vísceras de pollo	25
4.3.1. Obtención del extracto enzimático	25
4.3.2. Medición de actividad proteolítica	26
4.3.3. Determinación de proteína soluble	29
4.4. Ensayo piloto de elaboración de ensilados	33
4.4.1. Elaboración de ensilados	33
4.4.2. Monitoreo durante el proceso de ensilaje	34

4.5. Elaboración de ensilado para su evaluación nutrimental	41
4.5.1. Diagrama de trabajo	41
4.5.2. Elaboración del ensilado de homogeneizado de vísceras de pollo y alfalfa	42
4.5.3. Preparación de las dietas para la prueba biológica de Conversión alimenticia	42
4.5.4. Evaluación biológica del ensilado	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1. Materias primas	47
5.1.1. Análisis proximal de la alfalfa	47
5.1.2. Análisis proximal del homogeneizado de pollo	48
5.2. Medición de la actividad enzimática en las vísceras de pollo	49
5.2.1. Determinación de la actividad enzimática proteolítica	49
5.2.2. Cuantificación de proteína soluble	50
5.2.3. Actividad enzimática específica	51
5.3. Ensayo piloto de los ensilados	52
5.3.1. Monitoreo durante el proceso de ensilaje	52
5.4. Evaluación biológica del ensilado	58
5.4.1. Obtención y monitoreo del ensilado de pollo-alfalfa	58
5.4.2. Análisis proximal de las materias primas para la elaboración de dietas	61
5.4.3. Crecimiento de las ratas	63
5.4.4. Conversión alimenticia de las ratas	66
6. CONCLUSIONES	68
7. BIBLIOGRAFÍA	69

1. INTRODUCCIÓN

El consumo de productos avícolas ha aumentado sostenidamente en los últimos años; según datos de The USA Poultry & Egg Export Council (USAPEC, 2008) reportan que la carne de pollo estadounidense exportada a los tres principales países importadores: Rusia, China, y México, en el 2007 sumó 1.3 millones de toneladas, lo cual representa el 51% del volumen total de las exportaciones, obteniéndose en ese mismo año el record de todos los tiempos en el valor de las exportaciones de carne de ave y huevo. En México, la Secretaria de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA, 2006), especifica que el consumo nacional aparente (CNA) de la carne de pollo, creció al doble del año 1995 al 2005, siendo este de 1, 396,599.0 toneladas y 2, 797,262.8 toneladas, respectivamente.

Una de las desventajas del procesado industrial de aves para consumo humano es que el 18 % de la producción está constituido por los despojos generados después de la faena de la canal (vísceras, patas, cabezas, plumas), parte de estos se destinan para alimentación animal y otros se tiran contaminando el ambiente. Sin embargo, pueden ser aprovechados como materia prima en la producción de alimentos para animales, después de un proceso económico como el ensilado, con esto se evitaría la contaminación que producen los desperdicios y se colaboraría en la protección del medio ambiente.

La técnica de ensilaje consiste en la licuefacción de desechos de origen animal, mediante enzimas endógenas hidrolíticas, aceleradas por ácidos orgánicos y/o inorgánicos o por medio de la fermentación láctica de un sustrato de hidratos de carbono que se les añade, por lo cual, el ensilado es una alternativa económica para la suplementación energética y proteínica en las dietas dirigidas a la alimentación animal, ya que diversos estudios en ensilados de subproductos de pescado y pollo, han comprobado que poseen un alto valor nutrimental.

Durante los procesos químicos que se llevan a cabo en la producción de ensilado, se disminuye el contenido de algunos aminoácidos, principalmente triptófano, estos pueden ser obtenidos de otras fuentes al mezclarse con cereales y/o leguminosas. Varios estudios avalan que la alfalfa es una excelente especie forrajera por proporcionar elevados niveles de proteínas, minerales y vitaminas de

calidad. Además, se reconoce a la alfalfa como una leguminosa de alta flexibilidad en su utilización, momento de cosecha y conservación. Por estas cualidades se han incrementado los esfuerzos en investigación, centrándose en los procesos de transformación de la alfalfa.

Debido a que en la actualidad existe una gran demanda de alimento para animales destinados al consumo humano, es preciso encontrar métodos que optimicen los ya existentes, en este trabajo se elaborara un ensilado a base de vísceras de pollo y alfalfa para su uso en la alimentación animal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Obtener un ensilado de pollo a partir de vísceras, cabezas y piel de pollo con inclusión de alfalfa, que pueda utilizarse para elaborar un alimento de alto valor nutricional apto para la alimentación animal.

2.2. Objetivos particulares

- Determinar la composición química proximal de la alfalfa y el homogeneizado de vísceras, cabezas y piel de pollo.
- Cuantificar la actividad proteolítica en el homogeneizado de pollo.
- Establecer las condiciones óptimas para elaborar el ensilado.
- Evaluar en una prueba biológica la calidad nutrimental del ensilado.

3. ANTECEDENTES

3.1. Subproductos de la Industria avícola

Los subproductos de la producción avícola constituyen del 28 al 30 % del peso total del ave (Jamdar y Harikumar, 2005). Sangre, plumas, vísceras, cabezas y patas se acumulan rápidamente en grandes cantidades y si son manejados como desperdicios se traduce en pérdidas económicas.

Actualmente se ha avanzado en la utilización de éstos en la elaboración de dietas para peces, aves y ganado, ya que se destacan por ser ricos en proteínas y altamente palatables (Lallo, *et al.*, 1977, Lappie, *et al.*, 1992, Vizcarra, 1998). La principal presentación que se les da a los subproductos es en harinas; por citar algunos ejemplos: la harina de sangre contiene 80% de proteína cruda y es una excelente fuente del aminoácido lisina, sin embargo, la proteína que contiene es de mala calidad, por lo cual debe incluirse en porciones pequeñas en la ración; la harina de pluma hidrolizada contiene 70% o más de proteína, aunque es alta en cistina y deficiente en metionina, triptófano y lisina, solo sustituye hasta un 10% a la pasta de soya; por último la harina de subproductos avícolas (cabezas, patas, intestinos), es una excelente fuente de proteína. Los intestinos que ocupan entre el 20 y 30% de los desperdicios generados (Jamdar, y Harikumar, 2005), aportan un 30% de proteína asimilable con adecuados niveles de lisina y minerales como calcio y fósforo.

Por otra parte, si los subproductos no son canalizados para su uso inmediatamente después de la matanza, existe el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos, *Salmonella ssp* y enterobacterias, que pueden sobrevivir por largos periodos de almacenamiento y ello no solo repercute a la producción de aves, sino también a la salud de los consumidores.

Con el propósito de mantener un control sanitario y conservar la disponibilidad de los nutrimentos contenidos en estos subproductos; es posible utilizar distintos métodos como la cocción, deshidratación, compostaje o el ensilaje dentro de las granjas avícolas.

La cocción es una práctica común y exitosa en los pequeños productores, sin embargo, los subproductos deben ser utilizados a corto plazo. Aunque la deshidratación y la manufactura de harinas aumentan la vida de anaquel, el costo

energético es muy alto, que lo hace poco rentable e inclusive inalcanzable para los productores a baja escala. Tanto a nivel artesanal como industrial, la técnica de compostaje y ensilaje son viables de implementar, pero en la primera, existe la desventaja de que bacterias anaerobias tipo *Clostridium spp* proliferen en compostas mal elaboradas (Muñoz, 1999); en cambio, los ensilados al poseer un pH entre 3 y 4 eliminan la posibilidad de crecimiento de microorganismos patógenos y putrefactivos, con lo cual se permite la conservación de los subproductos hasta por varios años (Tatterson, 1981).

3.2. Ensilado de subproductos de origen animal

El primer ensilado elaborado a partir de desechos de animales, tuvo su origen en Suecia, fue de pescado y se utilizó durante la segunda guerra mundial, aunque, Noruega es actualmente el principal productor con una producción anual de 200,000 toneladas. De la elaboración de ensilados existe mayor información en los que se utilizan recortes y/o pesca acompañante, sin embargo, se han buscado nuevas alternativas de materia prima de los sectores avícola y porcino. México, contribuye a esta investigación con el ensayo de ensilados a partir de vísceras y subproductos de pollo y excretas porcinas (Vázquez, 2007, Toledo, 2007).

Específicamente, el ensilado de origen animal se define como un producto semilíquido o pastoso, que aprovecha los desperdicios de la industria que no son destinados para el consumo humano, y para su conservación se emplean tanto ácidos orgánicos como inorgánicos, siendo los primeros ya por adición o por síntesis *in situ* por bacterias lácticas.

Los ensilados químicos no presentan variaciones significativas entre los diferentes ensilados preparados. En contraste, los ensilados de tipo biológico (con microorganismos) si las presentan, debido principalmente a la presencia de microorganismos distintos a los generadores de ácido láctico, ya que producen aminas (amoníaco, histamina, cadaverina, putrescina y tiamina) que son tóxicas para los animales y afectan su crecimiento (Gilberg, *et al.*, 1982).

Para obtener un ensilado de alta calidad, no basta con partir de una materia prima adecuada, sino que esta debe alcanzar un pH entre 2 y 4, con el fin de activar las enzimas digestivas pepsinas y catepsinas que se encuentran en las vísceras. La

mezcla de ácidos fórmico y sulfúrico se ha utilizado con éxito, ya que además de acelerar la actividad hidrolítica de las enzimas, inhibe el crecimiento microbiano y disminuye los costos de producción. (Raju, *et al.*, 1997, Santana, *et al.*, 2008, Vizcarra, 1998).

Aunado al pH, la temperatura posee una relación directa con la velocidad y niveles de licuefacción del tejido (Lo, *et al.*, 1992). Diversos estudios, indican que la temperatura óptima de trabajo es de 37 °C y agitación ocasional, con lo cual se asegura una proteólisis máxima durante los tres primeros días de ensilaje. (Gildberg, *et al.*, 1982; Vizcarra, *et al.*, 1999).

La producción de ensilado no requiere de equipo costoso; tanto a nivel artesanal como a escala industrial es factible llevarse a cabo (Vázquez, 2007). Debido a que consta de cuatro operaciones básicas: molienda, homogeneización, envasado y almacenamiento, es una tecnología altamente adaptable para conservar los subproductos que se generan en las industrias del sector ganadero y acuícola, de manera amigable con el medio ambiente, segura y más económica que la manufactura de harinas (principal destino).

Principales cambios químicos durante el ensilaje

- **Cambios químicos en proteínas**

El primordial cambio que sucede durante la elaboración del ensilado es la hidrólisis proteínica, la cual es llevada a cabo mayoritariamente por enzimas endógenas de las vísceras. Elevados niveles de catepsinas (B, D, H y L) y aminopeptidasas se encuentran en estos órganos, en el caso específico del pollo, la actividad proteolítica en los intestinos es 1.5 a 3 veces más alta que en el músculo esquelético, hígado y bazo. A pH ácido, la catepsina D es la principal enzima responsable de la degradación de la matriz proteínica (Donta y Van, 1970). En un estudio realizado por Jamdar y Harikumar (2005) se demuestra que esta proteasa retiene más del 50% de la actividad a través de un periodo de seis horas de autólisis, mientras que en las otras ácido-dependientes se perdía en 30 minutos. Asimismo, al utilizar un inhibidor específico, “pepstatin” a pH 2.5, la degradación del tejido fue inhibido en un 95 %.

La degradación enzimática de las proteínas se caracteriza por una fase inicial rápida, durante la cual, una gran cantidad de enlaces peptídicos son hidrolizados, seguida de un decremento en la hidrólisis que corresponde a una fase estacionaria. Ésta última, puede deberse a factores como la inactivación enzimática, inhibición de productos y a la autodigestión de las enzimas (Shahidi, *et al.*, 1995).

A fin de conocer el grado de hidrólisis durante la elaboración del ensilado, se determina el nitrógeno no proteínico (NNP) con respecto al nitrógeno total (NT), ya que conforme la matriz proteínica al licuarse por acción de las enzimas, aumenta la concentración de péptidos, aminoácidos y bases volátiles totales, como consecuencia el grado de hidrólisis aumenta (Dapkevicius, *et al.*, 1998). Por citar un ejemplo, Vázquez (2007) al elaborar un ensilado de vísceras y despojos de pollo con una mezcla de ácidos propiónico y sulfúrico, cuantificó el primer día 50.6 % de hidrólisis y en la etapa final a los 43 días, un 98.3 %.

- **Cambios químicos en lípidos**

Durante el proceso de ensilaje, los lípidos se ven afectados a través de dos principales vías de reacción: lipólisis y autooxidación, las cuales deben evitarse con la adición de antioxidantes, porque además de reducir su valor nutritivo, generan compuestos volátiles que imparten sabores y olores desagradables.

La lipólisis, es catalizada por lipasas que hidrolizan los triglicéridos y provocan la liberación de los ácidos grasos. En condiciones de temperatura entre 30 y 40 °C a un pH de 7 a 9, la actividad de la mayoría de ellas se favorece (Badui, 2006).

Los métodos de control de la lipólisis en el ensilado, además de la disminución de pH, son el precocimiento de los desechos de animales y la remoción de grasas (Machin, *et al.*, 1989). El primero, aunque inactiva a las lipasas también ocasiona el deterioro de las enzimas proteolíticas, lo cual, en el caso de los rumiantes es una ventaja, debido a que en los ensilados se busca un menor daño en las proteínas (Guo, 2007). Con la remoción de grasas, no sólo se evita la lipólisis sino igualmente la autooxidación, que es la principal vía de rancidez de las grasas.

De todos los lípidos, los ácidos grasos insaturados son los más susceptibles a la rancidez oxidativa por el mecanismo de radicales libres, que consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. En el transcurso de la iniciación,

catalizada por calentamiento, iones metálicos e irradiación, se producen radicales de ácidos grasos ($R\cdot$); los cuales reaccionan con el oxígeno para formar radicales peróxidos ($ROO\cdot$), estos pueden interactuar con otras moléculas de lípidos y crear hidroperóxidos ($ROOH\cdot$) que a su vez generan nuevos radicales libres ($R\cdot$), provocando una reacción en cadena. Al aumentar los radicales en el sistema, se van formando no radicales o productos finales (aldehídos, cetonas, alcoholes, pequeños ácidos carboxílicos y alquenos) y se termina con la cadena anterior (Farkas, 1997).

Los efectos de la oxidación lipídica en los ensilados repercuten en forma directa sobre la producción de engorda animal. La disminución en la palatabilidad y el daño a ácidos grasos esenciales, linolénico y araquidónico, proteínas y vitaminas, son los más adversos (Machin, *et al.*, 1990). A causa de este deterioro, el uso de los antioxidantes en la elaboración de los ensilados es trascendental.

Compuestos donadores de protones como: Etoxiquina, Butilhidroxitolueno (BHT) y Terbutilhidroxiquinona (TBHQ), actúan en la iniciación y propagación de la oxidación (Gildberg, *et al.*, 1982, Santana, *et al.*, 2008). Los antioxidantes se usan en concentraciones de hasta 200 ppm (0.02%) del contenido de aceite en el ensilado, cantidad suficiente para su protección.

Vázquez (2007) a través de un ensilado elaborado a partir de piel, cabezas, patas y vísceras de pollo corroboró el éxito de la mezcla 1:1:1 BHT, TBHQ y ácido cítrico, al encontrar una menor producción de malonaldehído (producto de la oxidación lipídica) en el ensilado con estos antioxidantes, en comparación al ensilado sin éstos. En el caso del ácido cítrico, aunque su mecanismo de acción no disminuye el número de radicales, protege a los lípidos a través de la formación de complejos con metales.

Santana y colaboradores (2008) en un estudio realizado en ensilado de pescado, el TBHQ (2 ppm) protegió a los ácidos grasos poliinsaturados, determinándolos en igual cantidad, tanto en la harina como en el ensilado de pescado.

3.3. Descripción de la alfalfa

La alfalfa es una planta originaria de Asia occidental, fue introducida en Europa desde la antigua Persia, llegando a España con las invasiones árabes, de allí se trajo a México en 1519, desde entonces, ha sido un cultivo sumamente explotado para sistemas de producción intensiva de rumiantes, vacuno de leche y ovino-caprino (LLorca y cols., 1999).

En el centro y norte de México la alfalfa, *Medicago sativa*, es un cultivo popular entre los agricultores, teniendo un papel muy importante en la producción de leche en estabulación y en la elaboración de concentrados alimenticios para aves y ganado de engorda. Se estima que se cultivan alrededor de 300,000 hectáreas de alfalfa bajo condiciones de riego en todo el país, sobresalen los estados de Guanajuato y Chihuahua como los líderes en superficie sembrada. Otros estados productores de forraje de alfalfa son Hidalgo, Puebla, Querétaro, Michoacán, Jalisco y Baja California (Salinas, 2008).

Debido al crecimiento de la ganadería lechera en estabulación y al uso relativamente reciente del agua de bombeo del subsuelo y/o de presas para regar, en México, la alfalfa es ahora cultivada todo el año en una gran diversidad de regiones. La explotación se hace en forma intensiva, teniéndose desde 8 hasta 12 cortes de forraje por año. Se considera que el promedio nacional de persistencia económica de la alfalfa es de casi tres años. Entre las variedades mexicanas más comunes se encuentran Júpiter, San Miguelito, Milenio y Atlixqueña; sin embargo, al no ser autosuficientes en la producción de alfalfa se tiene que importar todos los años de Estados Unidos, cuyas variedades más conocidas son Cuf-101, SW.14, Pioneer 5929, Alta Verde y Excelente. Se estima que México importa entre el 85% y el 90% de sus necesidades anuales de semilla de alfalfa. Los principales países proveedores, aparte de Estados Unidos, son España y Australia. (Salinas, 2008).

Como forraje, la alfalfa posee dos características fundamentales: 1) Calidad alimenticia excepcional en términos proteínicos, vitamínicos y minerales. Presenta altos niveles de β -carotenos y xantofilas, respecto a los primeros son precursores de la vitamina A y tienen una clara influencia en la producción de los bovinos, mientras que las xantofilas se han utilizado ampliamente en nutrición aviar. Debido a que proporciona calcio, fósforo, potasio, magnesio, azufre, etc., permite emplearla para

complementar eficazmente las raciones; 2) Capacidad de sintetizar nitrógeno junto con microorganismos fijadores del nitrógeno en el suelo, lo cual permite aprovechar diferentes tipos de suelos e incluso suelos no favorables para otros cultivos, como es el caso del maíz, que es una especie muy exigente (Journet, 1993; Undersander, *et al.*, 1993).

- **Conservación de forraje**

Entre las grandes dificultades nacionales, se distinguen bajos niveles de producción agrícola y pecuaria, como resultado de un gran número de factores técnicos y socioeconómicos que inciden sobre la producción. Uno de los factores más notables dentro de la problemática pecuaria, es el relacionado con la alimentación de los animales, el cual tiene estrecha relación con la disponibilidad de forraje. En México, se puede encontrar una variedad amplia de condiciones ambientales, y casi todas formas climáticas tipificadas en el mundo; sin embargo, la producción de forraje esta limitada por el comportamiento estacional. De acuerdo con la información disponible, en la época de lluvias se produce de 60 a 90% del volumen anual, correspondiente al resto de la época (Jiménez, 2001).

Al considerar la importancia del manejo de la producción como alternativa para regular las variaciones en el abastecimiento del forraje, es vital optimizar los métodos de su conservación. Las formas comerciales de forrajes conservados más comunes en México son: henificación y ensilado; de éstas los forrajes representativos son la alfalfa (*Medicago sativa*), avena (*Avena sativa*) y el maíz (*Zea mays*).

Tanto la henificación (reducción de la humedad a menos de 20%) como el ensilaje, son métodos de conservación que están al alcance de cualquier explotación; la decisión de utilizar uno u otro está en función del clima, tradiciones culturales, cultivos forrajeros en explotación, conocimiento técnico-práctico, infraestructura disponible, maquinaria y tipo de animal. En grandes áreas de Europa, el heno y los cultivos verdes han sido el alimento principal de las vacas lecheras. Sin embargo, en las últimas décadas, bajo condiciones más intensivas de producción, la tendencia ha sido sustituir la elaboración tradicional de heno por ensilado (Ekern y Vik-Mo, 1983).

A nivel mundial, se observa un aumento de la conservación de forrajes mediante el ensilaje, especialmente en los países de clima templado húmedo. La principal razón de esto, es el riesgo y mayor trabajo que requiere la henificación a causa del clima, ya que las lluvias deterioran la calidad del forraje y las mayores pérdidas que se producen en la henificación en comparación al ensilaje (Musiera y Ratera, 1984).

3.4. Ensilado de especies forrajeras

Regularmente, el ensilaje forrajero se lleva a cabo a través de la fermentación láctica, lo cual se consigue a través de dos condiciones fundamentales:

- a) Alto grado de anaerobiosis para limitar las pérdidas por respiración celular, comprimiendo bien el forraje y expulsando el aire.
- b) Favorecer las fermentaciones lácticas, impidiendo el desarrollo de fermentos contraproducentes (butíricos y putrefactivos).

- **Proceso de ensilaje forrajero**

El forraje, ya segado y colocado en el silo, continúa su proceso de respiración, puesto que las células están aun vivas, se producen reacciones que desprenden CO₂ y calor. En esta fase de respiración, hay degradación de parte de los azúcares solubles e incluso de las proteínas, que no se detiene cuando el pH es inferior a 4.

La fase de fermentación comienza al finalizar la respiración, acidificándose el medio ambiente mediante la producción de ácido acético por bacterias coliformes, que tienen una temperatura óptima de 18 a 25 °C, pero que no resisten la acidez ni las altas temperaturas, desapareciendo al llegar el forraje a pH 4.2. Su acción es de escasa duración y sin gran importancia en el proceso.

Al seguir disminuyendo el pH, comienzan a proliferar bacterias lácticas, cuyo óptimo desarrollo se produce a 35 °C pero pueden vivir entre 5 y 60 °C, necesitando de un ambiente rico en azúcares solubles, exento de oxígeno y pH entre 3 y 4. Alcanzado este nivel de acidez, se interrumpe y estabiliza el proceso, completándose así la fase de fermentación. El proceso dura aproximadamente 21 días.

Cuando no se alcanza rápidamente un pH menor a 4, se desarrollan los microorganismos putrefactivos, destacando los de género *Clostridium*. Estos atacan a proteínas, aminoácidos y otros compuestos celulares, produciendo ácido butírico, amoniaco, así como sustancias que pueden ser tóxicas para el ganado (Hardy, *et al.*, 1986).

Con el propósito de garantizar la calidad del ensilado pueden utilizarse diferentes aditivos, según su modo de acción son agrupados en 4 categorías: acidificantes, bacteriostáticos, estimulantes de la fermentación láctica y conservadores biológicos (Gómez, 2005).

La adición de ácidos inorgánicos u orgánicos, inhabilita el desarrollo de *Costridium*, y a concentraciones más elevadas también inhibe parcialmente la fermentación láctica. Gracias a este efecto microbiológico se consigue una disminución en las pérdidas de materia seca y una mayor durabilidad del ensilado. Hardy y colaboradores (1986) señalan que la combinación de ácido fórmico y el presecado del forraje han producido una alta recuperación de azúcares y proteína bruta, así como bajos niveles de nitrógeno amoniacal. También Guo y colaboradores (2007), reportan la eficacia en ensilados de alfalfa tratados con ácido fórmico al impedir la degradación de los aminoácidos durante el ensilaje de alfalfa, y al reducir el nivel de bases volátiles (NH₃-N). De hecho, corroboraron que el ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, tirosina, leucina, glicina, lisina e histidina, aumentaron sustancialmente en comparación a los ensilados sin adición del ácido.

Los aditivos bacteriostáticos tienen como fin inhibir la fermentación butírica y otras no deseables. El formol o formaldehído es un producto esterilizante y bacteriostático.

Sustratos, enzimas y cultivos microbianos, son estimulantes que aceleran la fermentación, aumentan la reserva de material fermentable y establecen dominancia de bacterias productoras de ácido láctico, respectivamente. Los materiales usados, en el mismo orden descrito, son melaza; amilasas y celulasas; cultivos de *Lactobacillus*. En forrajes pobres en hidratos de carbono, como la alfalfa, son eficaces los estimuladores a base de azúcares, ya que además de reducir la humedad, aumentan el contenido energético del ensilado.

Conservadores o aditivos de tipo biológico, se elaboran a base de bacterias lácticas y ocasionalmente enzimas, sobre un sustrato inerte o azucarado. Estas bacterias, aparte de inducir la fermentación láctica, provocan una mayor ingestión por el animal y mejoran la utilización del nitrógeno.

3.5. Uso del ensilado en la alimentación animal

Aunque el uso del ensilado de especies forrajeras se remonta a un tiempo más atrás, en comparación al ensilado de origen animal, numerosos estudios avalan indistintamente su éxito al incorporarse a la dieta de animales. Por tal motivo, cada vez más se deben buscar estrategias para su complemento; como es el caso de un ensilado a partir de excretas porcinas 82%, grano de sorgo molido 20%, y melaza 8%, donde Meza (2000) concluyó que puede incluirse hasta un 40% en dietas para corderas en crecimiento, con parámetros productivos de ganancia de peso, consumo de materia seca y conversión alimenticia similares a los de una dieta tradicional.

En relación a los ensilados únicamente de fuente animal, destacan los de pescado con una mayor explotación e información; hoy en día constituyen un alimento apropiado para cerdos, pollos, patos, rumiantes y hasta los peces (Pérez, 1995).

Aludiendo a experiencias con ensilados de vísceras de pescado en pollos, Vizcarra (1999) encontró que una mezcla ensilado-sorgo 70:30, puede ser incluida hasta en un 15 % en dietas dirigidas a aves en etapas iniciales de su vida, sin efectos adversos en el grado de conversión alimenticia. En cerdos, de igual forma, con el ensilado de vísceras de pescado adicionado con aceite crudo de palma, es posible sustituir la proteína de la torta de soya en un 75%, tanto en la etapa de levante como en la de ceba (período de desarrollo y engorde de los cerdos que ocurre cerca de los 20 kg de peso y termina cuando es enviado al mercado), con los mismos rendimientos de ganancia en peso. (Bermudez, *et al.*, 1999).

A pesar de la escasez de ensayos y aplicación industrial, los ensilados de subproductos de pollo, se han abierto alternativas de utilidad en el sector porcino y acuícola. Ejemplos evidentes son los estudios realizados por Lallo y colaboradores (1997), en los cuales informan que el ensilado de residuos de pollo, sin patas, plumas y cabezas, con incorporación de melaza de caña y *Lactobacillus*, puede

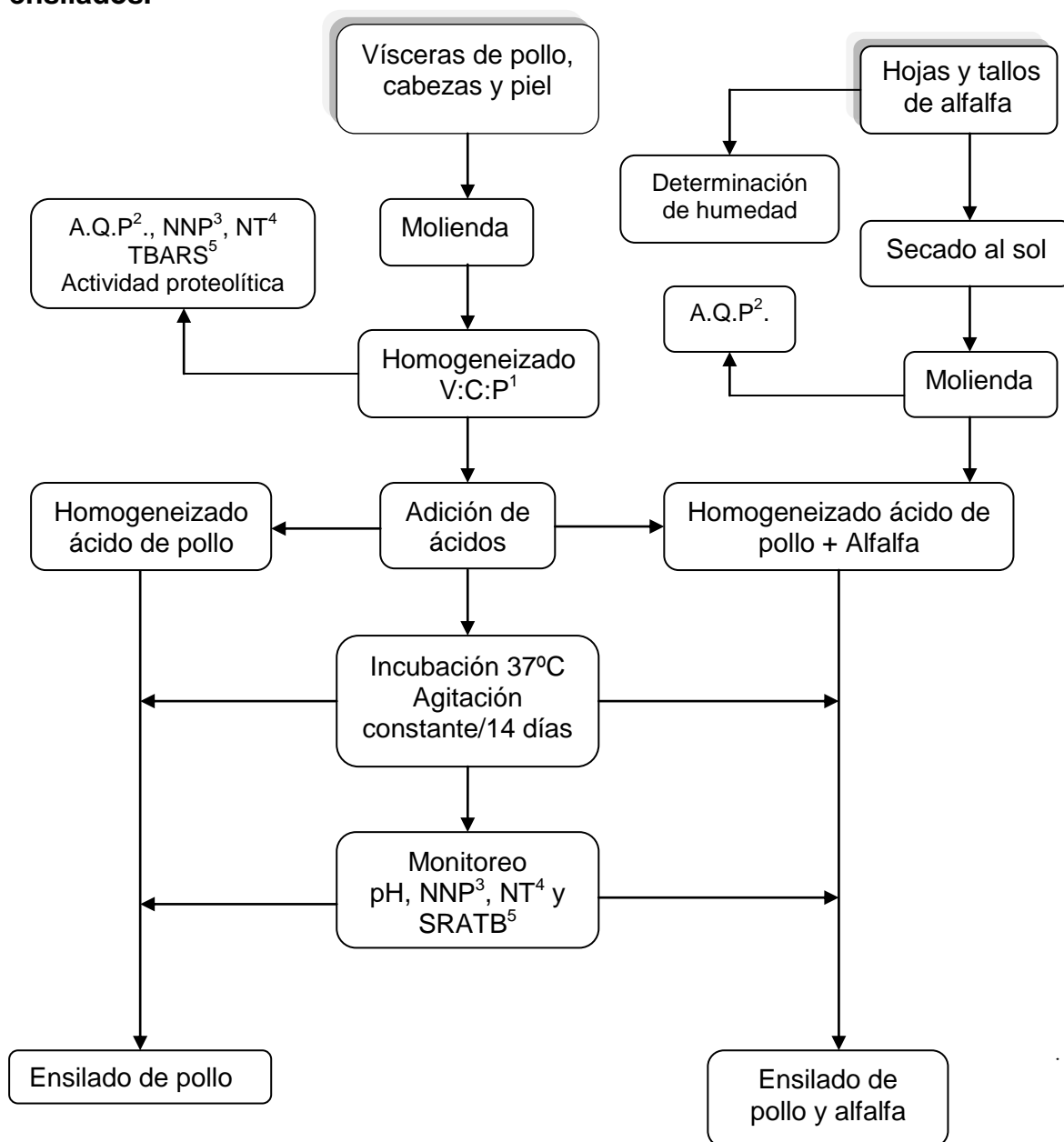
remplazar en un 30 %, a una dieta comercial para cerdos, sin afectar su desarrollo de crecimiento o su salud; asimismo, Toledo (2007) verificó que la inclusión del 15% de ensilado de residuos de pollería 75.5%, tortilla molida 20%, melaza 4% y ácidos orgánicos (fórmico, valérico y succínico) en la alimentación de cerdos durante la etapa de engorda (finalización), resulta 26.72 % más redituable para el productor, que alimentar a los cerdos con el alimento comercial; Middleton y colaboradores (2000), en el campo de la acuicultura, concluye que al alimentar a tilapias con ensilado de pollo co-extraído y camote 60:40, estas no presentan consecuencias significativas en su desarrollo de crecimiento, mientras se incorpore a la dieta en un 33%.

El principal destino que se le da al ensilado de alfalfa es el sector ganadero. En un estudio realizado por Hoffman y colaboradores (1998), en vacas en etapa de lactancia, se observó que al ser alimentadas con ensilado de alfalfa, produjeron más leche que las alimentadas con pasto, como consecuencia del alto contenido de proteína en la alfalfa. Igualmente, el ensilado de alfalfa mostró en vacas periparturientas una retención positiva de N, Ca, P, Mg y K, minerales esenciales en la producción de leche (Kume, *et al.*, 2001).

4. METODOLOGÍA

4.1. A continuación se presenta un diagrama de bloques para visualizar de manera gráfica las actividades desarrolladas en esta etapa de trabajo.

Figura 1. Caracterización de la materia prima y ensayo piloto de elaboración de ensilados.



¹V:C:P. Homogeneizado de vísceras y cabezas de pollo

²A.Q.P. Análisis químico proximal, método AOAC (1990)

³NNP. Determinación de nitrógeno no proteínico

⁴NT. Cuantificación de nitrógeno total

⁵SRATB. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

4.2. Materiales y método para la caracterización de las materias primas.

4.2.1. Acondicionamiento de las materias primas

Se utilizaron vísceras (tripas, mollejas, hígados), cabezas, piel de pollo y alfalfa fresca, los cuales fueron adquiridos en el Mercado de “La Bola” en Santo domingo, Ciudad de México.

Para facilitar el proceso, la alfalfa previamente se secó al sol. Posteriormente en un molino marca Whiley utilizando una malla de 2 mm fue molida, para luego ser almacenada a temperatura ambiente en un recipiente de plástico.

Porcentualmente se licuó 45.3% de tripas, 16.7% de mollejas, hígados, cabezas y 4.7% de piel de pollo todo esto en una licuadora semi-industrial marca MOMAT L-10, por un tiempo de 15 min para facilitar la molienda de dicha mezcla se adicionó agua (21.7 % v/p). Por último, la pasta obtenida se separó en recipientes de plástico y se congeló a -45 °C para su análisis químico y obtención del extracto enzimático.

4.2.2. Análisis proximal de la alfalfa y el homogeneizado de pollo

Siguiendo las técnicas de la AOAC (1990), se realizó el análisis proximal de la alfalfa y del homogeneizado de pollo.

- **Determinación de humedad**

Fundamento

La cuantificación de humedad se basa en la pérdida de peso de la materia en cuestión por la evaporación de agua al aplicar calor.

Materiales

- Balanza analítica Sartorius Modelo 022605.
- Desecador de vidrio.
- Espátula.
- Charolas de aluminio.
- Estufa con corriente forzada LAB-LINE Modelo IMPERIAL III.
- Estufa de vacío LAB-LINE Duo Vac Oven Modelo 3620.

Procedimiento

Se colocan a peso constante las charolas en la estufa de vacío y se registra su peso. De la alfalfa fresca se pesan 30 gramos y del homogeneizado de pollo 7 gramos, cada muestra en su charola, y se introducen en la estufa de corriente forzada a 65 °C por 24 horas. Posteriormente se secan en la estufa de vacío a una temperatura de 60-65 °C con una presión mínima de 25 mm Hg, hasta peso constante, es decir, cuando no hubo variación en el peso hasta la tercera cifra decimal. La determinación se realiza por triplicado.

El mismo procedimiento se lleva a cabo en la cuantificación de la humedad residual en la alfalfa secada al sol.

Cálculos

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

Donde:

P_i = peso de la charola con la muestra húmeda en gramos;

P_f = peso de la charola con la muestra seca en gramos;

m = peso de la muestra húmeda en gramos.

- **Determinación de cenizas totales**

Fundamento

Las cenizas de los productos alimentarios están constituidas por el residuo inorgánico que queda después de incinerar la materia orgánica a 500 °C.

Materiales

- Mufla THERMOLYNE Modelo 1500.
- Balanza analítica Sartorius Modelo 022605.
- Crisoles de porcelana.
- Desecador de vidrio.
- Espátula.
- Mechero Bunsen.
- Pinzas.

- Triángulo de porcelana.
- Tripie.
- Campana de extracción.

Procedimiento

Los crisoles se ponen a peso constante en la mufla, a una temperatura entre 500-550 °C. Se colocan 5 gramos de alfalfa y 3 gramos del homogeneizado de pollo, previamente secados en cada crisol. Bajo la campana de extracción se carboniza la materia a la flama del mechero Bunsen hasta el cese de humo. Los crisoles se introducen a la mufla (500-550 °C) con el fin de obtener las cenizas, posteriormente se pesan y cuando estén a peso constante se registra el valor para calcular el porcentaje de cenizas. La determinación es por triplicado.

Cálculos:

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

Donde:

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

P_o = peso del crisol a peso constante en gramos;

m = peso de la muestra en gramos.

- **Determinación de proteína cruda**

Fundamento

El Método de Kjeldahl es el más utilizado para la determinación de nitrógeno orgánico en alimentos. Consta de tres etapas: a) digestión de la materia orgánica por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores, donde el nitrógeno orgánico se reduce hasta nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco; b) liberación del amoníaco obtenido de la digestión por destilación en presencia de un álcali y c) valoración del amoníaco con una solución de ácido valorado.

Reactivos

Glucosa R.A.

Sulfato de potasio R.A.

Mezcla digestiva.

Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada y adicionar 50 mL de ácido ortofosfórico (H_3PO_4), cuando se haya disuelto completamente la sal, agregar lentamente por la pared del recipiente 430 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Agitar por 30 min para homogeneizar perfectamente.

Solución de NaOH al 40%

Pesar 400 g de NaOH y disolver con 800 mL de agua destilada. Trasladar a un matraz aforado de 1000 mL, adicionar agua hasta el aforo.

Peróxido de hidrógeno al 30%

Solución indicadora A: Rojo de metilo 10%

Disolver 100 mg de rojo de metilo con alcohol metílico en un matraz aforado de 100 mL. Agregar el disolvente hasta el aforo.

Solución indicadora B: Verde de bromocresol al 10%

Disolver 100 mg de verde bromocresol con alcohol metílico en un matraz aforado de 100 mL. Agregar el disolvente hasta el aforo.

Solución de ácido bórico 1% con indicadores

Colocar 20 g de ácido bórico en un vaso de precipitados de 1000 mL. Adicionar 400 mL de agua para disolver el ácido y transferir a un matraz volumétrico de 2000 mL, agregar 20 mL de la solución indicadora A y 14 mL de la solución indicadora B. Mezclar vigorosamente y agregar el volumen de agua necesario para alcanzar el aforo.

Solución de HCl 0.01 N

Valorado con carbonato de sodio hasta la cuarta cifra decimal.

Materiales

-Espátula.

-Pizeta.

-Vasos de precipitados de 50, 500 y 1000 mL.

- Matraces aforados de 100 y 1000 mL.
- Papel cebolla.
- Balanza analítica Sartorius.
- Tubos de digestión de 75 mL.
- Digestor Ab-20/40. TECATOR.
- Equipo de microdestilación Kjeltec 1030. TECATOR.

Procedimiento

1. Aproximadamente se pesan 0.1 g de muestra sobre papel cebolla, el cual se coloca doblado en el tubo digestor.
2. Se agrega 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de mezcla digestiva.
3. Los tubos se colocan en el digestor a una temperatura de 340°C por un tiempo de 15 min.
4. Se retiran los tubos del digestor y cuando estén a temperatura ambiente se les adiciona 1.5 mL de H₂O₂ al 30%.
5. Nuevamente se colocan los tubos dentro del digestor a 370° C, manteniéndose en digestión hasta observar el líquido incoloro o ligeramente verde transparente. El tiempo aproximado es de 1.5 horas.
6. Concluida la digestión, los tubos se retiran del digestor y se enfrían a temperatura ambiente.
7. Para el proceso de destilación, a estos tubos con la muestra digerida se les adiciona 25 mL de agua desionizada, y se colocan individualmente en el microdestilador automático.
8. Los mililitros de HCl que se gastan en la titulación del amonio atrapado en la solución de ácido bórico con indicadores, se registran para conocer la cantidad de Nitrógeno.
9. Al mismo tiempo en que se lleva a cabo la digestión en las muestras, se realiza el estándar de caseína con 0.02 g (como referencia) y el blanco de reactivos, utilizando 0.1 g de sacarosa, asimismo, se destilan como lo expuesto en las muestras. La determinación se realiza por duplicado.

Cálculos

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

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

Donde:

% NT = % de nitrógeno total;

P = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación de la muestra;

B = mL de HCl 0.01N gastados en la 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 6.25 (cuando no se conoce el de la muestra).

Determinación de grasa cruda

Fundamento

La grasa total es la suma de los componentes con características de lípidos (tri, di y monoglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides, vitaminas liposolubles, pigmentos, etc.) que son extraídos con disolventes orgánicos y expresados como triglicéridos.

El método que se utilizó para la determinación fue el de Goldfish, en el cual, el material seco y molido se coloca en un aparato de extracción continua donde las gotas condensadas del disolvente caen sobre la muestra contenida en un dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente. Así, el disolvente está en contacto continuo con la muestra, lográndose la extracción total de la grasa. Al eliminar el disolvente, el extracto etéreo se cuantifica gravimétricamente.

Reactivos

Éter de petróleo, punto de ebullición 35-60 °C

Materiales

- Vasos de Extracción Goldfish de borde esmerilado.
- Balanza analítica Sartorius Modelo 022605.
- Estufa de vacío LAB-LINE Duo Vac Oven Modelo 3620.
- Pinzas.
- Cartuchos de celulosa.
- Portadedales de vidrio.
- Anillos metálicos con rosca.
- Aparato de extracción Goldfish Labconco Modelo 350001-00 CV.

Procedimiento

1. Se pesan 5 g de harina de alfalfa y 2 g de homogeneizado de pollo en polvo.
2. La materia se coloca dentro de un cartucho de celulosa tapado con algodón. Cada cartucho se introduce en un portadedal para poder sostenerlo en el seguro metálico del aparato de extracción.
3. En los vasos esmerilados a peso constante se adiciona 50 mL de éter, con la ayuda de anillos metálicos con rosca, se aseguran los vasos al aparato de extracción.
4. Se activa la recirculación de agua helada en el aparato y se suben las parrillas de calentamiento hasta el contacto con los vasos. Por un periodo de 4 horas en posición LOW, se controla el calentamiento.
5. Una vez extraída toda la grasa se cambian los portadedales por tubos colectores y nuevamente se calientan los vasos a fin de recuperar el éter.
6. Cuando los vasos estén casi libres de disolvente se retiran del aparato y se colocan en la campana de extracción por unos minutos para eliminar el resto del disolvente.
7. Finalmente se colocan los vasos en la estufa de vacío hasta alcanzar el peso constante. La cuantificación es por triplicado.

Cálculos

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

Donde:

P_f = peso del vaso después de la extracción sin disolvente y con la grasa extraída;

P_o = peso del vaso vacío antes de la extracción en gramos;

m = peso de la muestra en gramos.

Determinación de fibra cruda

Fundamento

La porción de los alimentos que corresponde a la fibra es aquella que no puede ser digerida por las enzimas del intestino; es decir, son los hidratos de carbono estructurales tales como la celulosa y hemicelulosa de los tejidos vegetales.

Para la determinación de la fibra, la muestra desengrasada se somete a una hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis alcalina con una posterior incineración del material insoluble y por diferencia se obtiene el contenido de hidratos de carbono no degradables.

Reactivos

Solución de H₂SO₄ al 1.25 % m/v

Solución de NaOH al 1.25 % m/v

Silicato de aluminio

Antiespumante, emulsión SIGMA-B

Alcohol etílico. Grado reactivo

Materiales

-Vasos de Berzelius de 600 mL KIMAX.

-Espátula.

-Perlas de vidrio.

-Aparato de digestión LABCONCO.

-Estufa de vacío LAB-LINE Duo Vac Oven Modelo 3620.

-Mufla THERMOYNE Modelo 1500.

- Crisoles de porcelana.
- Embudos Buchner con filtro.

Procedimiento

1. La muestra seca y desengrasada se coloca en un vaso de Berzelius con 0.5 de silicato de aluminio y perlas de vidrio.
2. Se adicionan 200 mL de H₂SO₄ al 1.25 % hirviendo y unas gotas de antiespumante e inmediatamente se instala en el aparato de digestión. Por espacio de 30 minutos exactos se digiere la muestra.
3. Después de ese periodo, se recupera el residuo mediante la filtración a vacío y se lava con 500 mL de agua destilada caliente hasta eliminar el ácido.
4. Nuevamente el residuo se transfiere al vaso Berzeluis, se le agrega 200 mL de NaOH 1.25 % hirviendo y unas gotas de antiespumante para colocarlo a digestión por 30 minutos.
5. El contenido del vaso se deposita en el embudo Bucher y se realiza la filtración al vacío. Con 500 mL de agua destilada caliente se lava el residuo a razón de quitar el álcali y rescatar el material adherido en las perlas de vidrio.
6. Por último, se le adiciona al residuo 25 mL de alcohol etílico.
7. En forma cuantitativa se pasa el residuo a un crisol de porcelana con peso constante y se coloca en la estufa de vacío por un tiempo de 8 horas, se deja enfriar para registrar su peso.
8. A continuación se incineran en la mufla (550 °C); se enfría y nuevamente se pesa el crisol. Las determinaciones son por triplicado.

Cálculos

$$\% \text{ Fibra} = \left(\frac{P_s - P_c}{m} \right) \times 100$$

Donde:

P_s = peso del crisol con la muestra después de la digestión en gramos

P_c = peso del crisol con la muestra posterior a la incineración en gramos

m = peso de la muestra en gramos.

Determinación de carbohidratos totales (por diferencia)

Se calculan por diferencia restando a 100 la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína, grasa y fibra cruda.

Cálculo

% Carbohidratos = 100 - (%humedad + %proteína + %grasa + % cenizas + %fibra).

4.3. Medición de la actividad enzimática de las vísceras de pollo

4.3.1. Obtención del extracto enzimático

Reactivos

HCl 0.1 N.

Se mide un volumen de 19.7 mL de HCl concentrado (37%) y se lleva a un aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 2000 mL. La titulación se realiza con Na₂CO₃ anhidro, utilizándose como indicador el verde de bromocresol.

Agua acidulada a pH= 3.0

A un vaso de precipitados de 1 L se le agregan 900 mL de agua destilada y se introduce el electrodo de un potenciómetro para ajustar el pH a 3 con HCl concentrado.

Materiales

- Vasos de precipitados de 50 mL y 1000 mL.
- Probeta de 25 mL.
- Pipeta Pasteur.
- Potenciómetro Corning 1432.
- Espátula.
- Balanza analítica Sartorius Modelo 022605.
- Homogeneizador Potter.
- Matraz volumétrico de 250 mL y 2000 mL.
- Tubos para centrifuga de 50 mL.
- Ultracentrífuga Sorvall RC 50 Plus.

Procedimiento para la obtención del extracto enzimático

1. A partir de una fracción del homogeneizado de pollo, se realiza la fragmentación del tejido con un homogeneizador Potter constituido por un émbolo y un tubo de vidrio, el cual se coloca dentro de un baño de hielo.
2. De este homogeneizado se toman 25.0 g y se lleva a pH= 3 con HCl 0.1 N para activar el pepsinógeno.
3. La mezcla se vierte en un matraz aforado de 250 mL y se afora con agua acidulada a pH 3.
4. De la mezcla se toman 50 mL y se colocan en tubos para centrifugar a 16000 r.p.m. por 45 min a 4 °C.
5. Se separa el sobrenadante y se desecha el sedimento.
6. A partir de este extracto enzimático, se realiza la medición de la actividad proteolítica y contenido de proteína (conservado en congelación).

4.3.2. Medición de actividad proteolítica siguiendo el método de Anson (1938)

Fundamento

La determinación de actividad proteolítica se basa en la digestión de hemoglobina por las enzimas presentes en la muestra, bajo condiciones estándar: pH, 37 °C por 10 minutos. El sustrato no digerido se precipita con ácido tricloroacético, la tirosina y el triptofano del sobrenadante se hacen reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu que da una coloración azul, que será proporcional a la actividad hidrolítica de la muestra sobre el sustrato.

Una unidad de actividad proteolítica expresa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de 1 μmol de tirosina a 37 °C al pH óptimo de la enzima en 1 minuto. Para el cálculo de la actividad específica (unidad de actividad / mg de proteína) se determina la concentración de proteína con los preparados enzimáticos, según el método de Lowry.

Reactivos

HCl 0.06 N

Se mide un volumen de 127.8 mL de HCl 0.12 N y se afora con agua destilada en un matraz volumétrico de 200 mL.

Solución estándar de tirosina 2 μ mol/mL

Colocar 18.1 mg de tirosina (Sigma) en un matraz aforado de 50 mL y aforar con HCl 0.06 N.

Hemoglobina al 2% en HCl 0.06 N

Pesar 0.5 g de hemoglobina bovina (Sigma) y llevar a un volumen de 25 mL en un matraz aforado con HCl 0.06 N.

Ácido tricloroacético 5%

Se pesan 5 g de ácido tricloroacético al 19 % y se colocan en un matraz aforado de 100 mL, a éste se adiciona el volumen de agua necesario para alcanzar el aforo.

NaOH 0.5 N

Pesar 5.0 g de NaOH en perlas y disolver en agua destilada; aforar a 250 mL.

Reactivo de Folín-Ciocalteu

Diluir 1 volumen del reactivo de Fenol- Folin Ciocateu (Hycel de México), con 2 volúmenes de agua destilada, este se prepara al momento para ser utilizado.

Materiales

- Matraces volumétricos de 250 mL, 100 mL, 25 mL y 10 mL.
- Probeta de 250 mL y 50 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Espátulas.
- Pipetas graduadas de 10 mL, 5 mL y 1 mL.
- Tubos de ensayo de 16 X 150 mm.
- Vortex Super mixer N° 1290.
- Baño de agua con regulación de la temperatura a 37 °C.
- Tubos centrifuga de 25 mL.
- Centrifuga Eppendorf 5702.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner, Modelo 340.

Preparación de la curva estándar de tirosina

1. A partir de la solución patrón de tirosina ($2\mu\text{mol/mL}$) se miden 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mL en matraces aforados de 10 mL, y se llevan al aforo con agua destilada correspondiendo a 0.00, 0.02, 0.04, 0.06, 0.1, 0.16 y 0.2 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente.
2. De cada una de las soluciones patrón se colocan 2.5 mL en tubos de ensaye.
3. Se agrega a cada tubo 5mL de NaOH 0.5N y 1.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido, posteriormente se agita.
4. Después de 10 minutos, se lee a una longitud de onda de 750 nm en el espectrofotómetro, ajustado contra el blanco de reactivos.
5. Por último, se grafica la absorbancia contra la concentración de tirosina expresado en $\mu\text{mol/mL}$.

La determinación de cada concentración de la curva patrón se realiza por triplicado.

Procedimiento para medir la actividad proteolítica en el extracto enzimático.

1. Del extracto enzimático se toma 1 mL, colocándose en un tubo de ensayo se adicionan 5 mL de Hemoglobina al 2% (por triplicado).
2. Se incuban a 37°C por 10 minutos.
3. La reacción se detiene con 10 mL de ácido tricloracético al 5%.
4. Esta mezcla se coloca en tubos para centrifugar y se centrifuga a 4000 r.p.m. por 20 min a temperatura ambiente.
5. Se toma una alícuota de 2.5 mL del sobrenadante y se coloca en el tubo de ensayo.
6. A cada tubo se agregan 5mL de NaOH 0.5 N y 1.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se agita.
7. Después de 10 minutos se lee a una longitud de onda de 750 nm en el espectrofotómetro, ajustado contra el blanco de reactivos.
8. Se obtiene el contenido de tirosina en $\mu\text{mol/mL}$ por interpolación en la curva patrón de tirosina.

4.3.3. Determinación de proteína en el extracto enzimático por el Método de Lowry

Fundamento

Para cuantificar la cantidad de proteína presente en la materia prima se utilizó la técnica de Lowry, esta se fundamenta en el uso de la reacción de Biuret, donde las proteínas reaccionan con los iones cobre en medio alcalino. El reactivo de Folín-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico), se reduce por los residuos de tirosina y de triptofano presentes en la proteína, y se forma un complejo cobre-proteína que es detectado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm.

A partir de una curva patrón de albúmina sérica bovina se cuantifica en el extracto la proteína presente.

Reactivos

Buffer de citrato-fosfato, pH 3

Para su elaboración se prepararon dos soluciones:

a) Solución de ácido cítrico 0.1 M. Pesar 9.61 g de ácido cítrico y disolverlo en 250 mL de agua destilada y llevar a un aforo de 500 mL con la misma.

b) Disolución de fosfato de sodio heptahidratado 0.2 M. Disolver 13.44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua destilada, verterlo en un matraz volumétrico de 250 mL para llegar al volumen de aforo con agua destilada.

Verter en un matraz de 1000 mL, 398 mL de la disolución de ácido cítrico 0.1 M y 102 mL de la solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, adicionar agua destilada hasta el aforo. A esta nueva solución se le ajusta el pH a 3 con HCL y NaOH concentrados.

Solución estándar de albúmina sérica bovina 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Pesar 0.026 g de albúmina (Sigma) en un matraz aforado de 50 mL y adicionar poco a poco agua destilada hasta el aforo para evitar la formación de burbujas. Almacenar en alícuotas de 10 mL a $-4\text{ }^\circ\text{C}$.

Reactivo A

En un matraz aforado de 100 mL colocar 0.23 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 10.0 g de carbonado de sodio, adicionar un volumen de 69 mL de NaOH 0.8 N, con agua destilada llevar al aforo.

Reactivo B

Disolver 2.3 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1g de sulfato de cobre pentahidratado en 12.5 mL de NaOH 0.8 N y aforar a 100 mL con agua destilada. Almacenar este reactivo en un envase ámbar.

Reactivo mezcla

Se incorporan 25 volúmenes de la disolución de NaOH 0.8 N, con 18 volúmenes del reactivo A y 2 volúmenes del reactivo B. La preparación se realiza al momento.

Reactivo C

Un volumen del reactivo de Folín-Ciocalteu se diluye con dos volúmenes de agua destilada, también esta solución se elabora al momento.

Materiales

- Balanza Analítica Sartorius Modelo 022605.
- Pipetas graduadas de 5 mL.
- Matraces volumétricos de 50 mL y 10 mL.
- Probeta graduada de 50 mL.
- Vortex Super mixer N° 1290.
- Tubos de ensaye de 16 X 150 mm.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner. Modelo 340.

Preparación de la Curva Patrón de albúmina sérica bovina

1. Se preparan disoluciones con concentraciones de 0.5, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$ a partir de la disolución estándar de albúmina (500 $\mu\text{g/mL}$).
2. De cada disolución se toma 1 mL y se coloca en tubos de ensaye; a cada uno se le agrega 0.9 mL del reactivo mezcla y se agita en un vortex, después se adiciona 0.6 mL de reactivo C, nuevamente se agita para añadir 0.6 mL de reactivo C y mezclar vigorosamente. Los tubos se incuban a temperatura ambiente por 45 minutos, protegidos de la luz. La determinación de cada concentración se realiza por triplicado.
3. Se leen las absorbancias en un espectrofotómetro a 750 nm, el cual se ajusta contra el blanco de reactivos.

4. Se traza la curva de absorbancia contra concentración de albúmina sérica bovina (μg de proteína/mL).

La concentración de proteína de la muestra se calcula a partir de la curva patrón y el resultado se obtiene en μg de proteína/mL, el cual se multiplica por el factor de dilución de la alícuota del extracto, expresado en mg de proteína/mL.

Procedimiento: Determinación del contenido de proteína en el extracto enzimático

1. A partir del extracto enzimático se toma una alícuota de 1 mL, se deposita en un matraz aforado de 50 mL y se lleva al volumen con el buffer citrato-fosfato pH 3.
2. En un tubo de ensayo se coloca 1 mL de la anterior solución 1:50.
3. Se añade 0.9 mL del reactivo mezcla e inmediatamente se agita en un vortex.
4. Del reactivo C se agrega 0.6 mL y se agita para volver a agregar el mismo volumen de este reactivo.
5. Se incuban a temperatura ambiente por 45 min, protegiendo el tubo de la luz.
6. En un espectrofotómetro a 750 nm se leen las absorbancias, éste se ajusta contra el blanco de reactivos. La determinación se realiza por triplicado.
7. El contenido de proteína se determina al interpolar el valor de la absorbancia de la mezcla en una curva patrón de albúmina sérica bovina.

Cálculos para determinar la actividad enzimática específica

Ejemplo de cálculo:

Tyr $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ homogeneizado = [(Tyr $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de extracto X 250 mL)/10 min]/25 g;

Tyr $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ homogeneizado = [(Tyr 0.154 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ X 250 mL)/10 min]/25 g = **0.154.**

Tyr 0.154 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ = Valor de tirosina interpolado en la curva patrón de tirosina.

Donde:

250 mL = Aforo;

10 min = tiempo de reacción;

25 g = gramos de homogeneizado.

Proteína mg/g homogeneizado = [(proteína $\mu\text{mol}/\text{mL}$ de extracto X 50 mL X 250 mL)/1000]/25 g;

Proteína mg/g homogeneizado = [(proteína 63.953 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ X 50 mL X 250 mL)/1000]/25 g = **31.98.**

Proteína 63.953 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ = Valor interpolado en la curva patrón de albúmina.

Donde:

250 mL = aforo;

50 mL = dilución;

25 g = gramos de homogeneizado.

Tyr $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína = (Tyr $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ homogeneizado) / (proteína mg/g homogeneizado);

Tyr $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína = (Tyr 0.154 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$) / (proteína 32 mg/g) = **0.0047.**

4.4. ENSAYO PILOTO DE ELABORACIÓN DE ENSILADOS

La intención de realizar este ensayo fue conocer las condiciones óptimas (temperatura, pH, almacenamiento, agitación y homogeneización) para elaborar el ensilado en estudio.

4.4.1 Elaboración de ensilados

Se obtuvieron dos ensilados con un similar porcentaje de proteína.

1. Ensilado de homogeneizado de pollo al 10% de proteína

En la elaboración del ensilado se utilizaron 300 g de homogeneizado de pollo como fuente de proteína y 91.6 g de agua, mezclándose hasta obtener homogeneidad, luego se midió el pH inicial. Se ajustó el pH a 3 con ácido fórmico y sulfúrico concentrados, en una relación de 5.6:4.4 respectivamente (Ruiz, 2007). Por último, en función del contenido lipídico del ensilado, se le adicionó como antioxidante BHT al 0.02%.

La proporción de ensilado a 400 g, se estableció con base en la mínima cantidad de muestra necesaria para realizar las determinaciones de pH, NNP, NT y SRATB durante el tiempo de ensilaje.

En un recipiente de plástico de 2 L se preparó el ensilado y se incubó a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 14 días, con agitación esporádica.

2. Ensilado de homogeneizado de pollo y alfalfa 50:50 de 10% de proteína

El ensilado se elaboró con 208.5 g de homogeneizado de pollo, 91.5 g de alfalfa y 700 g de agua, se utilizaron las mismas condiciones que en el ensilado de pollo, sólo se modificó la proporción de ácidos fórmico- sulfúrico, 5.4:4.6.

Puesto que en este ensilado se trató de mantener el mismo contenido de proteína (10%) que el del ensilado de pollo, se utilizó la proporción de ensilado de pollo-alfalfa 50:50 de 10%, y se mezclaron los ingredientes del homogeneizado y alfalfa en las cantidades indicadas; además, debido a que la alfalfa absorbe una suma importante de agua, fue inevitable agregarla hasta obtener una homogeneización completa y poder realizar las mediciones de los parámetros mencionados.

4.4.2. Monitoreo durante el proceso de ensilaje

pH

La determinación se realizó con un potenciómetro marca Corning 1432, los días 1, 2, 3, 6, 8, 9, 10 y 14 de estudio.

Evolución de hidrólisis del contenido proteínico

El grado de hidrólisis proteínica se expresa como el porcentaje de nitrógeno no proteínico (NNP) con respecto al contenido del nitrógeno total (NT). Dicha medición se realizó a la materia prima y posteriormente al ensilado durante el transcurso del ensilaje en los días 1, 3, 6, 8 y 14 de estudio.

Determinación de nitrógeno no proteínico

Fundamento

La cuantificación del nitrógeno no proteínico se basa en la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético al 20% seguido de una digestión, destilación y titulación (método de micro-Kjeldahl).

Reactivos

Ácido tricloroacético al 20%

Pesar 404 g de ácido tricloroacético (pureza 99%) y disolverlos en 1000 mL de agua destilada para llevarlos a un volumen de aforo de 2000 mL.

Sulfato de potasio R.A.

Glucosa R.A.

Peróxido de hidrógeno al 30%.

Solución indicadora A: Rojo de metilo 10%

Se disuelven 100 mg de rojo de metilo con alcohol etílico en un matraz aforado de 100 mL, se agrega el disolvente hasta alcanzar el aforo.

Solución indicadora B: Verde de bromocresol al 10%

Se disuelven 100 mg de verde bromocresol con alcohol etílico en un matraz aforado de 100 mL, se agrega el disolvente hasta alcanzar el aforo.

Solución de ácido bórico 1% con indicadores

Colocar 20 g de ácido bórico en un vaso de precipitados de 500 mL. Un volumen de 400 mL de agua se adiciona para disolver el ácido y transferir a un matraz volumétrico de 2000 mL, se agregan 20 mL de la solución indicadora A y 14 mL de la solución indicadora B. Ésta mezcla se agita vigorosamente y se agrega el volumen de agua necesaria para alcanzar el aforo.

Solución de HCl 0.01 N

Valorado con carbonato de sodio hasta la cuarta cifra decimal.

Materiales

- Balanza analítica Sartorius.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Matraces aforados de 25 mL.
- Espátulas.
- Tubos para centrifuga de 50 mL.
- Centrífuga.
- Embudos.
- Fibra de vidrio.
- Pipeta graduada de 5 mL.
- Tubos de digestión TECATOR.
- Digestor Ab-20/40. TECATOR.
- Equipo de microdestilación Kjeltex 1030. TECACOR.

Procedimiento

1. Se pesa 1 g del ensilado y se disuelve con una solución de ácido tricloroacético al 20%, llevándose a un volumen de aforo de 25 mL.
2. Por dos horas se deja reposar con el fin de precipitar toda la proteína del ensilado.
3. Después de ese periodo de tiempo, todo el volumen del matraz se transvasa en un tubo y se centrifuga a 4400 r.p.m. por 30 min.
4. Con el propósito de separar algunos residuos de proteína suspendidos en la superficie, se filtra a través de un embudo con fibra de vidrio.

5. Del sobrenadante se toman 3 mL y se colocan en un tubo de digestión. La medición se realiza por triplicado.
6. A cada tubo de digestión se le agregan 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de mezcla digestiva.
7. Los tubos se colocan en el digestor a una temperatura de 340°C por un tiempo de 15 min.
8. Se retiran los tubos del digestor y cuando estén a temperatura ambiente se les adiciona 1.5 mL de H₂O₂ al 30%.
9. Nuevamente se sitúan los tubos dentro del digestor a 370° C, manteniéndose en digestión hasta observar el líquido incoloro o ligeramente verde y transparente. El tiempo aproximado es de 1.5 horas.
10. Concluida la digestión, los tubos se retiraran del digestor y así disminuye su temperatura hasta ser igual a la del ambiente.
11. Para el proceso de destilación, a los tubos con la muestra digerida se les adiciona 25 mL de agua desionizada y se colocan individualmente en el microdestilador automático.
12. Para conocer la cantidad de NNP se registran los mililitros de HCl gastados en la titulación del amonio atrapado en la solución de ácido bórico con indicadores.
13. Al mismo tiempo en que se lleva a cabo la digestión en las muestras, se realiza el estándar de caseína con 0.02 g (como control) y el blanco de reactivos, utilizándose 0.1 g de sacarosa, por duplicado cada uno. Asimismo, se destilan y titulan como lo expuesto en las muestras.

Cálculos

$$\% \text{ NNP} = [(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100]/m;$$

Donde:

% NNP = % de nitrógeno no proteínico;

P = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación de la muestra;

B = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación del blanco;

N = normalidad de la solución de HCl;

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014);

m = peso de la muestra en gramos.

Determinación de nitrógeno total (NT)

A través del método de micro-Kjeldahl se cuantificó el nitrógeno total; como ya se indicó, éste consiste en el método de cuantificación de proteína cruda.

Cálculos

$$\% \text{ NT} = [(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100]/m$$

Donde:

% NT = % de nitrógeno total;

P = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación de la muestra;

B = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación del blanco;

N = normalidad de la solución de HCl;

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014);

m = peso de la muestra en gramos.

Determinación del grado de oxidación de la grasa

La cuantificación se realizó por el método propuesto por Vycke (1970), el cual se basa en la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, que se expresan como malonaldehído. Para precipitar la fracción proteínica que se encuentra en la materia prima y en las muestras obtenidas durante el ensilaje, los días 0,1,3, 6, 8 y 14, se empleó una solución de ácido tricloroacético al 7.5% en agua. Uno de los principales aldehídos que resultan de la oxidación lipídica es el malonaldehído, y cuando reacciona junto con los demás aldehídos con el ácido tiobarbitúrico se producen compuestos coloreados, que van desde el color rosa pálido hasta el rojo, se detectan a 538 nm en un espectrofotómetro que es proporcional a la cantidad de malonaldehído presente.

Reactivos

Ácido tricloroacético

Se pesan 75 g de ácido tricloroacético y se disuelven en agua destilada para verterlos en un matraz aforado de 1000 mL, agregando agua hasta el aforo.

Solución de ácido tiobarbitúrico 0.02 M

Sobre una nave de vidrio, se pesan 0.59 g de ácido tiobarbitúrico, cuidadosamente se colocan dentro de un matraz volumétrico de 200 mL. Se adiciona 100 mL de agua destilada tibia para facilitar la disolución, una vez disueltos los gránulos y a temperatura ambiente, se agrega el volumen de agua destilada hasta el aforo.

Solución estándar de tetraetoxipropano 0.01 M

Pesar 0.06 g de tetraetoxipropano y disolver con 10 mL de agua destilada. Dentro de un matraz aforado de 25 mL verter y agregar agua hasta completar el volumen y por último agitar.

Solución de trabajo de tetraetoxipropano 1×10^{-5} M

Con una micropipeta se toman 200 μ L de la solución de tetraetoxipropano 0.01 M y se colocan en un matraz volumétrico de 200 mL, se adiciona agua destilada hasta el aforo.

Materiales

- Balanza analítica Sartorius.
- Espátulas.
- Pizeta.
- Matraces aforados de 25, 200, 1000 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL y 250 mL.
- Pipeta automática finnpipette (de 200 μ L - 1000 μ L).
- Tubos para centrifuga de 50 mL.
- Centrífuga.
- Embudos.
- Fibra de vidrio.
- Pipeta graduada de 5 mL.
- Gradilla.
- Tubos.

- Canicas.
- Baño de agua a temperatura de ebullición.
- Celdas de vidrio.
- Espectrofotómetro Sequoia-Turner Modelo 340.

Procedimiento

1. Se pesan aproximadamente 0.5 g de muestra y se homogeneiza con 15 mL de solución de ácido tricloroacético al 7.5%, éste volumen se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL y se agrega el ácido hasta el aforo.
2. Para separar la proteína precipitada se centrifuga a 4400 r.p.m. por 30 min., el contenido de los tubos se filtra a través de un embudo con fibra de vidrio, a fin de eliminar las partículas visibles en suspensión.
3. Del filtrado se toma una alícuota de 5 mL y se coloca dentro de un tubo, agregándose 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.02 M. La determinación se realiza por triplicado.
4. Los tubos se tapan con canicas para colocarse en un baño de agua hirviendo por un período de 45 min.
5. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos se enfrían hasta que alcanzaron la temperatura ambiente.
6. Durante los primeros 30 min, se determina la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 538 nm contra un blanco preparado con 5mL de agua en vez de los 5 mL del filtrado.
7. El contenido de malonaldehído en la muestra, se cuantifica por interpolación de la curva patrón de tetraetoxipropano (1 mol de tetraetoxipropano hidrolizado libera 1 mol de malonaldehído).

Preparación de la curva de tetraetoxipropano

1. De la solución de trabajo de tetraetoxipropano 1×10^{-5} M, se toman alícuotas de 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mL y se depositan en un tubo de vidrio.
2. Cada tubo se lleva a un volumen final de 5 mL al agregar 5, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5 y 2.0 mL de agua destilada, correspondientemente.
3. Se adiciona 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.02 M.
4. Los tubos se tapan con canicas y son colocados dentro de un baño de agua hirviendo por 45 min, transcurrido ese tiempo se disminuye su temperatura con un baño de agua fría.
5. Cuando la temperatura del contenido de los tubos desciende, se determina la absorbancia a una longitud de onda de 538 nm en el espectrofotómetro durante los primeros 30 minutos.

Cálculos

El resultado de absorbancia obtenido en la muestra, se interpola en la ecuación de la curva de tetraetoxipropano (TEP), a fin de conocer la concentración de malonaldehído, el cual se produce por hidrólisis ácida de TEP.

$$\text{Abs}_{538\text{nm}} = m[\text{TEP}] + b;$$

$$[\text{TEP}] = (\text{Abs}_{538\text{nm}} - b)/m;$$

$$[\text{TEP}] = \text{Concentración molar de tetraetoxipropano};$$

$$\text{Abs}_{538\text{nm}} = \text{Absorbancia en la alícuota de la muestra a una longitud de onda de 538 nm};$$

$$b = \text{ordenada al origen};$$

$$m = \text{pendiente.}$$

Para expresar los mg de malonaldehído por kg de ensilado, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{malonaldehído mg/kg} = [(MDA \text{ mmol})(PM)(Aforo/alícuota)] / (\text{kg muestra});$$

Donde:

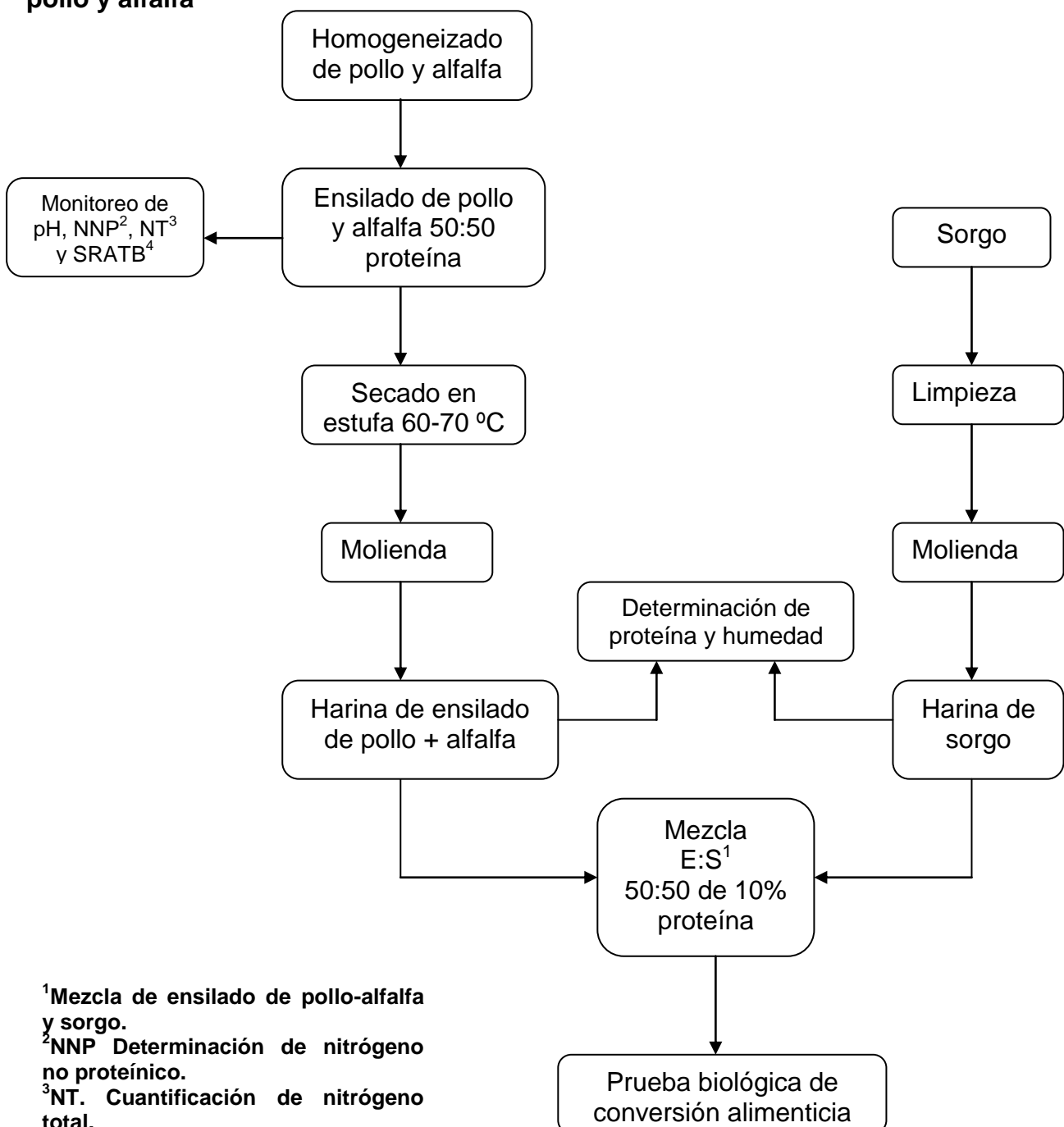
MDA = malonaldehído;

PM = peso molecular del malonaldehído.

4.5. Elaboración de un ensilado para su evaluación nutricional

4.5.1. A continuación se presenta un esquema con las actividades desarrolladas para la elaboración del ensilado a base del homogeneizado de vísceras de pollo, alfalfa y sorgo. Posteriormente, se realizará la evaluación nutricional de este ensilado.

Figura 2. Evaluación nutricional del ensilado de vísceras, cabezas, piel de pollo y alfalfa



¹Mezcla de ensilado de pollo-alfalfa y sorgo.

²NNP Determinación de nitrógeno no proteínico.

³NT. Cuantificación de nitrógeno total.

⁴SRATB. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

4.5.2. Elaboración del ensilado de homogeneizado de vísceras de pollo y alfalfa.

De acuerdo al estudio piloto, las condiciones óptimas para elaborar el ensilado a base de homogeneizado de vísceras de pollo y alfalfa (50:50 de 10% de proteína) fueron pH 3, mezcla de ácidos fórmico-sulfúrico 5.4:4.6, temperatura 37 °C durante 14 días. Los días 0,1,5,7,12 y 14 se realizó el monitoreo de pH, porcentaje de hidrólisis y grado de oxidación.

Con el propósito de aumentar el valor nutritivo del ensilado, se adicionó 0.11g de triptofano, siendo el aminoácido que más se ve afectado por la acidez del medio. Previo a su incorporación, fue necesario disminuir el pH a 5 del ensilado a con una solución de NaOH 40 % p/v para evitar su deterioro y un posible decremento en el consumo de las dietas por parte de las ratas, debido a un ligero gusto ácido del ensilado.

El ensilado fue secado en una estufa con corriente de aire LAB-Line Modelo Imperial III, a una temperatura de entre 65 y 70 °C por un tiempo aproximado de 12 horas. Una vez seco, se disminuyó el tamaño de partícula con un mortero, hasta la obtención de una harina homogénea. Posteriormente, se determinó el porcentaje de proteína cruda por el método de micro-Kjeldahl y la humedad.

4.5.3. Preparación de las dietas para la prueba biológica de Conversión alimenticia

Para la preparación de la dieta experimental utilizada en la prueba biológica de Conversión alimenticia, el ensilado se mezcló con un cereal cuya proteína no fuera deficiente en triptófano, como el sorgo, que además en México es comúnmente utilizado en la alimentación animal por su bajo costo.

La harina se preparó moliendo el sorgo entero (*Sorghum vulgare*) en un molino Thomas-Wiley Modelo No. 4. con una malla de 2 mm, y a esta se le determinó el contenido de humedad y proteína por el método de micro-Kjeldahl, para obtener mayor exactitud en el calculo de la preparación de la dieta experimental, siendo esta isoproteínica e isocalórica a una dieta control de caseína de 10% de proteína y con un aporte energético de 1800 kJ por cada 100 g de dieta.

En la **tabla 1** se muestra la composición de las dietas empleadas para la prueba de Conversión alimenticia.

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

Ingrediente	Dieta control Caseína 10% de proteína	Harina de ensilado pollo-alfalfa: harina de sorgo 50:50 de 10% proteína
Caseína	11.6	-
Harina de ensilado pollo-alfalfa (50:50 de 10 % de proteína)	-	18.6
Harina de sorgo	-	55.4
Sacarosa	22.0	6.6
Dextrosa	19.0	5.7
Dextrina	25.0	7.5
Manteca vegetal	8.0	5.5
Aceite vegetal	6.0	4.1
Mezcla de minerales	2.0	-
Mezcla de vitaminas	1.0	1.0
Celulosa comercial	5.4	2.6

Caseína (de leche bovina SIGMA C-3400).

Glucosa (grado técnico).

Dextrina (grado técnico).

Sacarosa (grado técnico).

Aceite de maíz (grado comercial).

Manteca de maíz (grado comercial).

Mezcla de sales (ICN Pharmaceuticals No. Cat. 170760).

Mezcla de vitaminas (ICN Pharmaceuticals No. Cat. 904654).

Celulosa en polvo (grado técnico).

Materiales

- Espátulas.
- Cucharas.
- Vasos de precipitados de 250 y 500 mL.
- Recipientes de plástico de boca ancha 2 y 4 L.
- Balanza.
- Mezcladora mecánica HOBART Modelo N-50.

Procedimiento

Las harinas fueron homogeneizadas en la mezcladora junto con los demás ingredientes sólidos, excluyendo las vitaminas, una vez incorporada completamente la mezcla, se le adicionó el aceite y la manteca fundidos en el horno de microondas para finalizar con la mezcla de vitaminas.

Las dietas se almacenaron en recipientes de plástico y permanecieron en refrigeración durante todo el estudio.

4.5.4. Evaluación biológica del ensilado

- **Método de Conversión alimenticia**

Fundamento

Esta prueba biológica evalúa la calidad nutrimental de un alimento e indica la cantidad de alimento ingerido por los animales para subir 1 g de peso durante el ensayo.

Materiales

- Espátulas.
- Balanza granataria de un platillo.
- Balanza para pesar animales de laboratorio.
- Comederos para ratas.
- Bebedores con sujetador.
- Jaulas individuales para ratas.
- Ratas hembra, cepa Wistar.

Procedimiento

Se utilizan 12 ratas hembra de la cepa Wistar con un peso inicial (P_i) de 118 g \pm 10 g. De acuerdo a su peso, son distribuidas por el método de “culebra japonesa”, en el cual se ordena de forma ascendente o descendente los pesos de las ratas y se agrupan en los lotes experimentales. En este caso se manejan dos lotes de 6 ratas cada uno. Las ratas se ubican en forma individual en jaulas con piso de rejilla, debajo de éstas, se coloca una charola de papel para recuperar el alimento desperdiciado por las ratas y obtener el alimento ingerido por animal (AI).

Las condiciones de luz y temperatura se mantienen en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas a temperatura aproximada de 22 °C respectivamente. Con respecto a la alimentación, las dietas y el agua se suministran sin restricción. El peso de las ratas y el alimento ingerido se registra tres veces a la semana por un período de 21 días, donde la última pesada corresponde al peso final (P_f).

Cálculos

Para conocer la conversión alimenticia, se divide, los gramos de alimento ingerido durante el periodo de estudio, entre el incremento de peso del animal en los 21 días de ensayo. Además de estos cálculos, se construye una curva de crecimiento con los valores promedio \pm ESM del incremento de peso acumulado Vs el tiempo de experimentación.

Conversión alimenticia = Alimento ingerido / incremento en peso en gramos.

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

Donde:

σ = desviación estándar;

n = número de datos de la muestra.

A continuación en la **tabla 1** se presentan los ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas de caseína y ensilado de pollo-alfalfa:sorgo, evaluadas en la prueba de conversión alimenticia.

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

Ingrediente	Dieta control Caseína 10% de proteína	Harina de ensilado pollo-alfalfa: harina de sorgo 50:50 de 10% proteína
Caseína	11.6	-
Harina de ensilado pollo-alfalfa (50:50 de 10 % de proteína)	-	18.6
Harina de sorgo	-	55.4
Sacarosa	22.0	6.6
Dextrosa	19.0	5.7
Dextrina	25.0	7.5
Manteca vegetal	8.0	5.5
Aceite vegetal	6.0	4.1
Mezcla de minerales	2.0	-
Mezcla de vitaminas	1.0	1.0
Celulosa comercial	5.4	2.6

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Materias primas

5.1.1. Análisis proximal de la alfalfa

Se le determinó el porcentaje de humedad a la alfalfa fresca, y el resto del análisis proximal se realizó en la alfalfa secada al sol por dos días, molida en un molino Wiley, utilizando una malla de 2 mm, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 2. Análisis proximal de la alfalfa expresado en base húmeda y base seca.

Determinación	(g/100 g _{muestra})	
	Base Húmeda.	Base Seca.
Humedad	83.84±0.19	-
Proteína	4.01±0.014	24.83±0.09
Grasa	0.21±0.04	1.31±0.06
Cenizas	2.02±0.03	12.52±0.15
Fibra cruda	3.78±0.14	23.37±0.87
Carbohidratos¹	6.14	37.97

Los valores son el promedio ± D.S. de un triplicado, CV < 5%
¹Obtenidos por diferencia.

La composición proximal cuantificada, se asemeja a lo reportado en la literatura en base húmeda (INNSZ, 1996). Con respecto a la humedad, la alfalfa aproximadamente tiene un 86.5 % y se obtuvo un porcentaje menor de 83.84%, lo cual es muy semejante. En cambio, el contenido proteínico fue ligeramente mayor, 4.01% con respecto a la referencia, que es de 3.66%, este resultado es lógico, ya que al perder humedad se concentra la proteína, y en consecuencia aumenta su valor. El porcentaje de sólidos oscila en 13.5% y se obtuvo 12.15%; uno de los componentes que afecta este contenido, son las cenizas, las cuales varían en función del tipo del suelo o región donde sea cultivada la alfalfa, esto explica la variación entre el dato teórico y el experimental.

Es importante subrayar, que el contenido de proteína determinado en la alfalfa en base seca (24.83%), a más de ser una fuente aceptable de proteína para la elaboración del ensilado, su proporción de hidratos de carbono (37.97%) contribuye a suplir la carencia de éstos por parte del homogeneizado de pollo.

5.1.2. Análisis proximal del homogeneizado de pollo

Además del alto contenido de humedad (76.6%), el homogeneizado de pollo presentó como componentes mayoritarios: proteínas y grasas en un porcentaje de 10.17% y 10.62% en base húmeda, respectivamente. Trabajos anteriores en ensilados de vísceras de pollo se aproximan a estos resultados; señalando un rango de proteína del 11 al 12% y en grasa del 8 a 13% (Shaw, *et al.*, 1997, Vázquez, 2007).

El porcentaje de cenizas cuantificado (tabla 3), es afín a lo que se ha reportado en las tablas de análisis proximal (INNSZ, 1996) y en ensayos de ensilados de pollo, donde los valores oscilan en 1% (B.H.). En relación a la fibra cruda, la literatura no contempla su aporte específico, probablemente se deba a que su cantidad fluctúa en base a el tipo de alimentación del ave antes de la matanza.

Tabla 3. Análisis proximal del homogeneizado de pollo expresado en base húmeda y en base seca.

Determinación	(g/100 g _{muestra})	
	Base húmeda	Base seca
Humedad	76.6 ± 0.39	--
Proteína	10.17 ± 0.37	43.65 ± 0.37
Grasa	10.62 ± 0.15	45.58 ± 0.15
Cenizas	1.02 ± 0.05	4.38 ± 0.05
Fibra cruda	1.17 ± 0.001	5.04 ± 0.47
Carbohidratos¹	0.36*	1.35*

Los valores son el promedio ± D.S. de un triplicado, CV < 5%

¹Obtenidos por diferencia

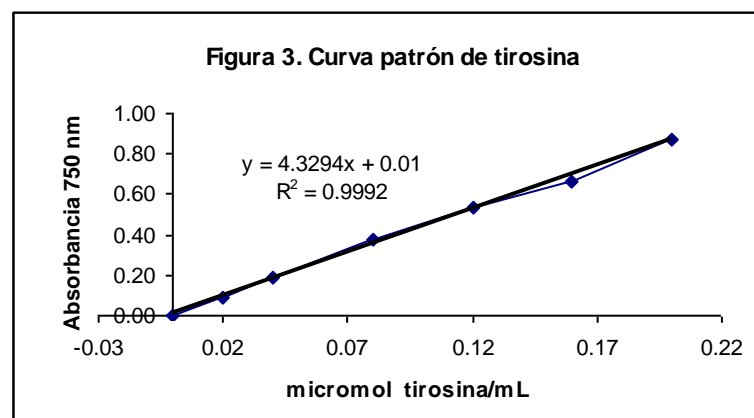
5.2. Medición de la actividad enzimática en las vísceras de pollo

5.2.1. Determinación de la actividad proteolítica

El análisis de este parámetro nos da indicio del estado de las proteinasas en las vísceras de pollo. Factor determinante para llevar a cabo el ensilado. A través del método de Anson (1938) es posible conocer la unidad de actividad enzimática, que expresa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de 1 μmol de tirosina en 1 minuto. Los resultados se condensan en las siguientes tablas y gráficas.

- **Determinación de μmol de tirosina liberados por el extracto enzimático**

Por interpolación de la curva patrón de tirosina, se obtuvo la cantidad de μmol liberados por mL de extracto enzimático.



En la **tabla 4** se observan la cantidad de μmol de tirosina liberados por mL del extracto enzimático y por gramo de homogeneizado de pollo por minuto.

Tabla 4. Actividad proteolítica enzimática por g de homogeneizado de vísceras, cabezas y piel de pollo.

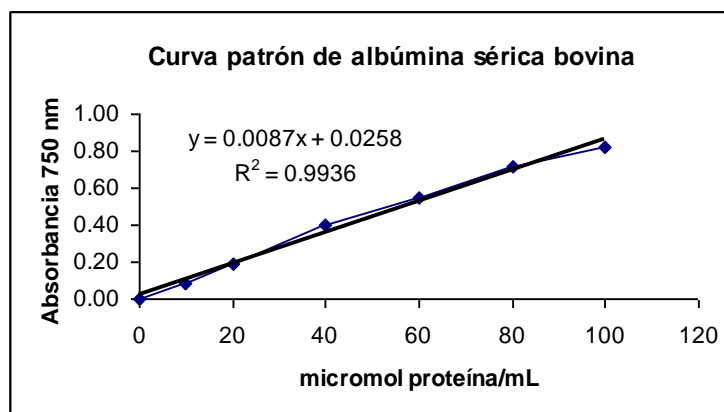
Alícuota del extracto enzimático (mL)	Abs a 750 nm	Tyr μmol /mL de extracto	Unidad de actividad (Tyr μmol /min/g homogeneizado)
1	0.196	0.043	43.302
2	0.192	0.042	42.291
3	0.194	0.042	42.796
Promedio \pm D.S.	0.194 \pm 0.002	0.042 \pm 0.005	42.796 \pm 0.510

Los valores presentaron un C.V. < 5%.

5.2.2. Cuantificación de proteína en el extracto enzimático

Paralelo a la determinación de actividad enzimática, se cuantificó por medio de la técnica de Lowry (1951) la cantidad de proteína presente en el extracto enzimático del homogeneizado de pollo y así obtener la unidad de actividad específica de las enzimas proteolíticas.

A partir de la curva patrón de albúmina sérica bovina se interpoló la absorbancia de la muestra, en la cual se observa linealidad en concentración de 20 a 100 µg proteína/mL.



Los resultados de la determinación de proteína en el extracto enzimático y por gramo de homogeneizado se concentran en la en la tabla 5.

Tabla 5. Contenido de proteína en el extracto enzimático y por gramo de homogeneizado de pollo.

Alícuota (mL) Dilución 1:50 del extracto original	Abs a 750 nm	proteína µg /mL de extracto	proteína mg /g homogeneizado
1	0.753	86.912	54.959
2	0.727	83.804	52.994
3	0.708	81.533	51.558
Promedio ± D.S.	0.729 ± 0.02	80.083 ± 2.70	53.170 ± 1.71

Los valores presentaron un C.V. < 5%.

5.2.3. Actividad enzimática específica

En la tabla 6 se registran los resultados de la determinación de la actividad enzimática específica.

Tabla 6. Actividad enzimática específica en el homogenizado de vísceras de pollo.

Muestra	Actividad enzimática específica (Tyr μmol / min /mg proteína)
1	0.0788
2	0.0798
3	0.0830
Promedio \pm D.S.	0.0805 \pm 0.002

Los valores presentaron un C.V. < 5%

En el estudio realizado por Ruiz (2007), la actividad enzimática proteolítica cuantificada en el pez diablo (*Hypostomus plecostomus*) fue de 0.0185 UA/mg proteína, la cual fue suficiente para la elaboración del ensilado con una hidrólisis del 96.51% al día séptimo. En función de esto, se infiere que al determinar una actividad proteolítica más alta en las vísceras de pollo (0.0805 UA/mg proteína), es posible la obtención del ensilado, aún partiendo de materia prima distinta.

5.3. ENSAYO PILOTO DE LOS ENSILADOS

A fin de establecer las condiciones óptimas del proceso de ensilaje, fue necesario realizar una prueba piloto. Por tanto, se siguió el desarrollo de pH, % hidrólisis y grado de oxidación en los ensilados.

5.3.1. Monitoreo durante el proceso de ensilaje

Desarrollo de pH

Uno de los principales índices en que se debe tener control es el pH, ya que de este depende el desarrollo y la calidad del ensilado. Antes de comenzar, la materia prima presentaba un pH de 6 y 5.4 en el homogeneizado de pollo y en la mezcla de homogeneizado de pollo-alfalfa (50:50 de 10 % de proteína) respectivamente. Por lo cual, es posible asegurar que el grado de frescura en las vísceras de pollo era el adecuado, porque una vez que llega el pH a 7 o más, significa que están descompuestas. La suma del homogeneizado y alfalfa abate el pH, y con ello se esperaría la disminución de pH a partir de una menor cantidad de ácidos añadida, pero experimentalmente aumentó al doble esta cantidad. Es viable que se haya formado un buffer en el ensilado a partir de la relación entre las proteínas del pollo y los carbohidratos de la alfalfa e impide la reducción del pH, como se ha informado por algunos autores (Jimenez, A., 2001).

En ambos casos, desde que se adicionó la mezcla de ácidos fórmico-sulfúrico concentrados, el pH osciló alrededor de 3. Sólo se observó un ligero cambio en el día sexto, elevándose su pH de 3 a 3.3 en el ensilado del homogeneizado de pollo y a 3.15 en homogeneizado-alfalfa. Al mantener un rango de pH entre 3 y 4 a temperatura $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ se dan las condiciones indispensables para la proteólisis enzimática en el ensilado; además, el bajo pH ayuda al control microbiológico por impedir el crecimiento de bacterias patógenas como *Clostridium*, *Salmonella*, y *Staphylococcus* (Muñoz, *et al.*, 1999, Lallo, *et al.*, 1996).

Las ventajas principales que ofrece la elección de la mezcla de ácidos fórmico-sulfúrico, son la disminución de costos (ya que los ácidos orgánicos se caracterizan por tener precios más elevados), y la aceleración de la actividad proteolítica favorecida por la adición de ácido sulfúrico (Santana, *et al.*, 2007, Tatterson, I.N., 1981).

Los datos de pH durante el transcurso de preparación del ensilado se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Monitoreo de pH en los ensilados piloto.

Día	Ensilado de pollo	Ensilado de pollo-alfalfa
	pH	
0	3.00 ¹	3.00 ²
1	3.05	3.00
2	3.05	3.00
3	3.05	3.00
6	3.30	3.15
8	3.30	3.15
14	3.30	3.15

¹Adición de 2.37 mL de ácido fórmico + 1.89 mL de ácido sulfúrico.

²Incorporación de 5.4 mL de ácido fórmico + 4.6 mL de ácido sulfúrico.

- **Proceso hidrolítico del contenido proteínico**

En el transcurso de elaboración de los ensilados, las enzimas endógenas de las vísceras de pollo degradan gradualmente la matriz proteínica hasta péptidos y aminoácidos solubles. Mediante la determinación del Nitrógeno no proteolítico (NNP) en relación del Nitrógeno total (NT) es viable conocer este índice de hidrólisis. La tabla 8 muestra los valores determinados en el período de ensilaje.

Tabla 8. Desarrollo del NT y NNP en los ensilados del estudio piloto (g/100 g muestra).

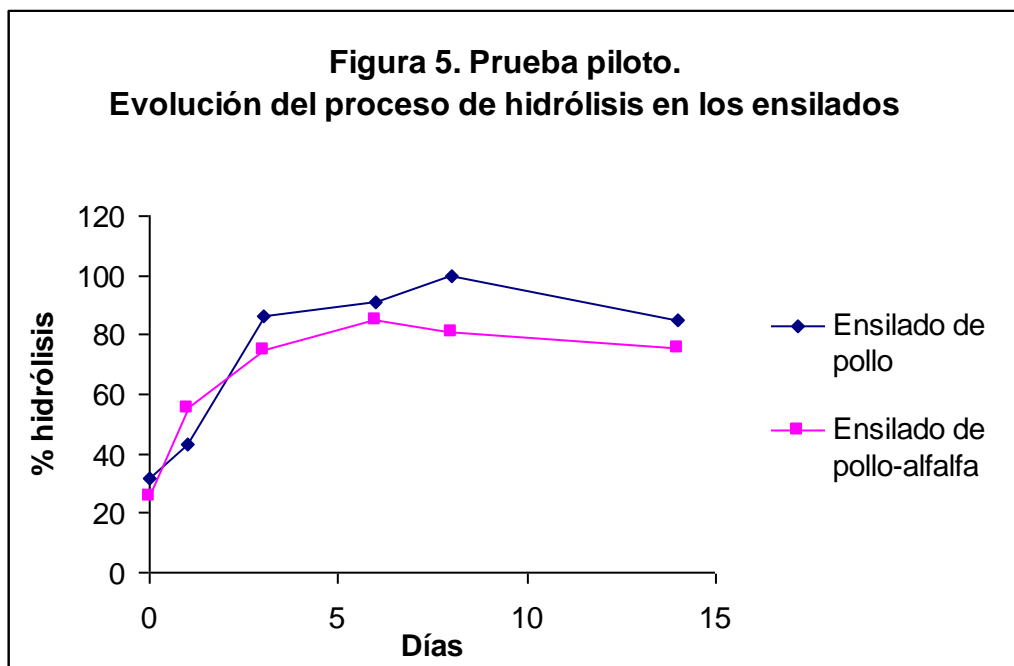
Día	Ensilado de pollo			Ensilado de pollo y alfalfa		
	NNP	NT	Hidrólisis	NNP	NT	Hidrólisis
0	0.39 ± 0.01	1.21 ± 0.06	31.99 ± 0.73	0.16±0.01	0.62±0.01	25.48±0.96
1	0.52 ± 0.00	1.21 ± 0.00	43.11 ± 0.00	0.35±0.01	0.63±0.01	55.56±1.38
3	1.04 ± 0.02	1.21 ± 0.01	86.50 ± 1.91	0.49±0.02	0.64±0.01	74.62±0.54
6	1.31 ± 0.03	1.43 ± 0.14	90.74 ± 1.85	0.56±0.1	0.64±0.03	84.97±3.59
8	1.56 ± 0.04	1.55 ± 0.01	100.00 ± 1.82	0.62±0.02	0.76±0.01	80.66±3.16
14	2.70 ± 0.02	3.18 ± 0.08	84.91 ± 0.83	0.74±0.01	0.99±0.01	75.43±0.96

Los valores son el promedio ± D.S. de un triplicado, CV < 5%.

Se registró la evolución hidrolítica de los ensilados en un periodo de 14 días. Ambos presentan una velocidad más alta de proteólisis durante los primeros tres días, lo cual no se opone con los estudios previos en ensilados de pollo y pescado, donde se indica que la mayor actividad enzimática se exhibe en ese tiempo (Vázquez, 2007 y Ruiz, 2007), sin embargo, dichos estudios también exponen que a partir del séptimo u octavo día, el porcentaje de hidrólisis permanece casi constante, lo cual contradice los resultados obtenidos, puesto que el índice disminuye (marcado en el ensilado de pollo) al final del monitoreo. Una excesiva evaporación en el transcurso de ensilaje, especialmente del día 8 al día 14, pudo haber perjudicado esta cuantificación. A fin de evitar este tipo de error, se determina el NT y se ve claramente que aumenta su valor hasta llegar al doble, pero el NNP no incrementa en la misma proporción, además de que ningún artículo consultado señala un fenómeno similar. Por lo anterior, en el segundo ensayo se decidió utilizar un recipiente de boca estrecha para saber si en verdad la pérdida de agua era la causa de un falso resultado.

Al comparar los ensilados se percibe una evidente diferencia en la velocidad de hidrólisis (figura 5); el ensilado de pollo alcanza una hidrólisis del $100 \pm 1.82\%$ en el octavo día y, en cambio, en el ensilado de pollo-alfalfa sólo fue de $80.66 \pm 3.16 \%$, es posible atribuir esto a las distintas fuentes de proteína. No obstante, Vázquez (2007) en su ensilado de vísceras de pollo, aunque obtuvo una hidrólisis de 86.4%, similar al ensilado pollo-alfalfa en el octavo día, aumentó a 97.7% al final del ensayo (día 61). Esto indica que probablemente en ambos, la evaporación al final altero los resultados.

En conclusión, las condiciones experimentales de incubación a 37 °C, reducción del pH alrededor de 3 y agitación esporádica utilizadas en esta prueba piloto, fueron las apropiadas para la elaboración del ensilado de pollo con alfalfa y así seguir con la segunda etapa de evaluación biológica.



- **Desarrollo Oxidativo en el proceso de ensilaje**

En estudios con ensilados distintos autores aseveran, que el uso de antioxidante es vital para proteger los lípidos, más aún, la materia prima que tenga un alto nivel de lípidos insaturados. Un control inadecuado en la oxidación de éstos, afecta directamente al consumo del ensilado y a su valor nutrimental, motivo por el cual, se adicionó el antioxidante BHT y se evaluó la oxidación de los ácidos grasos a través del método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, donde los resultados se expresan como mg de malonaldehído por kg de muestra.

A pesar del elevado contenido graso en el homogeneizado de pollo, se observa en la tabla 9 que al inicio no presentó un grado de rancidez significativo, 8.81 malonaldehído mg/kg. También Vazquez (2007), en un estudio con vísceras de pollo, obtuvo un valor semejante de 10.05 mg/kg, lo cual indica que la materia prima, gracias a su perfil de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, no es tan susceptible de oxidarse. Esto implica una ventaja sobre los ensilados de pescado, ya que en ellos se llega a reportar hasta 42 mg/kg, aún partiendo de un porcentaje menor de grasa (Santana, 2008).

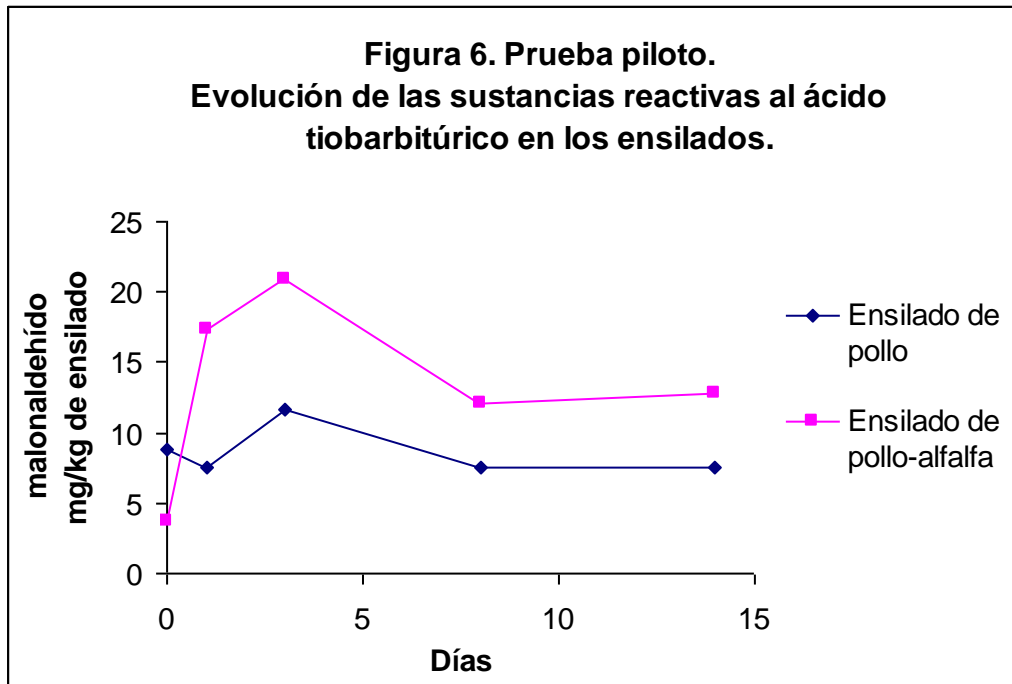
En la tabla 9 se muestran los resultados del proceso oxidativo durante la elaboración de ensilados.

Tabla 9. Estudio piloto. Desarrollo del proceso oxidativo de los ensilados.

Días	Ensilado de pollo y alfalfa	Ensilado de Pollo		
	malonaldehído mg/kg			
		datos corregidos		datos corregidos
0	8.81.± 0.03	8.81 ± 0.03	3.73 ± 0.07	3.73 ± 0,07
1	7.57 ± 0.14	7.57 ± 0.14	17.3 ± 0.27	17.,3 ± 0.27
3	11.60 ± 0.04	11.6 ± 0.04	20.95 ± 0.52	20.95 ± 0.52
8	20.91 ± 0.37	7.56 ± 0.37	18.29 ± 0.73	12.05 ± 0.73
14	20.98 ± 000	7.58 ± 0.00	19.2 ± 0.00	12.83 ± 0.00

Los valores son el promedio ± D.S. de un triplicado, CV < 5%.

Tomando en cuenta que el exceso de agua evaporada durante el proceso de ensilaje, principalmente después del día octavo contribuye a sobreestimar los resultados determinados de malonaldehído, fue preciso hacer una corrección en función de la pérdida de agua. Los datos corregidos que se observan en la figura 6, ofrecen una mayor similitud al comportamiento registrado por Ruiz (2008) en ensilado de pescado diablo con el mismo antioxidante BHT, se aclara que al llegar a un valor máximo de contenido malónico, éste empieza a decrecer; hecho asociado a la reacción paulatina entre el malonaldehído (producto de la oxidación lipídica) y las proteínas solubles en agua, péptidos y aminoácidos libres, descrito por Battkus y Bose (1972).



Debido a que el ensilado de pollo y alfalfa presenta un menor aporte de lípidos en comparación al de pollo, se cuantificó un valor de malonaldehído de tan solo 3,73 mg/kg. Sin embargo, al tercer día incrementó a 20.95 mg/kg; tal resultado podría inducirnos a la especulación de que la acción del antioxidante es deficiente. Con la finalidad de hacer una conclusión más convincente, se monitoreó la evolución del proceso oxidativo en el ensilado para la prueba biológica, y se verificó que el antioxidante si es el apropiado, puesto que expuso un contenido malónico que no es superior a 5 mg/kg (Tabla 12).

5.4. Evaluación biológica del ensilado

5.4.1. Obtención y monitoreo del ensilado de pollo-alfalfa

A partir de las condiciones establecidas en la prueba piloto, se elaboró el ensilado de pollo-alfalfa, la principal modificación fue en las dimensiones del recipiente, donde se utilizó uno de boca estrecha para disminuir la evaporación de agua. En el transcurso del ensilaje, se llevó a cabo el monitoreo de pH, porcentaje de hidrólisis y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRATB).

- **Desarrollo de pH**

Como en el primer ensayo piloto, la relación de ácidos fórmico-sulfúrico 5.5:4:5 y el pH de 3.2 se conservó. Durante el proceso del ensilaje, sólo se registró un ligero incremento de pH comparándolo con el día sexto registrado en el anterior experimento, se presentó a la mitad del ensayo, lo que significa que probablemente se formó un buffer y no fue necesario agregar más ácidos. La tabla 10 concentra los valores de pH monitoreados.

Tabla 10. Monitoreo de pH en el ensilado pollo-alfalfa.

Día	Ensilado de pollo-alfalfa 50:50 de 9.6% de proteína pH
0	3.20 ¹
1	3.20
2	3.20
5	3.20
7	3.40
12	3.40
14	3.40

¹Adición de 9.40 mL de ácido fórmico + 7.60 mL de ácido sulfúrico.

- **Proceso hidrolítico**

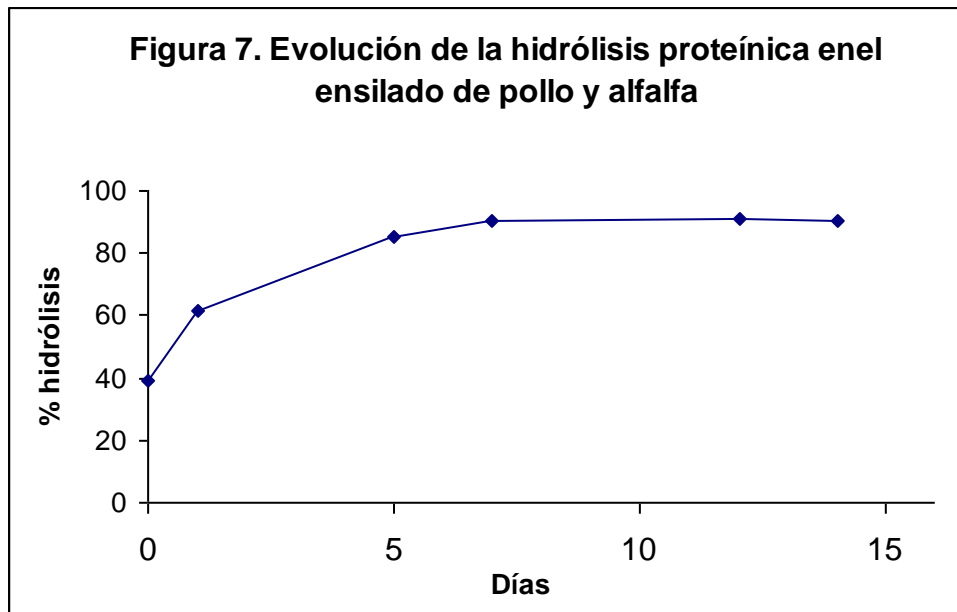
El seguimiento de proteólisis en el proceso del ensilaje se muestra en la tabla 11, es notable que la máxima velocidad de hidrólisis se obtuvo en los primeros 5 días, mismo comportamiento que en el ensilado previo, a partir del día séptimo logró mantenerse casi constante el índice de hidrólisis, alrededor del 90%, lo que corrobora la hipótesis de que la excesiva evaporación de agua contribuyó a arrojar resultados equívocos de NNP en el primer intento. De igual forma, se distingue que la hidrólisis no llegó al 100%, lo que quizás se atribuya a la explicación proporcionada en el análisis de la prueba piloto; sin embargo, se alcanzó una degradación proteínica ligeramente mayor en este ensilado que la del ensayo anterior que fue de 84.97 %. Al considerar que se partió de una materia prima con un porcentaje más alto de hidrólisis (38.92 %), en comparación al del primer ensilado (25.48%), puede aclararse el porque de este resultado.

Tabla 11. NT y NNP en el ensilado de homogeneizado de pollo y alfalfa (g/100 g muestra).

Días	NNP	NT	Índice de hidrólisis
0	0.24 ± 0.01	0.61 ± 0.02	38.92 ± 1.22
1	0.37 ± 0.01	0.61 ± 0.01	61.42 ± 0.23
5	0.53 ± 0.01	0.62 ± 0.01	85.36 ± 0.17
7	0.56 ± 0.01	0.63 ± 0.02	90.37 ± 0.09
12	0.56 ± 0.00	0.63 ± 0.05	91.06 ± 1.04
14	0.58 ± 0.03	0.64 ± 0.02	90.01 ± 0.87

Los valores expresan el promedio ± D.S. de un triplicado, CV < 5%.

El comportamiento del proceso hidrolítico representado en la figura 7, se asemeja a lo que reporta Vázquez (2007) en un ensilado de pollo (86.36%), lo cual deduce que es aceptable la realización del ensilado pollo y alfalfa con un alto índice de hidrólisis en un periodo de 7 días. Asimismo, se confirma que en los ensilados de tipo ácido llega a solubilizarse más del 90% del nitrógeno orgánico, como lo especifica Ruiz (2007), en su estudio de ensilado de pescado que presentó un 96.51 % de proteólisis en un tiempo igual de 7 días.



- **Rancidez oxidativa durante el proceso de ensilaje**

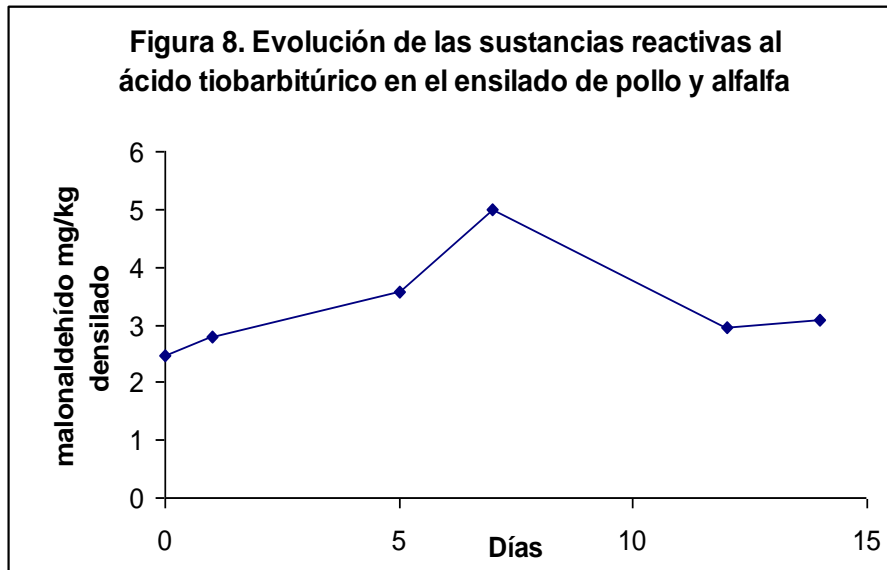
El nivel de oxidación de los lípidos, expresado como malonaldehído en el ensilado, no constituye un daño estimable en éstos (Tabla 12). Se verifica el efecto protector del BHT y la posible contribución de los β -carotenos de la alfalfa como antioxidantes, al reaccionar con los radicales libres que causan la rancidez oxidativa.

Tabla 12. Desarrollo del proceso oxidativo en el ensilado de pollo y alfalfa.

Días	malonaldehído mg/kg
0	2.46 \pm 0.12 ¹
1	2.79 \pm 0.00
5	3.58 \pm 0.12
7	5.01 \pm 0.24
12	2.96 \pm 0.13
14	3.08 \pm 0.26

¹Los valores son el promedio \pm D.E. de un triplicado, CV <5%.

La evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico plasmado en la figura 8, es análogo al de los ensilados de la prueba piloto.



5.4.2. Análisis proximal de las materias primas para la elaboración de las dietas para el ensayo biológico de Conversión alimenticia

El alto contenido de agua en el ensilado, impedía su manejo para la elaboración de la dieta a evaluar, por lo que fue necesario secarlo a una temperatura de 65-70 °C en estufa de corriente de aire. Durante este proceso, se elimina parte del ácido fórmico presente y con ello la percepción de un gusto ácido por las ratas, que podría provocar la disminución del consumo de las dietas en la prueba biológica. Otra ventaja que ofrece el secado del ensilado, es que el mercado se inclina más por esta presentación, debido a que facilita su transporte y almacenamiento, ello repercute directamente en una baja de costos.

Los resultados de composición proximal de las harinas de ensilado de pollo-alfalfa y sorgo, se presentan en la tabla 13. Al considerar los datos reportados en artículos de ensilado en los que no existe diferencia relevante entre el contenido de macronutrientes de la materia prima en fresco y el de las harinas (Fagbenro, 1996 y Ruiz, 2007), se decidió sólo determinar experimentalmente el contenido de humedad y de proteína, confirmándose lo expuesto.

La investigación realizada por Lallo y colaboradores (1997), en una harina de ensilado de desperdicios de pollo, encontró un porcentaje de proteína de 28.1%, semejante al obtenido en este ensayo, 26.93%. Sin embargo, como era de esperarse, el contenido de grasa y fibra diverge por la presencia de la alfalfa.

La harina de sorgo, es una excelente fuente de carbohidratos (78.27%) y en dietas con ensilados de pescado se ha adicionado, no solo por aportar hidratos de carbono, sino también para suplementar la deficiencia de triptófano (Vizcarra, *et al.*, 1999, Santana, *et al.*, 2008). No obstante, su escaso contenido proteínico (9.03%) afectó el ajuste de la dieta al 10% de proteína, con respecto a la dieta control de caseína, reduciéndose a 9.6% (ver tabla 13).

Tabla 13. Análisis proximal de las harinas de ensilado y sorgo expresado en base húmeda (g/100 g de muestra).

Determinación	Harina de ensilado de pollo-alfalfa 50:50 de 9.6% de proteína	Harina de sorgo
Humedad*	1.81	4.90
Proteína cruda*	26.93	9.03
Grasa cruda	17.36	2.90
Cenizas totales	9.55	1.40
Fibra cruda	16.71	1.60
Hidratos de carbono	27.64	76.27

Los valores son el promedio \pm D.S. de un triplicado, CV < 5%.

*Solo los porcentajes de humedad y proteína se determinaron experimentalmente. Los datos de la harina de ensilado se obtuvieron por cálculo a partir del análisis proximal del homogeneizado de pollo y alfalfa. En relación a los valores de la harina de sorgo, se consultó las tablas de composición de alimentos (INNSZ, 1996).

5.4.3. Crecimiento de las ratas durante la prueba de Conservación alimenticia

Para llevar a cabo la evaluación de la calidad nutrimental del ensilado de pollo (vísceras, cabeza y piel) y alfalfa, se preparó una dieta a base de ensilado de pollo-alfalfa y sorgo 50:50 de 9.6% de proteína y 1791 kJ/100g. Con ésta se realizó la prueba biológica de conversión alimenticia, utilizando como control una dieta a base de caseína 10% de proteína y 1800 kJ/100g.

Al inicio del periodo experimental, las ratas mostraron una ingesta muy variable que conforme avanza el tiempo se fue normalizando, tanto el grupo control como el experimental no manifestaron ningún efecto perjudicial en su desarrollo. La dieta satisfizo las necesidades nutrimentales y energéticas de los animales, lo que verifica que es un alimento seguro libre de toxicidad y agentes patógenos. Anteriores trabajos avalan estos resultados, como es el ensayo realizado por Jalil y colaboradores (2001) con gallinas ponedoras, en el cual se implementó a la dieta en un 40% el ensilado de desperdicios de pollo, obteniéndose en las gallinas y en la producción de huevo un desarrollo similar al de la dieta comercial. De igual forma, en cerdos alimentados con una dieta al 30 % de ensilado de subproductos de pollo (sin patas, plumas y cabezas), Lallo y colaboradores (1997), encontraron que en ese porcentaje puede sustituirse la dieta tradicional, sin afectar el crecimiento o la salud de los animales.

Aunque, las ratas aceptaron el ensilado, su ingesta fue menor en comparación a la dieta de caseína, probablemente debido a la palatabilidad percibida por animales de ensayo. No obstante, otros autores como Fagbero y Fasakin (1996) llegaron a la conclusión de que es posible utilizar la proteína proveniente de un ensilado de vísceras de pollo para la elaboración de dietas dirigidas a peces gato, hasta implementarse en un 30% como harina, sin presentar ningún cambio significativo en el consumo y el crecimiento de los peces.

Tabla 14. Alimento ingerido acumulado de las ratas alimentadas con las dietas de caseína 10% de proteína y ensilado de pollo-alfalfa y sorgo 50:50 de 9.6% de proteína.

Días	Dieta de caseína 10% proteína ¹	Dieta de ensilado:sorgo 50:50 de 9.6% proteína ²
	gramos	
1	10.98 ± 13.99	1.20 ± 2.78
3	30.37 ± 20.67	34.08 ± 7.80
6	76.58 ± 22.77	76.58 ± 8.88
8	105.47 ± 21.61	106.38 ± 9.39
10	137.88 ± 22.84	134.65 ± 8.94
13	193.20 ± 25.06	177.90 ± 12.95
15	220.38 ± 31.15	206.08 ± 15.47
17	256.78 ± 35.05	234.95 ± 19.92
20	311.52 ± 42.03	280.05 ± 27.60
21	332.92 ± 41.04	293.40 ± 30.55

Los valores son el promedio ± D.E. de 6 ratas.

¹1800 kJ/100g.

²1791 kJ/100g.

Los datos de incremento en peso corporal promedio de las ratas que se registraron durante el ensayo biológico se reportan en la tabla 15. Es notorio que existen diferencias significativas entre los animales alimentados con la dieta de caseína, y los alimentados con la dieta ensilado pollo-alfalfa:sorgo al final del ensayo. Esto es consecuencia de la variabilidad de la ingesta de alimento por el grupo, misma que se va corrigiendo conforme pasa el tiempo. Con la dieta control, las ratas presentaron un mayor incremento en peso; aunque se podría inferir este resultado a partir de que la dieta de ensilado pollo-alfalfa:sorgo posee un porcentaje ligeramente menor de proteína, ésta diferencia no es marcada, lo cual es más razonable atribuir a que la calidad nutrimental de la dieta de caseína

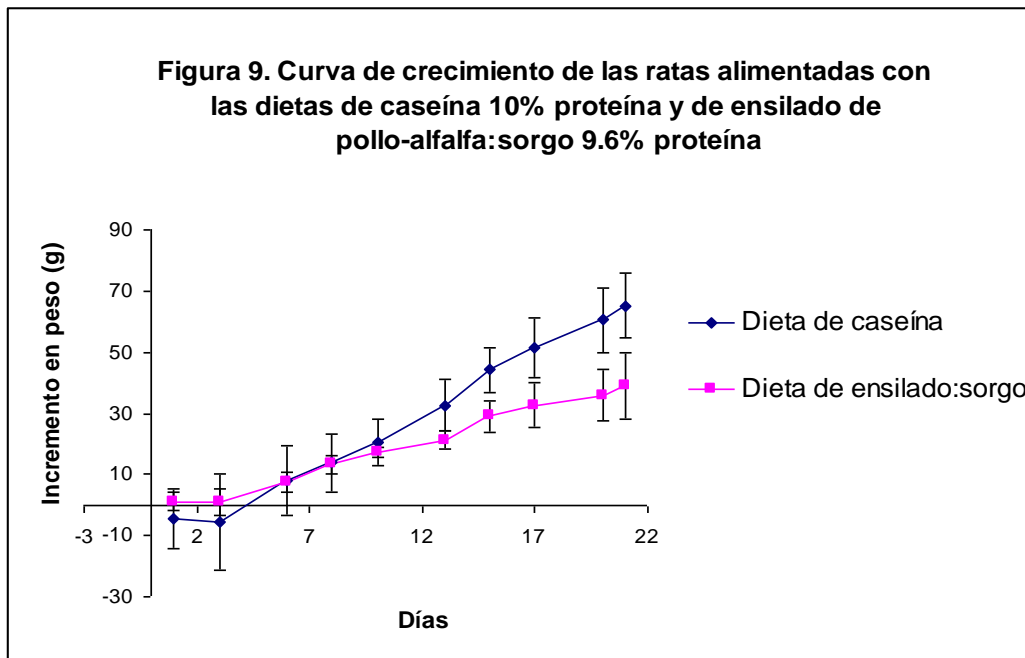
es más alta que la dieta del ensilado, mismo que se corrobora en la conversión alimenticia.

Tabla 15. Incremento del peso corporal de las ratas alimentadas con las dietas de caseína 10% y ensilado de pollo-alfalfa y sorgo 50:50 de 9.6% de proteína durante la prueba biológica de conversión alimenticia.

Días	Dieta de caseína 10% proteína ¹	Dieta de ensilado:sorgo 50:50 de 9.6% proteína ²
	gramos	
1	-4.38 ± 9.62	1.20 ± 2.78
3	-5.62 ± 15.92	0.90 ± 4.35
6	8.00 ± 11.64	7.63 ± 3.36
8	13.75 ± 9.52	13.20 ± 2.90
10	20.43 ± 7.41	17.13 ± 1.67
13	32.65 ± 8.62	21.30 ± 3.20
15	44.33 ± 7.37	28.98 ± 4.97
17	51.57 ± 9.73	32.68 ± 7.21
20	60.58 ± 10.64	35.88 ± 8.51
21	65.20 ± 10.44	39.08 ± 10.77

Promedio ± DE de un sextuplicado.

En la figura 9 se interpreta que la tasa de crecimiento para todas las ratas del ensayo, es baja, ya que la pendiente de la curva es ligeramente pronunciada; sin embargo, es posible apreciar cierta tendencia a mejorar su ganancia de peso. Al principio del ensayo, en ambas dietas los animales mostraron dificultad para habituarse al alimento (más marcado en las ratas con la dieta control); lográndose adaptar hasta el día sexto. A partir de ese día se observa un crecimiento equiparable en los dos lotes de ratas, pero conforme transcurre el tiempo (día 13), las ratas alimentadas con la dieta de caseína presentaron un mayor incremento en peso que las que consumieron la dieta de ensilado con sorgo.



5.4.4. Conversión alimenticia de las ratas

Son varios los agentes que influyen en el crecimiento de las ratas, entre los cuales se encuentra la cantidad de alimento consumida, el nivel de proteína de la dieta, la edad, el sexo, el estrés de la rata y la duración del estudio (Gómez, 1998). La conversión alimenticia relaciona la ganancia de peso con la cantidad de alimento consumida, y es un indicador de la calidad de la dieta que el animal recibe así como de la eficiencia metabólica del mismo.

En la tabla 16, se muestra que los animales alimentados con la dieta de caseína, presentaron una conversión alimenticia más eficiente que los alimentados con la dieta de ensilado-sorgo. Lo que significa que probablemente la dieta experimental tiene una mezcla de proteínas de menor calidad que la de caseína. Con relación al aporte de aminoácidos, existen investigaciones que sustentan que la combinación del ensilado con sorgo, mejora la calidad proteínica de la dieta, ya que este cereal es rico en triptofano y suple su carencia en el ensilado. Por su parte se reconoce a la alfalfa, por su elevado contenido proteínico, especialmente en lisina, que aunque no sufre daño en el proceso de ensilaje, se complementa en un buen balance con el sorgo, escaso en éste. En función a lo anterior, es razonable pensar que la presencia de celulosa en la alfalfa, puede haber influido negativamente en la digestión y la utilización del alimento, y por tanto, en la conversión alimenticia de las ratas.

Tabla 16. Conversión alimenticia *

Rata	Dieta de caseína	Dieta de ensilado:sorgo
1	4.56	8.73
2	5.45	6.33
3	5.07	6.82
4	4.95	9.20
5	5.38	6.03
6	5.43	9.52
Promedio ± DE	5.14 ± 0.35	7.77 ± 1.55

* Se calcula como el alimento ingerido acumulado/incremento de peso acumulado de los animales al día 21 en gramos.

6. CONCLUSIONES

- El contenido de proteína determinado en la alfalfa y en el homogeneizado de las vísceras, cabezas y piel de pollo, indica que son fuentes aceptables de proteína para la realización del ensilado.
- Se determino una actividad proteolítica de 0.0805 UA/mg proteína/minuto en el homogeneizado de pollo, la cual es adecuada para la elaboración de un ensilado de pollo.
- Bajo las condiciones de pH, temperatura y tiempo establecidas en este ensayo fue posible obtener un ensilado de vísceras, cabezas y piel de pollo y alfalfa, con un alto porcentaje de hidrólisis.
- Es factible el uso del ensilado de pollo con inclusión de alfalfa y combinación con sorgo para elaborar dietas que se destinen a la alimentación animal.

7. BIBLIOGRAFÍA

Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22: 79-89.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K. Washington, D. C. 15th edition. Vol. I y II. pp. 17-18, 40-62, 69-83 y 1095-1098.

Badui, D. 2006. *Química de los Alimentos*. Ed. Pearson Addison Wesley, México. 4^{ta} edición. pp. 282-294.

Bermudez, J., Rodriguez, J., Ocampo, A., Peñuela, L. E. 1999. Ensilaje de vísceras de pescado Cachama blanca (*Piaractus brachyponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos de engorde en una dieta con aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis-Elaeis oleifera*). Publicado por la Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia. pp. 1-7.

Dapkevicius, M.L., Bautista, I., Nout, R., Rombouts, F., Houben, J. 1998. Lipid and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. *Journal of Food Chemistry*. 63(1): 97-102.

Donta Sam y Van Vunakis H. 1970. Chicken Pepsinogens and Pepsins. Their Isolation and Properties. *Biochemistry*, 9 (4): 2791.

El Jalil, M.H., Faid, M. Elyachioui, M. 2001. A biotechnological process for treatment and recycling poultry wastes manure as a feed ingredient. *Biomass and Bioenergy*. 21: 301-309.

Ekern, A. y Vik-Mo, L. 1983. Forrajes conservados como alimento para vacas lecheras. En W. Broster y H. Swan. 1983. Traducción de Ruy Orcasberro G. A.G.T. Editor. México. pp. 235-268

Fagbenro, O. A. and Fasakin, E. A. 1996. Citric-acid-ensiled poultry viscera as protein supplement for catfish (*Clarias Gariepinus*). *Bioresource Technology*, 58:13-16.

Farkas, J., Floros, J., Lineback, D. 1997. Oxidation Kinetics of Menhaden Oil with TBHQ. *Journal of Food Science*. 62(3):505-509.

Gilberg, A., Raa, J. 1982. Properties of propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*. 28:647-653.

Gómez, D. 2005. *Practicultura*. Ed. Universidad Politécnica de Valencia. España. pp. 83-98 y 233-248

Gómez, G., Quesada, S., Vargas, R. 1998. Crecimiento y conversión alimenticia de ratas Sprague-Dawley sometidas a la ingesta de extractos acuosos de pejibaye (*Bactris gasipaes*). *Agronomía Costrarricense* 22(2): 185-189.

- Guo, X., Ding, W., Han, J., Zhou, H.** 2007. Characterization of protein fractions and amino acids in ensiled alfalfa treated with different chemical additives. *Animal Feed Science and Technology*. pp. 1-10.
- Hardy, C., Dominguz, G. y Gutierrez, A.** 1986. Conservación de pastos y forrajes. En: I.C.A. 1986. Los pastos en Cuba. Tomo I. Producción. Ed. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba. 607-647. Citado por Jiménez, A. 2001.
- Hoffman, P., Combs, D., Casler, M.** 1998. Performance of lactating dairy cows fed alfalfa silage or perennial ryegrass silage. *J. Dairy Sci.* 81. 162-168. Citado por Kume, S *et al*, 2001.
- INNSZ,** 1996. Tablas de composición de alimentos. Subdirección de nutrición experimental y ciencia de los alimentos. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran. México, D.F. pp. 93.
- Jamdar, S. y Harikumar, P.** 2005. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. *Bioresource Technology*. 96:1276-1284.
- Jiménez, A.** 2001. Conservación de Forraje para la alimentación del ganado. *Apoyos Académicos* 6. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 11-50.
- Journet M.** 1993. Perspectives de valorisation des grandes légumineuses par les herbivores, Intéret zootechnique et qualité des produits animaux. *Fourrages* 134. pp. 229.
- Kume, S., Toharmat, T., Nonaka, K., Oshita, T., Nakui, T., Ternouth, J.** 2001. Relationships between crude protein and mineral concentrations in alfalfa and value of alfalfa silage as mineral source for perparturient cows. 93:157-168.
- Lallo, C., Singh, R., Donawa, A., y Madoo, G.** 1997. The ensiling of poultry offal with sugarcane molasses and *Lactobacillus* culture for feeding to growing/finishing pigs under tropical conditions. *Animal Feed Science and Technology*, 67: 213-222.
- Lapie, L.P. y Bigueras- Benitez, C.M.** 1992. Feedings studies on tilapia (*Oreochromis sp.*) using fish silage. *FAO Fisheries Report*, 470:165-177, Supl. Roma-Italy, FAO.
- Llorca, M., Masip, J., Ollé, F.** 1999. La alfalfa deshidratada cultivo, transformación y consumo. Ed. AIFE. España. pp. 17-21, 140-144, 209-215.
- Lo, K., Liao, P., Gao, Y.** 1992. Effect of temperature on silage production from salmon farm mortalities. *Bio-Resource Technology*. 2357: 33-36
- Machin, D., Panigrahi, S., Bainton, J. y Morris, T.** 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.

- Meza, C.** 2000. Parámetros productivos y del metabolismo ruminal de ovejas en crecimiento al ofrecer dietas con ensilado de excretas porcinas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México. pp. 67.
- Middleton, T., Ferket, P., Boyd, L., Daniels, H. y Gallagher, M.** 2000. An evaluation of co-extruded poultry silage and culled jewel sweet potatoes as a feed ingredient for hybrid Tilapia. (*Oreochromis niloticus* X *O. mossambicus*). Aquaculture. 198: 269-280.
- Muños, R., Heredia, L. A., López, C., Ávila, E.** 1999. Valoración nutricional de una composta elaborada con subproductos avícolas para alimentar pollos de engorda. Veterinaria México, 30 (3):249-256.
- Musiera, P. y Ratera, G.** 1984. Praderas y forrajes, producción y aprovechamiento. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 438-215. Citado por Jiménez, A. 2001.
- Pérez, R.** 1995. Fish silage for feeding livestock. World Animal Rev. 82:34-42
- Raju, A., Rose, C. y Rao, M.** 1997. Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases. 66:139-147.
- Reyes, C., Fraga, I., Galindo, J. Ramos, D.** 2003. Influencias de la alfalfa (*Medicago sativa*) en el crecimiento de postlarvas de Camarón Rosado (*Farfantepenaeus notialis*). Centro de Investigaciones Pesqueras, Ciudad de la Habana, Cuba. pp. 900-906.
- Ruiz, E.** 2007. Elaboración y evaluación nutrimental de un ensilado de pescado diablo (*Hypostomus plecostomus*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 1-67.
- SAGARPA. 2006. Coordinación General de Ganadería
<http://www.sagarpa.gob.mx/DesktopSerlet 15/12/2008>.
- Salinas, S.** 2008. Pasado, Presente y Futuro de la Alfalfa (*Medicago sativa*) en México. Ed. SEBESA. México. pp. 1-4.
- Santana, H.** 1994. Desarrollo de un alimento para pollos de engorda a partir de ensilaje de pescado sierra (*Scomberomorus maculatus*). Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Química. U.N.A.M. pp. 3-29.
- Santana, H., Avila, E., Sotelo, A.** 2008. Preparation of silage from Spanish macderel (*Scomberomorus maculatus*) and its evaluation in broiler diets. Animal Feed Science and Technology, 14:129-140.
- Sistema de producción animal. AVES. 2005. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp. 223-237.

- Shahidi, F., Man, X., Synowiecki, J.** 1995. Production and Characteristics of protein hydrolysates from capelin. *Food Hem.* 53: 285-293. Citado por Jamdar, S & Harikumar, P. 2005.
- Shaw, D., Narasimha, D., Mahendrakar, N.** 1998. Effect of different levels of molasses, SALT and antimycotic agents on microbial profiles during fermentation of poultry intestine. *Bioresource Technology.* 63: 237-241.
- Tattersson, I.N.** 1981. Fish silage-preparation, properties and uses. *Animal Feed Science and Technology,* 7:153-159.
- Toledo, G.** 2007. Evaluación y análisis de costo-beneficio por kg de cortes magros producidos en cerdos de engorda alimentados con una dieta a base de ensilado de residuos de pollería. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp. 1-44.
- Undersander D., Hintz R., Howard T., Hutjens M., Kilmer L., Linn J., Martin N., Shaver R.** 1993. Alfalfa for dairy animals. Ed. Certified Alfalfa Seed Council. Davis. California. USA.
<http://www.usapeec.kz/en/15/12/2008>.
- Vázquez, F.** 2007. Obtención de un ensilado de pollo. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. pp. 1-57.
- Vicke, W.** 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as measure of oxidative rancidity. *Fette Seiifen Anstrichmittel.* 72 (2):1080-1087.
- Vizcarra, L.** 1998. Desarrollo de un alimento para aves a base del ensilaje de desperdicio de atuneras. Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos. Facultad de química. UNAM. pp. 40-58, 117-126.
- Vizcarra, L., Avila, E., Sotelo, A.** 1999. Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 79: 1915-1922.