



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

---

EVALUACIÓN NUTRIMENTAL DE UN ENSILADO  
DE PEZ DIABLO (*Pterygoplichthys multiradiatus*)  
PARA ALIMENTACION DE POLLOS DE ENGORDA

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

KARLA NALLELY ANGELES MELGOZA



MÉXICO D.F., 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

***Jurado asignado***

Presidente: Profesora: Lucia Cornejo Barrera

Vocal: Profesor: Jorge Alejandro Flores Maldonado

Secretario: Profesora: Argelia Sánchez Chinchillas

1er. Suplente: Profesora: Leticia Gil Vieyra

2do. Suplente: Profesor: Jesús Antonio Beas Rivera

Sitio donde se desarrolló el tema:

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio 111, Departamento de Farmacia,  
Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema

---

Q. A. Argelia Sánchez Chinchillas

Supervisor técnico

---

M. en C. Rosa María Argote Espinosa

Sustentante

---

Karla Nallely Angeles Melgoza

**Esta tesis forma parte del proyecto:**

**“Desarrollo tecnológico para el aprovechamiento e industrialización del pez diablo en la región del bajo Balsas en Michoacán” Con clave 37147, del fondo mixto de CONACYT**

## **Agradecimientos**

A la máxima casa de estudios UNAM, a mi Facultad de Química y a todos los profesores del área de alimentos por brindarme la oportunidad de formarme como universitaria.

A la Universidad Autónoma de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán y al Dr. Carlos Martínez Palacios por ofrecerme la beca y los ejemplares de pez diablo. Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) y a los Doctores Ernesto Ávila y Benjamín Fuentes, por su accesibilidad para realizar la prueba biológica.

Mi respeto y admiración hacia la Maestra Hemérita Angela Sotelo López<sup>†</sup> por aceptarme en su laboratorio y por confiar en mí para desarrollar esta tesis, así como por demostrarme su grandeza, sabiduría y entrega a la vida.

A los profesores que forman parte del jurado de esta tesis, por sus aportaciones y tiempo.

A la profesora Lucy Cornejo por sus sabios consejos y apoyo incondicional.

Por ser mi maestra, asesora, amiga y compañera Argelia Sánchez por ayudarme en la dirección de esta tesis de una manera clara y sencilla, también por todas sus aportaciones y correcciones. Me ha alentado a crecer como profesionista y enseñarme a ver la vida de la mejor manera, demostrándome que para todo problema hay una solución.

A mi gran amigo y profesor José Luz González al ser una persona ejemplar, por todo su apoyo educativo y moral brindado durante la Carrera. Y también por todas las aventuras inolvidables compartidas junto con Zoila.

A Rosita, Lety, Arge, Erika, Nané, Alesita y Toño por todos los consejos técnicos y su incondicional amistad en mi estancia en el laboratorio 111, que hicieron más alegre el desarrollo experimental.

A Ro, Erika, Luis García, Elena, Rafa, Mar, Les, Viko, Tulio, Nancy, Erik, Lu, Luis, Lukeño, Daniela, Abraham, Puma, Adriana, Tocayo, Alfaro, Neto, Rafa Carbajal por su amistad, por todos los momentos compartidos y por ser parte de mi familia universitaria. A Karen, Zoila, Mirna, Karla E., Fanny, Angy, Aida, Chava, Adriana, Isabel, Lorena, Rosiles por su confianza, cariño, amistad y por hacer divertidas las largas jornadas de la carrera.

A Ri y Toño por todos los años que hemos crecido juntos como hermanos, así como sus maravillosos consejos y amistad. Por todos sus favores, consejos, protección, confianza y apoyo moral a mi Tío Lázaro, Jesús y en especial a mi abuelita Mode.

Por su incondicionalidad en las buenas y en las malas durante toda la carrera a Víctor Manuel Hernández Pimentel por su extraordinario amor, por compartir una de las etapas más importante de mi vida como amigo y como novio.

## ***Dedicatorias***

*Les doy gracias mis padres por darme la vida, llenarme  
de amor, valores, alentarme a ser feliz y mejor cada día.  
Y por su apoyo y confianza*

*A mis hermanos para que  
vean que las metas se logran.  
Perseverar para alcanzar.*

*A la familia Hernández Pimentel  
Por su inmensa amistad, confianza,  
consejos, y por brindarme su casa.*

**“La filosofía del hombre está escrita en su plato”**

**Mahatma Gandhi**

## Índice general

### Resumen

<b>Introducción</b>	1
<b>Antecedentes</b>	2
1. Características del pez diablo	2
2. Composición química del pescado	4
2.1. Proteínas	4
2.2. Lípidos	5
2.3. Hidratos de Carbono	6
2.4. Minerales	6
2.5. Vitaminas	6
3. Ensilado de pescado	7
3.1. Tipos de ensilado	8
3.2. Ventajas	8
3.3. Desventajas	9
3.4. Algunos aspectos a considerar en el proceso de ensilaje para obtener buenos resultados	9
4. Cambios químicos que ocurren en el desarrollo del ensilado	10
4.1. Proteólisis	10
4.2. Nitrógeno No Proteínico (NNP)	11
4.3. El pH	11
4.4. Autooxidación de las grasas	12
4.4.1. Mecanismo de autooxidación	12
4.4.2. Antioxidantes	14



---

---

	ÍNDICE
5. Función de los nutrimentos en la dieta de las aves	14
5.1. Hidratos de carbono	15
5.2. Grasas	16
5.3. Proteínas y aminoácidos	16
5.3.1. Proteínas de fuente animal	16
5.3.2. Proteína de fuente vegetal	17
5.3.2.1. Soya	17
5.3.2.2. Sorgo	18
5.4. Vitaminas	18
5.4.1. Vitaminas liposolubles	19
5.4.2. Vitaminas hidrosolubles	19
5.5. Minerales	20
5.6. Agua	23
5.7. Antibióticos	23
6. Absorción y metabolismo en las aves	24
7. Formulación de dietas	26
<b>Objetivos</b>	28
<b>Metodología</b>	29
Diagrama general de la investigación	29
1. Recepción y acondicionamiento de la muestra	30
2. Caracterización del pez diablo	30
2.1. Determinación de humedad	30
2.2. Determinación de cenizas totales	31
2.3. Determinación de proteína cruda	31

---

---

	ÍNDICE
2.4. Determinación de grasa cruda	32
2.5. Determinación de hidratos de carbono totales	32
3. Determinación de actividad proteolítica total	33
3.1. Determinación de proteína soluble en el extracto	34
4. Determinación de Nitrógeno No Proteínico (NNP)	34
5. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
6. Preparación del ensilado	35
6.1. Monitoreo del ensilado	35
7. Formulación y manufactura de dietas para pollos	36
8. Metodología de la prueba biológica con pollos	36
9. Análisis estadístico	37
<b>Resultados y discusión</b>	<b>38</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>Recomendaciones</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>54</b>
<b>Anexo</b>	<b>58</b>

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Aminoácidos esenciales en el pescado	5
<b>Tabla 2.</b> Contenido medio en vitaminas del pescado	6
<b>Tabla 3.</b> Análisis proximal del homogeneizado de pez diablo	38
<b>Tabla 4.</b> Proteína soluble y actividad proteolítica del extracto de pez diablo	39
<b>Tabla 5.</b> Evolución de proteólisis en el ensilado	42
<b>Tabla 6.</b> Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el ensilado	44
<b>Tabla 7.</b> Análisis proximal del pez diablo	45
<b>Tabla 8.</b> Ingredientes de las dietas utilizadas en ensayo biológico	47
<b>Tabla 9.</b> Crecimiento de las aves durante la prueba biológica	47
<b>Tabla 10.</b> Conversión alimenticia de las dietas	50

**Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Actividad de las proteasas	10
<b>Figura 2.</b> Evolución del pH en el ensilado	41
<b>Figura 3.</b> Evolución de la hidrólisis en el ensilado	43
<b>Figura 4.</b> Evolución de la oxidación en el ensilado	45
<b>Figura 5.</b> Crecimiento de las aves durante el ensayo biológico	48
<b>Figura 6.</b> Alimento acumulado durante el ensayo biológico	49

El propósito de este trabajo fue evaluar la calidad nutricional de un ensilado de pez diablo, con el fin de aprovechar una fuente de proteína animal que no es explotada en la región que comprende la presa del Infiernillo del bajo Balsas en el estado de Michoacán. Mediante las metodologías oficiales descritas en el AOAC (1990), se elaboró la caracterización bromatológica al pez diablo completo. Dicho pez contiene: 65.10% de humedad, 16.1% de proteína cruda, 4.71% de grasa cruda, 8.68% de cenizas. Se cuantificó la actividad proteolítica específica de las enzimas endógenas del pez obteniendo un resultado de 0.013 U/mg de proteína, a través del método de Anson (1938). En la elaboración del ensilado químico, se utilizó una mezcla de ácido sulfúrico y ácido fórmico, para proporcionar las condiciones ácidas necesarias, para que las enzimas proteolíticas propias del pescado se activen y produzcan la hidrólisis. Como antioxidante se utilizó butilhidroxitolueno (BHT) para evitar la oxidación de las grasas. El ensilado se incubó por 19 días a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con agitación ocasional y manteniendo el pH en un rango de 3.1-4. Durante el proceso de ensilaje, se monitorearon el Nitrógeno No Proteínico (NNP), el Nitrógeno Total (NT) y pH como parámetros que indican el avance de la hidrólisis y la calidad del ensilado. Esto es porque durante la hidrólisis se producen compuestos nitrogenados que aumentan el pH, convirtiéndose en un medio de desarrollo de microorganismos indeseables. Por el contenido de grasa en el ensilado, se monitoreó su oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), obteniendo al final del ensilado 7.9 mg malonaldehído/kg. Alcanzada la proteólisis de 90.18%, se concluyó el ensilado y se efectuó el análisis proximal obteniendo: 65.8% de

humedad, 15.69% de proteína, 4.42% de grasa cruda y 8.15% de cenizas. El ensilado se secó y se hizo pasar por una malla de 1 mm para obtener una harina con la cual se realizó la prueba biológica en pollos de engorda en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. El estudio se realizó por 3 semanas con dietas al 22% de proteína. En la dieta testigo las fuentes de proteína fueron sorgo y soya, mientras que en la dieta experimental se utilizó la harina de ensilado en 1.15% de inclusión, sorgo y soya. Se midió el crecimiento y la conversión alimenticia, donde se encontró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre las dietas. El crecimiento de los pollos alimentados con la dieta testigo fue superior a la dieta de ensilado. Sin embargo, la conversión alimenticia de la dieta de ensilado fue menor. Esto se atribuye a que en el proceso de ensilaje las proteínas fueron hidrolizadas, haciendo que el alimento sea más digerible por los animales. Con estos resultados se observa que el ensilado de pez diablo es una fuente alternativa de proteínas para alimentación aviar.

En el estado de Michoacán, principalmente en la presa del “Infiernillo” y en toda la región del bajo Balsas, se producen especies como el pez blanco, trucha y tilapia. Sin embargo, su producción se ha visto afectada por la introducción de especies exóticas como el pez diablo o *cascudo* (nombre alterno para aumentar su aceptabilidad). Especie que ha logrado reproducirse con facilidad y actualmente, el 80% de la extracción de la presa del Infiernillo corresponde al pez diablo. Para los pescadores, el pez diablo se ha considerado una plaga, porque las espinas que tiene en su espalda y alrededor de todo su cuerpo se envuelven entre las redes de los pescadores haciendo muy difícil retirarlos y generalmente son destruidas.

A pesar de que en otros países como Brasil, en donde el pez diablo es la segunda especie de río que más se consume; en México no ha sido adoptado para alimentación humana debido a su aspecto. Una opción para su aprovechamiento es la elaboración de ensilado, el cual es un producto de manufactura sencilla y con un costo de producción bajo en comparación a la harina de pescado, sin dejar de mencionar su prolongada vida de anaquel y estabilidad microbiológica. Los ensilados de pescado contienen un alto valor nutricional y se han realizado estudios para usarlo en alimentación de pollos de engorda, cerdos y en granjas de acuacultura donde los resultados han sido exitosos. En este trabajo se realizó un ensilado químico de pez diablo entero y se evaluó su calidad nutricional como ingrediente en dietas para pollos de engorda para conocer su valor nutricional y con ello implementar una nueva alternativa de uso, haciendo que el pez diablo sea un recurso benéfico para la comunidad.

## 1. Características del pez diablo

El pez diablo es un pez tropical, nativo de la cuenca del Amazonas en Sudamérica conocido como *plecos* ó *limpia-peceras*. Su identificación taxonómica presenta algunos problemas ya que es muy confusa. Actualmente se conoce como *Pterygoplichthys multiradiatus*.

Pertenece a la familia Loricariidae, de la cual se conocen aproximadamente 680 especies en el mundo, al menos una docena de éstas, se encuentran establecidas en el medio silvestre y se han convertido en especies invasoras en México, Estados Unidos, Taiwan, Filipinas, Japón y Singapur.

Este pez se ha adaptado a vivir como especie de ornato, ya que se utiliza como limpiador de algas de las paredes de los acuarios. En México ha sido importado con este fin a los acuarios sin restricción alguna. En 1995, se detectaron por primera vez en México, en el río Mezcala, perteneciente a la cuenca del río Balsas. Durante los últimos 4 años, los plecos se han expandido rápidamente y actualmente es común encontrarlos en varias de las cuencas hidrológicas más grandes del país. (Mendoza *et al.*, 2007)

El pez diablo presenta diversas particularidades con respecto a su morfología, su fisiología y su comportamiento que acentúan su potencial invasivo. Por ejemplo: tienen una reproducción precoz con una alta tasa reproductiva, un comportamiento de anidación que junto con sus hábitos nocturnos los hacen imperceptibles, y el cuidado parental que resulta en una alta supervivencia larval. Son altamente territoriales y pueden ser muy agresivos. Su boca con forma de

chupón puede fijarse fuertemente en los sustratos naturales y resistir corrientes rápidas. Al desplazarse en grandes cardúmenes, dañan o arrancan la vegetación nativa, la cual es sitio de anidación o refugio de otras especies. Los plecos al anidar cavan galerías de hasta metro y medio de profundidad desplazando grandes cantidades de sedimentos que perturban la estabilidad de las riveras afectando la calidad del agua. Por otro lado, el desarrollo de escamas con fuertes espinas y placas óseas, en gran medida, explica la carencia de depredadores. Normalmente su crecimiento es rápido y la mayor parte de las especies son de tamaño pequeño o mediano, aunque pueden alcanzar tallas de 50-70 centímetros y pesos hasta de 3 kg. Su gran estómago vascularizado funciona como pulmón, permitiéndoles respirar aire atmosférico en condiciones de hipoxia hasta por 8 horas. Su estómago también funciona como vejiga natatoria, con lo que pueden aumentar su flotabilidad para desplazarse en una columna de agua. Además sus niveles de glucosa y lactato, los más altos entre peces, les provee la energía necesaria para sostener el ritmo cardíaco en los periodos de hipoxia.

Ecológicamente son extremadamente adaptables, algunos son tolerantes a la salinidad, en aguas con una temperatura de 23-27°C y pH de 6.5-7.8.

La presa Infiernillo, alguna vez fue reportada como la más importante de Latinoamérica por la producción de tilapias y carpas. En 1970 la pesquería comercial se consideró la principal actividad de 119 comunidades alrededor de la presa. En la actualidad entre 70 y 80% de la captura de tilapia se ha sustituido por el pez diablo, lo que significa pérdidas por un monto de 36 millones de pesos al año y un costo social importante al dejar desempleados a 3 600 pescadores, que



con los procesadores y sus familias suman 46 mil personas afectadas. (Mendoza *et al.*, 2007)

En las redes de pesca, dicho pez causan severos daños, al grado que los pescadores tienen que desecharlas; además presenta un problema de salud, ya que los que se pescan son abandonados en las orillas, descomponiéndose al aire libre.

Probablemente el pez diablo o pecos se encuentra ampliamente distribuido, porque los aficionados a las peceras los envían al medio ambiente, cuando éstos ya no caben en las peceras y aunque es bien intencionado, esto también ha ayudado a la gran problemática que se ha comentado.

## **2. Composición química del pescado**

### **2.1. Proteínas**

Al igual que las de la carne, las proteínas del músculo del pescado se dividen en: sarcoplasmáticas que constituyen entre el 16 y el 20% de la proteína total; proteínas miofibrilares alrededor del 75% del total; y proteínas del tejido conjuntivo.

Las proteínas del pescado tienen un elevado valor biológico, incluso mayor que el de la carne. El músculo de pescado es rico en lisina y metionina. Pero también son buena fuente fenilalanina, treonina, valina, leucina, isoleucina y triptófano.

**Tabla 1. Aminoácidos esenciales en el  
pescado**

<b>Aminoácido</b>	<b>g/100 g de proteína</b>
Lisina	8.5-10.5
Metionina + Cisteína	4-5
Fenilalanina + Tirosina	6-7.5
Treonina	3.5-4.5
Valina	4-6
Leucina	6.5-8
Isoleucina	4
Triptófano	1-1.1

Astiasarán, 2000

## **2.2. Lípidos**

Generalmente son compuestos que son solubles en disolventes orgánicos y escasamente solubles en agua. Los ésteres de glicerol de los ácidos grasos, que representan hasta el 99% de los lípidos de origen animal y vegetal, se han llamado grasas o aceites, dependiendo de su estado físico a temperatura ambiente.

Los lípidos en la dieta juegan un papel importante en la nutrición, ya que aportan energía y ácidos grasos esenciales, actúan como transportadores de vitaminas y aumentan la palatabilidad de los alimentos. Los pescados son buena fuente de  $\omega$ -3 como, ácidos eicosapentaenoico (C20:5) y docosahexaenoico (C22:6). (Astiasarán, 2000)

### 2.3. Hidratos de carbono

Son compuestos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno. Los hidratos de carbono están presentes en muy poca cantidad en el músculo de pescado, con valores inferiores a 0.3g/100g. (Astiasarán, 2000)

### 2.4. Minerales

El pescado contiene principalmente 20-140 mg/100g de sodio y de 200-400 mg/100g de potasio. (Astiasarán, 2000)

### 2.5. Vitaminas

Los pescados grasos tienen vitaminas liposolubles, especialmente la A y la D. Respecto a las vitaminas hidrosolubles, el pescado contiene concentraciones variables de vitaminas del grupo B, en general, la tiamina, la riboflavina y la niacina están en mayor cantidad. (Pearson, 1997)

**Tabla 2. Contenido medio en vitaminas del pescado  
(valores por 100g de fracción comestible)**

	<b>Peces magros</b>	<b>Peces grasos</b>
Vitamina A	50-100 UI	4000-6000 UI <sup>1</sup>
Vitamina D	10-20 UI	8000-12000 UI <sup>2</sup>
Vitamina B <sub>1</sub>	0.1-0.4 mg	0.3-0.4 mg
Vitamina B <sub>2</sub>	0.2-0.4 mg	0.3-0.6 mg
Nicotinamida	6-12 mg	4-8 mg

<sup>1</sup> UI=0.3 mg ; <sup>2</sup> 1UI=0.025 mg

Astiasarán, 2000

### **3. Ensilado de pescado**

Ensilar es el proceso de guardar alimento en un silo tratando de conservar sus características nutrimentales aunque no sus propiedades sensoriales. (Ruíz, 2007) El ensilado de pescado se empezó a fabricar en los años 30 en Suecia (Neave, 1986). Esta modalidad se ha desarrollado en muchos países europeos e incluso en América Latina (Bertullo, 1989; Mattos *et al.* 2003). El ensilado de pescado es un producto semi-liquído que puede ser elaborado a partir de residuos o totalidad del pescado y es una alternativa para disminuir la gran cantidad de desechos de las industrias pesqueras o para utilizar la flora de acompañamiento presente en la captura. Una de las principales razones para considerar el ensilado de pescado es la necesidad de utilizar al máximo el desecho de pescado y el pescado entero que por diversas razones no se puede usar; cuando la cantidad disponible, los costos de transporte y otros impedimentos hicieran incosteable la producción de harina de pescado. (Neave, 1986)

El fenómeno de ensilaje, se alcanza por efecto de las enzimas proteolíticas contenidas en el pescado. Estas enzimas presentan su mayor actividad cuando el pH se reduce a un rango de 3.1-4 por efecto de la producción o la adición de ácidos (Vizcarra, 1999). A su vez, el pH ácido impide la descomposición del producto, otorgándole una estabilidad a temperatura ambiente por mucho tiempo. Se utiliza principalmente en alimentación de aves y cerdos, aunque también se ha sugerido en alimentación de ranas y peces. (Copes, 2006)

### 3.1. Tipos de ensilado

Existen tres formas básicas para conseguir la licuefacción del material a ensilar:

- A través de la adición de ácidos minerales u orgánicos o mezcla de ambos (ensilado químico), tales como el fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico, etc.;
- Con el uso de microorganismos productores de ácido láctico (ensilado biológico), tales como *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus*, *Candida lipolítica* utilizando una fuente de hidratos de carbono. (Agudelo et al., 2004);
- Ó con ayuda de enzimas como bromelina, papaína. (Neave, 1986)

### 3.2. Ventajas

Dentro de las ventajas que ofrece el ensilado:

- Es un alimento que posee gran digestibilidad, cualidad que proporciona un gran beneficio en alimentación animal, sin dejar de mencionar que las proteínas que lo constituyen son de un elevado valor biológico. (Balsinde, 2004)
- Según Lupín (1983), el ensilado de pescado puede ser eventualmente utilizado en la piscicultura de agua dulce como alimento de peces, disminuyendo los costos de producción.
- El ensilado es un producto acidificado, estable, con buenas cualidades nutritivas y antimicrobianas contra bacterias patógenas y putrefactivas. Los

estudios de estabilidad del ensilado muestran que es factible almacenar este producto por períodos mayores a 6 meses sin requerir de refrigeración (Bello, 1995).

- La elaboración de ensilados biológicos utilizando residuos de pescado, exige una inversión baja y puede ser obtenida de manera artesanal por pescadores (Agudelo et al., 2004).

### **3.3. Desventajas**

Dentro de las desventajas que se le atribuyen a los ensilados se encuentran:

- Los costos de los ácidos que en ocasiones son importados, el manejo cuidadoso de estos ácidos por parte de los pescadores, lo cual constituye un peligro y riesgo para ellos en caso de ensilados químicos. (Bello, 1995)
- En el ensilado biológico, para obtener buenos resultados se necesitan cepas específicas para acidificar el producto.
- En el caso de realizar ensilados con papaína y bromelina el costo del ensilado es mayor.

### **3.4. Algunos aspectos a considerar en el proceso de ensilaje para obtener buenos resultados son:**

- La materia prima debe de tener un diámetro de 3 a 4 mm.
- El ácido se debe incorporar perfectamente con el pescado, a fin de evitar zonas sin tratamiento que pueden descomponerse.

- Es preciso agitar la mezcla en forma periódica para acelerar la licuefacción.  
(Neave, 1986)

#### 4. Cambios químicos que ocurren en el desarrollo del ensilado

##### 4.1. Proteólisis

La proteólisis no está considerada como una desnaturalización, ya que se fragmenta con ella el soporte polipeptídico y por lo tanto no se trata de un cambio de conformación sino de un rompimiento irreversible de enlaces covalentes de las proteínas por acción de las enzimas proteasas o proteinasas que hidrolizan el enlace peptídico. Existen proteasas de origen vegetal (papaína, ficina y bromelina), animal (pepsina, tripsina y quimiotripsina, renina) y microbianas (de hongos y bacterias).

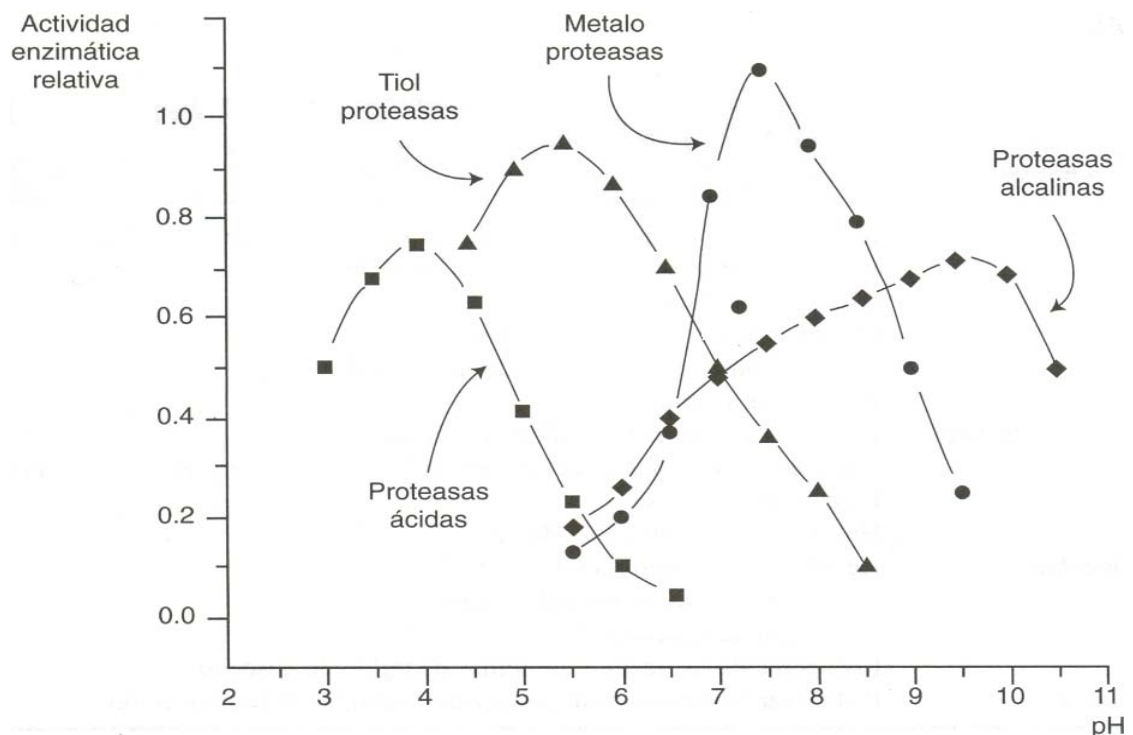


Figura 1. Actividad de las proteasas

Pueden tener acción endo o exo; en este último caso pueden ser carboxipeptidasa si remueven el último aminoácido del extremo carboxilo, o aminopeptidasas si lo hacen por el extremo amino. Se pueden clasificar de acuerdo a la química de su mecanismo catalítico en: serino-, tiol-, metalo- proteasas y proteasas ácidas. En la Figura 1 se muestran los rangos de pH en que estas enzimas son activas. (Badui, 2006)

#### **4.2. Nitrógeno No Proteínico (NNP)**

A consecuencia de la licuefacción producida por las enzimas proteolíticas la masa que se está ensilando libera el agua de los tejidos y con ello pierde consistencia. Esta hidrólisis ocasiona la formación de nitrógeno no proteínico, que está compuesto de aminoácidos libres, péptidos y bases volátiles; encontrándose en mayor cantidad el amoníaco y trimetilamina (Backhoff, 1976). La temperatura tiene un efecto importante sobre la producción del NNP en el proceso de ensilaje, a una temperatura alta se obtiene un mayor porcentaje de NNP. (Lo *et al.*, 1993; Fagbenro *et al.*, 1993)

Por lo tanto, la medición de NNP y pH en el desarrollo del ensilado, son parámetros que indican la calidad de éste. (Fagbenro *et al.*, 1993)

#### **4.3. El pH**

El pH es un parámetro de gran importancia para saber la calidad del ensilado ya que durante los primeros días del ensilado a causa de la hidrólisis, se desprenden compuestos nitrogenados que elevan el valor de pH hasta un valor de 6. Gracias a la acidez del ensilado se evita la proliferación microbiológica y con



ello la descomposición del producto. Se han hecho estudios durante 6 meses donde el ensilado sigue conservando sus características. (Bello, 1995)

#### **4.4. Autooxidación de las grasas**

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro de los alimentos. Es un fenómeno de gran importancia ya que da lugar a sabores y olores desagradables. Las reacciones de oxidación también pueden disminuir la calidad nutritiva de los alimentos y algunos de los productos de la oxidación son potencialmente tóxicos. La reacción espontánea del oxígeno atmosférico con los lípidos provoca el deterioro oxidativo. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden descomponerse a través de este proceso, ya sea que estén en forma de ácidos grasos libres o de triglicéridos o fosfolípidos. La luz y un agente sensibilizante como la clorofila y la mioglobina pueden desencadenar la formación del oxígeno singulete a partir de oxígeno en su estado fundamental e iniciar el deterioro oxidativo. Los metales como el oro, el cobre o la enzima lipooxigenasa pueden catalizar el proceso de iniciación del deterioro oxidativo. (Pokorny *et al.*, 2005). La velocidad de autooxidación depende de la composición en ácidos grasos, de la concentración y actividad de los antioxidantes, de la presión parcial de oxígeno, de la superficie que entra en contacto con el oxígeno y de las condiciones en que se almacena el alimento (temperatura, luz, contenido acuoso).

##### **4.4.1. Mecanismo de autooxidación**

Al ser una reacción en la que intervienen radicales libres, la autooxidación se desarrolla en tres pasos distintos. El primer paso es la iniciación en la cual se

forman radicales libres a partir de moléculas lipídicas. La sustracción de un átomo de hidrógeno por una especie reactiva, tal como el radical hidroxilo, provoca la iniciación de la oxidación lipídica. La iniciación secundaria por ruptura homolítica de hidroxiperóxidos, es una reacción relativamente baja de energía y representa normalmente la principal reacción de iniciación de la oxidación en aceites comestibles. La reacción esta catalizada frecuentemente por iones metálicos. Tras la iniciación, se encuentran las reacciones de propagación, que consisten en la transformación de un radical lipídico en otro diferente. Estas reacciones normalmente suponen la sustracción de un átomo de hidrógeno de una molécula lipídica o la adición oxígeno a un radical alquilo. La entalpia de las reacciones es relativamente baja en comparación a las reacciones de iniciación. A la presión atmosférica normal, la reacción de los radicales alquilo con el oxígeno es muy rápida y los radicales peróxido se encuentran por ello a concentraciones mucho más alta que los radicales alquilo. Ya que la energía de disociación del enlace C-H se reduce en la vecindad de grupos funcionales alqueno, la sustracción de los átomos de hidrógeno tiene lugar más rápidamente en los grupos metileno situados entre dos grupos alqueno de un ácido graso poliinsaturado. Las reacciones de terminación en la cuales los radicales libres se combinan para formar moléculas con electrones apareados son reacciones de baja energía, pero están limitadas por la baja concentración de radicales y por la necesidad de que los radicales posean la orientación adecuada para que se produzca la reacción. (Pokorny *et al.*, 2005)

#### **4.4.2. Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias que pueden retrasar el comienzo o reducir la velocidad de oxidación de las sustancias autooxidables. Existen cientos de compuestos, naturales y sintéticos, con propiedades antioxidantes, aunque para ser utilizados deben de cumplir las pruebas de inocuidad. Los principales antioxidantes liposolubles ordinariamente utilizados en los alimentos son fenoles. Para que su eficacia sea máxima, los antioxidantes primarios se suelen utilizar en combinación con otros antioxidantes fenólicos, o con diversos agentes secuestradores de metales. Una determinada sustancia retrasa la reacción de autooxidación si inhibe la formación de radicales libres en la fase de iniciación o si se interrumpe la cadena de propagación de radicales libres.

Los antioxidantes sintéticos más usados son los compuestos fenólicos como el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxibutiltolueno (BHT), la *ter*-butilhidroquinona (TBHQ) y los ésteres de ácido gálico, como el galato de propilo (PG). Los antioxidantes fenólicos sintéticos contienen sustituciones alquílicas para mejora su solubilidad en grasas y aceites. De acuerdo a las normas de buenas prácticas de producción el uso de estos cuatro antioxidantes sintéticos está limitado al 0.02 % del contenido de grasa o aceite del alimento. Algunos antioxidantes como el BHA y el BHT se usan en combinación por su efecto sinérgico. (Pokorny *et al.*, 2005)

### **5. Función de los nutrimentos en la dieta de las aves**

Las necesidades de las aves son muy complejas, y para que puedan vivir, crecer y reproducirse necesitan recibir en su dieta más de 40 compuestos

específicos o elementos químicos. Los nutrimentos requeridos se dividen en seis grupos de acuerdo a su función y naturaleza química: 1. Hidratos de carbono; 2. Grasas; 3. Proteínas; 4. Vitaminas; 5. Minerales; y 6. Agua.

Una ración debe proporcionar todos los nutrimentos conocidos en cantidades adecuadas; si falta alguno de éstos o la proporción no es la adecuada, el crecimiento se reducirá o no será posible la reproducción en el animal adulto, inclusive podría ser causa de muerte.

### **5.1. Hidratos de Carbono**

La principal función de los hidratos de carbono en las dietas de las aves es proporcionar energía, la cual se requiere para mantener la temperatura corporal y para funciones esenciales del cuerpo, como el movimiento y las reacciones químicas involucrados en la síntesis de los tejidos y la eliminación de los desechos.

Los hidratos de carbono más útiles en la alimentación de las aves son azúcares simples, sacarosa, maltosa y almidón. Los alimentos que constituyen mejores fuentes de hidratos de carbono para las aves son los granos, los subproductos de los granos y algunos tubérculos. Los granos de cereales contienen un alto contenido de hidratos de carbono, cuyo principal componente es el almidón; baja cantidad de fibra; poca cantidad de proteína y particularmente es deficiente en lisina y metionina. Las aves dependen de los granos como su principal fuente de energía y en términos generales, del 60 al 70% de la dieta consiste en granos.

## **5.2. Grasa**

Las grasas son la forma de cómo se almacena la energía en el cuerpo y en el huevo. Las grasas y los aceites son la fuente más concentrada de energía en la avicultura. En la formulación de dietas para aves se debe poner atención en el ácido linoleico ya que no es sintetizado por el ave y a partir de éste ácido graso no saturado, se sintetiza el ácido araquidónico que es esencial para crecimiento, tamaño del huevo e incubabilidad. El maíz y los aceites de soya, ajonjolí, cártamo y girasol son fuentes excelentes de estos ácidos grasos. En comparación al maíz, el sorgo y el trigo son deficientes en ácido linoleico.

## **5.3. Proteína y aminoácidos**

Las proteínas para la alimentación de las aves son de dos clases: de origen animal y de origen vegetal. La proteína animal es superior a la de origen vegetal, debido principalmente a su alto contenido de aminoácidos esenciales, minerales y al aporte de varias vitaminas del complejo B; pero si las proteínas de vegetales se procesan adecuadamente y se complementan con aminoácidos, minerales y vitaminas su valor nutritivo será similar al de las proteínas animales. Por lo general, las fuentes de proteína de origen animal se utilizan en limitadas cantidades en las dietas, y si el precio y la disponibilidad lo permiten se complementan con porcentajes pequeños de proteínas animales. (Ávila, 1992)

### **5.3.1. Fuentes de proteína animal**

Harinas de pescado. El empleo de harinas de pescado en dietas para aves, debido a su costo y disponibilidad, por lo general se limita a niveles que varían del

1 al 7%; a un valor mayor al 10% existe la posibilidad de transmitir olor y sabor a pescado a los productos avícolas. (Ávila, 1992). North (1993) maneja que un porcentaje mayor de 6 a 10% ó el 1% de aceite de pescado se transmite el olor a pescado en carne y huevo. Otros ejemplos de fuentes de proteína animal son: harinas de carne, hueso y sangre, entre otras.

### **5.3.2. Fuentes de proteína vegetal**

Dentro de este grupo se encuentran principalmente las pastas de oleaginosas, subproductos que se obtienen después de que se extrae el aceite de las semillas de las oleaginosas. Estas pastas son ricas en proteínas y su contenido suele variar del 20 al 50%. Algunos ejemplos de fuentes de proteína vegetal son: pastas de soya, algodón, ajonjolí, girasol, cártamo, nabo, alfalfa, gluten de maíz y gallinaza (excremento de gallina).

#### **5.3.2.1. Soya**

Estados Unidos y Brasil conjuntamente cosechan más del 80% de la producción mundial. La soya es una leguminosa, aunque por su alto contenido en lípidos es considerada una oleaginosa. A diferencia de los cereales que son abundantes en gluteínas y prolaminas, las proteínas de soya y de otras oleaginosas son una mezcla de globulinas y de albúminas. En general, las proteínas de la leguminosas son ricas en los aminoácidos indispensables, tales como lisina, treonina, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina; sin embargo, son deficientes en metionina y cisteína. (Badui, 2006)

### **5.3.2.2. Sorgo**

En México, el maíz es el ingrediente básico en la alimentación humana motivo por el cual, fue necesario contar con un grano que se utilizara en la industria animal. Por este motivo y por el auge que ha tenido la industria avícola, se desarrolló en México el cultivo de sorgo. Su valor energético es ligeramente menor que el del maíz, pero puede sustituir parcial o totalmente al maíz si se toma como base el contenido de nutrimentos. Generalmente, su contenido de proteína es más alto que el del maíz y la proteína posee un mayor contenido de lisina, triptófano pero menor cantidad de aminoácidos azufrados (metionina+cistina y treonina). Su valor alimenticio es comparable al del maíz y, para el caso específico de las dietas de aves, puede reemplazar todo el maíz amarillo de la dieta, proporcionando fuentes adicionales de xantofilas para la pigmentación de la piel o de la yema de huevo (Ávila, 1992). El sorgo es el único cereal que, en algunas variedades, contiene polifenoles, tanto en sus hojas como granos.

### **5.4. Vitaminas (Ávila, 1992)**

Las vitaminas son sustancias orgánicas requeridas en cantidades muy pequeñas en la dieta, para el mantenimiento de la salud y para un funcionamiento normal del ave. Las vitaminas se dividen en dos grupos: las liposolubles (solubles en grasa) y las hidrosolubles (solubles en agua).

Entre las funciones de las vitaminas se encuentran: el mantenimiento del cuerpo, crecimiento, engorda, reproducción, producción del huevo, actividad y procesos metabólicos tales como digestión, absorción y excreción. La carencia de una vitamina produce síntomas de deficiencias características. La mayoría de las

vitaminas sirven como parte de sistemas enzimáticos que catalizan reacciones bioquímicas específicas que ocurren en diferentes células del cuerpo.

#### **5.4.1. Vitaminas liposolubles**

**Vitamina E o alfa tocoferol.** Es un antioxidante biológico. En pollos su deficiencia produce encefalomalacia y diátesis exudativa. En dietas el uso de grasas o aceites ricos en ácidos grasos no saturados aumenta el requerimiento de esta vitamina. Los antioxidantes sintéticos pueden disminuir la necesidad de esta vitamina.

#### **5.4.2. Vitaminas hidrosolubles**

**Tiamina** (*vitamina B<sub>1</sub>*). Tiene como funciones principal estimular el apetito, promover la digestión y proteger al cuerpo de enfermedades de los nervios. Los síntomas característicos de su deficiencia son: polineuritis, trastornos del apetito y la digestión, constipación, edema e inanición. Las principales fuentes de vitamina son las levaduras, puliduras y salvado de arroz, granos de cereales y melazas.

**Riboflavina** (*vitamina B<sub>2</sub>*). Es necesaria para el crecimiento, así como para el mantenimiento del cuerpo y la salud, previene la parálisis de los dedos torcidos (enlargamiento del nervio ciático) y se requiere para la incubabilidad. Las fuentes naturales de esta vitamina son las levaduras de cerveza, los subproductos de destilería, la leche y la harina de alfalfa.

**Ácido pantoténico.** Es esencial para el crecimiento, la salud de los nervios, la prevención de dermatitis y el crecimiento de las plumas. La deficiencia de esta vitamina se caracteriza por retraso del crecimiento, retraso en el desarrollo de las



plumas y dermatitis en la boca, párpados y cojinetes de las patas. Esta vitamina es abundante en subproductos de la leche y la harina de alfalfa.

**Biotina.** Previene la dermatitis y el crecimiento pobre. Los síntomas de deficiencia de esta vitamina son similares a los de una carencia de ácido pantoténico, excepto que en este caso la dermatitis aparece primero en las patas. Las fuentes de esta vitamina son el extracto de hígado, la levadura y yema de huevo.

**Ácido fólico.** Conocido también como *folacina* su función implica la síntesis de purinas y pirimidinas para la formación de proteínas del músculo, crecimiento normal, formación de la sangre, desarrollo de las plumas y producción de huevo. Su deficiencia ocasiona anemia caracterizada por disminución de eritrocitos y hemoglobina, así como parálisis. Las fuentes de esta vitamina son las hojas de las plantas, el hígado y la levadura.

**Colina.** Es parte estructural de los fosfolípidos y la acetilcolina que auxilia la transmisión de impulsos nerviosos; además, es esencial en el metabolismo de las grasas. Su deficiencia se caracteriza por una enfermedad típica de las aves, la perosis o tendón zafado; otros síntomas característicos son: hígado graso y disminución de la producción de huevo. El hígado, el germen de trigo y la pasta de soya son fuentes de estas vitaminas.

### **5.5. Minerales (Ávila, 1992)**

Son elementos químicos que se encuentran en las plantas y en los animales. En las aves los minerales son indispensables para diversas funciones, principalmente para el crecimiento. Algunos minerales son requeridos en grandes

cantidades y por esto se denominan minerales mayores: Ca, P, Mg, Na, K y Cl. Otros minerales son requeridos en muy pequeñas cantidades, estos son los minerales traza o menores: Cu, Co, Fe, I, Mn, Zn, Mo y Se.

**Calcio.** Es importante para la coagulación de la sangre y para la contracción muscular. Para poder obtener una óptima producción de huevo y buena calidad, se debe de proporcionar calcio en una cantidad de 3.25 a 3.5% para climas templados, ya que la temperatura y la edad del ave afecta el metabolismo de este mineral.

**Fósforo.** Es esencial en el metabolismo energético, constituyente de los ácidos nucleicos y necesario para la actividad de varios sistemas enzimáticos.

El Calcio y el fósforo se encuentran relacionados, un exceso o deficiencia puede interferir en su actividad. El calcio se encuentra disponible en los ingredientes de la dieta de aves en forma disponible. El fósforo se presenta en alimentos de origen vegetal en forma de fitatos, y el 30% del contenido de fósforo se considera como fósforo disponible.

**Magnesio.** Generalmente se encuentra relacionado con el metabolismo del calcio, ya que participa en el desarrollo normal del hueso, musculo y nervio. Este elemento generalmente se encuentra en buena proporción en los ingredientes de las dietas de aves.

**Sodio, potasio y cloro.** Se encuentran presentes en fluidos corporales o en tejidos blandos. Su principal función es ayudar a mantener el equilibrio ácido-base en los fluidos del organismo. El sodio se encuentra en el líquido extracelular y el potasio en el intracelular. El cloro es parte del ácido clorhídrico secretado por el proventrículo. Una deficiencia de estos elementos provoca reducción del

crecimiento, deshidratación del cuerpo, y si es muy severa la deficiencia puede provocar la muerte. La ración de sodio y cloro son de 0.25 a 0.50%, un exceso es tóxico para el ave.

**Hierro.** Forma parte de la hemoglobina en los glóbulos rojos, que actúa como portadora de oxígeno. Su carencia provoca anemia nutricional y despigmentación de las plumas de las aves.

**Cobre.** Se requiere para la utilización del hierro en la formación de hemoglobina. Su carencia produce anemia, aún en presencia de hierro.

**Manganeso.** Ayuda en la prevención de perosis que se caracteriza por un alargamiento de la articulación tibiometatarsal y, consecuentemente, un deslizamiento del tendón de Aquiles de los cóndilos (tendón zafado). Esta enfermedad en pollos produce retraso del crecimiento, disminución en la producción de huevo y la incubabilidad así como en la calidad del cascarón. Este mineral se debe proporcionar en la dieta, ya que los ingredientes no satisfacen la necesidad del ave.

**Cobalto.** En aves está asociado con la vitamina B<sub>12</sub>, necesaria para un crecimiento y reproducción normal.

**Zinc.** Es esencial para el crecimiento, su deficiencia reduce el crecimiento de plumas y los huesos largos de las alas y las patas se ensanchan y acortan. El zinc forma parte de la enzima anhidrasa carbónica, que facilita la conversión de CO<sub>2</sub> derivado de los tejidos en H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en la sangre y la degradación de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para liberar CO<sub>2</sub> en los pulmones. Esta enzima ayuda a la calcificación de huevo en el útero. El zinc se debe proporcionar en la mezcla de minerales en la dieta.

**Molibdeno.** Es un nutriente esencial involucrado en una reacción enzimática que convierte a la purina en ácido úrico para su excreción. Los ingredientes de la dieta satisfacen las necesidades del ave y no es necesario agregarlo en la mezcla de minerales.

**Selenio.** Algunas de sus funciones metabólicas son la prevención de anomalías del músculo (miopatías) y diátesis exudativa. El selenio es tóxico cuando se adiciona en cantidades elevadas.

### **5.6. Agua**

El agua permite que el ave desarrolle sus funciones normales. Ablanda el alimento para la digestión, es importante para la absorción de los nutrientes, ayuda a la eliminación de productos de desecho, sirve para el control de la temperatura corporal, es el medio para que las reacciones metabólicas se lleven a cabo, actúa como lubricante en las articulaciones, músculos y tejidos del organismo. Constituye aproximadamente el 50% del peso de un ave adulta y el 78% del peso de un pollo recién nacido. Los huevos están compuestos por 60% agua. El agua se puede obtener al beberla, a través de los alimentos y la que está disponible por medio de procesos metabólicos.

### **5.7. Antibióticos (North, 1993)**

La mayoría de los antibióticos se suministran en la ración o bien se agregan al agua para facilitar su adición en el aparato digestivo y en el torrente sanguíneo con mayor rapidez, ya que algunas veces no comen pero si beben durante el curso del brote de una enfermedad grave. Otros antibióticos pueden inyectarse.

La bacitracina, es usada principalmente para enteritis necrótica y se puede suministrar en alimento o en el agua.

El coccidiostato, es un fármaco muy utilizado ya que es muy común que las aves se enfermen de coccidiosis, enfermedad producida por un grupo de protozoarios *Coccidia*. A largo plazo el parasito genera resistencia.

Otros antibióticos usados en la avitecna son: Clorotetraciclina, eritromicina, gentamicina, penicilina, entre otros.

## **6. Absorción y metabolismo en las aves**

Los productos de la digestión pasan a través de la pared del intestino delgado hacia el torrente circulatorio. La absorción de los nutrimentos se realiza mediante sistemas de transporte especializados y se ve favorecida por la presencia de las vellosidades, que aseguran una rápida y completa absorción de los nutrimentos digeridos. La sangre transporta los nutrimentos absorbidos del alimento al hígado; de esta forma, son utilizados en el metabolismo (que es el conjunto de cambios químicos que sufren los nutrimentos desde el momento de ser absorbidos por el organismo hasta que aparecen como productos de excreción).

La glucosa puede almacenarse como glucógeno en músculos o hígado, pero sólo en cantidades limitadas. Cuando la energía ingerida en forma de hidratos de carbono excede las necesidades del animal para energía inmediata o para almacenamiento en forma de glucógeno, se convierte en grasa y se almacena en el tejido adiposo. En las aves, los ácidos grasos (excepto el ácido linoleico) pueden ser sintetizados a partir de hidratos de carbono en el hígado, de donde

son transportados al tejido adiposo o al ovario. Los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son agua y CO<sub>2</sub>.

Las grasas pueden ser oxidadas rápidamente a agua, CO<sub>2</sub> y energía, con la característica de que puede liberarse 2.25 veces más de energía potencial durante su metabolismo que los hidratos de carbono. Las grasas absorbidas también pueden almacenarse directamente en el tejido adiposo o transferirse a la grasa del huevo. Además, las grasas también son importantes constituyentes de la estructura del cuerpo. Los ácidos grasos son componentes importantes de las membranas celulares.

Los aminoácidos se utilizan primordialmente para síntesis de proteínas, ya sea para la construcción de nuevos tejidos del cuerpo o para reparación de los mismos. Cuando se dan en exceso son desaminados en el hígado y el nitrógeno puede emplearse para sintetizar aminoácidos no esenciales o simplemente se elimina en forma de ácido úrico en la orina. El carbono de los aminoácidos se oxida a agua, CO<sub>2</sub> y energía, o se convierte a glucosa o grasa.

Los minerales absorbidos se transforman a hueso y cascarón de huevo o se emplean en tejidos blandos. Parte de los excedentes de minerales pueden almacenarse pero la mayoría se excretan. Las vitaminas se almacenan en el hígado y en otros tejidos. Las vitaminas liposolubles se almacenan en mayor grado que las vitaminas hidrosolubles.

Los productos finales del metabolismo como el ácido úrico, agua y minerales, se desechan a través de la orina. El CO<sub>2</sub> y agua en forma de vapor se excretan por los pulmones. Las aves no tienen glándulas sudoríparas; por lo tanto se

pierde muy poca agua por la piel. El resto de desperdicios del cuerpo se excretan vía heces.

## **7. Formulación de dietas (Ávila, 1992)**

La formulación de una dieta de pollos debe de suministrar alimentos que al oxidarse, proporcione cantidades suficientes de energía, así como sustancias requeridas para el crecimiento y producción: aminoácidos, lípidos, vitaminas, minerales traza. Se debe de controlar la cantidad de estos nutrimentos, ya que una deficiencia puede causar alguna anomalía en el crecimiento del ave, y un exceso puede ser tóxico provocando la muerte del ave.

Por otra parte, ya que no todas las fuentes de proteína son ricas en aminoácidos esenciales, se debe corregir el error por falta de aminoácidos en la elaboración de dietas. Una manera de realizar la complementación de aminoácidos es realizando una combinación de fuentes naturales de proteína y aminoácidos sintéticos. De esta manera la deficiencia de ciertos aminoácidos en una fuente de proteína se compensa con el alto contenido de ese aminoácido en otra fuente de proteína o con aminoácido sintéticos. La lisina y la metionina son aminoácidos que se obtienen en forma pura a bajo costo.

El balance de los nutrimentos en la dieta debe tratarse con cuidado, las aves se alimentan en primer lugar para satisfacer sus necesidades de energía, de modo que si la dieta tiene un bajo valor energético (con mucha fibra) las aves consumen más alimento para satisfacer esta necesidad. También puede suceder que la proteína se utilice para formación de energía en vez de emplearse en la síntesis de tejidos causando que el crecimiento se reduzca.

Dado que el alimento representa del 70 al 80% de los costos de producción de carne y huevo, las dietas no sólo deberán ser adecuadas nutricionalmente, sino también producir el menor costo posible. Al realizar el balanceo de dietas se requiere tener en cuenta una serie de factores para que sean adecuadas: necesidad de nutrimentos, línea o raza del ave, etapa fisiológica, ambiente, uso de las mejores materias primas disponibles.



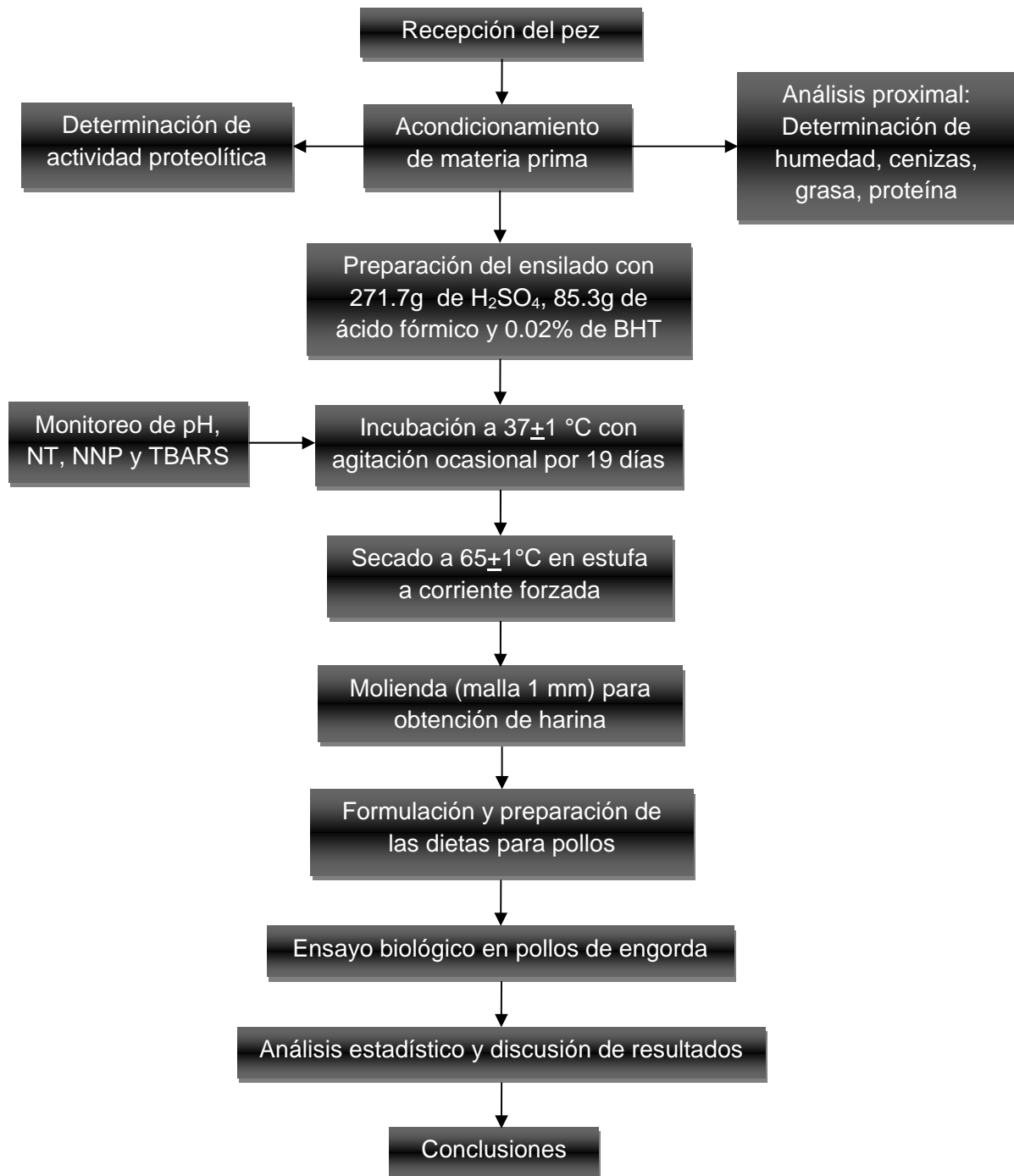
*Objetivo general*

- Elaborar y caracterizar un ensilado de pez diablo (*Pterygoplichthys multiradiatus*) y aplicarlo como ingrediente en dietas destinado a alimentación de aves.

*Objetivos particulares*

- Determinar la composición proximal del pez diablo así como su actividad proteolítica.
- Elaborar un ensilado de pez diablo y monitorear los cambios fisicoquímicos que se presentan.
- Evaluar la calidad nutricia del ensilado de pez diablo como ingrediente en dietas para alimentación de pollos de engorda.

Diagrama general de la investigación.



### **1. Recepción y acondicionamiento de la muestra.**

El Instituto Nacional sobre la Investigación de Recursos Naturales (INIRENA), proporcionó 15 kg de pez diablo congelado procedente de la Presa Adolfo López Mateos en Morelia, Michoacán. Una vez recibida la muestra se almacenó inmediatamente en un ultracongelador (REVCO) a  $-50\pm 1^{\circ}\text{C}$  mientras se realizaba el acondicionamiento. La materia prima se trasladó a un refrigerador para un descongelamiento gradual. Posteriormente, se retiró todo tipo de material que se encontraba enredado en el caparazón del pescado como trozos de hilo de red, madera y algas. El pescado se cortó en trozos que se colocaron en una picadora semi industrial cuidando que la temperatura no aumentara a más de  $10^{\circ}\text{C}$ . Una vez homogeneizado se separó en porciones de 5 kg, las cuales se almacenaron en un ultracongelador REVCO a  $-50 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### **2. Caracterización del pez diablo**

A partir del homogeneizado de pez diablo se realizó el análisis proximal: determinación de humedad, grasa cruda y proteína cruda. La determinación de cenizas totales se realizó por separado. Las técnicas se realizaron de acuerdo a los procedimientos de la AOAC (1990), las cuales se detallan en el Anexo 1.

#### **2.1. Determinación de humedad**

##### *Fundamento:*

El agua en los alimentos se encuentra en dos formas como agua enlazada o libre, el agua libre es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede perder con facilidad por secado (Kirk et al., 2006). Dado el contenido de

humedad de la muestra la determinación se realizó en dos pasos: secado en estufa a 100-110°C, seguido de un secado en estufa al vacío a 60-65°C con una presión mínima de 25 mmHg.

## **2.2. Determinación de cenizas totales**

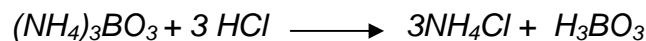
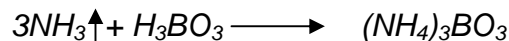
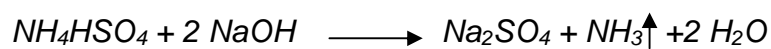
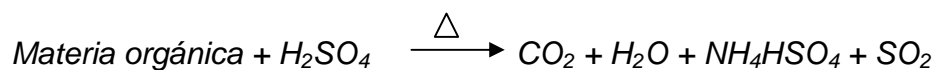
### *Fundamento:*

Las cenizas de un producto alimentario es el residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. Las cenizas obtenidas no tiene necesariamente la misma composición que la materia inorgánica del alimento original, ya que puede haber pérdidas por volatilización o algunas interacciones entre los componentes. (Kirk et al. 2006). La determinación se realizó haciendo una calcinación de la materia orgánica, seguido de una incineración a 500-550°C para obtener las cenizas totales.

## **2.3. Determinación de proteína cruda**

### *Fundamento:*

El método de Kjeldahl se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos, para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno en forma de amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato ácido de amonio. El resultado de la digestión, una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre de vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado en una solución de ácido bórico formando borato de amonio, el cual se titula con HCl.



El contenido de nitrógeno no proteínico es alto en algunos alimentos como el pescado, pero los factores comúnmente usados para convertir nitrógeno en proteína cruda se basa en el contenido promedio de nitrógeno de las proteínas encontradas en alimentos particulares. En este caso el factor utilizado fue de 6.25. (Kirk et al., 2006)

#### 2.4. Determinación de grasa cruda

##### *Fundamento:*

El contenido de lípidos libres, que básicamente son grasas neutras (triglicéridos) y ácidos grasos libres, se determina por extracción del material seco y molido con una fracción ligera de éter etílico ó de petróleo en un aparato de extracción continua. (Kirk et al. 2006). La determinación se realizó en un aparato de extracción tipo Goldfish, utilizando éter de petróleo como disolvente, la extracción se realizó por 4 horas.

#### 2.5. Determinación de hidratos de carbono totales

Esta determinación es calculada por diferencia, pues el contenido de hidratos de carbono en los pescados es menor al 0.3%, haciendo despreciable su

valor. A 100% se le resta la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína y grasa.

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

### **3. Determinación de actividad proteolítica total**

#### *Fundamento:*

Este método se basa en la digestión de hemoglobina por las enzimas presentes en la muestra bajo condiciones estándar: pH 3, 37°C por 10 minutos. El sustrato no digerido, se precipita con ácido tricloroacético. Del sobrenadante se toma una alícuota para hacerse reaccionar con un reactivo de Folin-Ciocalteu, que da una coloración azul con tirosina y triptófano, cuya absorbancia se mide a 750 nm. (Anson, 1938). Ésta determinación se realizó en dos extractos de homogeneizado de pez diablo.

La actividad enzimática, se mide a través de unidades (U), que es la cantidad de enzima que se requiere para transformar en producto una  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto, en condiciones óptimas de pH y temperatura. Para saber la proporción de enzima con respecto a todas las proteínas que pueden estar presentes en una preparación, se utiliza la actividad específica, éstas son las unidades de actividad de la enzima en relación con la cantidad total de proteína en miligramos. (Badui, 2006).

### **3.1. Determinación de proteína soluble en el extracto**

*Fundamento:*

El principio de este método consiste en dos fenómenos: la formación de un complejo colorido de cobre debido a la presencia de enlaces peptídicos y la reducción del ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (reactivo de Folin-Ciocalteu) por los aminoácidos aromáticos (Rick y Firttch, 1974). La metodología se describe en el anexo 1.

### **4. Determinación de Nitrógeno No proteínico (NNP)**

*Fundamento:*

Es una metodología propuesta por Lo y cols. (1993), que permite conocer la evolución de la hidrólisis del contenido proteínico expresado como porcentaje de Nitrógeno No Proteínico (NNP) del contenido total de nitrógeno. Las alícuotas para conocer el avance del NNP en el ensilado se tomaron los días 0, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17 y 19.

### **5. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

*Fundamento:*

Se utilizó el método propuesto por Vyncke (1970), que consiste en medir sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, las cuales se expresan como malonaldehído. El malonaldehído (MDA) es el principal compuesto producido en la oxidación de los lípidos, el cual al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico produce un pigmento rojo que puede ser medido espectrofotométricamente a 538 nm.

Para monitorear el avance de la oxidación se tomaron alícuotas los días 0, 1, 7, 10, 14 y 20.

## **6. Preparación del ensilado**

Una vez descongelado 13862 g de pez diablo molido, se le adicionó de forma alterna 271.7 g de ácido sulfúrico (1.96% p/p) y 85.3 g (0.615% p/p) de ácido fórmico ambos diluidos en agua; posteriormente se agregó 0.02% de BHT diluido en la mínima cantidad de etanol. El ácido disminuyó el pH a un valor inicial de 3.1; a las 24 horas de incubación, el pH aumentó y se adicionó nuevamente ácido sulfúrico y de ácido fórmico manteniendo el porcentaje anterior para disminuir el pH a un valor de 3.4. Una agitación frecuente fue requerida para homogeneizar las condiciones del ensilado.

### **6.1. Monitoreo del ensilado**

Durante el desarrollo del ensilado se realizaron muestreos para determinar los cambios debidos a la proteólisis y con ello saber el avance del proceso de ensilaje. Se monitoreó diariamente el pH del ensilado con ayuda de un potenciómetro, se tomaron alícuotas para medir el Nitrógeno Total (NT) por el método de Kjeldahl, Nitrógeno No Proteínico (NNP) y sustancias reactivas al ácido tioarbitúrico (TBARS).

Una vez alcanzada la proteólisis de 90.18%, se efectuó el análisis proximal del ensilado mediante las metodologías descritas en el AOAC, 1990. Posteriormente se trasladó a una estufa de corriente forzada a  $65\pm 1^{\circ}\text{C}$ , para



eliminar la humedad y finalmente se pasó por una malla de 1 mm para obtener la harina de ensilado de pez diablo.

### **7. Formulación y manufactura de dietas para pollos**

Se formularon dietas con 22% de proteína. Las dietas cumplen con la característica de ser isocalóricas e isoproteínicas. Los requerimientos nutricionales para la etapa iniciadora de los pollos de la raza Ross 308, se tomaron del manual Ross Aviagen 308 Broiler Nutrition Specification. Para realizar la prueba biológica en pollos se formularon dos dietas:

**1. Dieta testigo.-** Fuente de proteína sorgo y soya.

**2. Dieta experimental.-** Fuente de proteína sorgo, soya y harina de ensilado de pez diablo al 1.15 % de inclusión.

Todos los ingredientes de las dietas fueron utilizados en forma de harina, con un tamaño de partícula de 1-5 mm. Con ayuda de una mezcladora semi industrial se incorporaron los ingredientes; el aceite fue el último ingrediente en adicionarse para evitar la formación de grumos. Una vez homogeneizadas las dietas se guardaron en costales y fueron rotuladas como "1R" que pertenece al testigo y "2R" al ensilado de pez diablo.

### **8. Metodología de la prueba biológica con pollos**

Se realizó un ensayo biológico por 21 días en pollos, en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAV) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia ubicado en la Delegación Tlahúac,

Distrito Federal en el mes de febrero del 2008. Se inició la prueba con 52 pollos machos de la raza Ross 308 con 1 día de nacidos y con un peso promedio de 38.7 g. Los cuales se distribuyeron al azar en tres replicas por tratamiento, dos de ellas con 9 pollos y una con 8 pollos. Las réplicas se colocaron al azar en los distintos niveles de la incubadora Petersime. Cada nivel estaba provisto de: 2 comederos, 1 bebedero y 1 lámpara de calefacción en un ambiente cerrado. Las instalaciones tuvieron buenas condiciones de ventilación y sanidad.

Cada 7 días se procedía a pesar a los animales para calcular el incremento en peso. El alimento se pesó al inicio y fue controlado durante el experimento y los pollos se mantuvieron con agua *ad libidum*.

Al décimo día de experimentación, los pollos fueron vacunados contra la enfermedad de Newcastle (cepa Lasota), se usaron dos vacunas una vía ocular y otra subcutánea en emulsión a fin de reforzar la respuesta inmunológica.

## **9. Análisis estadístico**

Para analizar los datos obtenidos en la prueba biológica se utilizó el programa estadístico "Statgraphics plus 5.1" para realizar un análisis de varianza de una vía con una prueba de rangos múltiples para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

### Análisis proximal del pez diablo

Para conocer la calidad nutricional del pez diablo, se procedió a realizar el análisis proximal. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Análisis proximal del homogeneizado de pez diablo (g/100g de muestra)<sup>1</sup>**

<b>Componente</b>	<b>Base húmeda (BH)</b>	<b>Base seca (BS)</b>
Humedad	65.10 ± 0.53	-----
Proteína	16.10 ± 0.77	46.13
Grasa	4.71 ± 0.16	13.49
Cenizas	8.68 ± 0.22	24.87
Hidratos de carbono <sup>2</sup>	5.41	15.51

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

2. Calculado por diferencia.

Generalmente el contenido de proteína no es un componente muy variable, mientras que el agua y la grasa si lo son. Según Astiasarán (2000), el contenido de proteína cruda del pescado oscila entre un 17 y un 20%. El contenido acuoso oscila entre el 60 y el 80%. En función del contenido de grasa los pescados se pueden clasificar como magros o blancos con menos de 1% de grasa, pescados grasos con un 8-15% de grasa y semigrasos con una porción entre 2-7% de grasa. El alto contenido de cenizas fue porque el pez diablo se ocupó entero. Ruíz (2007), realizó un análisis proximal del pez diablo, donde reportó un contenido de proteína de 51.26% BS, superior al encontrado en este trabajo y un contenido de

grasa de 5.26% BS. La diferencia del contenido graso puede ser a causa de que un aproximado de 70% de los ejemplares contenía huevera.

### **Actividad proteolítica del pez diablo**

Para conocer la actividad proteolítica de las enzimas del pez diablo, provenientes de las vísceras y de los músculos, se controlaron los parámetros como temperatura, pH y tiempos de reacción. En la Tabla 2, se indican los resultados obtenidos a partir de la medición de proteína de los extractos por el método de Bergmeyer (1991).

En estudios realizados por Ruiz (2007) con pez diablo, encontró una actividad proteolítica específica de 0.018 U/mg de proteína, este es un valor mayor al que se muestra en la Tabla 4. Esto nos indica que con un valor de 0.013 U/mg de proteína, es suficiente para lograr la proteólisis en el proceso de ensilaje y de esta forma aprovechar el pez diablo completo sin generar mermas.

**Tabla 4. Proteína soluble y actividad proteolítica del extracto de pez diablo**

<b>Extracto</b>	<b>Contenido de proteína soluble mg proteína/mL de extracto</b>	<b>Actividad enzimática U<sup>2</sup>/g muestra</b>	<b>Actividad específica U/mg proteína</b>
A <sup>1</sup>	50.56±0.36	0.739 ± 0.087	0.015 ± 0.002
B	52.76±0.3	0.574 ± 0.040	0.011 ± 0.001
Promedio	51.66	0.657	0.013

1. Promedio de triplicado ± desviación estándar

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

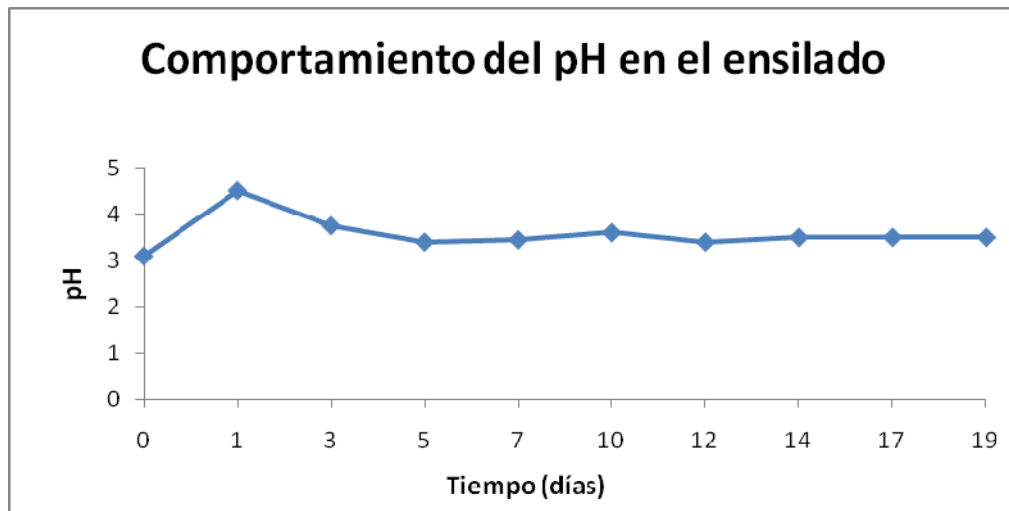
### **Elaboración del ensilado de pez diablo**

Una vez homogeneizado el pez diablo y de determinar la actividad proteolítica se procedió a realizar el ensilado químico, con ayuda de una mezcla de ácido sulfúrico y ácido fórmico, este último en menor proporción a causa de su precio. El porcentaje de ácidos es tomado de los estudios realizados por Vizcarra (1999), quién utilizó esta mezcla y obtuvo un porcentaje de hidrólisis satisfactorio en el ensilado. Los ácidos se agregaron diluidos en agua por su alta reactividad. El pH inicial del pez diablo era de 6.4 y con los ácidos se descendió hasta un pH de 3.1 para activar las enzimas proteolíticas y así obtener el ensilado. En función del contenido de grasa, se adicionó 0.02% de BHT (hidroxibutiltolueno), dicha porción es el límite permisible para este antioxidante. Finalmente, para tener a las enzimas en las mejores condiciones de actividad, el ensilado se mantuvo a una temperatura de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  y con agitación ocasional para obtener una hidrólisis homogénea.

### **Monitoreo de pH en el desarrollo del ensilado**

En la Figura 2, se muestra gráficamente el monitoreo del pH. En los trabajos realizados por Vizcarra (1999), indica que las enzimas proteolíticas presentan mayor velocidad de reacción a un rango de pH de 3.1-4. A medida que la proteólisis progresa, se producen compuestos nitrogenados, como péptidos, aminoácidos, aminos, amonio y otros compuestos de bajo peso molecular que perturban la capacidad amortiguadora del producto, incrementándose los valores de pH (Lindgren, 1983). Por esta razón a las 24 horas de incubación del ensilado, el pH aumentó a 4.5 fue necesario agregar otra porción de ácido sulfúrico y ácido

fórmico, bajando el pH hasta 3.4. Los siguientes días de ensilaje el pH se mantuvo dentro del rango de 3.1-4 y no hubo necesidad de adicionar más ácido al ensilado.



**Figura 2.** Evolución del pH en el ensilado

Otro aspecto importante del control del pH, es que si es mayor de 3.5-4, el ensilado no está del todo protegido contra el desarrollo de microorganismos, particularmente los hongos del género *Aspergillus flavus* (Córdova *et al.*, 1986). Se han realizado estudios de estabilidad del ensilado (Bello, 1995), que muestran que es factible almacenar este producto por períodos mayores a 6 meses sin requerir de refrigeración.

### **Hidrólisis en el ensilado**

Una vez que se establecieron las condiciones óptimas de pH y temperatura, las enzimas proteolíticas del pescado inician la hidrólisis del material. Con una

relación entre la determinación de Nitrógeno Total (NT) y Nitrógeno No Proteínico (NNP) se conoce el avance de la proteólisis durante el desarrollo del ensilado. En la Tabla 5, se observa que el valor máximo de proteólisis fue de 90.18%, el cual se obtuvo en 19 días. Por otra parte algunos investigadores han indicado que cerca del 80% de Nitrógeno total se solubiliza a temperaturas de 23-30°C (Tatterson, 1974; Gilberg, 1977; Backhoff, 1976), la cual se obtiene a partir del día 15. Si se busca reducir tiempos en la obtención de ensilado, puede hacerse en 4 días.

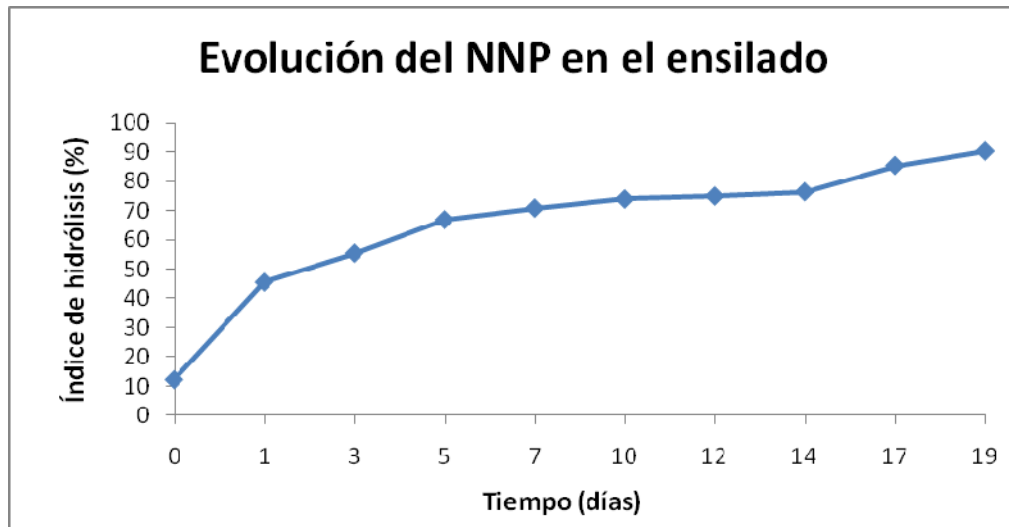
**Tabla 5. Evolución de proteólisis en el ensilado**

Días	NT <sup>1</sup>	NNP <sup>2</sup>	Proteólisis (%)
0	2.10	0.26	12.38
1	2.02	0.92	45.54
3	2.38	1.32	55.46
5	2.20	1.47	66.82
7	2.19	1.55	70.77
10	2.14	1.58	73.83
12	2.30	1.72	74.85
14	2.28	1.74	76.31
17	2.31	1.97	85.28
19	2.24	2.02	90.18

1. Nitrógeno total (%), promedio de triplicado

2. Nitrógeno No Proteínico (%), promedio de triplicado

La Figura 3, presenta en forma gráfica los resultados del porcentaje de hidrólisis en el ensilado, notándose un incremento progresivo al primer día de ensilaje y con el transcurso del tiempo la proteólisis aumenta.



**Figura 3.** Evolución de la hidrólisis en el ensilado

### **Oxidación lipídica**

El alto grado de insaturación de los lípidos del pescado hace que éste sea un alimento muy susceptible de experimentar reacciones de autooxidación tras reaccionar con el oxígeno atmosférico en presencia de radicales libres iniciadores de estas reacciones, produciendo compuestos indeseables y en algunos casos tóxicos si el deterioro es muy alto (Jackson *et al.*, 1984). Como una medida preventiva de este evento, se utilizó BHT como antioxidante, para obtener un producto de buena calidad y mayor vida de anaquel.

En la Tabla 6, se encuentran los resultados obtenidos de la técnica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Al inicio del proceso de ensilaje se obtuvo un valor de 9.62 mg de malonaldehído/Kg de muestra, lo cual muestra que la materia prima empezaba a sufrir deterioro oxidativo.



Ruiz (2007), bajo las mismas condiciones de trabajo, encontró un contenido inicial de 2.36 mg malonaldehído/kg de pescado, pero el contenido de grasa (5.26% BS) obtenido en ese experimento es menor al encontrado en este trabajo.

Por otra parte, estudios realizados por Santana y cols., (2007) con ensilado de sardina, obtuvieron valores de 20-30 mg/kg de malonaldehído obtenidos por la técnica de TBARS indicando que estos son aceptables, ya que Farkas y cols. (1997), aconsejan que ensilados con valores comprendidos entre 8-250 mg/kg de MDA son aceptables. Por lo tanto, el uso de BHT ayudó a controlar y proteger al ensilado del proceso de oxidación.

**Tabla 6. Evolución de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el ensilado<sup>1</sup>**

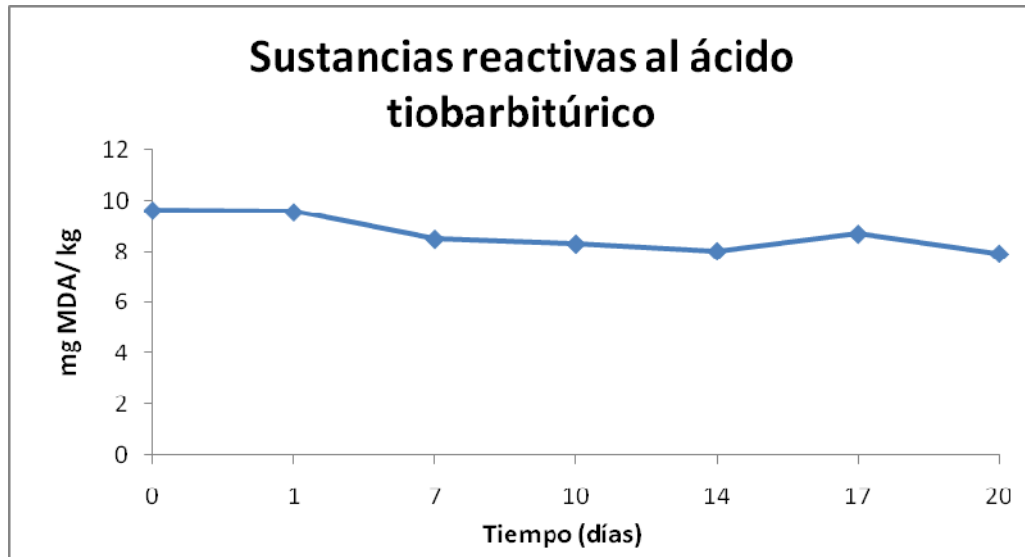
Tiempo (días)	mg malonaldehído(MDA) / kg muestra
0	9.62 <sup>2</sup>
1	9.55
7	8.48
10	8.29
14	8.0
20	7.9

1. Con BHT (Butilhidroxitolueno) como agente antioxidante.

2. Promedio de triplicado.

En la Figura 4, se observa gráficamente el comportamiento de la oxidación lipídica donde el MDA va disminuyendo ligeramente con el transcurso del tiempo. El antioxidante evita que se desencadene la reacción de autooxidación, ya que los compuestos formados en la primeras etapas de oxidación interactúan con las

moléculas del antioxidante impidiendo así la formación compuestos indeseables en etapas avanzadas de oxidación lipídica.



**Figura 4.** Evolución de la oxidación en el ensilado

#### Análisis bromatológico del ensilado de pez diablo

**Tabla 7. Análisis proximal del ensilado del pez diablo<sup>1</sup>  
(g/100 g muestra)**

Componente	Base húmeda (BH)	Base seca (BS)
Humedad	65.80 ± 2.91	-----
Proteína Cruda	15.69 ± 0.57	45.88
Grasa cruda	4.42 ± 0.19	12.92
Cenizas totales	8.15 ± 0.31	23.83
Hidratos de Carbono <sup>2</sup>	5.94	17.37

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

2. Calculado por diferencia.

Una vez alcanzada la proteólisis de 90.18% se realizó el análisis proximal del ensilado (Ver Tabla 7). El valor de proteína es ligeramente inferior (45.88% BS) al encontrado antes de realizar el ensilado (46.13% BS), esto es debido a que las condiciones ácidas del ensilaje causa que el aminoácido triptófano se vea afectado. Sin embargo, se requiere de un perfil de aminoácidos para confirmarlo.

### **Evaluación nutrimental en pollos de engorda**

Después de 21 días de ensilaje, se realizó el análisis proximal del ensilado pez diablo y con esos valores se realizó la formulación de dietas para los pollos. La pérdida de triptófano en el ensilado se consideró al realizar la formulación de las dietas, donde se hizo una complementación con sorgo (rico en triptófano) para corregir el error por aminoácidos. El ensilado se utilizó en forma de harina la cual fue pasada por una malla de 1 mm para que el ensilado se incorpore mejor con el total de los ingredientes y evitar que las aves la rechazen.

El proceso de ensilado hace que la proteína sea más biodisponible, es decir, para los animales es más sencillo digerirla y aprovecharla.

El nivel de inclusión utilizado fue bajo (1.15%), ya que autores como Ávila, (1992) sugieren utilizar las fuentes de proteína animal en cantidades limitadas a niveles de 1-7% con el fin de complementar las dietas y para evitar la posibilidad de que se transmita el olor y sabor a pescado en los productos avícolas.

En la Tabla 8, se encuentra la formulación de las dietas las cuales son isocalóricas e isoproteicas.

**Tabla 8. Ingredientes de las dietas utilizadas en el ensayo biológico (g/1000g)**

<b>Ingrediente</b>	<b>Testigo</b>	<b>Ensilado</b>
Sorgo	572.5	535.03
Soya	353.8	291.52
Ensilado de pez diablo	----	137.5
Aceite de segunda	28.9	17.68
Carbonato de calcio	15.4	4.95
NaCl	4.4	3.59
L-Lisina	1.2	2.17
Metionina 99	2.1	2.16
Ortofosfato 1820	18.6	1.1
Vitaminas Pollo-E	1	1
Cloruro de colina 60	1	1
Coccidiostato	0.5	0.5
Minerales	0.5	0.5
IQ	0.2	0.15
Bacitricina	0.5	0.15

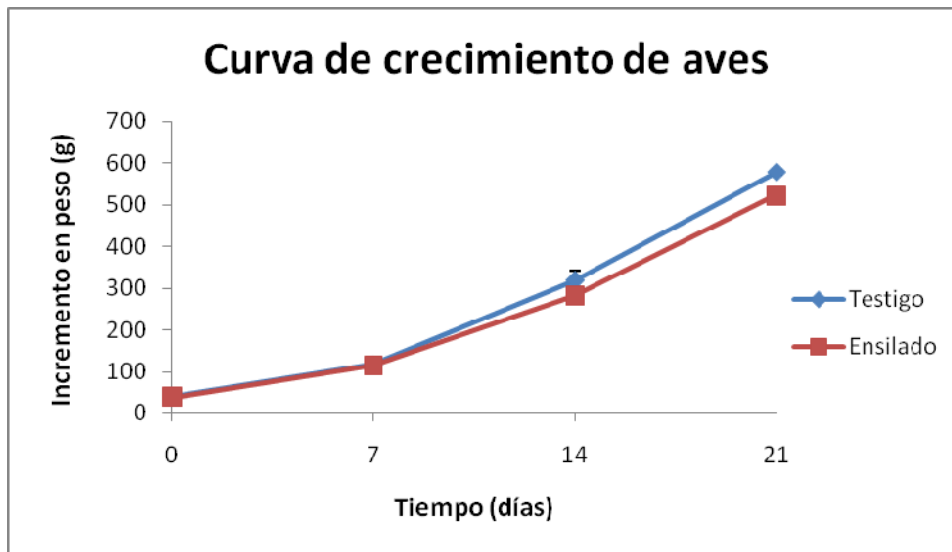
**Tabla 9. Crecimiento de las aves durante la prueba biológica<sup>1</sup>**

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Testigo (g)</b>	<b>Ensilado (g)</b>
0	39.45 ± 3.29	38.17 ± 2.05
7	116.38 ± 16.89	114.18 ± 10.06
14	318.98 ± 23.40	281.75 ± 13.09
21	578.62 ± 7.06	523.16 ± 13.09

1. Promedio de 3 replicas ± desviación estándar

A partir de la segunda semana de experimentación, los pollos que consumen la dieta experimental con ensilado tienen un crecimiento inferior a la dieta testigo sin embargo, a lo largo de la prueba los pollos no presentaron síntomas de desnutrición. (Ver Tabla 9).

Existen factores que ejercen una influencia sobre los resultados obtenidos en la prueba biológica como edad, sexo, cepa, condiciones ambientales (tamaño de la incubadora, temperatura y luz), los cuales se consideraron al realizar la experimentación y se mantuvieron constantes. A pesar de que la curva de crecimiento (Figura 5) demuestra gráficamente que las dietas tienen la misma tendencia, se encontró diferencia significativa entre ellas ( $p \leq 0.05$ ).

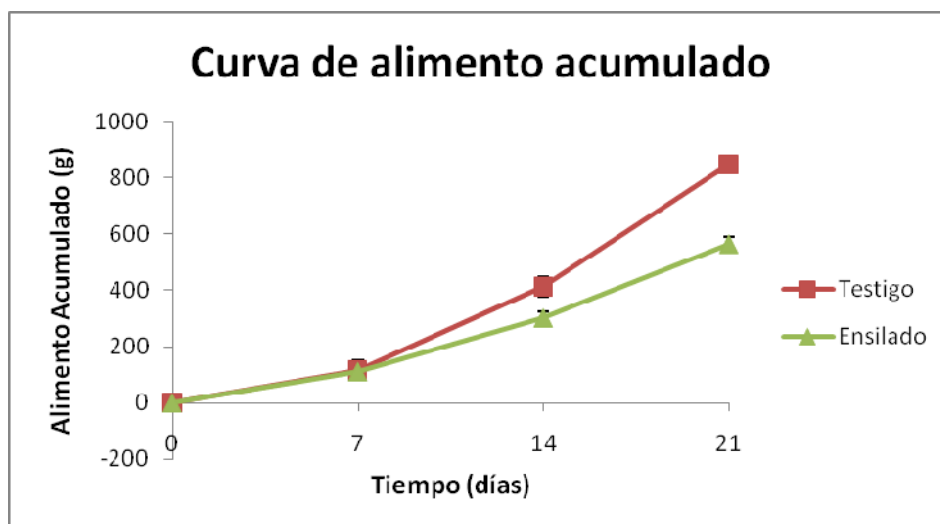


**Figura 5.** Crecimiento de las aves durante el ensayo biológico

En este trabajo, se realizó la prueba biológica por 3 semanas que pertenecen a la etapa de iniciación. Rodríguez y cols., (1990) realizaron un

ensayo biológico con ensilado de pescado y lo evaluaron en pollos de engorda. Los tratamientos fueron: harina de pescado al 5% y ensilado de pescado al 2.5 y 5%. En la etapa de iniciación encontraron diferencia estadística, sin embargo, en la etapa de acabado no encontraron diferencias significativas entre las dietas. Estos resultados también los encontró Berenz, (1990) que realizó el ensayo en pollos con ensilado de residuos de sardina, y en la etapa de acabado el ensilado reemplazó eficazmente como fuente proteínica animal a la harina de pescado en términos de peso - incremento - conversión alimenticia y retribución económica.

Es conveniente realizar el ensayo biológico con la etapa de iniciación y con la etapa de acabado, pues es mayor el tiempo en el que se puede monitorear el comportamiento de los animales. En este trabajo no fue posible realizar la etapa de acabado, por falta de materia prima y espacio en las incubadoras de los pollos, ya que las utilizadas sólo mantienen a los pollos cómodos en la etapa de iniciación y no en la de acabado.



**Figura 6.** Alimento acumulado durante el ensayo biológico

En el ensayo biológico, en la primera semana de alimentación, las aves comieron de igual forma las dietas, en la segunda semana el ensilado empezó a ser poco consumido por las aves tal como se muestra gráficamente en la Figura 6.

La conversión alimenticia relaciona el alimento consumido y la ganancia de peso de los animales, una conversión alimenticia menor indica una alta ganancia de peso con una baja ingesta de alimento, lo cual se ve reflejado en los costos de producción. En la Tabla 10, se observa la conversión alimenticia de las dietas, existe diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre la dieta experimental y la dieta testigo, donde la dieta con 1.15% de inclusión con harina de ensilado es la mejor opción para usarse como fuente de proteína.

**Tabla No 10. Conversión alimenticia de las dietas  
a la tercera semana de evaluación<sup>1</sup>**

Dieta	Conversión alimenticia <sup>2</sup>
Testigo	1.46 ± 0.05
Ensilado	1.33 ± 0.05

1. Conversión alimenticia = alimento acumulado / ganancia de peso.

2. Promedio de triplicado ± desviación estándar

En el ensilaje se solubilizan las proteínas ayudando a que los animales las digieran más fácil, esto explica el hecho de que el ensilado tenga una menor conversión alimenticia. A pesar de que se evaluó un nivel de inclusión bajo, no significa que deje de ser una fuente proteica alternativa, ya que el bajo costo de obtención del ensilado y el alto contenido de proteína son factores muy importantes a considerar en la formulación de dietas.

En la producción animal, la alimentación representa entre el 50 y 80% de los costos de producción. Un problema particular en la alimentación animal, es la provisión de proteínas, debido a la limitada disponibilidad de insumos proteínicos y su relativo alto costo. En el caso de la harina de pescado, a pesar de ser una fuente proteínica muy completa, su fabricación es un proceso sumamente costoso. En tal sentido se hace necesaria la búsqueda de fuentes alternas de proteínas de diferentes orígenes. Se sabe que en muchos países donde no se procesa harina de pescado, los ensilados han sido empleados como un sustituto de la misma.



- ✦ El alto contenido de proteína en la materia prima, es un factor determinante para la utilización del pez diablo en la elaboración de ensilados.
- ✦ Una actividad proteolítica de 0.013 U/mg de proteína del homogeneizado de pez diablo es suficiente para lograr un grado de hidrólisis del 90.18%.
- ✦ Las condiciones óptimas de temperatura, pH y agitación ocasional, lograron la hidrólisis de 90.18% en 19 días de ensilaje.
- ✦ El uso de BHT en el ensilado ayudó a mantener en niveles bajos (7.9 mg de malonaldehído (MDA)/kg de muestra), la oxidación de las grasas.
- ✦ La dieta experimental con 1.15% de ensilado de pez diablo, obtuvo una menor conversión alimenticia, lo cual indica que el proceso de ensilaje facilita la digestibilidad de las proteínas.
- ✦ Por lo tanto, este trabajo demostró que el utilizar ensilado de pez diablo como ingrediente en dietas para alimentación de pollos de engorda producirá una baja ingesta de alimento con un crecimiento apreciable, lo cual es importante en la reducción de costos en alimentación y producción avícola.

Para estudios posteriores con ensilado de pez diablo:

- Elaborar un perfil de aminoácidos para realizar la complementación adecuada en las dietas.
- Se recomienda evaluar diferentes niveles de inclusión (mayores al estudiado), del ensilado de pez diablo, con el fin de aprovechar esta fuente alterna de proteína en alimentación animal.
- Realizar la prueba biológica con etapa de acabado para determinar, si también ofrece buenos resultados en alimentación de pollos de acabado.
- Comparar el desempeño del ensilado contra harina de pescado en alimentación animal, considerando costos y manufactura.

- Agudelo C., Alzate C., Chaparro A., Arguelles C., Peña V., (2004). *Cuantificación y aprovechamiento de los subproductos pesqueros en el trapezio amazónico colombiano*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. pp 7-9.
- Astiasarán A., Martínez H. (2000). *Alimentos: composición y propiedades*. 2ª edición, Editorial Mc Graw- Hill, Zaragoza. Cap. 2, pp 29-35, 43.
- Anson M. (1938). *The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin*. J. Gen. Physiology. 22:79-89.
- AOAC. (1990). *Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15<sup>th</sup> Edition, Arlington. Vol. 1. pp 17-18, 69-70, 79.
- Aviagen. (2007). Ross 308 broiler: Nutrition specification. USA. pp 4-6.
- Ávila Gonzalez E. (1992). *Alimentación de las aves*. 1ª edición, Editorial Trillas, México. Cap.1-4.
- Badui D. (2006). *Química de los alimentos*, 4ª edición, Editorial Pearson, México, pp. 176, 335, 633-635.
- Balsinde R, Fraga C, Galindo L. (2004). *Inclusión del ensilado de pescado: Alternativa en la elaboración de un alimento extruido para el camarón de cultivo*. Rev. Panorama Acuícola.
- Backhoff, H. (1976). *Some chemical changes in fish silage*. J. Food. Technol. 11: 353-363.
- Bello R. (1995). *Experiencias con Ensilado de Pescado en Venezuela. Capítulo 1: Ensilados químicos*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela Caracas, Venezuela.

- <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap1.htm>. Consulta: junio 2008.
- Berenz Z. (1990). *Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos*. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao, Perú. Cap. 2.  
<http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap2.htm>. Consulta: junio 2008.
  - Bergmeyer, U. (1991). *Methods of Enzymatic Analysis*. 3<sup>rd</sup> Edition, Ed. VCH, Berlin. pp 88-92.
  - Bertullo, E. (1989). *Desarrollo del ensilado de pescado en América Latina*. 2<sup>a</sup> Consulta de Expertos sobre Tec. Pesq. en América Latina. FII819/RLAC/2, pp 24-45.
  - Copes J., Pellicer K., Hoyo G., García N. (2006). *Producción de ensilado de pescado en baja escala para uso de emprendimientos artesanales*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. *Analecta Veterinaria* 26(1): 5-8.
  - Córdova, E., Bello, R. (1986). *Procesamiento y evaluación de ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 36 (3):522-534.
  - Fagbenro O., Jauncey K. (1993). *Chemical and nutritional quality of stored fermented fish (tilapia) silage*. *Bioresource Tech*. 46: 207-211.
  - Farkas J., Floros J., Lineback D., Watkins B. (1997). *Oxidation kinetics of menhaden oil with TBHQ*. *J. Food Sci*. 62(3):505-507.
  - Gilberg A., J. Raa. (1977). *Properties of a propionic acid/formic acid preserved silage of cod viscera*. *J. Sci. Food Agric*. 28: 647.

- Jackson A., Kerr A., Cowey C. (1984). *Fish silage as a dietary ingredient for salmon. I. Nutritional and storage characteristics*. Aquaculture. 38:211-220.
- Kirk R., Sawyer R., Eagan H. (2006). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. 2ª Edición, Editorial CECSA, México. pp 19-35, 199.
- Lindgren S., Pleaje M. (1983). *Silage fermentation of fish waste products with lactic acid bacteria*. J.Sci Food Agric. 34:1057.
- Lo K., Liao P., Gao Y. (1993). *Effects of temperature on silage production from salmon farm mortalities*. Bioresource Technology. 44:33-37.
- Lupín H. (1983). *Ensilado biológico de pescado. Una propuesta para la utilización de residuos de la pesca continental en América Latina*. FAO. COPESCAL/83/10
- Mattos Y., Carcelén F., Arvaizo T. (2003). *Uso de ensilado biológico de pescado en la alimentación de cuyes mejorados*. Rev Inv Vet Peru; 14 (2): 89-96.
- Mendoza R., Ramírez C., Koleff P., Alvarez P., Aguilar V. (2007). *Los peces diablo: Especies Invasoras de alto impacto*. Biodiversitas 70:1-5.
- Neave V. (1986). *Introducción a la tecnología de productos pesqueros*. México, D.F. Ed. CECSA. pp 305-310.
- North M., Bell D. (1993). *Manual de producción avícola*. 3ª edición, Editorial Manual Moderno, México, pp. 521-522, 751, 754.
- Pearson A., Dutson T. (1997). *Production and processing of healthy meat, poultry and fish products*. Ed. Blackie Academic and Professional, Londres.
- Pokorny J., Yanishlieva N. (2005). *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. Editorial Acribia, Zaragoza. pp 7-11, 42, 43.

- Rick W., Firtch P. (1974). *Pepsin in: Methods of enzymatic analysis*. English academic Press Inc, 2<sup>nd</sup> edition, USA. pp 171-179, 1046-1057.
- Rodríguez T., Montilla J., Bello R. (1990). *Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. II. Prueba de comportamiento en pollos de engorde*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 40(4); 548-559.
- Ruíz E. (2007). *Elaboración y evaluación nutrimental de un ensilado de pescado Diablo (Hypostomus plecostomus)*. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. U.N.A.M. pp. 6, 42-43, 50.
- Santana H., Avila E., Sotelo A. (2007). *Preparation of silage from Spanish mackerel (Scomberomorus maculatus) and its evaluation in broiler diets*. Animal Feed Sci. Tech. 141:129-140.
- Tatterson I., Windsor M. (1974). *Fish silage*. J. Sci. Food Agric. 25:369.
- Vizcarra L., Ávila E., Sotelo A. (1999). *Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in broilers*. J. Sci. Food Agric. 79:1915-1922.
- Vyncke W. (1970). *Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity*. Fette seifen anstrichmittel, (72): Jargang, Nr. 12, 1080-1087. Citado por Vizcarra (1999).

## **Determinación de humedad**

### Materiales

- Muestra de homogeneizado de pez diablo
- Balanza analítica (Sartorius analitic)
- Desecador de Vidrio
- Charolas de aluminio
- Estufa con corriente forzada (LAB-LINE, Modelo IMPERIAL III)
- Estufa con vacío

### Procedimiento

1. Se colocaron las charolas de aluminio en la estufa hasta peso constante.
2. En las charolas se adicionó 5g de muestra extendida por toda la superficie de la charola para tener mayor superficie de evaporación.
3. Las charolas con la muestra se metieron en la estufa a una temperatura entre 100-110°C.
4. Después de 24 horas se sacaron las muestras y se trasladaron a una estufa al vacío a una temperatura de 60 -65°C.
5. Finalmente se pesó la muestra y se calculó el contenido de humedad.

### Cálculos:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

Pi= peso de la charola con muestra antes de secada (en gramos)

Pf= peso de la charola con muestra después de secada (en gramos)

m= peso de muestra (en gramos)

### **Determinación de cenizas totales**

#### Materiales

- Balanza analítica (Sartorius analitic)
- Crisoles de porcelana
- Mufla (THERMOLYNE, Modelo 1500)
- Desecador de vidrio
- Mechero Bunsen
- Campana de extracción

#### Procedimiento

1. Se colocó a peso constante los crisoles a una temperatura de 550°C por aproximadamente hora y media.
2. Se le colocaron 2g de muestra en el crisol.
3. Se carbonizó a la flama de un mechero bajo una campana de extracción.  
Se retiró cuando ya no se produjo humo.
4. Se introdujo el crisol a la mufla, la cual estaba a una temperatura de entre 500-550 °C.



5. Retiró el crisol de la mufla cuando las cenizas presentaron peso constante hasta la tercera cifra decimal.

Cálculos:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

$P_f$ = Peso del crisol con la muestra después de incinerada (en gramos)

$P_i$ = Peso del crisol a peso constante (en gramos)

$m$ = peso de muestra (en gramos)

### **Determinación de proteína cruda**

Materiales

- Tubos de digestión Tecator de 75 mL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Balanza analítica (Sartorius analitic)
- Digestor (Tecator Modelo Ab-20/40)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto Analizar Tecator, Modelo 1030)

Reactivos

- Sulfato de Potasio (R.A. Mallinckrodt)
- Mezcla digestiva (3g de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 430 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado)
- Peróxido de Hidrógeno al 30%

- Solución de NaOH al 40% p/v ( 40 g de NaOH en 100 mL de agua destilada)
- Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)
- Solución de HCl 0.01N valorada hasta la cuarta cifra decimal
- Glucosa anhidra (Merk)
- Caseína libre de vitaminas (88.8% N Pianstiehl Lab. INC)

#### Procedimiento

1. Se pesaron 10 a 40 gramos de muestra en un papel de celulosa y se colocaron en el tubo de digestión.
2. Se agregaron 0.5 g de  $K_2SO_4$  y 3 mL de mezcla digestiva.
3. Colocó el tubo en el digestor por 15 minutos.
4. Se enfrió y se agregó 1.5 mL de  $H_2O_2$  y nuevamente se colocaron en el digestor a una temperatura de 370 °C.
5. La digestión se terminó cuando la mezcla se volvió transparente en un tiempo aproximado de 1 hora y media.
6. Una vez efectuada la digestión se enfriaron los tubos y se les realizó la microdestilación.
  - a. Se agregó a cada tubo digerido 25 mL de agua destilada y se colocaron en el equipo Kjeltec.
  - b. Se registro la cantidad de ácido utilizado para titular.
  - c. Se calculó el contenido de proteína utilizando el factor de 6.25.

- d. Se realizó un blanco negativo con dextrosa y un control positivo con caseína.

Cálculos:

$$\% N_2 = \frac{(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

Donde:

P= mL de la titulación de la muestra

B=mL de 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)

### **Determinación de Nitrógeno No Proteínico (NNP)**

Materiales

- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Matraces aforados de 100 mL
- Tubos de centrifuga
- Pipetas graduada de 5 mL
- Centrifuga (Sorvall, Modelo super T21)
- Tubos de digestión Tecator de 25 mL

- Digestor (Tecator, Modelo Ab-20/40)

#### Reactivos

- Ácido tricloroacético (Mallinckrodt) al 20%  
Disolver 20 g de ácido tricloroacético en agua destilada y aforar a 100mL
- Sulfato de Potasio (R.A. Mallinckrodt)
- Mezcla digestiva (3g de  $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 50 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 430 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado)
- Peróxido de Hidrógeno al 30%
- Solución de NaOH al 40% p/v ( 40 g de NaOH en 100 mL de agua destilada)
- Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)
- Solución de HCl 0.01N valorada hasta la cuarta cifra decimal)
- Glucosa
- Caseína libre de vitaminas

#### Procedimiento

1. Se preparó una solución de la muestra al 2% p/v en ácido tricloroacético al 20%.
2. Se dejó precipitar la proteína por 2 horas y después se centrifugó a 4400 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Del sobrenadante se tomó 3 mL, al cual se le determinó nitrógeno por el método de micro-Kjeldhal.

Cálculos:

$$\% N_2 = \frac{(M-B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m(a/b)}$$

Donde:

M= mL de titulación de la muestra

B= mL de titulación de blanco

N= miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m= peso de la muestra

a=alícuota de la solución al 2% (3 mL)

b= aforo de la solución al 2% (50 mL)

### **Determinación de grasa.**

Materiales

- Balanza analítica (Sartorius analitic)
- Aparato de extracción Goldfish (LABCONCO, Modelo 35001-00CV)
- Tubos colectores de disolvente
- Cartuchos de celulosa
- Portadedales de vidrio
- Vasos de borde esmerilado (LABCONCO)
- Bomba de recirculación (Little Grant puma. Modelo 1)
- Estufa de vacío (LAB-LINE Duo Vac Oven, modelo 3620)

## Reactivo

- Éter de etílico (RGA)

## Procedimiento

1. Se colocaron los vasos esmerilados a peso constante en una estufa.
2. Se colocaron 3 g de muestra seca y molida en un cartucho de celulosa y se tapó con un trozo de algodón, se colocó en el portadedal.
3. Se adicionaron aproximadamente 50 mL de éter de etílico en el vaso de borde esmerilado, este con ayuda del anillo metálico con rosca se aseguró al aparato de extracción
4. Se abrió la llave del agua para que circulara en el refrigerante.
5. Se subió la parrilla hasta que estuviera en contacto con el vaso.
6. Se prendió el equipo manteniendo temperatura baja por 2 horas
7. Posteriormente se cambiaron los portadedales por tubos colectores para recuperar el éter aproximadamente 20-30 mL.
8. Se retiraron los vasos del equipo cuando estuvieron casi libres de disolvente y fueron colocados en una campana de extracción por un poco tiempo para eliminar el resto del disolvente. Finalmente se colocaron en la estufa de vacío hasta alcanzar el peso constante.
9. Se enfriaron en un desecador y se pesaron.

Cálculos:

$$\% \text{ grasa} = \frac{P_f - P_i}{m} \times 100$$

Donde:

Pf= Peso del recipiente después de la extracción (en gramos)

Pi= Peso del recipiente antes de la extracción (en gramos)

m= Peso de la muestra (en gramos)

### **Determinación de actividad proteolítica**

Materiales

- Balanza analítica (Sartorius analitic)
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Homogeneizador
- Tiras de papel pH
- Potenciómetro
- Vasos aforados de 50 mL
- Charola con hielo
- Tubos de centrifuga de 20 mL
- Centrifuga (Sorvall, Modelo súper T21)
- Pipetas automáticas de 100-1000 $\mu$ L
- Pipetas graduadas de 1-5 mL
- Tubos de ensaye
- Gradilla
- Incubadora
- Termómetro

- Vortex
- Celdas
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner, Modelo 340)

#### Reactivos

- Agua acidulada pH 3
- HCl 0.06 N
- Hemoglobina bovina al 2% en HCl 0.06N  
Disolver 2 g de hemoglobina con HCl 0.06N y aforar a 100 mL
- Ácido tricloroacético (Mallinckrodt) al 5%  
Disolver 5 g de ácido tricloroacético con agua destilada y aforar a 100 mL
- NaOH 0.5 N  
Disolver 2 g de NaOH en agua destilada y aforar a 100mL
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel de México)  
Diluir 1 mL de reactivo con 2 mL de agua destilada
- L-Tirosina (Sigma Chemical Co., St. Louis, M.o., USA.)  
Preparar solución estándar de 2  $\mu$ mol de tirosina/ mL en HCl 0.2 N

#### Procedimiento

##### *Preparación del extracto enzimático*

1. Durante este procedimiento se mantuvo el material sobre hielo.



2. Se pesó 5 g de pescado homogeneizado y se diluyó con 13 mL de HCl 0.1 N y con agua acidulada pH 3 se aforó a 50 mL.
3. Después de esta disolución se llevó a un homogeneizador donde se realizó una segunda homogeneización.
4. El material se centrifugó a 16000 rpm a 4°C por 20 minutos.
5. El sobrenadante se recuperó y se separó para determinar Actividad proteolítica por el método de Anson y el contenido de proteína por el método de Lowry.

#### *Determinación de actividad proteolítica*

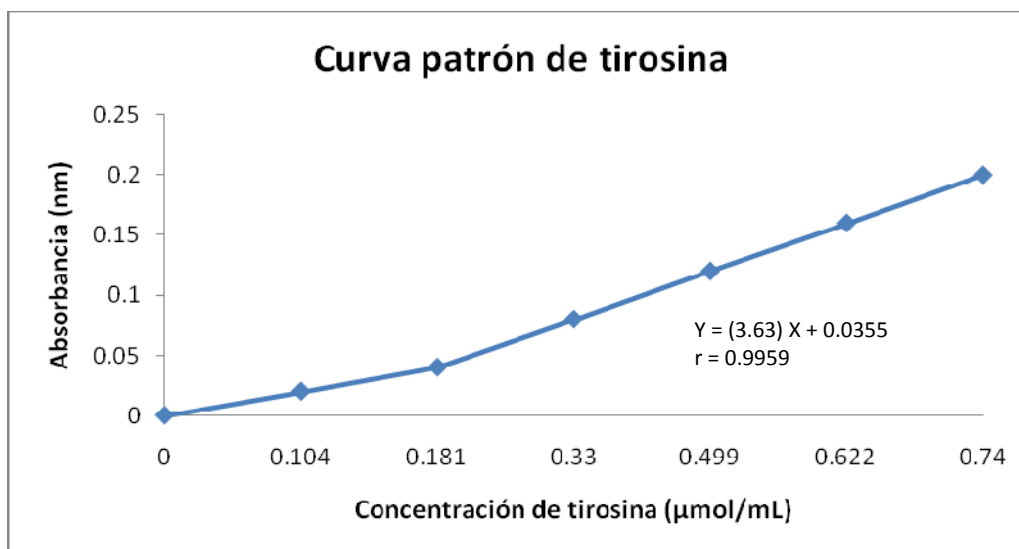
1. Se mezcló con vortex 0.5 mL del extracto enzimático con 2.5 mL de sustrato (hemoglobina bovina al 2%), este último se calentó previamente a 37 °C en baño de agua.
2. Se incubó a 37°C por exactamente 10 minutos.
3. Transcurrido el tiempo, se agregaron 5 mL de ácido tricloroacético al 5%, se agitó con vortex para detener la hidrólisis.
4. Se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos.
5. Del sobrenadante se tomó 2.5 mL y se mezclaron con 5 mL de NaOH 0.5 N y 1.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido.
6. Después de 10 minutos se midió la absorbancia a 750 nm contra un blanco de reactivos.

### Blanco

- I. El blanco de la muestra se realizó agregando 5 mL de ácido tricloroacético a 2.5 mL de hemoglobina se agitó y finalmente se agregaron 0.5 mL de extracto.
- II. Se agitó y se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos.
- III. Se tomó 2.5 mL del sobrenadante y le realizó la reacción colorimétrica.
- IV. Con este blanco se corrigieron las lecturas donde se cuantificaron algunas cantidades de tirosina libre presente en el extracto enzimático y el sustrato.

### *Preparación de la curva patrón de tirosina*

1. De la solución estándar de tirosina, se prepararon soluciones con concentraciones de 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 y 0.2  $\mu\text{mol/mL}$ .
2. Se tomó 2.5 mL de cada una de las soluciones estándar y mezclaron con 5 ml de NaOH 0.5 N y 1.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido.
3. Después de 10 minutos midió la absorbancia a 750 nm contra un blanco de reactivos.
4. El blanco de reactivos se realizó adicionando 2.5 mL de HCl 0.2 N en lugar de agregar solución estándar de tirosina.



Cálculos:

A partir de la curva de calibración se obtiene el valor de tirosina liberada en el ensayo enzimático (µmol/mL).

$$U = \frac{(\text{tyr } \mu\text{mol/mL})(8\text{mL reacción})(0.5\text{mL alícuota})(50\text{mL aforo})}{10 \text{ min}}$$

10 min

$$U = \text{mol tyr/min}$$

Para el cálculo de actividad específica (U/mg de proteína) se determinó la concentración de proteína soluble de los preparados enzimáticos por el método de Lowry.

## **Determinación de proteína soluble por el método de Lowry**

### Materiales

- Tubos de ensaye de 13 x 100
- Gradilla
- Pipetas automáticas de 100-1000  $\mu$ L
- Pipetas graduadas de 1-5 mL
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Matraces aforados de 10 mL y 50 mL
- Vortex (LAB- LINE)
- Celdas 1 cm
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner, Modelo 340)

### Reactivos

- NaOH 0.1 N  
Disolver 4 g de NaOH en agua destilada y aforarla a 1000mL
- Solución A  
Disolver 50 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada y aforar a 10 mL
- Solución B  
Disolver 2 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro y 20 mg de  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en NaON 0.1 N y aforar a 100 mL
- Solución C  
Mezclar 1 mL de la solución A y 50 mL de la solución B
- Solución D

Diluir 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma) con 9 mL de agua destilada

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

Preparar solución estándar de 500 µg de albúmina/ mL

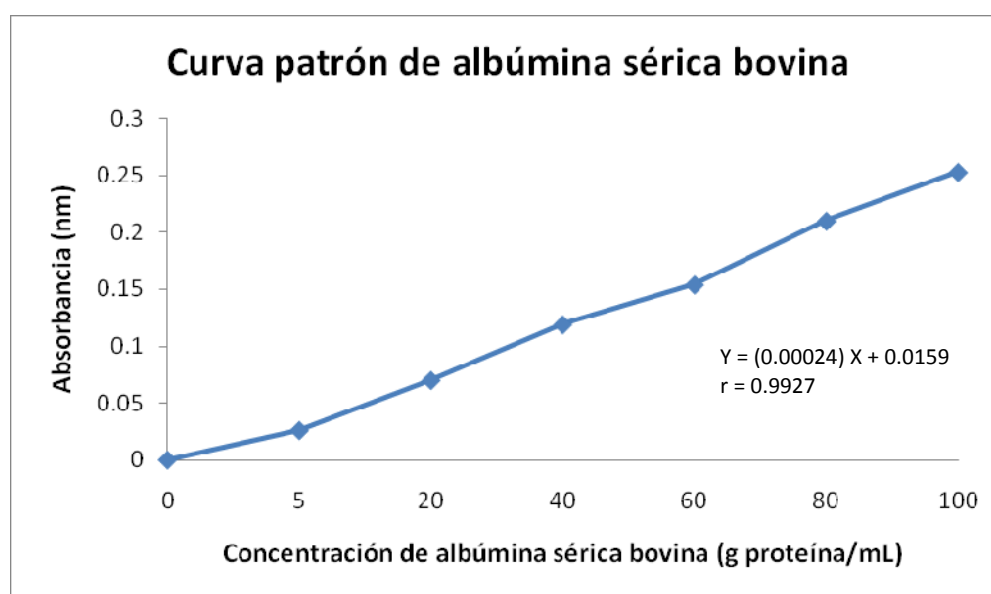
#### Procedimiento

1. Se diluyo (1:50) del extracto enzimático.
2. Se colocó en un tubo de ensaye 1.2 mL de la disolución y se agregaron 0.9 mL de la solución C.
3. Se agitó en vortex y se adicionó 0.6 mL de la solución D se agitó y se agregaron 0.6 mL de solución D y se agitó vigorosamente.
4. Se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos, protegiendo de la luz.
5. Las absorbancias de las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 750 nm.
6. El espectro se ajustó con el blanco de reactivos de la curva patrón.

#### Curva patrón de albúmina

1. Prepararon soluciones con concentraciones de 0, 5, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/ mL, a partir de una solución de albúmina sérica bovina (0.5 mg/mL).
2. En tubos de ensaye se colocaron 1.2 mL de cada solución estándar y se agregaron 0.9 mL de la solución C.
3. Se agitó con un vortex y se le agregaron 0.6 mL de la solución D se agito y se agregaron 0.6 mL de solución D y se agito vigorosamente.

4. Se incubar a temperatura ambiente por 45 minutos, protegiendo de la luz.
5. Leer absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro a 750 nm.



Cálculos:

Interpolando el valor de absorbancia de las muestras se obtiene la concentración ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) de proteína en el extracto. Este valor se multiplica por 50 que corresponde al factor de dilución y los  $\mu\text{g}$  de proteína se convierte a mg para obtener mg/ml de la concentración de proteína y con ello calcular la actividad enzimática específica (U/mg proteína).

### **Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico**

#### Material

- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Matraces aforados de 10 mL
- Gradilla
- Tubos de ensaye
- Canicas
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Baño de agua a ebullición
- Tubos de centrifuga
- Centrifuga (Sorvall, Modelo super T21)
- Celdas
- Espectrofotómetro (Sequoia-Turner, Modelo 340)

#### Reactivos

- Solución de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA)(Sigma chemical CO., USA) 0.02 M
- Solución de ácido tricloroacético (Mallinckrodt) al 7.5%
- Solución estándar de 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano (TEP) 0.01 M

#### Procedimiento

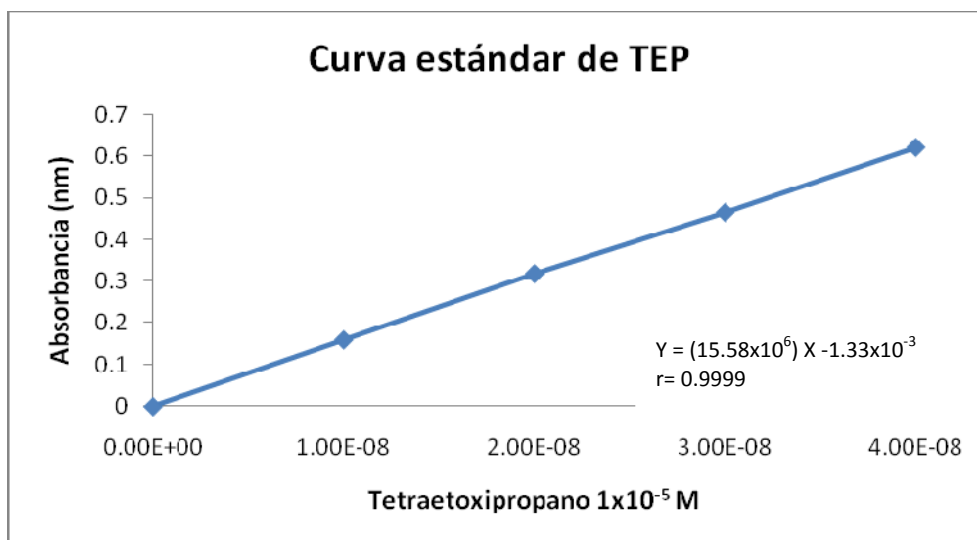
1. Se preparó una solución de la muestra al 2% p/v en ácido tricloroacético al 7.5%

2. Se agitó y se centrifugó a 4400 rpm por 45 minutos.
3. Del sobrenadante se tomaron 5 mL y se mezclaron con 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.02 M
4. Los tubos se colocaron en baño María por 45 minutos tapando los tubos con canicas.
5. Después de este tiempo se enfriaron y se leyeron a 538 nm contra un blanco preparado con 5 mL de agua en lugar de 5 mL de sobrenadante.

*Preparación de la curva estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP)*

1. Se tomó 250  $\mu$ L de la solución estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) 0.01 M y se aforó a 250 mL con agua destilada.
2. De esta solución se tomaron alícuotas de 1 a 20 mL y se aforaron a 25mL con agua destilada.
3. Se tomaron 5mL de las soluciones estándar y se mezclaron con 5 mL de ácido tiobarbitúrico y se siguió con el mismo procedimiento que con la muestra.





Cálculos:

Para conocer la concentración de MDA, el valor de absorbancia obtenido se interpoló en la curva patrón de 1,3,3-tetraetoxipropano (TEP). Los moles obtenidos de TEP se multiplicaron por 72062mg MDA/mol y después se multiplicaron por el aforo que fue 100mL y se divide por la alícuota que se tomó y se dividió por la cantidad de muestra tomada en Kg para expresar el resultado en mg de MDA/Kg de muestra.

### Análisis estadístico

**Tabla ANOVA. Incremento en peso entre las dietas**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuadrado</b>	<b>gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Coficiente-F</b>	<b>P-Valor</b>
Entre grupos	4614.27	1	4614.27	41.70	0.0030
Intragrupos	442.649	4	110.662		
Total(Corr)	5056.92	5			

La tabla ANOVA descompone la varianza de las dietas en dos componentes:

Un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 41.70, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el P-valor de la prueba F es menor a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la ganancia en peso con nivel de confianza del 95.0%. Para determinar las medias que son significativamente diferentes, se realizó una prueba de Rangos Múltiples.

**Contraste Múltiple de Rango para ganancia en peso de las dietas. Método: 95% LSD**

<b>Tratamiento</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
2	3 <sup>a</sup>	523.157	X
1	3	578.62	X

<sup>a</sup> Replica entre tratamientos

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límites</b>
1-2	*55.4633	23.8476

\*Existe diferencia significativa.

1. Testigo, 2 Ensilado.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la diferencia estimada entre cada par de medias. En la parte superior, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5.0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a cero.

**Tabla ANOVA. Conversión alimenticia entre las dietas**

<b>Fuente</b>	<b>Sumas de cuadrado</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Coficiente-F</b>	<b>P-Valor</b>
Entre grupos	0.0240667	1	0.0240667	10.10	0.0336
Intragrupos	0.00953333	4	0.00238333		
Total(Corr)	0.0336	5			

La tabla ANOVA descompone la varianza de la conversión alimenticia dos componentes:

Un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El F-ratio, que en este caso es igual a 10.10, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el P-valor de la prueba F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la conversión alimenticia a con un nivel de confianza del 95.0%. Para determinarlas medias que son significativamente diferentes unas de otras, se realizó un prueba de Rangos Múltiples.

**Tabla. Contraste Múltiple de Rango para Conversión alimenticia**

**Método: 95.0% LSD**

<b>Tratamiento</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
2	3 <sup>a</sup>	1.33667	X
1	3	1.46333	X

<sup>a</sup> Replica entre tratamientos.

<b>Contraste</b>	<b>Diferencias</b>	<b>+/- Límites</b>
1-2	*0.126667	0.110672

\*Existe diferencia significativa.

1 Testigo, 2 Ensilado

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la diferencia estimada entre cada par de medias. En la parte superior, se identifican 2 grupos homogéneos según la alineación del signo X en la columna. Dentro de cada columna, los niveles que tienen signo X forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente utilizado para discernir entre las medias es el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD). Con este método, hay un 5.0% de riesgo de considerar cada par de medias como significativamente diferentes cuando la diferencia real es igual a cero.