



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CINÉTICA DEL
DETERIORO QUÍMICO EN ALIMENTOS PARA MASCOTAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GRISEL ALEJANDRA ESCOBAR ZEPEDA



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Prof. María de los Ángeles Valdivia López
Vocal: Prof. María de los Ángeles Martínez Olmedo
Secretario: Prof. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez
1^{er} Suplente: Prof. Sandra Pérez Munguía
2° Suplente: Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén

El tema de esta tesis fue desarrollado en los laboratorios 322-323 del Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, de la Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

Asesor del tema:

María de los Ángeles Valdivia López

Supervisor técnico:

Bertha Julieta Sandoval Guillén

Sustentante:

Grisel Alejandra Escobar Zepeda

Agradecimientos

A la Maestra María de los Ángeles Valdivia López por la dirección y el apoyo incondicional durante y después de la realización del presente trabajo.

A la Q.F.B. Bertha Julieta Sandoval Guillén por sus sugerencias y observaciones realizadas durante el desarrollo del presente proyecto.

A cada uno de los miembros del jurado por las observaciones y sugerencias realizadas durante la revisión de la presente tesis.

A los compañeros del laboratorio 312 del Conjunto E de la Facultad de Química por las facilidades ofrecidas en los ensayos de electroforesis.

Al Dr. Francisco Ruiz Terán por sus sugerencias y apoyo incondicional.

Dedicatorias

A mi madre: María Guadalupe Zepeda Torres

A mi hermano y a mi primo: Jaziel Alejandro y Luis Enrique

Al QFB Oscar Orozco Gutiérrez

y

A Claudia Guadalupe Aguilera Cabrera

Índice

	Pág
1. Introducción	1
2. Objetivos	2
2.1 Objetivo general	2
2.2 Objetivos particulares	2
3. Generalidades	3
3.1 Elaboración de alimento para mascota	3
3.2 Cambios químicos que ocurren en los componentes del alimento	4
3.2.1 Cambios químicos que ocurren en los macrocomponentes del alimento	5
I. Oxidación de lípidos	5
I.I. Auto-oxidación	5
II. Efecto del procesado y almacenamiento sobre las proteínas	8
3.2.2 Deterioro químico de los microcomponentes	9
3.2.2.1 Vitaminas hidrosolubles	10
I. Tiamina (Vitamina B ₁)	10
II. Riboflavina (Vitamina B ₂)	11
III. Piridoxina (Vitamina (B ₆))	11
3.2.2.2 Vitaminas liposolubles	12
I. Retinol (Vitamina A)	12
II. Colecalciferol (Vitamina D ₃)	13
III. α -tocoferol (Vitamina E)	14
3.3 Cinética de deterioro químico y cálculo de vida útil	14
3.3.1 Rapidez de una reacción	15
3.3.2 Orden de una reacción	16

I. Reacciones de orden cero	16
II. Reacciones de primer orden	16
III. Reacciones de segundo orden	17
3.3.3 Efecto de la temperatura en la rapidez de reacción	17
3.3.4 Predicción de la vida útil	19
4. Metodología	21
Evaluación de la calidad química y nutricional	22
4.1 Estrategia experimental	24
5. Resultados y discusión	25
5.1 Características de la materia prima	25
5.2 Deterioro del material lipídico	27
5.2.1 Análisis del índice de peróxidos	27
5.2.2 Análisis del índice de Kreis	30
5.3 Deterioro de las proteínas	32
5.3.1 Cambio en la solubilidad de las proteínas	32
5.3.2 Evaluación de la Digestibilidad <i>in vitro</i>	34
5.3.3 Estudio electroforético	35
5.4 Deterioro de los micronutrientes	39
5.4.1 Vitaminas hidrosolubles	39
5.4.1.1 Vitaminas hidrosolubles en alimento para cachorro	40
5.4.1.2 Vitaminas hidrosolubles en alimento para perro adulto	44
5.4.2 Vitaminas liposolubles	47
5.4.2.1 Vitaminas liposolubles en alimento para cachorro	47
5.4.2.2 Vitaminas liposolubles en alimento para perro adulto	51
5.5 Evaluación instrumental de color	55
5.6 Cálculo de vida útil	59

6. Conclusiones	66
7. Bibliografía	67
Anexo 1. Materiales y metodología	70
A1.1 Análisis químico proximal	70
A1.1.1 Determinación de proteína cruda por el método de Kjeldahl	70
A1.1.2 Determinación de humedad por secado en estufa	70
A1.1.3 Determinación de grasa cruda por el método de Goldfish	71
A1.1.4 Determinación de cenizas totales	71
A1.2 Determinaciones realizadas en cada monitoreo	71
A1.2.1 Determinación de vitaminas del Complejo B	71
A1.2.2 Determinación de vitaminas liposolubles	72
A1.2.3 Determinación de índice de peróxidos por micrométodo	72
A1.2.4 Determinación del índice de Kreis	73
A1.2.5 Extracción y cuantificación de proteína soluble	74
A1.2.6 Evaluación de la Digestibilidad <i>in vitro</i>	75
A1.2.7 Evaluación instrumental de color	76
A1.2.8 Estudio electroforético sistema Tris-tricina-SDS (TSDS-PAGE)	76
Anexo 2. Resultados globales	80
A2.1 Formulación de alimento para perro adulto. Monitoreo a 45°C	80
A2.2 Formulación de alimento para perro adulto. Monitoreo a 22°C	82
A2.3 Formulación de alimento para perro adulto. Monitoreo a 5°C	83
A2.4 Formulación de alimento para Cachorro. Monitoreo a 45°C	84
A2.5 Formulación de alimento para Cachorro. Monitoreo a 22°C	86
A2.6 Formulación de alimento para Cachorro. Monitoreo a 5°C	87
Anexo 3. Análisis estadístico por prueba t de Student	89
A3.1 Metodología	90

A3.2 Resultados	94
A3.2.1 Vitamina B1 (Tiamina) – Alimento para Cachorro	94
A3.2.2 Vitamina B1 (Tiamina) – Alimento para Adulto	96
A3.2.3 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Cachorro	97
A3.2.4 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Adulto	98
A3.2.5 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Cachorro	99
A3.2.6 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Adulto	100
A3.2.7 Índice de Kreis – Alimento para Cachorro	101
A3.2.8 Índice de Kreis – Alimento para Adulto	102
A3.2.9 Índice de Peróxidos – Alimento para Cachorro	103
A3.2.10 Índice de Peróxidos – Alimento para Adulto	104
A3.2.11 Proteína soluble – Alimento para Cachorro	105
A3.2.12 Proteína soluble – Alimento para Adulto	106
A3.2.13 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Cachorro	107
A3.2.14 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Adulto	108
A3.2.15 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Cachorro	109
A3.2.16 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Adulto	110
A3.2.17 Vitamina E (α -tocoferol) – Alimento para Cachorro	111
A3.2.18 Vitamina E (α -tocoferol) – Alimento para Adulto	112
A3.2.19 Digestibilidad <i>in vitro</i> – Alimento para Cachorro	113
A3.2.20 Digestibilidad <i>in vitro</i> – Alimento para Adulto	114
A3.3 Síntesis de resultados y conclusiones	116

1. Introducción

Los animales de compañía son, en muchas ocasiones, considerados miembros de la familia y se les trata como tales. Ello implica que su alimentación, además de suministrar una cantidad de nutrientes correcta, equilibrada y disponible, debe permitirles optimizar su salud, actividad y longevidad. Además y dado que el sobrepeso y la obesidad, son problemas frecuentes en perros y gatos y que existen enfermedades que incluyen un tratamiento nutricional, la alimentación debe promover una correcta condición corporal y reducir el riesgo al padecimiento de determinadas patologías o acelerar la recuperación de los animales enfermos.

El valor del mercado de alimento para mascotas en México se estima en siete mil millones de pesos, que en términos de volumen equivale a 600 mil toneladas anuales donde el 89% representa el mercado canino, nicho con amplio potencial de crecimiento considerando que 48% de los dueños aún alimenta a sus mascotas con comida para humanos.

Los horarios de trabajo, la integración de la mujer al mundo laboral y el incremento de hogares de una sola persona hacen que la gente disponga de menos tiempo para su mascota, creando una mayor demanda de animales fáciles de mantener y que requieran pocas atenciones, incluyendo la alimentación.

Por lo anterior, garantizar la inocuidad y calidad del alimento durante el proceso y almacenamiento del producto, tiene fundamental importancia tanto para quien lo produce como para el consumidor y conocer los mecanismos mediante los cuales se presentan los principales cambios químicos permite controlar la estabilidad y la estimación de su vida útil.

Cambios químicos en los principales ingredientes pueden repercutir en la pérdida del valor nutritivo y aceptabilidad por parte del animal. De estos cambios se pueden derivar las reacciones que sufren principalmente los lípidos por oxidación y las consecuentes pérdidas de valor nutritivo en proteínas o microcomponentes como las vitaminas.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer el tiempo de vida útil de dos formulaciones distintas de alimento seco para mascota, a través del estudio de la cinética de deterioro químico de sus componentes.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la cinética de deterioro de los lípidos mediante la evolución de los productos primarios y secundarios de la oxidación para hacer posible la extrapolación a cualquier tiempo y temperatura.
- Determinar las cinéticas de deterioro químico de vitaminas liposolubles (A, D y E) así como de las del Complejo B (B₁, B₂ y B₆) para hacer posible la predicción del tiempo en el que su concentración alcanza el mínimo recomendado a cualquier temperatura.
- Estimar la pérdida de digestibilidad y solubilidad proteínica para establecer la cinética de reacción y extrapolarla a cualquier temperatura.
- Detectar mediante estudio electroforético cambios en los pesos moleculares de las proteínas a fin de relacionarlo con cambios en su solubilidad.
- Evaluar cambio en el color para establecer el efecto de la temperatura durante el almacenamiento.
- Identificar cuál de los componentes del alimento es el más susceptible a deterioro por efecto de la temperatura para calcular con base en éste la vida útil de cada producto.

1. Generalidades

3.1 ELABORACIÓN DE ALIMENTO PARA MASCOTA

El alimento para mascota que se fabrica comercialmente puede ser de tres tipos de acuerdo a su textura: húmedo, semi-seco o seco. En líneas generales, el mercado está dominado por los alimentos secos.

La mayor parte de los alimentos secos preparados comercialmente se elaboran utilizando un sistema de lotes que muele y mezcla los ingredientes crudos en cantidades predeterminadas que oscilan de 1,000 a 5,000 kg, dependiendo de su capacidad, luego la matriz resultante se coloca dentro de un preacondicionador que contiene paletas mezcladoras/transportadoras y que homogenizan la mezcla seca mientras se agregan líquidos como grasa, carne molida, etc, junto con agua y vapor para aumentar la humedad. En general la mezcla seca y cualquier líquido agregado son retenidos en el preacondicionador durante cerca de 45 segundos, lo que permite la gelatinización de los almidones.

Una vez que la mezcla ha sido acondicionada, es transferida al extrusor, donde se cocina y se forman las croquetas. Después de la extrusión, son secadas hasta una humedad determinada y luego son transportadas por aire o por cintas transportadoras o vibratorias a los compartimentos donde se rocían o espolvorean con grasas y saborizantes. El producto terminado es enviado a las máquinas envasadoras que las colocan en contenedores adecuados para el transporte y distribución (Hand y Thatcher, 2000). En la Figura 3.1.1 se muestra un esquema del sistema de elaboración de alimento para mascota por extrusión.

El 90% de los fabricantes de alimentos para mascotas utilizan extrusores de tornillo único que operan sobre el principio de fricción, donde la cocción de la masa se lleva a cabo cuando el material se pone en contacto con la pared del barril. El tiempo de cocción o de residencia puede variar de 10 a 270 segundos con temperaturas que oscilan entre los 80 a 200°C.

En general se prefiere corto tiempo y alta temperatura de tratamiento ya que proporciona cocción completa, destrucción de microorganismos y desnaturalización de factores antinutricionales tales como el inhibidor de tripsina y enzimas hidrolíticas (Hand y Thatcher, 2000).

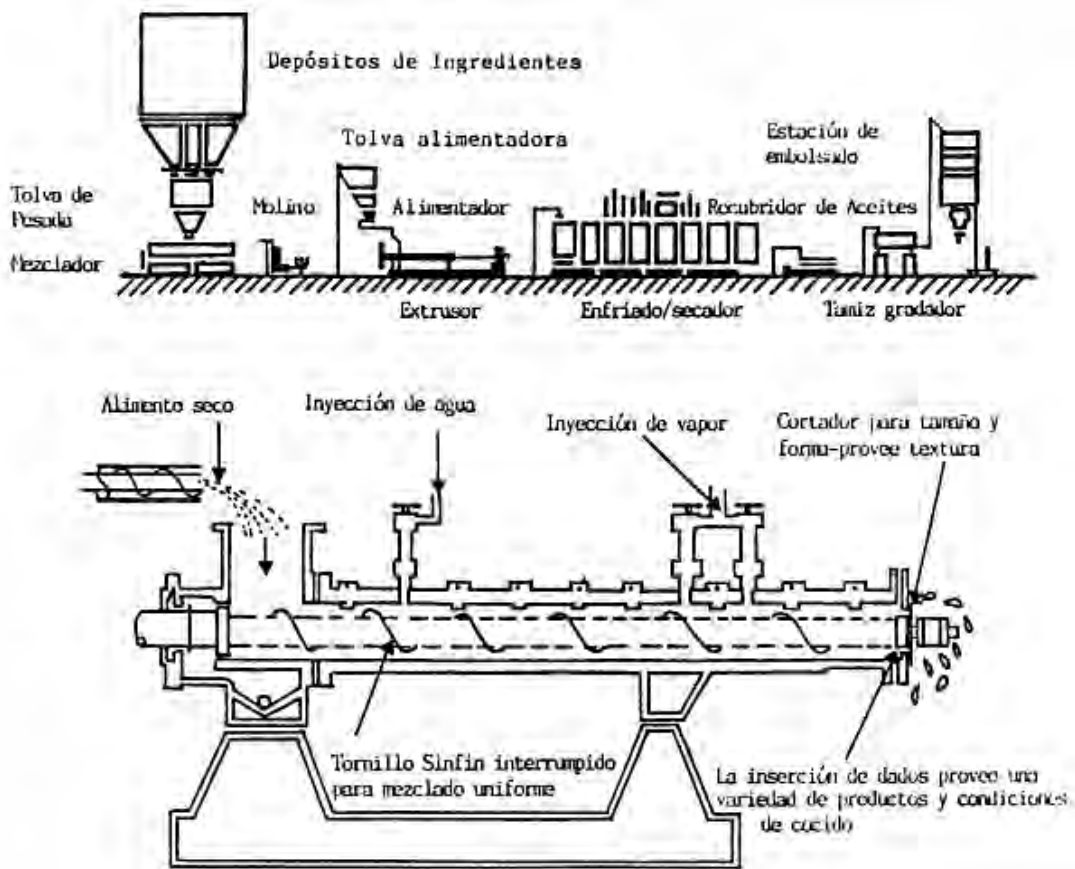


Figura 3.1.1 Diagrama de flujo típico de una planta para fabricación de alimento para mascota utilizando un sistema de cocido por extrusión (Fuente: Horn y Bronikowski, 1979).

3.2 CAMBIOS QUÍMICOS QUE OCURREN EN LOS COMPONENTES DEL ALIMENTO

Además de los cambios ocurridos en la matriz alimentaria durante la elaboración del producto, otros tantos acontecen durante su almacenamiento y distribución debido a la variedad de sus componentes internos y factores ambientales a los que son expuestos. Estos cambios causan el deterioro del producto reduciendo su vida de anaquel (Man y Jones, 1994).

3.2.1 Cambios químicos que ocurren en los macrocomponentes

Los cambios químicos más importantes se asocian a la acción enzimática y reacciones de oxidación, particularmente las de los lípidos que promueven el desarrollo de sabores y olores objetables, alteración en el color y degradación proteínica, así como el oscurecimiento no enzimático que provoca cambios en la apariencia del alimento además de ser el principal responsable de la degradación nutricional por la pérdida de solubilidad de las proteínas, oscurecimiento y desarrollo de sabores amargos (Charalambous, 1993).

I) Oxidación de lípidos

La rancidez de lípidos se divide en hidrolítica o lipólisis y rancidez oxidativa. La primera ocurre a través de lipasas o cuando los ácidos grasos son expuestos a temperaturas muy altas en presencia de agua, como en la fritura de alimentos con alto contenido de humedad. La rancidez oxidativa se divide en foto-oxidación, auto-oxidación y rancidez por vía enzimática por acción de lipoxigenasas. De las formas de rancidez oxidativa mencionadas, la auto-oxidación es la causa principal de deterioro en los alimentos (Badui, 2006).

I.I. Auto-oxidación

Tiene lugar por mecanismos típicos de radicales libres y está mediada por la presencia de oxígeno molecular o triplete¹.

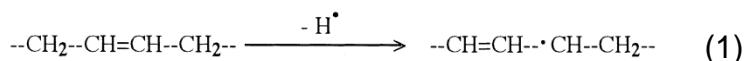
La rapidez de reacción depende de la composición de ácidos grasos observándose mayor rapidez mientras mayor sea la proporción de insaturados, la concentración y actividad de pro y antioxidantes presentes en la vecindad de los triacilglicerolos, la presión parcial de oxígeno, la presencia de metales de transición considerados como pro-oxidantes y las condiciones de almacenamiento tales como temperatura, exposición a la luz y contenido de humedad (Fennema, 1996).

La rancidez oxidativa es un proceso complejo que para su estudio se ha simplificado al dividirlo en tres etapas o fases:

¹ El $^3\text{O}_2$ u oxígeno triplete o en estado basal, presenta los electrones en orbitales diferentes con spines paralelos, a diferencia del estado excitado u oxígeno singulete $^1\text{O}_2$ donde ambos electrones π están apareados con spin opuesto en un solo orbital (Coulter, 1984).

1ª Etapa: Iniciación

La cadena de reacciones es iniciada por la formación de un radical en alguno de los carbonos que forma parte del ácido graso por sustracción de un radical hidrogeno de la cadena lipídica:



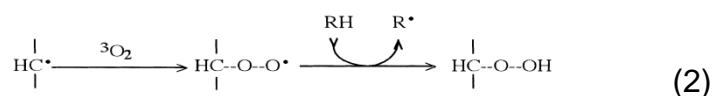
Distintos procesos de iniciación (por ejemplo fotólisis, radiación gamma, oxígeno singulete), producen diferentes radicales iniciadores. El evento de iniciación tiene un efecto en la química subsecuente, pues en la medida en que esta ocurre es en la que se extiende la cadena de reacciones.

Durante esta etapa de iniciación los productos que se obtienen son radicales libres como grupos R[•], radicales peróxidos ROO[•] e hidroperóxidos ROOH.

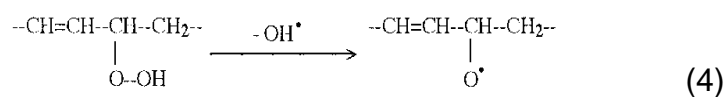
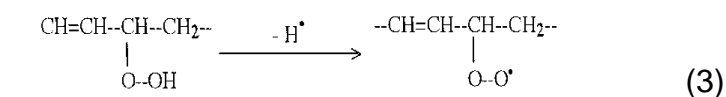
En la etapa de iniciación se puede presentar un periodo de inducción con baja concentración de los primeros productos de oxidación cuando en el alimento se ha adicionado algún tipo de antioxidante.

2ª Etapa: Propagación

Los radicales generados en el proceso de iniciación bajo sistemas de arreglos estructurales de dienos interrumpidos por metilenos a dienos conjugados reactivos en presencia de oxígeno triplete atmosférico, producen radicales peroxi en la cadena lipídica que a su vez pueden sustraer más hidrógenos de las cadenas adyacentes.



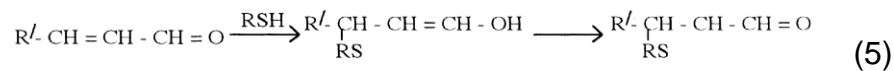
La peroxidación ocurre predominantemente en el carbono α con respecto a una insaturación y se obtienen radicales hidroxilo HO[•] y alcoxi RO[•] más reactivos que los radicales peroxi ROO[•]:



Los principales productos de esta etapa de oxidación son dienos conjugados, aldehídos alifáticos (como pentanal o hexanal) y oxoésteres o semialdehídos en la primera

generación u oxidación y aldehídos insaturados en posición 2 y 4, así como cetoácidos, epóxidos y moléculas dicarbonílicas como malonaldehído en la segunda generación u oxidación.

A este nivel, los productos aldéhicos pueden reaccionar con el grupo tiol del aminoácido cisteína de las proteínas en el orden de nmol/mg, afectando su solubilidad y por ende su digestibilidad:

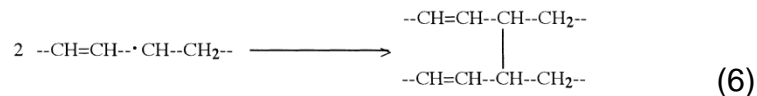


La concentración de los productos de la cadena de reacción son indicadores útiles del deterioro oxidativo ya que es posible detectarlos por métodos analíticos.

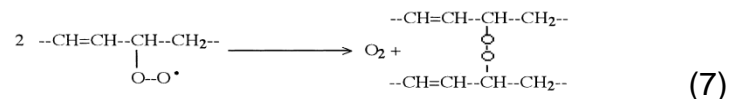
3ª Etapa: Terminación

La cadena termina por reacciones entre radicales, produciendo así dímeros y polímeros de cada vez mayor peso molecular.

A presiones de oxígeno bajas, la formación de enlaces carbono-carbono entre dos grupos acil tiene lugar en varias etapas por medio de una reacción de tipo Diles-Alder entre un doble enlace y un dieno conjugado para producir un ciclohexeno tetrasustituído. Otros productos por la combinación de radicales libres son los dímeros no cíclicos. Por adición de un radical libre a un doble enlace se obtienen dienos acíclicos, monoenos acíclicos y monocíclicos saturados:



En presencia de un exceso de oxígeno, la combinación entre radicales libres alquilo, alcoxi y peróxido dan lugar a una gran variedad de ácidos diméricos y poliméricos y acilgliceroles con enlaces carbono-oxígeno-carbono o carbono-oxígeno-oxígeno-carbono:



La adición de un radical libre a un doble enlace puede producirse en la misma molécula dando lugar a monómeros cíclicos, misma que se produce más fácilmente en ácidos poliinsaturados de cadena larga tales como el ácido araquidónico (Wheatley, 2000).

II) Efecto del procesado y almacenamiento sobre las proteínas

El cambio en la solubilidad de las proteínas se relaciona estrechamente con la pérdida de la calidad nutricional, es decir, conforme se pierde la solubilidad, se considera que la proteína se encuentra menos disponible para su aprovechamiento por el organismo debido a que la aglomeración dificulta el encuentro de las enzimas proteolíticas con los sitios específicos de corte (Ledezma, 2008).

Los tratamientos térmicos en alimentos con alto contenido de este nutrimento, pueden tener como consecuencia desulfuraciones, desaminaciones, isomerizaciones u otras modificaciones químicas de los aminoácidos que a veces van seguidas de la formación de sustancias tóxicas.

Las reacciones de desaminación se producen durante el calentamiento a las proteínas por arriba de 100°C. El amoníaco liberado proviene fundamentalmente de los grupos amida de la glutamina y la asparagina. La desaminación no afecta el valor nutritivo de las proteínas pero puede ir seguida de la formación de nuevos enlaces covalentes entre restos aminoácidos.

Tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 200°C isomerizan los restos aminoácidos a las formas D o L al azar, y como la mayoría de los D aminoácidos carecen de valor nutritivo, la racemización total de un aminoácido esencial reduce así el valor nutritivo al 50%, afectando además a la digestibilidad por los enlaces peptídicos en los que participan restos D.

Los tratamientos térmicos en presencia de oxígeno causan la destrucción parcial de los restos de triptófano.

Muchas de las reacciones químicas que afectan a los restos de aminoácidos suelen ir acompañadas de reacciones proteína-proteína favorecidas por los tratamientos térmicos intensos que conducen a la formación de enlaces cruzados covalentes isopeptídicos entre los restos de lisina y glutamina o de lisina y asparagina que llegan a afectar al 15% de los restos de lisina en una proteína. Desde el punto de vista nutricional, la formación de estos enlaces lleva a un descenso en la digestibilidad del nitrógeno, el coeficiente de eficacia proteica y el valor biológico de la proteína afectada. Aún más, puede reducir la disponibilidad nutritiva de otros aminoácidos además de la

lisina al impedir a las proteasas alcanzar los puntos de hidrólisis por impedimento estérico de los enlaces cruzados frenando la digestión in vivo de toda la proteína.

En la formación de enlaces covalentes durante la polimerización entre los lípidos en proceso de oxidación y las proteínas, parecen participar dos tipos de mecanismos: reacción radical libre, mediante el cual los radicales libres de los lípidos se unen a las proteínas para dar un complejo radical libre lípido-proteína o la formación de un radical libre proteico que se puede formar sobre átomos de carbono α y sobre átomos de azufre de los restos de cisteína, lo que puede ir seguido de la polimerización directa de las proteínas (Damodaran y Paraf, 1997).

El otro mecanismo ocurre mediante reacciones carbonilamina, y en él los derivados aldéhicos como el malonaldehído proveniente de la oxidación de ácidos grasos no saturados se unen a los grupos amino de las proteínas a través de reacciones tipo base de Schiff estableciendo enlaces covalentes del tipo 1-amino-3-iminopropeno que afectan las propiedades funcionales de las proteínas como su solubilidad o capacidad de retención de agua y dificultan en gran medida la hidrólisis enzimática.

Las reacciones lípido-proteína pueden tener efectos nutricionales adversos, aunque desde un punto de vista práctico, es probable que los alimentos proteicos que sufren oxidación lipídica se tornen sensorialmente inaceptables antes de que el valor nutritivo de la proteína se afecte (Fennema, 1996).

3.2.2 Deterioro químico de los microcomponentes

Las vitaminas son componentes de la dieta necesarios para el crecimiento y la conservación de la vida, aunque no son utilizados por el organismo como fuente de energía ni se incorporan como parte de la estructura tisular (Case, 2001). En general, las vitaminas se agrupan en hidrosolubles y liposolubles por su capacidad para solubilizarse en medios de naturaleza distinta.

Las vitaminas hidrosolubles de importancia para perros son las pertenecientes al Complejo B, éstas actúan como coenzimas involucradas en el metabolismo energético y en la síntesis tisular. Son pequeñas moléculas orgánicas sin cuya existencia la enzima jamás podría llevar a cabo la reacción específica. Las vitaminas tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, ácido pantoténico y biotina participan en la utilización de

la energía de los alimentos. El ácido fólico, la cobalamina y la colina son importantes para la conservación y el crecimiento celular y/o en la síntesis de células sanguíneas (Case, 2001).

El método de fabricación por extrusión produce pérdida de nutrientes debido sobre todo a las altas temperaturas y a las fuerzas de deslizamiento. Puede ocurrir una pérdida de Vitaminas A, E y tiamina del 21, 26 y 12% respectivamente. El agregado de niveles más altos de estas vitaminas compensa las pérdidas ocurridas durante el proceso de extrusión (Hand y Thatcher, 2000).

3.2.2.1 Vitaminas hidrosolubles

Las vitaminas del Complejo B que fueron estudiadas en esta investigación son la Tiamina (Vitamina B₁), Riboflavina (B₂) y Piridoxina (B₆).

I. Tiamina (Vitamina B₁)

Tiene importancia en el metabolismo de los α -cetoácidos y de los carbohidratos, por lo que las necesidades de esta vitamina en el animal dependen de la proporción de los azúcares en la dieta. La deficiencia de tiamina puede alterar significativamente el funcionamiento del sistema nervioso central (Case, 2001).

Se caracteriza por mostrar fuertes bandas de absorción en la región ultravioleta (UV) cuyo máximo ocurre cuando se encuentra suspendida en medio ácido a 247 nm de longitud de onda, su análisis es eficiente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Aunque la B₁ existe en una gran cantidad de alimentos, es una de las vitaminas más lábiles, pues su estabilidad depende de la temperatura, el pH, la fuerza iónica, el tipo de buffer y otros agentes reactivos. La estabilidad de la tiamina está tan influida por la naturaleza y estado en que se encuentra que es difícil extrapolar las pérdidas observadas en un sistema a las que pueden ocurrir en otro (Fennema, 1996).

II. Riboflavina (Vitamina B₂)

Esta vitamina debe su nombre a su color amarillo (flavina) y a que contiene el azúcar D-ribosa en su estructura. Es relativamente estable ante el calor e insensible al oxígeno atmosférico y estable en soluciones ácidas pero inestable en álcali. Se descompone rápidamente con la exposición a la luz, su degradación produce una molécula con alto poder oxidante denominado lumiflavina capaz de catalizar la destrucción de otras vitaminas, en especial el ácido ascórbico. La vitamina B₂ es estable a casi todas las condiciones de procesado o cocinado (Badui, 2006).

La riboflavina tiene importancia al actuar como componente de dos coenzimas (FMN o flavina mononucleótido y FAD o flavina adenina dinucleótido), que son necesarias en los sistemas enzimáticos oxidativos que liberan la energía de carbohidratos, grasas y proteínas (Case, 2001).

Esta vitamina se determina habitualmente por fluorometría, midiendo la típica fluorescencia verde-amarillenta tras una purificación por HPLC.

III. Piridoxina (Vitamina B₆)

Esta vitamina engloba tres compuestos: piridoxina, piridoxamina y piridoxal; esta última es la forma biológicamente activa y la coenzima de la que forma parte (piridoxal 5'fosfato), interviene en muchas de las reacciones del metabolismo de los aminoácidos (por ejemplo transaminación, recemización y descarboxilación) y en menor medida en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos. Esta misma molécula es necesaria en la síntesis de hemoglobina y la síntesis de niacina a partir de triptófano. Las necesidades de piridoxina de un animal dependen de la proporción de proteínas en la dieta (Case, 2001).

Las tres formas de la Vitamina B₆ son termoestables, pero se descomponen por la acción de álcalis. El piridoxal es la forma más estable y es la que se utiliza en la fortificación de los alimentos. Las tres formas por irradiación con luz UV y en presencia de oxígeno se transforman en sustancias biológicamente inactivas, como el ácido 4-piridóxico. La reacción del piridoxal con los grupos sulfhidrilos de las proteínas característicos del aminoácido cisteína puede repercutir de modo importante en la estabilidad de esta vitamina en los alimentos tratados térmicamente (Fennema, 1996).

Todas las formas de la Vitamina B₆ pueden analizarse simultáneamente por HPLC.

Dada la abundancia actual de alimentos bien formulados y equilibrados, las deficiencias de vitaminas del Complejo B son extremadamente raras en animales de compañía (Case, 2001).

3.2.2.2 Vitaminas liposolubles

El otro gran grupo de vitaminas es el de las liposolubles, en el que se incluyen la A, D, E y K. En la parte experimental de este trabajo, se han evaluado las concentraciones de las tres primeras.

I. Retinol (Vitamina A)

Todos los animales requieren fisiológicamente de Vitamina A activa que puede presentarse como alcohol libre o retinol, como aldehído o retinal y como ácido retinoico, sin embargo, la mayoría de los mamíferos entre ellos el perro, aunque no el gato, pueden convertir precursores tales como el β -caroteno en Vitamina A activa. Las formas más habituales de esta vitamina preformada en los alimentos son los derivados de retinol, como palmitato de retinil y acetato de retinil.

Los requerimientos nutricionales de la Vitamina A y su contenido en los alimentos comerciales se expresan en unidades internacionales (UI) o equivalentes de retinol, donde una UI de Vitamina A equivale a 0.3 microgramos (μg) de retinol ó 0.6 μg de β -caroteno (Hand, Thatcher, 2000).

Los perfiles nutricionales de la Asociación Americana de Oficiales de Control de Alimentos (AAFCO) recomiendan que los alimentos caninos cuya densidad energética sea de 3.5 kcal/g de materia seca, deben incluir un mínimo de 5,000 UI/kg de masa seca de alimento tanto para estados de crecimiento y reproducción como de mantenimiento.

En animales jóvenes la deficiencia de Vitamina A provoca trastornos de crecimiento óseo y alteraciones neurológicas, en perros adultos afecta la reproducción, visión y funcionamiento epitelial.

La intoxicación por Vitamina A es rara en el reino animal debido a que su precursor, el β -caroteno, no es tóxico y la mucosa intestinal regula su hidrólisis y la posterior absorción por el organismo (Case, 2001).

Al igual que la oxidación lipídica, la velocidad de la desactivación de la Vitamina A depende de enzimas, actividad de agua, atmósfera de almacenamiento y de la temperatura (Fennema, 1996).

II. Colecalciferol (Vitamina D₃)

Muchos animales poseen la capacidad de sintetizar Vitamina D a partir de 7-dehidrocolesterol cuando la piel recibe radiación UV. A continuación la forma inactiva de la vitamina se almacena en el hígado donde ocurre la primera conversión bioquímica que la transforma a su forma activa, la segunda conversión ocurre en riñón.

Los requerimientos dietéticos de esta vitamina sensible al oxígeno, dependen de la cantidad de calcio y fósforo en la dieta y de la edad del animal. Dada la capacidad de la piel para producir la vitamina, los animales adultos cuya dieta contiene suficiente aporte de calcio y fósforo presentan unos requerimientos de colecalciferol muy bajos. Durante el crecimiento, la Vitamina D es muy importante para el desarrollo normal y la mineralización del hueso. En cualquier caso, a pesar de esta necesidad adicional, los animales de compañía parecen requerir escasa cantidad en la dieta siempre que contengan suficiente calcio y fósforo.

La deficiencia de esta vitamina liposoluble provoca raquitismo en los animales en crecimiento que se caracteriza por malformaciones óseas secundarias por depósito insuficiente de calcio y fósforo arqueando las extremidades y engrosando las articulaciones; y osteomalacia en animales adultos que se debe a una descalcificación ósea por lo que aumenta la tendencia de los huesos largos a fracturarse.

En el otro extremo, el exceso de Vitamina D puede ser tóxico para perros y gatos provocando calcificación excesiva de los tejidos blandos del organismo. El consumo crónico de niveles elevados de Vitamina D puede eventualmente conducir a alteraciones esqueléticas y deformidades de dientes y mandíbulas en animales de compañía en crecimiento. La suplementación excesiva es la causa más frecuente de intoxicación por Vitamina D en perros y gatos.

El límite máximo establecido por la AAFCO para la Vitamina D es de 5,000 UI/kg de alimento seco, donde 40 UI de Vitamina D₃, equivalen a 1 µg de colecalciferol (Case, 2001).

III. α-tocoferol (Vitamina E)

La Vitamina E actúa como antioxidante biológico que neutraliza radicales libres previniendo así la peroxidación del material lipídico. Los requerimientos de esta vitamina en un animal dependen de la cantidad de ácidos grasos polinsaturados (AGPI) y selenio en la dieta, puesto que el α-tocoferol y el selenio actúan sinérgicamente. La Vitamina E se oxida con carácter preferente antes que los ácidos grasos insaturados, protegiéndolos así del enranciamiento.

La deficiencia de α-tocoferol se ha asociado en perros con la degeneración del músculo esquelético, alteraciones de la reproducción, degeneración retiniana y trastornos de la respuesta inmunológica así como ciertos trastornos de la piel.

La AAFCO recomienda un mínimo de 50 UI/kg de Vitamina E por cada kilogramo de masa seca de alimento para cualquier etapa de desarrollo, donde 1 UI equivale a 1 mg de acetato de α-tocoferol, y 1.49 UI son equivalentes a 1 mg de RRR-α-tocoferol que es el más abundante en los alimentos y el más activo biológicamente (Case, 2001).

3.3 CINÉTICA DE DETERIORO QUÍMICO Y CÁLCULO DE VIDA ÚTIL

Existen dos procedimientos generales para predecir el tiempo de vida útil de un producto: el método más común es elegir una situación desfavorable aislada a la que se somete el alimento, realizar dos o tres ensayos durante un periodo determinado y generalmente, por métodos sensoriales, extrapolar los resultados (lo que frecuentemente es una especulación lógica) a las condiciones de almacenamiento normal. Otro proceder es suponer que determinados principios de cinética química son aplicables en lo que se refiere a la dependencia de la temperatura, tales como la ecuación de Arrhenius, y recurrir a este diseño que aunque más complejo y costoso, probablemente da mejores resultados. La clave de la cinética química es que ciertos principios se cumplen con carácter general (Fennema, 1996).

Los productos usualmente se degradan a mayor rapidez cuando son expuestos a condiciones elevadas de estrés tales como temperatura, humedad, radiación, etc. El efecto de la temperatura en la rapidez de degradación se explica mediante la ecuación de Arrhenius y es probablemente la más usada en las pruebas de estabilidad de alimentos (Socarras y Magari, 2008).

3.3.1. Rapidez de una reacción

La rapidez de una reacción se expresa como el cambio de concentración de cualquiera de las especies en el tiempo para una reacción tal que:



Durante el transcurso de la reacción, la concentración de A decrece mientras que las concentraciones de B y C aumentan. La rapidez de esta reacción está dada por la pendiente de la curva típica de concentración de A en función del tiempo:

$$\text{Rapidez} = -d[A]/dt = d[B]/dt = d[C]/dt \quad (9)$$

donde las expresiones entre corchetes se refieren a las concentraciones de los reactivos y de los productos después de que se ha iniciado la reacción (Chang, 2008).

La rapidez que es inicialmente máxima, decrece a medida que transcurre la reacción. Se ha encontrado que la rapidez de una reacción depende de la concentración de los reactivos, de modo que mientras que la concentración de A en la reacción decrece, también lo hace la rapidez de la reacción. De esta forma:

$$\text{Rapidez} = \alpha[A]^n \quad (10)$$

donde n es una constante conocida como orden de reacción. La relación entre la rapidez y la concentración se denomina ecuación de rapidez y toma la forma

$$-d[A]/dt = k[A]^n \quad (11)$$

donde k es una constante de proporcionalidad para cada reacción a cada temperatura y se denomina constante de rapidez (Avery, 1982).

El orden de reacción especifica la dependencia empírica de la rapidez de las concentraciones. Puede ser cero, un número entero o un número fraccionario. Se puede usar la ecuación de rapidez para determinar las concentraciones de los reactivos en cualquier momento durante el transcurso de la reacción (Chang, 2008).

3.3.2. Orden de una reacción

I. Reacciones de orden cero

La ecuación de rapidez de una reacción de orden cero del tipo:



Esta dada por:

$$\text{Rapidez} = -d[A]/dt = k[A]^0 = k \quad (13)$$

La k (en unidades de concentración sobre tiempo) es la constante de rapidez de orden cero. Como puede verse, la rapidez de la reacción es independiente de la concentración del reactivo.

Al reorganizar la ecuación anterior e integrarla entre $t=0$ y $t=t$ y entre las concentraciones $[A]_0$ y $[A]$ correspondientes obtenemos que:

$$[A] = [A]_0 - kt \quad (14)$$

Donde se observa la dependencia de A con respecto al tiempo. La ecuación 14 demuestra que un gráfico de la concentración del reactivo A contra el tiempo arroja una línea recta de pendiente negativa $-k$ y que tiene como ordenada al origen la concentración inicial del reactivo.

II. Reacciones de primer orden

Una reacción de primer orden es aquella en la que la rapidez de la reacción depende sólo de la concentración del reactivo:

$$\text{Rapidez} = -d[A]/dt = k[A]^1 \quad (15)$$

Donde k (en unidades de tiempo^{-1}) es la constante de rapidez de primer orden. Al reorganizar la ecuación e integrarla entre $t=0$ y $t=t$ y entre las concentraciones $[A]_0$ y $[A]$ correspondientes obtenemos que:

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \quad (16)$$

Un gráfico de $\ln([A]/[A]_0)$ contra el tiempo produce una línea recta cuya pendiente negativa está dada por $-k$, la ecuación 16 muestra que en las reacciones de primer orden, la disminución de la concentración del reactivo con el tiempo, es exponencial.

III. Reacciones de segundo orden

En una reacción con un solo reactivo, las reacciones de segundo orden se caracterizan porque la rapidez es proporcional a la concentración de A elevada a la segunda potencia:

$$\text{Rapidez} = -d[A]/dt = k[A]^2 \quad (17)$$

y k (en unidades de concentración⁻¹tiempo⁻¹) es la constante de rapidez de segundo orden. Si separamos las variables e integramos, obtenemos:

$$1/[A]=kt + (1/[A]_0) \quad (18)$$

Al graficar el inverso de la concentración del reactivo A con respecto al tiempo, se observa una gráfica de pendiente k y con ordenada al origen del inverso de la concentración inicial (Chang, 2008).

La mayor parte de los datos de cinética de deterioro para el cambio de una característica de calidad en un alimento, basados en alguna reacción química o crecimiento bacteriano, siguen un modelo de orden cero (n=0) o primer orden (n=1). Si los datos son de orden cero, se obtiene un gráfica lineal usando coordenadas lineales, mientras que si son de primer orden se necesitan coordenadas semilogarítmicas (log A ó log B) para obtener una representación lineal. En el caso de que los datos sean de segundo orden la representación gráfica de A⁻¹ ó B⁻¹ frente al tiempo, produce una relación lineal (Fennema, 1996).

3.3.3. Efecto de la temperatura en la rapidez de reacción

En 1889, Arrhenius descubrió que la dependencia de muchas reacciones como función de la temperatura se podía describir mediante la siguiente ecuación:

$$k=A e^{(-E_a/RT)} \quad (19)$$

Donde k = constante de rapidez

A = factor preexponencial de Arrhenius con las mismas unidades que la constante de velocidad

e = 2.718 (base de los logaritmos naturales)

R = 8.314X10⁻³ kJmol⁻¹K⁻¹ (constante universal de los gases)

T = temperatura absoluta en Kelvin

E_a = energía de activación en kJmol⁻¹

La idea de energía de activación se basa en el modelo de que la reacción química es el resultado de un encuentro entre partículas y que tal encuentro será efectivo si se produce con una energía adecuada, el factor preexponencial tiene las mismas dimensiones que la constante de rapidez, está relacionado con las colisiones moleculares y depende de la temperatura.

En realidad, las moléculas no siempre se aproximan entre sí en la forma adecuada para que suceda una reacción incluso a pesar de que dispongan de mucha energía. Para corregir esas discrepancias, la teoría de colisiones considera que $A=Pz$, donde P se denomina factor de probabilidad o factor estérico y toma en cuenta que, en una reacción compleja, las moléculas deben tener la orientación adecuada para que suceda una reacción, y z es el número de colisiones entre los reactivos adecuados. Esta modificación es de gran ayuda, pero la evaluación de P resulta difícil (Chang, 2008).

En primera aproximación, la energía de activación corresponderá al suplemento de energía que necesitan adquirir las moléculas reaccionantes para que el encuentro conduzca a la formación de productos; el aumento de temperatura aumentará el número de moléculas activadas y en consecuencia la probabilidad de que el choque sea efectivo, lo que se manifestará en un aumento de la rapidez de reacción y el incremento de la constante de rapidez.

La integración de la ecuación (19) permite establecer que:

$$\ln(k) = \ln(A) - E_a/RT \quad (20)$$

La determinación experimental de E_a y el factor A puede hacerse a partir de la representación gráfica de $\ln(k)$ contra $1/T$, puesto que si se cumple la Ecuación de Arrhenius, aquello será una línea recta de pendiente $-(E_a/R)$ y ordenada al origen $\ln(A)$. Cuando esta representación no es lineal, la causa puede estar en que E_a y A no sean independientes de la temperatura o que la reacción transcurra por un mecanismo complejo o en un cambio de mecanismo dentro del margen de temperatura estudiado (Pedrero, 1992).

Las reacciones con energía de activación alta son muy dependientes de la temperatura. Para una reacción con E_a alta, la reacción se lleva a cabo lentamente a la temperatura dada y a la inversa para una E_a pequeña (Badui, 2006).

La característica puede medirse como un cambio químico, físico, microbiológico o sensorial, y los parámetros k y n se obtienen del ajuste de las ecuaciones por regresión lineal o no lineal, de manera que es posible obtener los valores de las constantes cinéticas para cada característica (Salinas et al; 2007).

3.3.4. Predicción de la vida útil

La predicción de vida útil se realiza a una temperatura específica o bien, en condiciones variables de temperatura. El valor límite de cada característica puede establecerse *a priori* como un valor límite ya sea máximo o mínimo permitido de acuerdo a los estándares publicados.

Si el fin de la vida útil se establece con base en el nivel de un atributo en particular, se tiene que:

$$C_i = C_o - kt_u \quad (21)$$

donde C_o es la concentración inicial del nutriente evaluado; C_i es la concentración alcanzada al tiempo t_u ; t_u es el tiempo final de la vida útil del producto k corresponde a la constante aparente de reacción determinada por regresión lineal o no lineal según haya sido establecido el orden de la reacción.

Para la cinética de orden cero la vida útil puede obtenerse como sigue:

$$t_u = (C_o - C_i)/k \quad (22)$$

En reacciones de primer orden, el final de la vida útil se expresa mediante la ecuación:

$$t_u = \ln(C_i/C_o)/k \quad (23)$$

se puede obtener el valor de k a cualquier temperatura interpolando en el gráfico de Arrhenius.

Para calcular el tiempo $t_{1/2}$ en el que la especie de interés ha desaparecido en un 50%, es decir a la mitad de su concentración inicial se calcula $\ln(0.5)/k$; y para el tiempo en el que la pérdida es del 90% se estima $\ln(0.1)/k$. Así sucesivamente es posible estimar cualquier tiempo una vez que se establece la fracción de pérdida de modo tal que $t_{1/f} = \ln(f)/k$, donde f es la fracción de pérdida de reactivo con respecto a la concentración inicial.

Así mismo, puede utilizarse el coeficiente de temperatura Q_{10} que considera la rapidez de reacción con un cambio de 10°C en la temperatura,

$$Q_{10} = k_1 / k_2 = t_{u,T} / t_{u,T+10} \quad (24)$$

donde T es la temperatura de referencia; $T+10^{\circ}\text{C}$ es la temperatura de referencia T mas 10°C ; k_1 es la constante de rapidez de reacción a la temperatura $(T+10^{\circ}\text{C})$ y k_2 es la constante de rapidez a la temperatura T . En la última parte de la igualdad $t_{u,T}$ es el tiempo de vida útil calculado a la temperatura T y $t_{u,T+10}$ es el tiempo de vida útil calculado a la temperatura $T+10^{\circ}\text{C}$.

Conociendo la vida útil de un alimento a una temperatura y su valor Q_{10} es posible calcular la vida útil a cualquier otra temperatura con intervalo de 10°C .

Aunque diversos estudios se han realizado en alimentos en relación con la modelación del deterioro aplicando estos criterios, es necesario considerar que los modelos de deterioro de la calidad desarrollados para un caso en particular, tienen un uso limitado en el alimento para el que fueron generados. Esto debido a que un cambio en la composición del sistema tiene efecto en las constantes cinéticas de las reacciones involucradas en las pérdidas de calidad, efecto que no puede predecirse. Por lo tanto, la extrapolación de resultados a matrices similares no es recomendable, a menos que se lleve a cabo un estudio cinético profundo del efecto de los cambios en la composición sobre las reacciones relacionadas con la calidad (Salinas et al; 2007).

4. Metodología

Se recibieron 50 bolsas (de cada una de las formulaciones de alimento para mascota) de polipropileno de doble capa coextruída (presentando polipropileno de alta densidad en el exterior y de baja densidad en el interior con un recubrimiento en la luz de la bolsa color blanco de policloruro de vinilideno (PVDC) o polialcohol vinílico (EVOH)) de tres soldaduras donde la soldadura puede ser también polipropileno.

El polipropileno es totalmente permeable a gases como N_2 , CO_2 y O_2 , por lo que las propiedades de impermeabilidad están dadas por el revestimiento de PVDC o EVOH que proporciona barrera alta a estos mismos gases (Bureau y Multon, 1995).

Cada bolsa contenía 2 kg de alimento para mascota formulación de adulto o cachorro según el caso. Las bolsas fueron entregadas en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo el mismo día de la elaboración del producto, es decir que no hubo almacenamiento previo al que se reporta en esta sección. Todas las bolsas de cada formulación correspondieron al mismo lote respectivo que reportaban en el empaque fecha de caducidad febrero de 2010, es decir, 12 meses, así como la leyenda “Consérvese en lugar fresco y seco” como condiciones de almacenamiento.

Cabe mencionar que se observó una marcada diferencia en los espacios de cabeza de las bolsas selladas al momento de la recepción.

En ambos casos, las 50 bolsas fueron divididas en tres lotes de 16 bolsas cada uno y cada lote fue almacenado a las diferentes temperaturas de trabajo:

- Refrigeración $5^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$;
- Incubación a $45^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ y
- Almacenamiento en temperatura controlada a $22^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ al abrigo de la luz.

En cada monitoreo se abrió una nueva bolsa sellada.

Una muestra de cada formulación fue envasada al vacío y almacenada como respaldo de tiempo cero en congelación a $-18^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ para el caso de que fuera necesario repetir alguna determinación.

A ambas formulaciones se les realizó análisis químico proximal (AQP) en la recepción.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD QUÍMICA Y NUTRICIONAL

Al tiempo cero se realizaron las determinaciones de concentración inicial de tres vitaminas del Complejo B (riboflavina, tiamina y piridoxina), así como las concentraciones iniciales de las vitaminas liposolubles retinol, α -tocoferol y colecalciferol; además se evaluó la calidad del material lipídico mediante la determinación del Índice de peróxidos e Índice de Kreis, y se determinó el porcentaje de proteína soluble así como el de digestibilidad *in vitro*.

También en este tiempo fue llevado a cabo un estudio electroforético para conocer el perfil de los pesos moleculares de las proteínas solubilizadas y se hizo la evaluación instrumental de color.

En los siguientes monitoreos se evaluó el cambio en la concentración de vitaminas del Complejo B y liposolubles, y se determinó Índice de peróxidos e Índice de Kreis, así como el porcentaje de proteína soluble y de digestibilidad *in vitro*.

Las muestras pertenecientes al lote almacenado a $45\pm 1^\circ\text{C}$ fueron monitoreadas cada semana, las del lote a $22\pm 1^\circ\text{C}$ se monitorearon cada dos semanas y finalmente para aquellas muestras que se mantuvieron en refrigeración a $5\pm 1^\circ\text{C}$ el monitoreo se realizó cada tres semanas. A continuación en la Tabla 4.1 se desglosa el plan de muestreo para las 16 semanas de almacenamiento donde las muestras son en todos los casos alimento para cachorro y alimento para adulto.

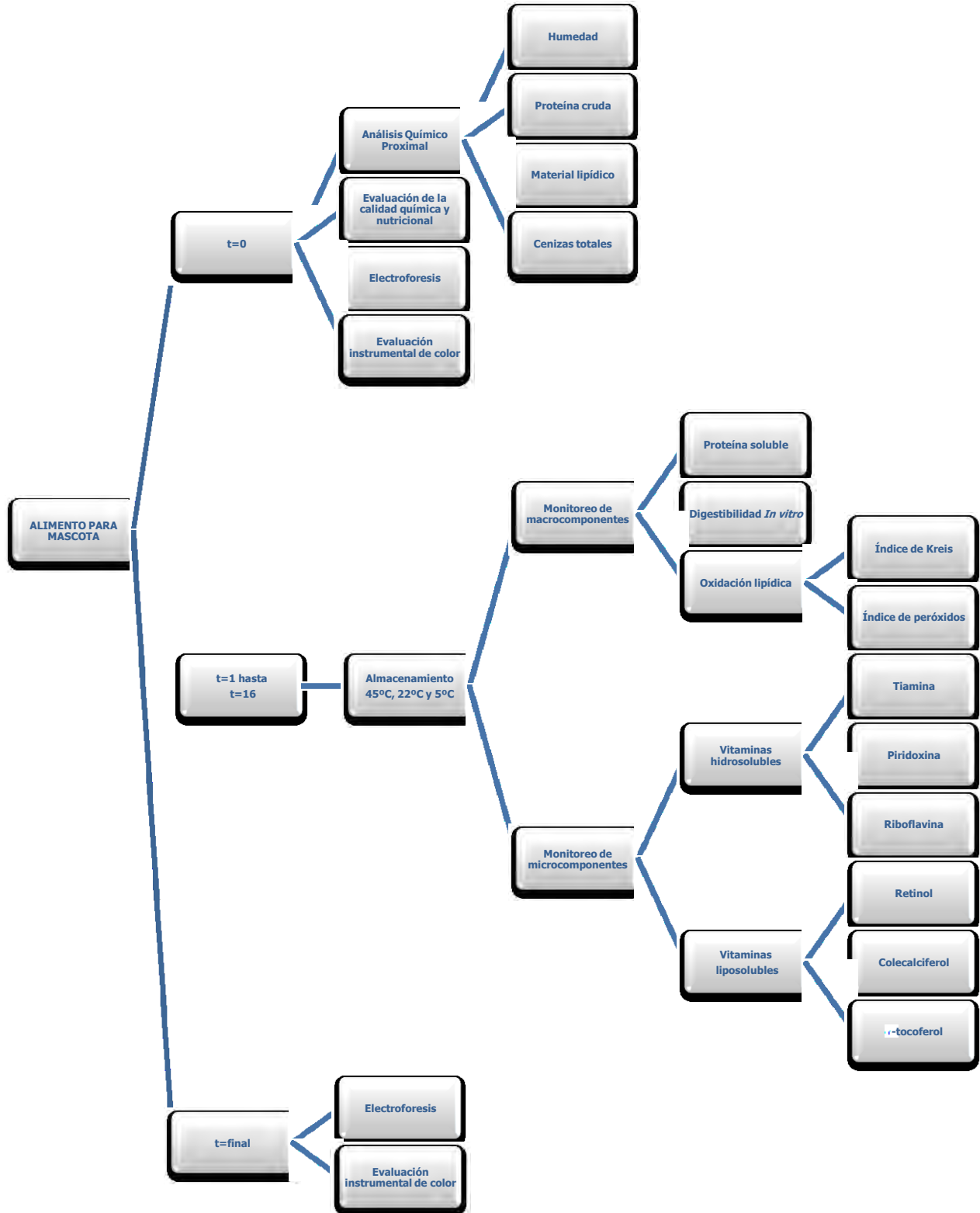
Semana 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Plan de muestreo																
t=0	t=1	t=2	t=3	t=4	t=5	t=6	t=7	t=8	t=9	t=10	t=11	t=12	t=13	t=14	t=15	t=16
45°C	45°C	45°C	45°C	45°C	45°C	45°C	45°C		45°C	45°C			45°C	45°C	45°C	45°C
22°C		22°C		22°C		22°C	22°C		22°C				22°C		22°C	
5°C			5°C				5°C			5°C		5°C				5°C
Determinación																
Color																Color
Electroforesis																Electroforesis
Solubilidad proteínas	Solubilidad proteínas															Solubilidad proteínas
Digestibilidad de proteínas	Digestibilidad de proteínas															Digestibilidad de proteínas
Oxidación lípidos (IP/IK)	Oxidación lípidos (Índice de Peróxidos/Índice de Kreis)															Oxidación lípidos (IP/IK)
Vitaminas hidrosolubles	Vitaminas hidrosolubles															Vitaminas hidrosolubles
Vitaminas liposolubles	Vitaminas liposolubles															Vitaminas liposolubles

Tabla 4.1. Plan de muestreo para las 16 semanas de almacenamiento. El tiempo t=8 corresponde a la semana del 6 al 12 de abril de semana santa, y los tiempos 11 y 12 son las dos semanas declaradas como de contingencia con la medida de suspensión obligatoria de labores.

Al final del tiempo de almacenamiento, se realizó para cada temperatura, la evaluación instrumental de color y se llevó a cabo otro estudio electroforético.

Las metodologías completas se encuentran en el **Anexo 1**.

4.1 Estrategia experimental



5. Resultados y discusión

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA

A continuación se presenta la lista de ingredientes reportados en las etiquetas así como los valores del AQP teóricos y los obtenidos experimentalmente en el laboratorio como resultado del promedio de tres determinaciones en las Tablas 5.1.1 y 5.1.2:

Componente	Valor teórico (%)	Valor experimental (%)
Proteína cruda	(min) 27.00	23.96±0.79
Grasa cruda	(min) 10.00	10.87±0.09
Fibra cruda	(máx) 3.00	ND
Humedad	(máx) 12.00	5.70±0.45
Cenizas	NR	11.17±0.29

Tabla 5.1.1. Análisis de garantía de alimento para cachorro y AQP determinado experimentalmente. NR: No reportado en la etiqueta. ND: No determinado experimentalmente.

Componente	Valor teórico (%)	Valor experimental (%)
Proteína cruda	(min) 21.00	20.45±1.18
Grasa cruda	(min) 9.00	8.34±0.35
Fibra cruda	(máx) 4.00	ND
Humedad	(máx) 12.00	4.51±0.44
Cenizas	NR	7.09±0.33

Tabla 5.1.2. Análisis de garantía de alimento para adulto y AQP determinado experimentalmente. NR: No reportado en la etiqueta. ND: No determinado experimentalmente.

Ingredientes:

Granos molidos (maíz, trigo y sorgo), harina de subproducto de pollo, harina de carne y hueso de cerdo, pasta de soya, gluten de maíz, grasa de res conservada con antioxidantes, sabor natural de pollo, carbonato de calcio, fosfato de calcio, sal, aminoácidos, cloruro de potasio, cloruro de colina, DHA como fuente de ácidos grasos Omega 3, suplemento de vitamina E y vitamina C como antioxidantes, suplemento de vitamina A, Pantotenato de calcio, Biotina, mononitrato de tiamina (Vitamina B1), suplemento de riboflavina (Vitamina B2) suplemento de piridoxina (Vitamina B6), suplemento de cianocobalamina (Vitamina B12), suplemento de Vitamina D₃ y Vitamina K, sulfato de zinc, sulfato de cobre, ioduro de potasio, minerales quelados y colorantes.

La lista de ingredientes es exactamente la misma tanto en alimento para adulto como para cachorro, es decir, la única variante son las proporciones de sus componentes.

En la formulación para cachorro se observa que los niveles de proteína reportados experimentalmente se encuentran por debajo del mínimo reportado en la etiqueta, lo mismo para grasa cruda en la formulación para adulto. Estas son ligeras discrepancias detectadas al inicio del trabajo experimental.

5.2. DETERIORO DEL MATERIAL LIPÍDICO

El seguimiento del deterioro del material lipídico se llevó a cabo por medio del monitoreo de la concentración de peróxidos, es decir el índice de peróxidos (IP) y por la presencia de productos secundarios de la oxidación mediante el índice de Kreis (IK).

5.2.1. Análisis del Índice de peróxidos (IP)

El Índice de peróxidos cuyo monitoreo se encuentra en las tablas del Anexo 2, es un testigo de la calidad de la grasa en el alimento, puesto que el incremento en su concentración explica el avance del enranciamiento por auto-oxidación. A este respecto cabe mencionar que en el tiempo cero, la formulación de alimento para cachorro inicia con un Índice de peróxidos de cero, (la concentración de peróxidos no es detectable por el método utilizado) y que la formulación de alimento para adulto, inicia con un valor de 0.58 meq/kg de grasa.

A 45°C, la etapa de iniciación de la auto-oxidación es más corta, ya que después de nueve semanas existe un marcado incremento de la concentración de peróxidos en ambas formulaciones. A temperatura de refrigeración, hasta tiempo $t=16$ el índice de peróxidos permanece casi sin cambios, y a temperatura ambiente en ese tiempo todavía no se observa un cambio drástico de acuerdo a los datos que se encuentran en el Anexo 2.

El orden de reacción ha sido determinado por método gráfico de acuerdo al ajuste de regresión lineal como se menciona en la sección de generalidades. Las constantes de rapidez corresponden a la pendiente de cada curva de acuerdo a la ecuación 16.

A la temperatura más alta de almacenamiento (45°C), es a la que se define el orden de la reacción (primer orden), pues a esta temperatura se presenta en el menor tiempo la ruptura de la fase de iniciación de la oxidación, lo que da paso a la fase de propagación donde el incremento en la concentración de peróxidos ocurre de manera exponencial.

Aún cuando a las temperaturas bajas la cinética pareciera de orden cero, esto no indica que no tenga en un momento dado que dispararse la fase de propagación.

En los Gráficos 5.2.1 y 5.2.2 se observa la cinética de deterioro de primer orden para el monitoreo de IP.

Los valores de las pendientes obtenidos a partir de las regresiones lineales aplicadas a estas curvas se encuentran en la Tabla 5.2.1.

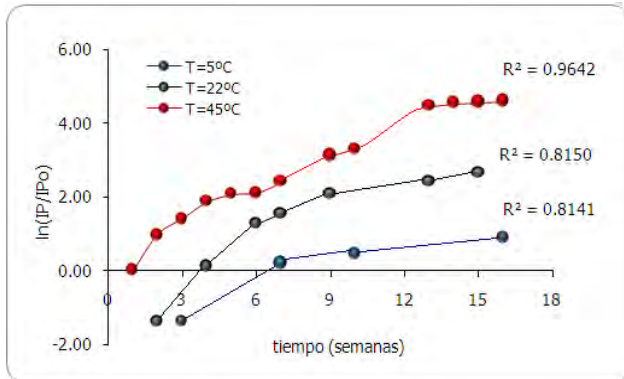


Gráfico 5.2.1. Cinética de primer orden del índice de peróxidos en alimento para cachorro.

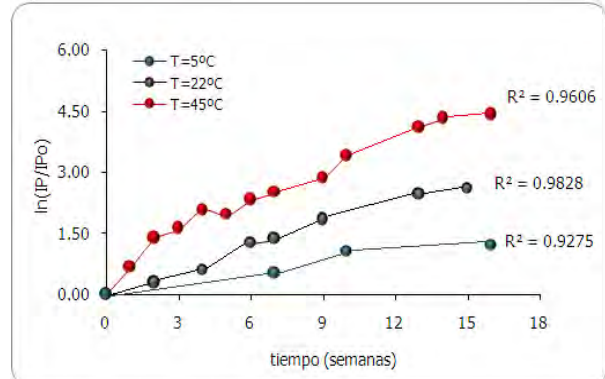


Gráfico 5.2.2. Cinética de primer orden del índice de peróxidos en alimento para perro adulto.

	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Cachorro	5	0.1637
	22	0.2747
	45	0.2875
Adulto	5	0.0774
	22	0.1830
	45	0.2612

Tabla 5.2.1. Valores de pendiente (constante de rapidez k) para la cinética de primer orden del Índice de peróxidos en alimento para cachorro y para perro adulto.

En ambas formulaciones se observa la tendencia de que el valor de las constantes de rapidez va en aumento de acuerdo a la temperatura, lo cual es perfectamente lógico, es decir que a mayor temperatura las reacciones implicadas en la generación de peróxidos ocurren a mayor rapidez. Esto acorde a lo publicado por Salinas *et al* en 2007.

De acuerdo al análisis estadístico basado en pruebas de hipótesis que se desarrolla en el Anexo 3, al comparar las constantes de rapidez a las diferentes temperaturas de trabajo, se encuentra que para ambas formulaciones, las constantes de rapidez son estadísticamente distintas, es decir, que de acuerdo con la tendencia observada en la Tabla 5.2.1, el deterioro del material lipídico evaluado mediante Índice de Kreis, sufre un incremento en la rapidez conforme aumenta la temperatura de almacenamiento.

Como se conocen los valores de las constantes de rapidez a las tres temperaturas, es posible trazar el gráfico de logaritmo natural del valor absoluto de la constante contra el inverso de la temperatura en unidades absolutas (Kelvin) de acuerdo a la ecuación 20.

Con esto se obtiene la representación de tres puntos que se muestra en el Gráfico 5.2.3 para ambas formulaciones de alimento para mascota.

En la Tabla 5.2.2 se encuentran los datos de energía de activación y factor preexponencial obtenidos a partir de las regresiones lineales correspondientes a cada una de las curvas.

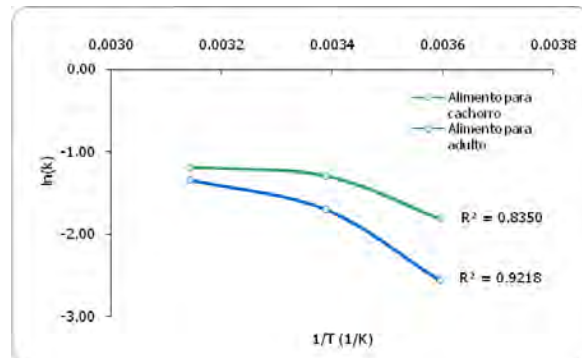


Gráfico 5.2.3. Tratamiento de Arrhenius del Índice de peróxidos en alimento para mascota.

	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Cachorro	-1,341.3	11.15	22.20	0.9138
Adulto	-2,653.5	22.06	1,199.91	0.9601

Tabla 5.2.2. Resultados de la aplicación de regresión lineal a la recta obtenida a partir del tratamiento de Arrhenius para el Índice de peróxidos de alimento para mascota.

Los valores de energía de activación difieren entre las formulaciones, pues de acuerdo a lo calculado, en el alimento para adulto es necesario el doble de energía para que los reactivos alcancen el estado activado que en el alimento para cachorro. Esto puede deberse al mayor contenido de material lipídico en el alimento para cachorro (determinado en el AQP contenido en la Tabla 5.1.1), lo que podría implicar mayor cantidad de ácidos grasos susceptibles a oxidación.

Lo anterior puede sumarse a un exceso de promotores que influyan en la formación de radicales libres durante la oxidación tales como la alta temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de extrusión, la presencia de metales traza de transición, así como una alta presión parcial de oxígeno en el envase, ya que como se mencionó en la sección de metodología, el espacio de cabeza no fue controlado en el momento del empacar.

5.2.2. Análisis del Índice de Kreis (IK)

El índice de Kreis al igual que el IP, es un indicativo de la evolución de la auto-oxidación que se basa en la detección de los productos secundarios de la misma, es decir detecta el deterioro del material lipídico con base en la aparición de productos aldehídicos más estables que los peróxidos.

A temperatura alta de trabajo (45°C), se observa el comportamiento cinético de primer orden, que aunque no es notorio a bajas temperaturas de almacenamiento, se considera que todas las reacciones obedecen un comportamiento del mismo orden para que pueda ser válida la extrapolación tal y como se realizó en el caso de IP en la sección anterior. Los Gráficos 5.2.4 y 5.2.5 ilustran las cinéticas de deterioro de ambas formulaciones de alimento para mascota.

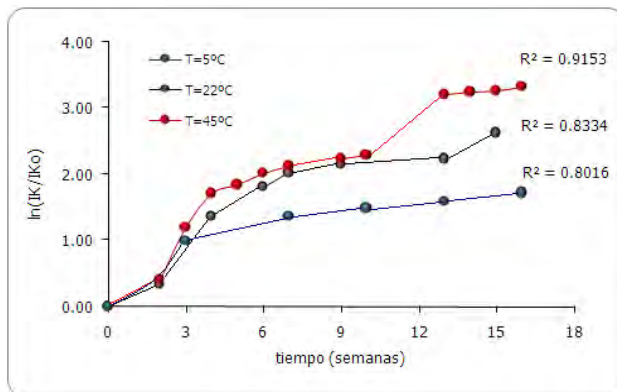


Gráfico 5.2.4. Cinética de primer orden del índice de Kreis en alimento para cachorro.

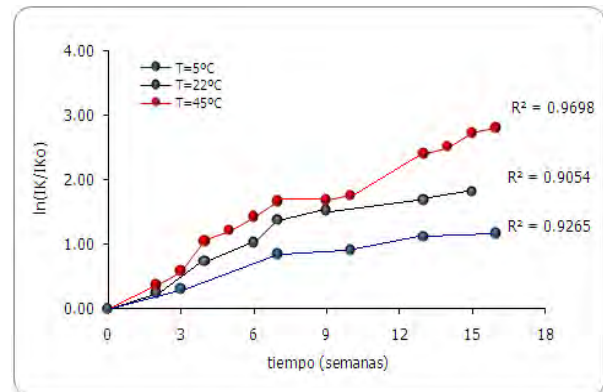


Gráfico 5.2.5. Cinética de primer orden del índice de Kreis en alimento para perro adulto.

	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Cachorro	5	0.0909
	22	0.1406
	45	0.1993
Adulto	5	0.0743
	22	0.1247
	45	0.1736

Tabla 5.2.4. Valores de pendiente (constante de rapidez k) para las cinéticas de primer orden de la evolución del Índice de Kreis en alimento para cachorro y para perro adulto.

La formación de productos secundarios ocurre a rapidezces similares en ambas formulaciones a temperaturas análogas, presentando a 5°C la menor rapidez y aumentando progresivamente con la temperatura.

Sin embargo, el análisis estadístico del Anexo 3 indica que, para ambas formulaciones, no existe diferencia significativa para los valores de constante de rapidez calculados a

las temperaturas de trabajo de 5 y 22°C y entre 22 y 45°C, pero que sí la hay al comparar 5 y 45°C. Es decir que debe presentarse un aumento de alrededor de 40°C en la temperatura de almacenamiento para que exista un efecto notorio sobre el incremento en el valor de la constante de rapidez-

El Gráfico 5.2.6 permite el cálculo de la energía de activación, con los valores de k calculados.

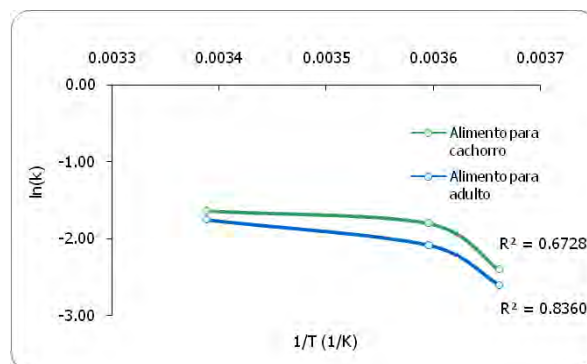


Gráfico 5.2.6. Tratamiento de Arrhenius del Índice de Kreis en alimento para mascota.

	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Cachorro	-2,590.3	21.54	1,339.93	0.8202
Adulto	-2,746.3	22.83	1,998.20	0.9143

Tabla 5.2.5. Resultados de la aplicación de regresión lineal a la recta obtenida a partir del tratamiento de Arrhenius para el Índice de Kreis de ambas formulaciones de alimento para mascota.

En este caso ambas energías de activación son muy parecidas entre las formulaciones. Es decir, que aún cuando en la formulación de alimento para cachorro se encuentra facilitada la aparición de los productos primarios de la oxidación (IP), nada promueve o facilita la generación de productos secundarios o aldéhdicos.

Por otro lado, cabe hacer notar que durante todo el monitoreo y a las tres temperaturas, los valores de IK son más altos en alimento para cachorro que en la formulación de adulto tal como se aprecia en los gráficos 5.2.4 y 5.2.5. Esto es congruente con la facilidad de generación de hidroperóxidos en el primer alimento.

5.3 DETERIORO DE LAS PROTEÍNAS

5.3.1 Cambio en la solubilidad de las proteínas (%PS)

En la evolución del cambio de solubilidad de las proteínas en el alimento para mascota se observa una disminución general en el porcentaje de proteína soluble que se acentúa conforme al aumento de temperatura de acuerdo a los datos contenidos en el Anexo 1.

La pérdida de solubilidad de las proteínas ocurre siguiendo una cinética de primer orden cuyo mecanismo se relaciona con la desnaturalización de las proteínas y la formación de agregados que merman en la solubilidad.

Los Gráficos 5.3.1 y 5.3.2 representan la cinética de primer orden para el deterioro de la proteína soluble, y en la Tabla 5.3.1 se encuentran los valores obtenidos para las constantes de rapidez.

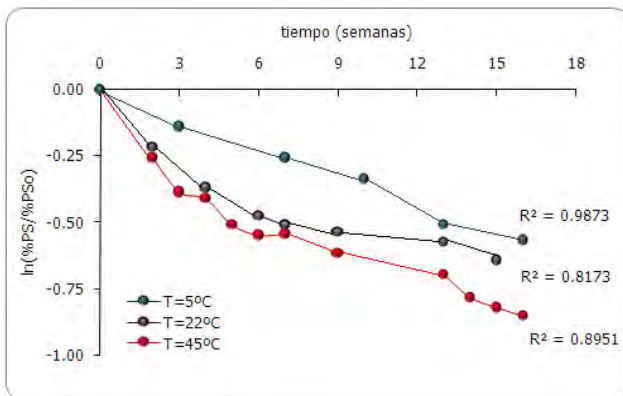
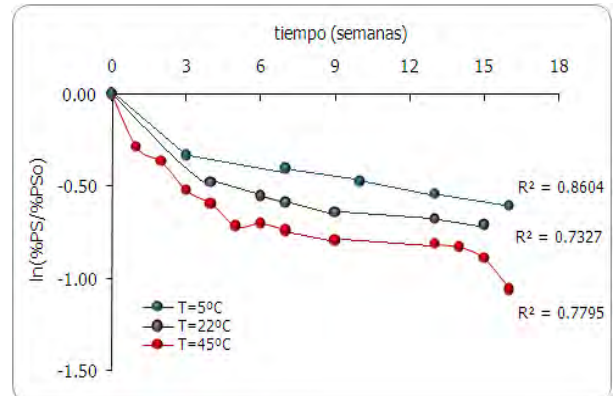


Gráfico 5.3.1. Cinética de primer orden del deterioro de proteína soluble en alimento para cachorro.



5.3.2 Cinética de primer orden del deterioro de proteína soluble en alimento para perro adulto.

	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Cachorro	5	0.0355
	22	0.0371
	45	0.0430
Adulto	5	0.0331
	22	0.0403
	45	0.0451

Tabla 5.3.1 Valores de pendiente (constante de rapidez k) para la cinética de primer orden del cambio de porcentaje de proteína soluble en alimento para mascota.

Se observa que la rapidez de la pérdida de solubilidad aumenta con la temperatura, esto se puede explicar argumentando que el aumento de la temperatura induce la desnaturalización de las proteínas, de modo que podrían desdoblarse estructuras

cuaternarias y/o terciarias (sin ruptura de enlaces peptídicos ni de puentes disulfuro), únicamente cambios conformacionales producto de la ruptura de interacciones débiles (tales como puentes de hidrógeno, interacciones entre moléculas hidrófobas, de naturaleza iónica o fuerzas de Van der Waals), que estabilizan la estructura nativa.

Esta desnaturalización puede llevar a la exposición de parches hidrofóbicos responsables de la formación de agregados de proteínas que merman en su solubilidad, aunado a las reacciones de entrecruzamiento con compuestos carbonílicos procedentes de la oxidación de lípidos cuya reactividad también aumenta con la temperatura.

El análisis estadístico del Anexo 3 concluye que las constantes de rapidez calculadas para el almacenamiento a 5°C son iguales a las calculadas a 22°C, y que a su vez, esta última es estadísticamente similar a la calculada para 45°C. Por último las constantes calculadas a temperatura de refrigeración son distintas estadísticamente a las correspondientes a $T = 45^{\circ}\text{C}$ en ambos alimentos.

Lo observado indica que la constante de rapidez presenta cambio significativo en tanto mayor es la diferencia de temperaturas. Entonces, será preferentemente a altas temperaturas de almacenamiento que observemos un efecto neto negativo en la estabilidad de la proteína soluble.

La premisa anterior se ve respaldada por los resultados obtenidos en el estudio electroforético que se discuten en la siguiente sección.

Si con las constantes de rapidez estimadas se realiza el tratamiento de Arrhenius, se obtiene el Gráfico 5.3.3.

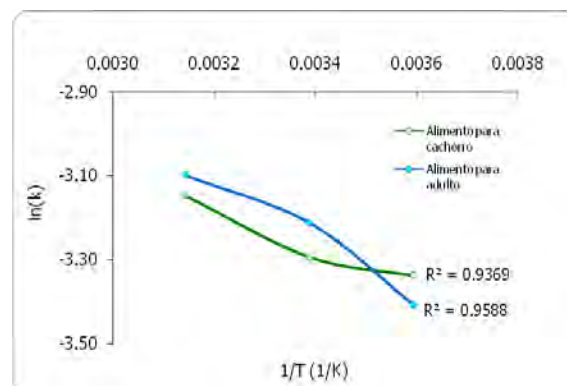


Gráfico 5.3.3. Tratamiento de Arrhenius para la pérdida de solubilidad de las proteínas en alimento para mascota.

	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Cachorro	-429.42	3.57	6.11	0.9679
Adulto	-677.59	5.63	2.58	0.9792

Tabla 5.3.2. Resultados de la aplicación de regresión lineal a las recta obtenidas a partir del tratamiento de Arrhenius para el cambio en la proteína soluble de ambas formulaciones cachorro y adulto.

Como se observa en la Tabla 5.3.2, para este mecanismo, las energías de activación son pequeñas, es decir que la pérdida de solubilidad de las proteínas ocurre con un requerimiento de energía relativamente bajo.

Es decir que en términos de solubilidad, la proteína es uno de los componentes cuya estabilidad se afecta con gran facilidad durante el almacenamiento.

5.3.2 Evaluación de la Digestibilidad *in vitro*

A las temperaturas de almacenamiento a las que ha sido expuesta la muestra, la proteína sufre una pérdida importante de solubilidad, por lo que resulta de suma importancia evaluar cómo es que se ve afectada la digestibilidad y por ende la calidad nutricional del alimento.

Cabe mencionar que la digestibilidad *in vitro* fue evaluada en la proteína total del alimento, tal y como se detalla en el Anexo 1.

En los Gráficos 5.3.4 y 5.3.5 se expresa la pérdida de digestibilidad en el tiempo a las tres temperaturas de trabajo y se observa que todos los datos caen prácticamente en el mismo intervalo, por lo que es imposible diferenciar una tendencia en función del tiempo o de la temperatura de almacenamiento.

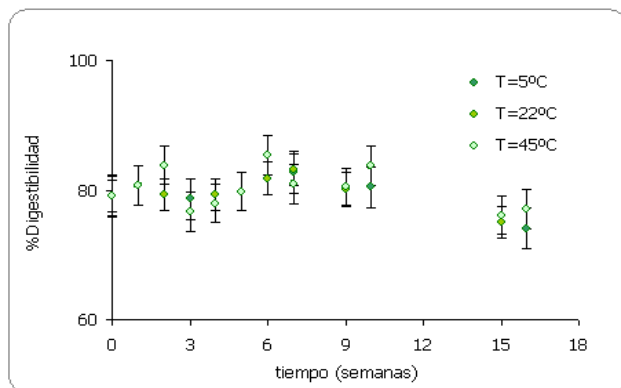


Gráfico 5.3.4. Evolución del porcentaje de digestibilidad en alimento para cachorro.

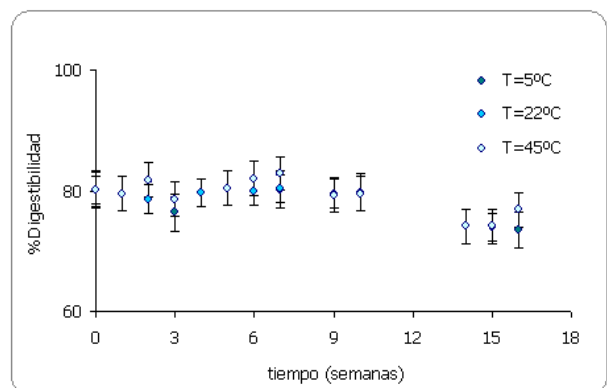


Gráfico 5.3.5. Evolución del porcentaje de digestibilidad en alimento para perro adulto.

Estadísticamente no existe correlación lineal entre la variable % de digestibilidad *in vitro* y tiempo para este sistema de acuerdo al tratamiento que se detalla en el Anexo 3.

En la formulación de alimento para cachorro, el porcentaje de digestibilidad *in vitro* se mantiene en un intervalo de valores que va desde 74.11-85.39%, donde el valor más bajo no corresponde a tiempo final y el más alto no corresponde a tiempo cero. Lo mismo ocurre en la formulación para adulto, donde los valores fluctúan entre 73.44-81.78% durante todo el monitoreo.

De acuerdo al estudio publicado por el Iams Technical Center en Lewisburg, Ohio realizado en 1993, donde se comparó la variabilidad de la digestibilidad de tres alimentos secos para perro, se reporta un porcentaje de digestibilidad de la proteína de 70.25, 80.99 y 85.86 para tres dietas A, B y C respectivamente (Case, 2001). Los datos encontrados con el método descrito son muy parecidos a estos durante todo el monitoreo como se puede corroborar con los datos globales del Anexo 2.

No ha sido posible observar una tendencia clara en el cambio de la digestibilidad *in vitro* debido posiblemente a que este parámetro fue evaluado en la proteína total (soluble+no soluble), por lo que el cambio, de existir, pudo no haber resultado significativo en el tiempo que duró el monitoreo y a las temperaturas de trabajo.

5.3.3 Estudio electroforético

En ambas formulaciones de alimento para mascota se incluyen proteínas de origen vegetal añadidas como parte de los granos molidos de maíz, trigo y sorgo, en la pasta de soya y el gluten de maíz; así como proteínas de origen animal contenidas en harina subproducto de pollo y en harina de carne y hueso de cerdo. En esta mezcla compleja de proteínas, se plantea evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el perfil de pesos moleculares.

Para este fin se elaboraron geles al 15% de acrilamida para separar preferentemente proteínas de bajo peso molecular en las que se supuso se evidenciaría con mayor claridad cualquier cambio en el perfil de pesos moleculares.

En la Figura 5.3.1 se observa que a tiempo cero, el perfil de pesos moleculares de las proteínas para cachorro se basa en cuatro péptidos de bajo peso molecular que van de 2.60 a 24.20 kDa (2.62, 9.71, 12.42, y 24.03, en promedio de los dos carriles); y un

péptido de alrededor de 45.2 kDa que aparece en la Figura 5.3.2, donde el péptido de alrededor de 22 kDa es el mismo que aparece en el primer gel.

En el caso de alimento para adulto el perfil cambia ligeramente, pues aparecen en la Figura 5.3.1 bandas desde 2.60 hasta alrededor de 24.16, contando en total seis bandas de bajo peso molecular (2.70, 2.81, 5.40, 6.43, 13.86 y 23.67 en promedio del duplicado) y una banda de peso molecular superior que se observa en el segundo gel (Figura 5.3.2) en 46.5 kDa.

Estas diferencias en los pesos moleculares a tiempo cero, implican que posiblemente en alimento para adulto esté ocurriendo mayor daño en las proteínas, posiblemente ocasionado por el proceso de obtención de harinas y/o durante la elaboración del alimento, lo que explicaría el mayor número de bandas.

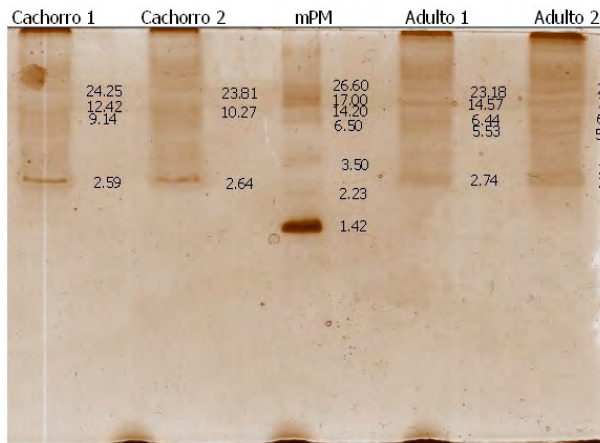


Figura 5.3.1. Electroforesis tiempo cero. Gel de poliacrilamida al 15% de acrilamida con marcador de ultra bajo peso molecular (mPM) y las muestras inyectadas por duplicado. Método de tinción con plata.

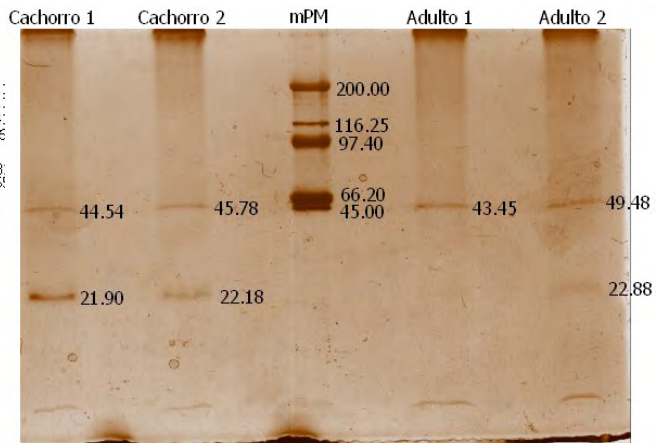


Figura 5.3.2. Electroforesis tiempo cero. Gel de poliacrilamida al 15% de acrilamida con marcador de alto peso molecular (mPM) y las muestras inyectadas por duplicado. Método de tinción con plata.

En el carril central del marcador en la Figura 5.3.1, se observa que la última banda tiene un peso molecular de 1.42 kDa, cuando el péptido de menor peso molecular en el marcador es de 0.6 kDa. Es decir que en esta electroforesis no ha sido posible separar los dos últimos marcadores y por ésta razón la banda se ha teñido intensamente. Lo anterior no parece tener implicaciones en la lectura de los pesos moleculares de las muestras puesto que la última banda aparece en 2.64 kDa pero nada a la altura de 1.5 kDa.

El perfil cambia bastante al tiempo final del monitoreo como se muestra en la Figura 5.3.3, pues a todas las temperaturas desaparecen las bandas de más bajo peso

molecular, es decir que no hay péptidos de peso inferior a 14.9 kDa, además de que en todos los carriles aparecen siete bandas cuyo máximo peso molecular es de 51.8 kDa.

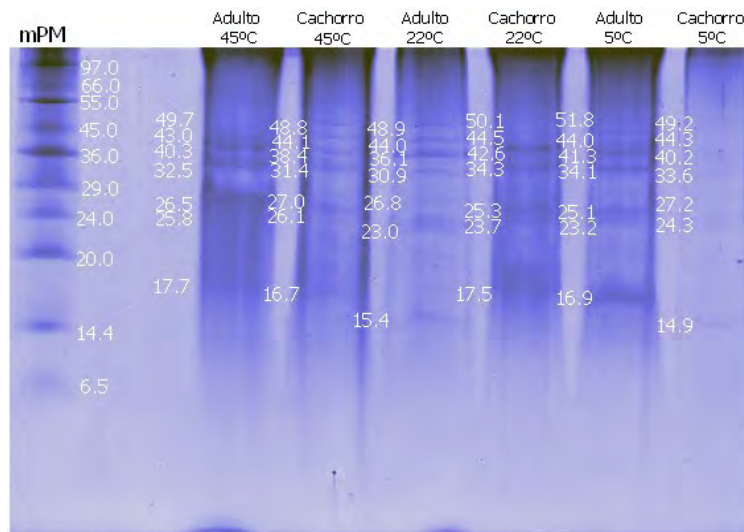


Figura 5.3.3. Electroforesis tiempo final.
Gel de poliacrilamida al 15% de acrilamida con marcador de amplio peso molecular (mPM).
Tinción con azul de Coomassie al 0.025%.

En ambas formulaciones, se observa con respecto al tiempo cero, un aumento general en el peso molecular a todas las temperaturas al final del almacenamiento que se acentúa en el lote a 45°C.

En todos los casos se podría decir que hay un grupo muy claro de cuatro proteínas cuyo peso molecular oscila entre 30-50 kDa; otro grupo de dos proteínas entre 23-27 kDa y por último proteínas de peso menor a 18 kDa.

El contraste está en que a tiempo cero en el primer grupo (30-50kDa), hay sólo una proteína en ambas formulaciones; en el segundo grupo (23-27kDa), hay nuevamente una sola proteína y es en el tercer grupo (<18kDa) donde se encuentran las tres proteínas restantes en formulación para cachorro y cinco en formulación para adulto.

A tiempo final de almacenamiento en ambos alimentos, la distribución de pesos moleculares en los grupos cambia notoriamente de modo que en el primer intervalo, se detectan cuatro proteínas, en el segundo sólo dos y en de menor peso se observa un solo péptido tal y como lo muestra la Tabla 5.3.3.1.

A tiempo final se ha calculado el promedio de las bandas análogas de cada una de las temperaturas de trabajo para facilitar la clasificación propuesta.

tiempo	Formulación	<18 kDa	23-27 kDa	30-50 kDa
Cero	Cachorro	2.62 9.71 12.42	24.03	45.20
	Adulto	2.70 6.43 2.81 13.86 5.40	23.67	46.50
Final	Cachorro	16.37±1.09	24.70±1.02 26.50±0.85	33.10±1.25 40.40±1.72 44.30±0.16 49.37±0.54
	Adulto	16.67±0.95	24.00±1.28 26.13±0.74	32.50±1.31 39.23±2.25 43.67±0.47 50.13±1.22

Tabla 5.3.3.1. Relación de cambio en los pesos moleculares a tiempo cero y final.

En general, con el almacenamiento aumenta el peso molecular de las proteínas aún en refrigeración, lo que sustenta la disminución en la proteína soluble de las muestras a todas las temperaturas de trabajo con efecto significativo a 45°C.

Todo esto indica un reacomodo de los pesos moleculares por la formación de aglomerados de las proteínas de más bajo peso molecular con las de alto (o con otras de bajo peso), por interacciones que se establecen después de posibles cambios conformacionales o rearrreglos tridimensionales para dar un nuevo perfil de proteínas afectando en gran medida a la solubilidad.

5.4. DETERIORO DE LOS MICRONUTRIENTES

El alimento para mascota marca comercial que ha sido objeto de este estudio, reporta en el empaque de sus dos presentaciones, cachorro y adulto, la siguiente leyenda:

Este producto es un alimento que cumple satisfactoriamente con los niveles de todos los nutrientes recomendados por la AAFCO (Asociación Americana de Oficiales de Control de Alimentos) para la nutrición de perros de todas las edades.

Por lo que el análisis se basó en las tablas que publica esta asociación para establecer los intervalos de concentraciones mínimas y máximas de vitaminas tanto hidrosolubles como liposolubles.

5.4.1 Vitaminas hidrosolubles

De acuerdo a las tablas de perfiles nutricionales de la AAFCO del año 2000 de alimentos para perros (publicadas por Case en el 2001), los niveles mínimos de las vitaminas hidrosolubles de nuestro interés son los que se han transcrito en la Tabla 5.4.1.

Vitamina	Cualquier edad (mg/kg)♦	Cachorro (mg/100g)♣	Adulto (mg/100g)♠
Tiamina	1.0	0.095	0.096
Piridoxina	1.0	0.095	0.096
Riboflavina	2.2	0.208	0.210

Tabla 5.4.1. Perfiles nutricionales de la AAFCO de alimentos para perros. La tabla supone una densidad energética de 3.5-4.0 kcal de energía metabolizable/g de materia seca (Case 2001).

♦ Las unidades están dadas por kg de alimento en peso seco.

♣ Conversión a mg/100g de alimento en base húmeda considerando 5.70% de humedad de acuerdo a la Tabla 5.1.1.

♠ Conversión a mg/100g de alimento en base húmeda considerando 4.51% de humedad de acuerdo a la Tabla 5.1.2.

La AAFCO no reporta valores máximos de estas vitaminas puesto que el exceso ingerido es eliminado fácilmente por orina.

Los valores de las tablas se estiman para una densidad energética en el alimento de 3.5-4.0 kcal de energía metabolizable/g de materia seca. La energía metabolizable (EM) de las muestras se calculó de acuerdo a los valores obtenidos en el AQP y de acuerdo al aporte teórico de proteínas y carbohidratos de 4kcal/g y de lípidos de 9kcal/g (Fennema, 1996).

Para la formulación de adulto, la EM es de 3.97 kcal/g de alimento en peso seco, y para la formulación de cachorro es de 3.98 kcal/g de alimento seco, por lo que las tablas son perfectamente aplicables a las muestras sin necesidad de hacer ajustes adicionales.

5.4.1.1 Vitaminas hidrosolubles en alimento para cachorro

La pérdida de todas las vitaminas hidrosolubles sigue una cinética de primer orden determinado por método gráfico con base en los datos del Anexo 2; lo que indica que su desaparición en el tiempo depende de la concentración de reactivo presente en el medio.

En el caso de la tiamina, la concentración correspondiente al tiempo cero es de 3.29 mg/100 g de alimento en base húmeda, esto es casi 35 veces la mínima cantidad recomendada, sin embargo, en el tiempo de monitoreo de 16 semanas, el último punto a 45°C (0.16 mg/100 g) es de menos del doble del mínimo.

La cinética de primer orden que se expresa en el Gráfico 5.4.1 describe el deterioro de esta vitamina y en él se logran diferenciar las tres temperaturas. El mínimo recomendado por la AAFCO se encuentra marcado por una línea horizontal de color azul.

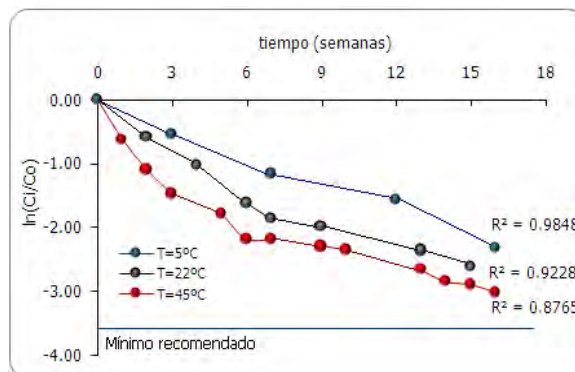


Gráfico 5.4.1. Cinética de primer orden del deterioro de tiamina en alimento para cachorro.

Analizando los datos obtenidos para piridoxina, es notable que a partir del tiempo ocho a 45°C, la vitamina ya no es detectable por el método utilizado en el desarrollo experimental de este trabajo (mismo que se describe en el Anexo 1), por esta razón, en el gráfico de cinética, la curva a 45°C se conforma únicamente por ocho puntos, aún cuando a tiempo cero, su concentración es 79 veces mayor que el mínimo recomendado.

Es posible que la pérdida de esta vitamina sea resultado de interacciones con otros componentes del alimento como por ejemplo algunos aminoácidos (ácidos aspártico y glutámico y los azufrados) o péptidos que induzcan reacciones que destruyen su actividad biológica (Badui, 2006).

La cinética de deterioro de la Vitamina B₆ se encuentra en el Gráfico 5.4.2.

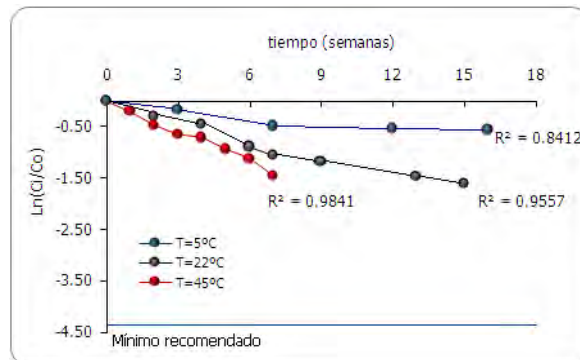


Gráfico 5.4.2. Cinética de primer orden del deterioro de piridoxina en alimento para cachorro.

Por último la riboflavina, parece ser una de las vitaminas más estables, cuya concentración inicial es menos de cuatro veces la mínima, pero durante el monitoreo, aún a la temperatura más alta de almacenamiento (45°C), existe una cantidad suficiente de la misma. Su cinética se encuentra en el Gráfico 5.4.3, y los valores de las pendientes (constantes de rapidez), de cada una de las curvas para cada vitamina se encuentran en la Tabla 5.4.2.

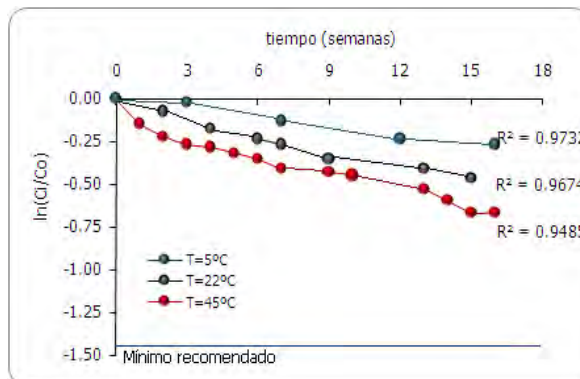


Gráfico 5.4.3. Cinética de primer orden de pérdida de riboflavina en alimento para cachorro.

Vitamina	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Tiamina	5	0.1378
	22	0.1469
	45	0.1570
Piridoxina	5	0.0358
	22	0.1080
	45	0.1943
Riboflavina	5	0.0185
	22	0.0308
	45	0.0351

Tabla 5.4.2 Valores de pendiente (constante de rapidez k) para la cinética de deterioro de primer orden de vitaminas hidrosolubles en alimento para cachorro.

La tendencia de las constantes k, indica en todos los casos un aumento de la rapidez de pérdida de las vitaminas con la temperatura.

El análisis estadístico desarrollado con la finalidad de comparar las constantes indica que no existe diferencia significativa entre las pendientes de las curvas de deterioro de tiamina a un nivel de significancia del 5% cuando se compara 5°C vs 22°C y 22°C vs 45°C. Sólo existe diferencia significativa entre los valores de constante a 5 y 45°C.

Para los casos de piridoxina y riboflavina, el mismo análisis puntualiza que sí existe diferencia significativa entre las constantes de rapidez calculadas a cada temperatura de trabajo.

Es decir, que en esta formulación, la pérdida de tiamina se ve afectada por la temperatura sólo por arriba de 22°C, pero que en general, las reacciones involucradas en su deterioro no incrementan en gran medida su rapidez cuando el almacenamiento es a temperaturas inferiores a la ambiente.

El tratamiento de Arrhenius del Gráfico 5.4.4 nos permitirá tener una idea de la susceptibilidad de los componentes a sufrir descomposición y esclarecerá la interpretación del análisis estadístico.

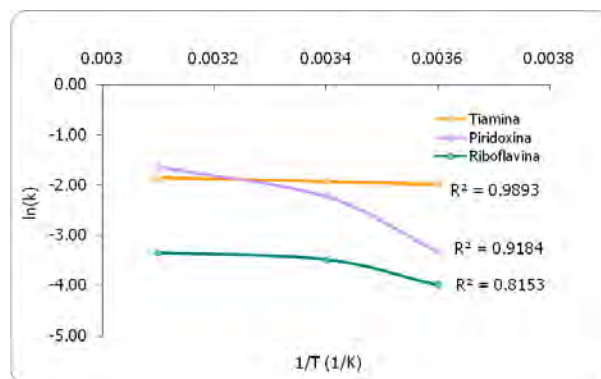


Gráfico 5.4.4. Tratamiento de Arrhenius para la pérdida de vitaminas hidrosolubles en alimento para cachorro.

Vitamina	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas ⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Tiamina	-257.79	2.14	0.35	0.9946
Piridoxina	-3,270.40	27.19	5,486.25	0.9583
Riboflavina	-1,214.10	10.09	1.62	0.9029

Tabla 5.4.3. Resultados de la aplicación de regresión lineal a las rectas obtenidas a partir del tratamiento de Arrhenius para el deterioro de vitaminas hidrosolubles en la formulación de alimento para cachorro.

De acuerdo con los datos obtenidos en la Tabla 5.4.3, la reacción que involucra la pérdida de tiamina presenta una barrera energética muy pequeña a vencer, mismo que se traduce en su susceptibilidad a desaparecer. Esto es congruente con la literatura que reporta a tiamina como una vitamina termosensible y con la discusión del párrafo anterior.

En cuanto a piridoxina y de acuerdo a Badui (2006), la energía de activación para llevar a cabo su destrucción es de 114 kcal/mol o 480 kJ. En este alimento la Ea se encuentra muy por debajo de ese valor lo que indica que en esta matriz alimentaria su pérdida está facilitada por alguna razón que podría estar ligada a su interacción con componentes del alimento como ya se ha mencionado con anterioridad.

Aunque piridoxina parece ser de las tres, la vitamina más afectada por la temperatura, al mismo tiempo es para la que se ha calculado la energía de activación más alta, es decir, la menos susceptible a pérdida o en otras palabras, la más estable a las condiciones de almacenamiento. Cabe mencionar que es la vitamina con concentración inicial más alta.

En la formulación de alimento para cachorro, es clara la evidencia de desaparición excesiva de la vitamina en cuestión después de 8 semanas a 45°C, pero al momento de integrar los resultados con el resto de las temperaturas de trabajo en el tratamiento de Arrhenius, resulta ser la que requiere vencer la mayor barrera energética para que ocurra la reacción. Esto sólo refuerza la idea de que a mayor temperatura, el efecto negativo sobre la estabilidad de los componentes es más claro.

Finalmente riboflavina presenta una Ea intermedia con respecto al resto de las vitaminas y valores bajos en sus constantes de rapidez.

5.4.1.2. Vitaminas hidrosolubles en alimento para perro adulto.

En esta formulación, la tiamina en tiempo cero tiene casi 25 veces mayor cantidad que el mínimo recomendado. Esta vitamina se pierde rápidamente en las primeras semanas de monitoreo a todas las temperaturas de trabajo de acuerdo a lo que se observa en las tablas del Anexo 1. A la temperatura más alta y después de dieciséis semanas de almacenamiento, la concentración de tiamina cae por debajo del mínimo recomendado por la AAFCO (Asociación Americana de Oficiales de Control de Alimentos), representado en el Gráfico 5.4.5 como una línea continua color azul. La cinética se ajusta a un modelo de primer orden.

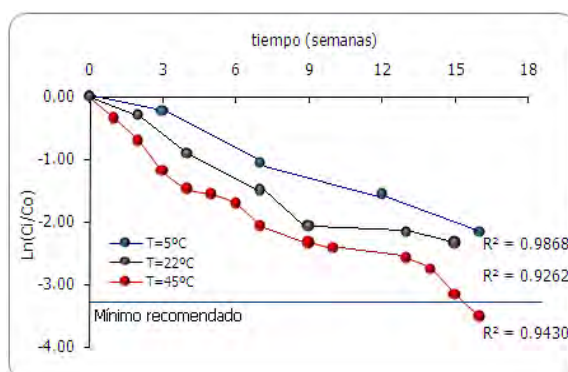


Gráfico 5.4.5. Cinética del deterioro de primer orden de tiamina en alimento para perro adulto.

En el caso de la Vitamina B₆, el alimento contenía en tiempo cero más de 80 veces el mínimo recomendado en las tablas de la AAFCO. Aún así, para la semana 15 de almacenamiento a 45°C la pérdida de la vitamina fue tal que los valores caen por debajo de 0.096 mg/100g de alimento (concentración mínima recomendada de piridoxina). A diferencia del alimento para cachorro, en este caso, la piridoxina fue cuantificable durante casi el doble de tiempo de monitoreo a 45°C. La cinética de deterioro de esta vitamina se encuentra en el Gráfico 5.4.6.

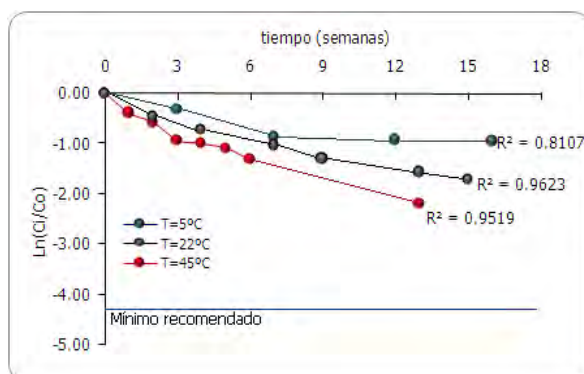


Gráfico 5.4.6. Cinética de primer orden de deterioro de piridoxina en alimento para perro adulto.

La riboflavina en esta formulación parece nuevamente ser la más estable, pues su degradación no presenta la marcada pérdida en las primeras semanas como ocurre con las otras dos vitaminas a 45°C de almacenamiento. La concentración inicial de la riboflavina fue de 0.79 mg/100g de alimento, sólo 3.7 veces mayor al mínimo. Esta es la única vitamina hidrosoluble que no presentó pérdida menor al mínimo en las dieciséis semanas de monitoreo tal y como lo muestra el Gráfico 5.4.7.

Los valores de las constantes de rapidez se encuentran integrados en la Tabla 5.4.4.

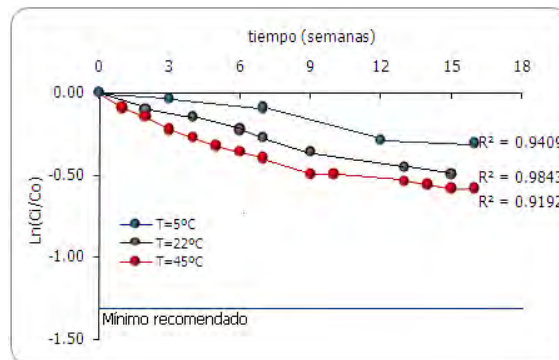


Gráfico 5.4.7. Cinética de primer orden de la pérdida de riboflavina en alimento para perro adulto.

Vitamina	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Tiamina	5	0.1384
	22	0.1623
	45	0.1875
Piridoxina	5	0.0592
	22	0.1082
	45	0.1585
Riboflavina	5	0.0216
	22	0.0316
	45	0.0343

Tabla 5.4.4 Valores de pendiente (constante de rapidez k) para la cinética de deterioro de primer orden de vitaminas hidrosolubles en alimento para perro adulto.

El análisis estadístico del Anexo 3 revela que no existe diferencia significativa entre las constantes k de las curvas trazadas al comparar 5°C vs 22°C y 22°C vs 45°C, en el caso de tiamina y piridoxina, cuyo valor de constante a 5 y 45°C sí son distintos estadísticamente hablando.

En el caso de riboflavina, en esta formulación el mismo análisis revela que no existe diferencia significativa entre las constantes de rapidez estimadas a las temperaturas de trabajo de 22 y 45°C, sólo es distinta de estas dos la constante calculada a 5°C evaluado con un nivel de significancia del 5%. Es decir que en este alimento, esta vitamina tiene gran estabilidad a temperatura de refrigeración, pero que a más de 22°C

el aumento de la misma no le afecta tan notoriamente como en la formulación para cachorro.

Con estas constantes de rapidez, se efectúa el tratamiento de Arrhenius para calcular las energías de activación. En el Gráfico 5.4.8 se encuentran las curvas obtenidas.

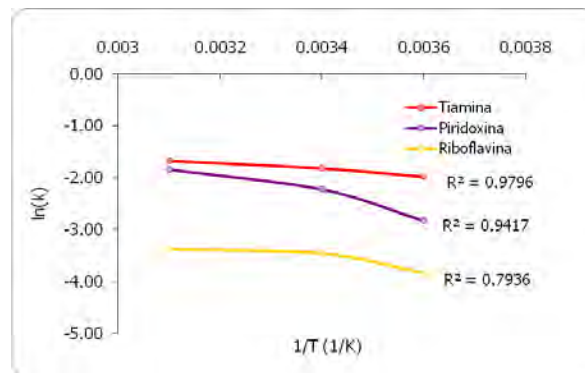


Gráfico 5.4.8. Tratamiento de Arrhenius para la pérdida de vitaminas hidrosolubles en alimento para perro adulto.

Vitamina	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas ⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Tiamina	-597.30	4.97	1.21	0.9897
Piridoxina	-1,914.60	15.92	63.43	0.9704
Riboflavina	-873.46	7.26	0.54	0.8908

Tabla 5.4.5. Resultados de la aplicación de regresión lineal a las recta obtenidas a partir del tratamiento de Arrhenius para el deterioro de vitaminas hidrosolubles en la formulación de alimento para perro adulto.

Como se observa en la Tabla 5.4.5, la energía de activación de tiamina es a simple vista, de mayor magnitud con respecto a la formulación de cachorro (aproximadamente del doble), es decir que esta formulación es menos susceptible a su pérdida. Este hecho, puede deberse a que en el caso de alimento para adulto, el mayor contenido de fibra cruda (Tablas 5.1.1 y 5.1.2), proteja hasta cierto punto a la Vitamina B₁ de la descomposición por ocupación de los grupos funcionales reactivos en la interacción con el mismo. También pueden presentarse interacciones con otros polímeros como almidón que repercutan sobre la estabilidad de las vitaminas.

El caso contrario se observa para piridoxina, pues la formulación para cachorro presenta a simple vista mayor Ea y por ende, menor susceptibilidad de deterioro. Es de llamar la atención que en alimento para adulto, el monitoreo de esta vitamina a 45°C haya arrojado valores por debajo del mínimo recomendado hasta la semana 15, a comparación del alimento para cachorro cuyo mínimo se alcanza desde la semana 8, lo cual es congruente con el hecho de que se haya detectado diferencia significativa entre las constantes de rapidez a distintas temperaturas en la segunda formulación más no

en la primera. La diferencia significativa entre las temperaturas de estudio indica que la elevación de la temperatura es suficiente para acelerar el deterioro en alimento para cachorro.

Por último riboflavina es un caso especial en esta formulación, pues el hecho de que no exista diferencia significativa entre las temperaturas ambiente y 45°C de almacenamiento habla de su termoestabilidad.

5.4.2 Vitaminas liposolubles

De acuerdo a las tablas de perfiles nutricionales de la AAFCO (Asociación Americana de Oficiales de Control de Alimentos) de alimentos para perros establecidos en el año 2000 y publicadas por Case en 2001, los niveles mínimos y máximos de vitaminas liposolubles de nuestro interés son los que se han transcrito en la Tabla 5.4.6.

Vitamina	Unidad	Cualquier edad [♦]		Cachorro [♣]		Adulto [♠]	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Retinol	µg	1,500	75,000	141.91	7,095.5	143.53	7,176.5
Colecalciferol	µg	12.5	125	1.18	11.82	1.20	11.96
α-tocoferol	mg	33.55	671	3.17	63.48	3.21	64.20

Tabla 5.4.6. Perfiles nutricionales de la AAFCO de alimentos para perros. La tabla supone una densidad energética de 3.5-4.0 kcal de energía metabolizable/g de materia seca (Case,2001).

♦ Las unidades están dadas por la AAFCO por kg de alimento en peso seco.

♣ Conversión por cada 100g de alimento base húmeda considerando 5.70% de humedad de acuerdo a la Tabla 5.1.1.

♠ Conversión por cada 100g de alimento base húmeda considerando 4.51% de humedad de acuerdo a la Tabla 5.1.2.

Lo primero es determinar si los valores a tiempo cero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones recomendado ya que para vitaminas liposolubles se establece nivel máximo.

5.4.2.1 Vitaminas liposolubles en alimento para cachorro

La concentración inicial de Vitamina A en el alimento para cachorro de acuerdo a los datos que se encuentran en el Anexo 2, es casi 30 veces mayor que el mínimo y no alcanza a rebasar el límite máximo, por lo que se dice que esta vitamina se encuentra dentro de las especificaciones.

Su deterioro sigue una cinética de primer orden y las constantes de rapidez se calculan a partir del Gráfico 5.4.9.

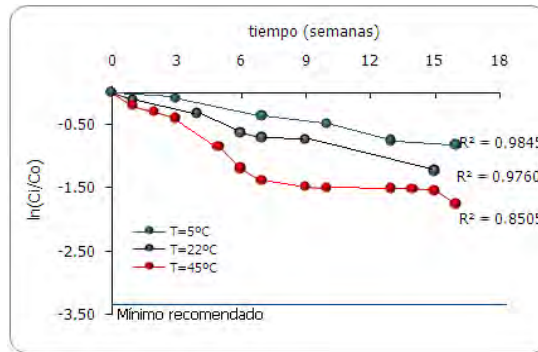


Gráfico 5.4.9. Cinética de primer orden de la pérdida de Vitamina A en alimento para cachorro.

Caso contrario el de la Vitamina D, que se encuentra muy por arriba del máximo recomendado por la AAFCO en alimento para perros, pues el valor inicial en esta formulación es de 315.86 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de alimento, es decir, excede al máximo casi 27 veces, y la concentración no logra entrar al límite aún después de dieciséis semanas de almacenamiento a 45°C como se observa en el Gráfico 5.4.10.

Se debe recordar que el consumo crónico de niveles elevados de Vitamina D en animales de compañía en crecimiento, puede eventualmente conducir a alteraciones esqueléticas y deformidades de dientes y mandíbulas. La suplementación excesiva es la causa más frecuente de intoxicación por Vitamina D en perros y gatos (Case, 2001). Como el perro es capaz de producir colecalciferol en la piel por exposición a luz UV, sus requerimientos de esta vitamina son realmente bajos cuando la dieta contiene suficiente calcio y fósforo, y la lista de ingredientes incluye carbonato de calcio y fosfato de calcio, por lo que la adición exagerada de suplemento de esta vitamina no está justificada.

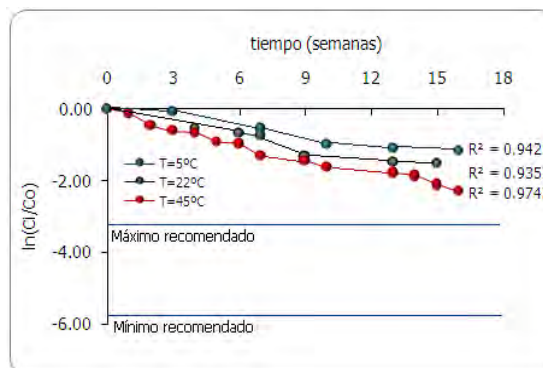


Gráfico 5.4.10. Cinética de primer orden de deterioro de colecalciferol en alimento para cachorro.

Por último la Vitamina E sí se apega a las recomendaciones de la AAFCO puesto que la concentración inicial es de 11.43 $\text{mg}/100\text{g}$ de alimento para cachorro, excediendo al mínimo 3.6 veces y manteniéndose por debajo del máximo.

Esta vitamina tiene importancia por la función que ejerce como antioxidante retrasando la oxidación del material lipídico por vía de auto-oxidación mediante la captación de radicales libres. El comportamiento de la evolución de su deterioro puede explicarse con base en la participación de la Vitamina C, otro antioxidante que interviene en la regeneración del α -tocoferol tal y como lo muestra la Figura 5.4.1.

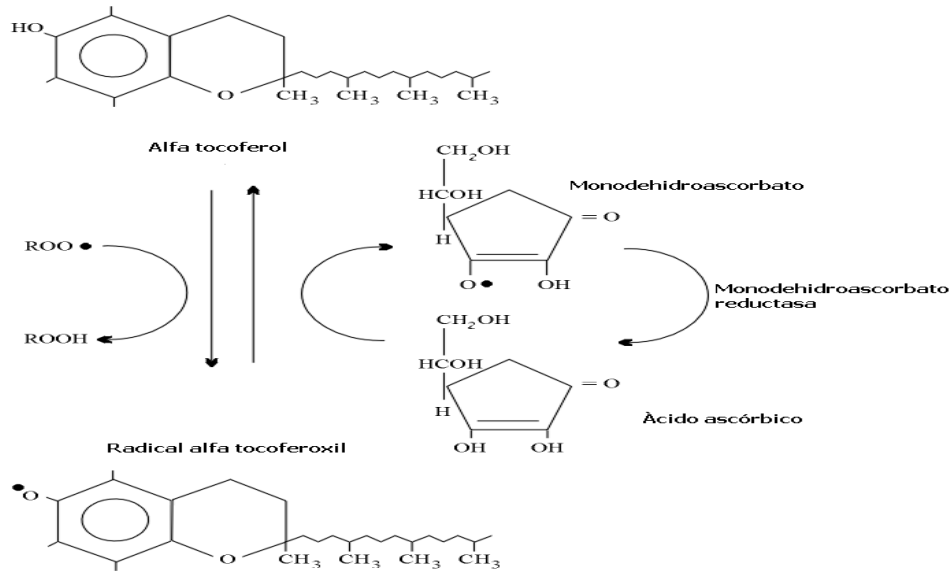


Figura 5.4.1. Regeneración del α -tocoferol por ácido ascórbico (Fuente: Pita, 1997)

Si faltara la enzima responsable de transformar el monodehidroascorbato en ácido ascórbico capaz de captar otro radical libre, entonces la Vitamina C puede seguir el mecanismo de descomposición se ilustra en la Figura 5.4.2:

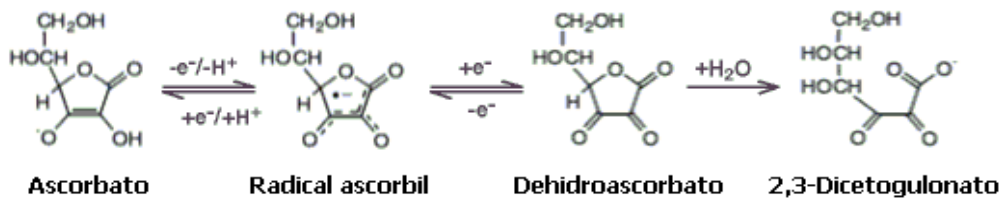


Figura 5.4.2. Descomposición del ascorbato a 2,3-Dicetogulonato (Fuente: Pita, 1997).

La regeneración de la Vitamina E a expensas de la descomposición del ácido ascórbico explica que sea esta vitamina la que presenta las constantes de rapidez a simple vista más bajas. En el Gráfico 5.4.11 se presenta la cinética de primer orden de la reacción de descomposición de la Vitamina E, y en la Tabla 5.4.7, los valores de las constantes k para todas las temperaturas y todas las vitaminas liposolubles.

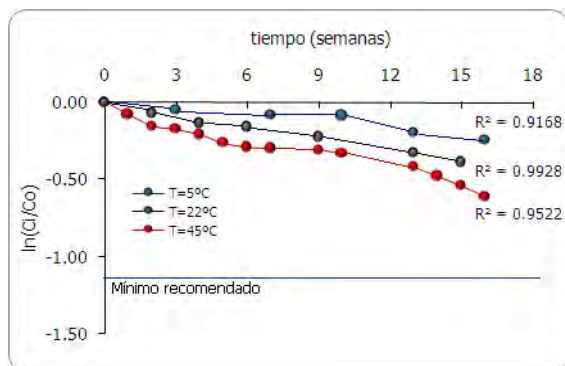


Gráfico 5.4.11. Cinética de primer orden de la pérdida de Vitamina E en alimento para cachorro.

Vitamina	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Retinol	5	0.0555
	22	0.0819
	45	0.1026
Colecalciferol	5	0.0833
	22	0.1062
	45	0.1340
α-tocoferol	5	0.0146
	22	0.0245
	45	0.0311

Tabla 5.4.7 Valores de pendiente (constante de rapidez k) y coeficiente de correlación lineal para todas las temperaturas de la cinética de deterioro de vitaminas liposolubles en alimento para cachorro.

A simple vista los valores de las constantes aumentan con la temperatura lo cual resulta lógico. El análisis estadístico contenido en el Anexo 3 revela que para retinol, la única constante de rapidez distinta es la correspondiente a 45°C.

Para Vitamina D sólo son diferentes entre ellas las $k_{45^{\circ}\text{C}}$ y $k_{5^{\circ}\text{C}}$ ya que ambas son similares cada una a la constante estimada a 22°C.

Vitamina E es la única en este caso cuyas constantes de rapidez difieren de manera significativa una de otra a todas las temperaturas de trabajo.

Con los valores de constante k se realiza el tratamiento de Arrhenius del que se obtiene la representación del Gráfico 5.4.12 a partir de cuyas pendientes se obtienen los datos de la Tabla 5.4.8 de acuerdo a la ecuación 20.

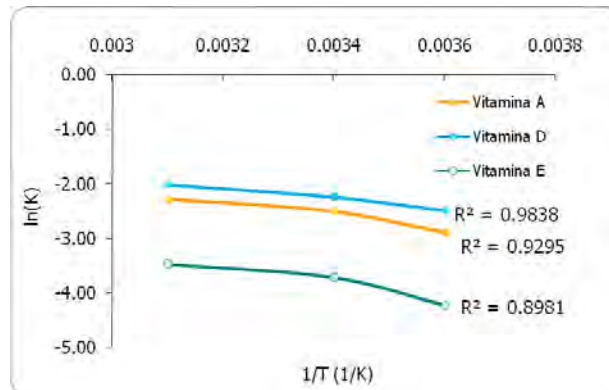


Gráfico 5.4.12. Tratamiento de Arrhenius para la cinética de pérdida de vitaminas liposolubles en alimento para cachorro.

Vitamina	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas ⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Retinol	-1,189.10	9.89	4.26	0.9641
Colecalciferol	-936.91	7.79	2.48	0.9919
α -tocoferol	-1,455.70	12.10	3.00	0.9477

Tabla 5.4.8. Resultados de la aplicación de regresión lineal a las curvas obtenidas a partir del tratamiento de Arrhenius para el deterioro de vitaminas liposolubles en la formulación de alimento para cachorro.

A simple vista la menor energía de activación de las vitaminas liposolubles presentes en el alimento para cachorro corresponde a la Vitamina D que es la que se encuentra en exceso en el alimento. Es decir que de las tres, el colesterciferol es la vitamina más susceptible al deterioro junto con retinol, que actúa como antioxidante aunque no tan potente como el α -tocoferol. Esta última es la vitamina con mayor energía de activación gracias probablemente al fenómeno de regeneración que implica un mayor requerimiento energético para poder llevar a cabo su desaparición, y en cuyo caso el incremento de la temperatura de almacenamiento tiene un efecto significativo en el aumento de la rapidez a la que ocurre su deterioro de acuerdo a lo concluido en el análisis estadístico del Anexo 3.

5.4.2.1 Vitaminas liposolubles en alimento para perro adulto

Se seguirá usando como referencia la Tabla 5.4.6 en la discusión de los resultados obtenidos en alimento para perro adulto.

En esta formulación, el retinol y el α -tocoferol se encuentran dentro de los límites recomendados por la AFFCO, caso contrario para el colesterciferol, que al igual que en la formulación para cachorro, la concentración inicial excede al máximo en poco más de 27 veces.

La cinética de primer orden que describe el deterioro de la Vitamina A muestra que la pérdida de esta vitamina (aún a la temperatura más alta de almacenamiento), se encuentra lejos del límite inferior recomendado. Esto es claro en el Gráfico 5.4.13 construido a partir del tratamiento de los datos contenidos en el Anexo 2.

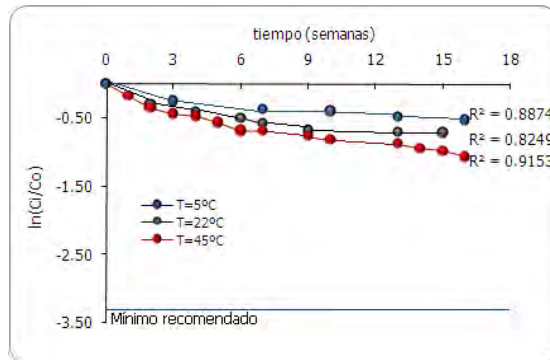


Gráfico 5.4.13. Cinética de primer orden de la pérdida de Vitamina A en alimento para perro adulto.

Como lo muestra el Gráfico 5.4.14 la concentración de Vitamina D se encuentra fuera de los límites recomendados aún dieciséis semanas después de almacenamiento a 45°C, puesto que ninguno de los puntos cae dentro del intervalo indicado entre las líneas azules.

En perros adultos la ingesta crónica de exceso de Vitamina D puede causar la sobrecalcificación de los tejidos blandos del organismo (Case, 2001), lo cual representa un problema grave para la salud de los animales de compañía.

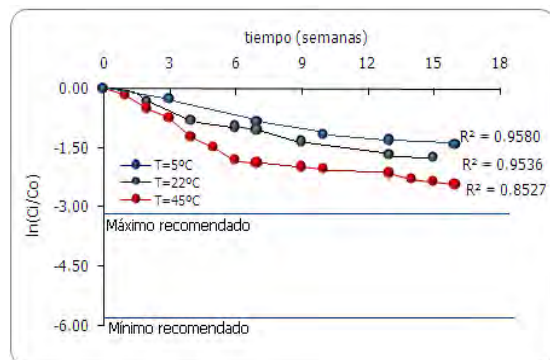


Gráfico 5.4.14. Cinética de primer orden de la pérdida de Vitamina D₃ en alimento para perro adulto.

Se debe tomar en cuenta que el alimento para adulto inicia con un índice de peróxidos mayor que la formulación para cachorro, es decir que desde el tiempo cero, este alimento presentó un grado más avanzado en la oxidación de lípidos, por lo que el antioxidante debió ser parte importante de la reactividad antes en el alimento de adulto

que en el de cachorro. El Gráfico 5.4.15 ilustra la cinética de primer orden para α -tocoferol y la Tabla 5.4.9 reúne los datos de constantes de rapidez para cada vitamina.

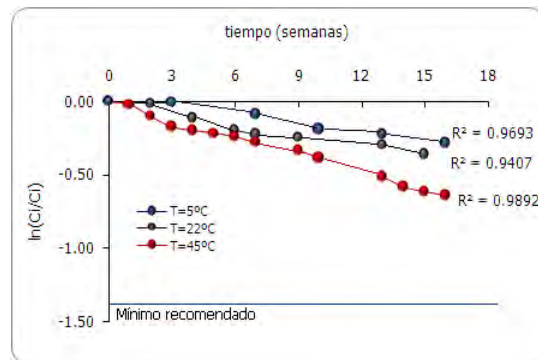


Gráfico 5.4.15. Cinética de primer orden de la pérdida de Vitamina E en alimento para perro adulto.

Vitamina	Temperatura (°C)	k (semanas ⁻¹)
Retinol	5	0.0300
	22	0.0435
	45	0.0558
Colecalciferol	5	0.0939
	22	0.1149
	45	0.1424
α -tocoferol	5	0.0193
	22	0.0243
	45	0.0394

Tabla 5.4.9 Valores de pendiente (constante de rapidez k) para todas las temperaturas de la cinética de deterioro de vitaminas liposolubles en alimento para perro adulto.

Para vitaminas liposolubles en alimento para perro adulto, el análisis estadístico del Anexo 3 indica con un nivel de confianza del 5%, que en el caso de retinol, la única constante k distinta al resto es la concerniente al almacenamiento a 5°C.

Vitaminas D y E, presentan diferencia significativa sólo para la constante a 45°C.

Es decir que la rapidez de pérdida de la Vitamina A disminuye de manera significativa al almacenar a 5°C, pero a más de 22°C, su rapidez de descomposición prácticamente no cambia aún al elevar la temperatura hasta 45°C. Sin embargo, la rapidez de pérdida tanto de Vitamina D como E no se ve disminuida de forma significativa al reducir la temperatura por debajo de 22°C, pero sí existe aceleración al elevar la temperatura por arriba de la ambiente.

Con los datos calculados de las constantes es posible hacer el tratamiento de Arrhenius que se muestra en el Gráfico 5.4.16.

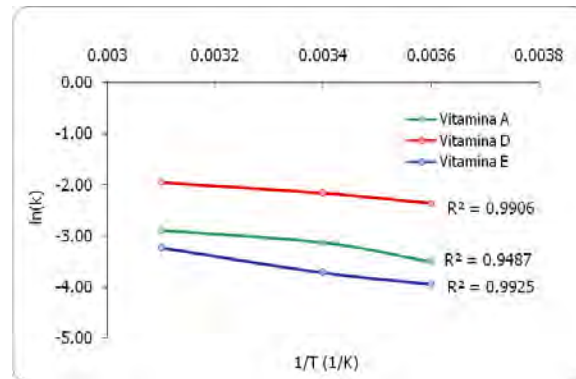


Gráfico 5.4.16. Tratamiento de Arrhenius para la cinética de pérdida de Vitaminas liposolubles en alimento para perro adulto.

Vitamina	-Ea/R	Ea (kJ/mol)	A (semanas ⁻¹)	Coefficiente de correlación lineal R
Retinol	-1,208.70	10.05	2.44	0.9740
Colecalciferol	-823.54	6.85	1.84	0.9953
α-tocoferol	-1,441.80	11.99	3.39	0.9962

Tabla 5.4.10. Resultados de la aplicación de regresión lineal a las curvas obtenidas a partir del tratamiento de Arrhenius para el deterioro de vitaminas liposolubles en la formulación de alimento para perro adulto.

Las energías de activación que se observan en la Tabla 5.4.10, requeridas para la desaparición de todas las liposolubles son muy parecidas en ambas formulaciones.

La energía de activación más alta en ambos alimentos es la correspondiente a la Vitamina E gracias a la regeneración, seguida del retinol y por último el colecalciferol.

Cabe mencionar que la descomposición de las vitaminas liposolubles se liga estrechamente al deterioro del material lipídico y a la eficiencia de los antioxidantes naturales o añadidos.

5.5 EVALUACIÓN INSTRUMENTAL DE COLOR

El color es el primer contacto que tiene el consumidor con el alimento y es de gran importancia en la decisión de compra y consumo de un producto. En este trabajo, la evaluación instrumental de color se realiza con el fin de obtener información sobre el efecto de la temperatura sobre este parámetro de calidad.

El alimento contiene croquetas color amarillo y rojo. El extracto con éter de petróleo de aquellas color amarillo resultó traslúcido y la evaluación fue fácil de realizar. Por otro lado, fue imposible llevar a cabo la extracción de color de las croquetas rojas con solventes orgánicos debido a que se trata de un colorante hidrosoluble, el problema resultó en que la extracción acuosa o con solución de ácido tricloroacético siempre fue turbia, por lo que se decidió trabajar únicamente con la fracción color amarillo.

El barrido espectrofotométrico de 200-700 nm permite identificar además de las variaciones de absorción en la fracción visible del espectro (380-700 nm), cambios en la región ultravioleta (200-380nm), que permite detectar el salto de electrones de un orbital de menor energía a uno de mayor en moléculas con dobles enlaces conjugados, por lo que hace posible la detección de su formación o desaparición en las moléculas reactivas del alimento (Mc Murry, 2008).

La longitud de onda de máxima absorbancia en esta fracción colorida, tal y como lo muestran los Gráficos 5.5.1 y 5.5.2, se encuentra a 440 nm en ambas formulaciones, que coincide con la $\lambda_{\text{máx}}$ para carotenoides¹ tales como el β -caroteno y la luteína (Coultrate, 1984).

Las escalas cambian de una formulación a otra debido a que las croquetas para cachorro contienen mayor cantidad de colorante perceptible aún a simple vista por comparación entre ambas muestras.

¹ Los pigmentos de tipo carotenoide se dividen en dos grupos principales: los carotenos como el β -caroteno y el licopeno, que son estrictamente hidrocarburos y proporcionan coloración naranja; y las xantofilas como la luteína y la capsantina que contienen oxígeno y son los pigmentos predominantes de los tejidos amarillos.

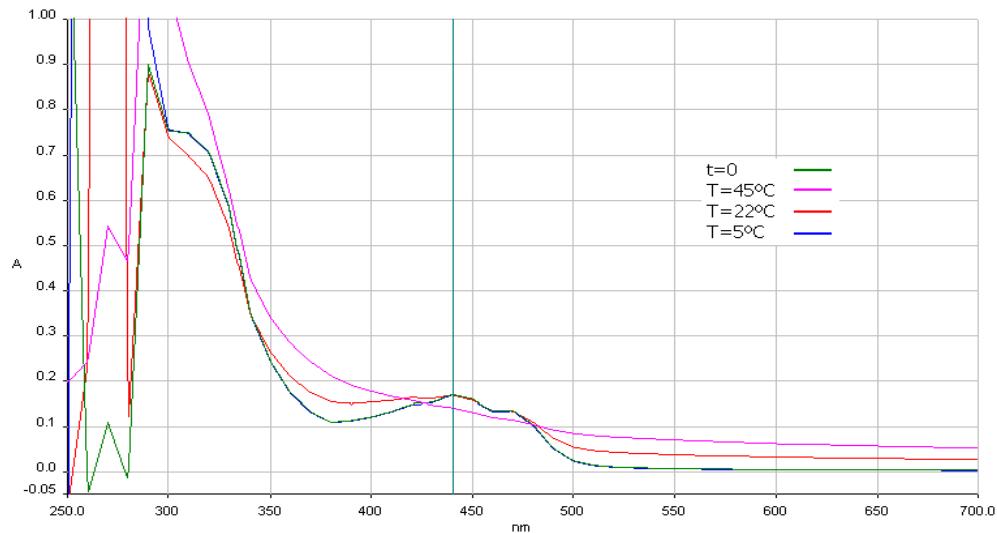


Gráfico 5.5.1. Barrido espectrofotométrico de la fracción amarilla de alimento para cachorro donde A son unidades de absorbancia.

En el Gráfico 5.5.1 se observa cómo a la longitud de onda de máxima absorción elegida dentro de la fracción visible del espectro en 440 nm, prácticamente se superponen todas las curvas a excepción de la correspondiente a 45°C, que presenta el menor valor de absorbancia a esta longitud de onda.

Destaca el comportamiento de las curvas a $\lambda=500$ nm en adelante donde se separan las rectas y a mayor temperatura se observa mayor intensidad de respuesta en las longitudes de onda características de máxima absorbancia de los colorantes más comunes utilizados en alimentos responsables de dar tonalidades rojas, verdes y azules (Madrid y Madrid, 2000). Las únicas que no logran separarse de la línea base $A = 0$ son el barrido a la muestra de $t=0$ y el de la muestra almacenada a 5°C.

Por otro lado, en la región de UV, por debajo de 380 nm, se observa un aumento en la absorción a 45°C posiblemente debido a la formación de nuevos dobles enlaces conjugados producto de la reactividad proveniente de la auto-oxidación del material lipídico. Esto tiene lógica puesto que el colorante se extrajo con un disolvente orgánico por lo que presenta naturaleza lipídica.

Las curvas correspondientes a tiempo cero y almacenamiento a temperatura de refrigeración se mantienen muy cercanas en todo el barrido, lo que indica que de las tres, 5°C es la temperatura a la que el color se afecta en menor grado.

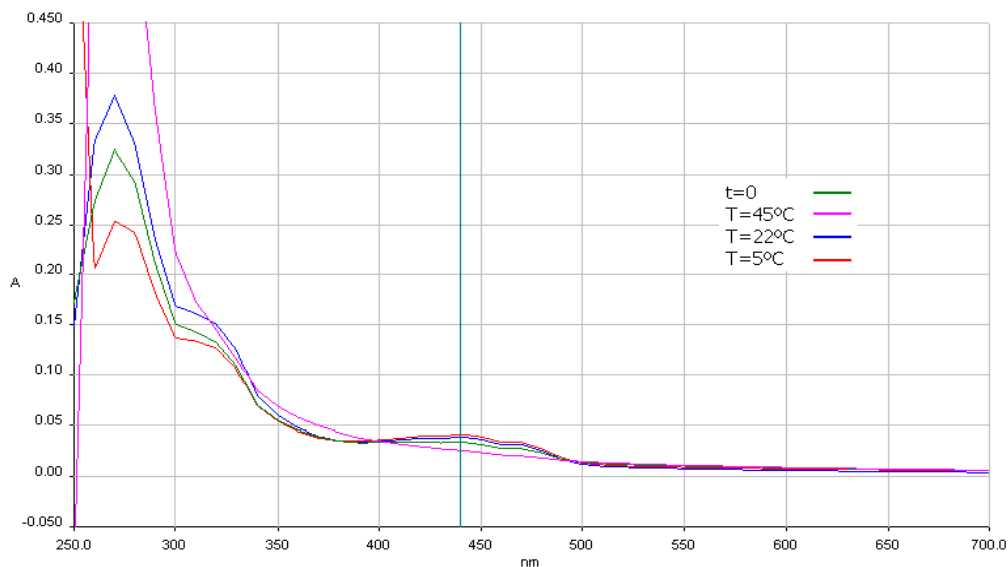


Gráfico 5.5.2. Barrido espectrofotométrico de la fracción amarilla de alimento para perro adulto donde A son unidades de absorbancia.

En los barridos de alimento para perro adulto ilustrados en el Gráfico 5.5.2, a la $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción (440 nm), nuevamente es la muestra almacenada a 45°C la que presenta una menor absorción. Las curvas correspondientes al almacenamiento a temperatura ambiente y refrigeración muestran una mayor absorción a esa misma longitud, lo que puede deberse a un cambio en la eficiencia de la extracción y no necesariamente a un aumento en la intensidad del color.

De 500-700 nm, a diferencia de lo observado en alimento para cachorro, las curvas se traslapan unas con otras, y antes de 400nm, en la región UV las curvas se separan de nuevo, mostrando claramente en la región de 250-320nm aproximadamente, una elevada absorción en la muestra a 45°C, seguida por la de 22°C y tiempo cero. La muestra almacenada a 5°C presenta una absorción menor que el resto a esta longitud de onda, indicando una disminución en moléculas responsables de la absorción a estas longitudes tales como aquellas que poseen dobles enlaces conjugados en su estructura.

La Tabla 5.5.1 contiene las absorbancias medidas a 440nm en cada una de las muestras.

Temperatura	Muestra	Absorbancia	% Cambio
t=0	Cachorro	0.1790	---
	Adulto	0.0344	---
45°C	Cachorro	0.1479	-17.37
	Adulto	0.0291	-15.41
22°C	Cachorro	0.1779	-0.61
	Adulto	0.0358	4.07
5°C	Cachorro	0.1793	0.18
	Adulto	0.0361	4.94

Tabla 5.5.1. Absorbancias a la $\lambda_{\text{máx}}=440$ nm de las muestras almacenadas a diferentes temperaturas y el porcentaje de cambio a tiempo final.

Se considera que los porcentajes de cambio negativos corresponden a pérdida de coloración, y los positivos a un aumento en la intensidad del mismo, y que cuando el porcentaje de cambio es muy pequeño (menor al 5%), ocurre debido al error por extracción, es decir que en estas muestras no hay cambio en la intensidad de color con respecto a las muestras de tiempo cero. Tal es el caso de las muestras de ambos alimentos almacenados a 5°C y a 22.

Los cambios más notorios se dieron en los lotes almacenados a 45°C en ambas formulaciones de alimento, cuyo porcentaje de pérdida de coloración es mayor al 15%. El hecho de que la estabilidad del aditivo se vea afectada con el almacenamiento a temperaturas altas confirma la suposición de que se utilizan colorantes de tipo carotenoide para conferir tonos amarillos a las croquetas.

El porcentaje de pérdida es a simple vista, mayor en cachorro que en adulto, lo que posiblemente esté relacionado con la mayor rapidez de reacción de formación de peróxidos a 45°C en la primera formulación con respecto a la segunda, comprometiendo así en mayor medida la estabilidad del carotenoide dando como resultado su decoloración.

No se realizó análisis estadístico debido a que no se cuenta con triplicado de las determinaciones.

5.6 CÁLCULO DE LA VIDA ÚTIL

Se lleva a cabo el cálculo de la vida útil con respecto al componente del alimento que representa la pérdida más importante en el tiempo de almacenamiento en función de la temperatura.

El Gráfico 5.6.1 es un resumen de las constantes de rapidez que permite evaluar el comportamiento de las cinéticas de deterioro a 22°C con el único fin de hacer un comparativo de estos valores a la temperatura aproximada a la que normalmente será almacenado el producto, para esto se dividen los resultados en macrocomponentes y microcomponentes hidrosolubles y liposolubles.

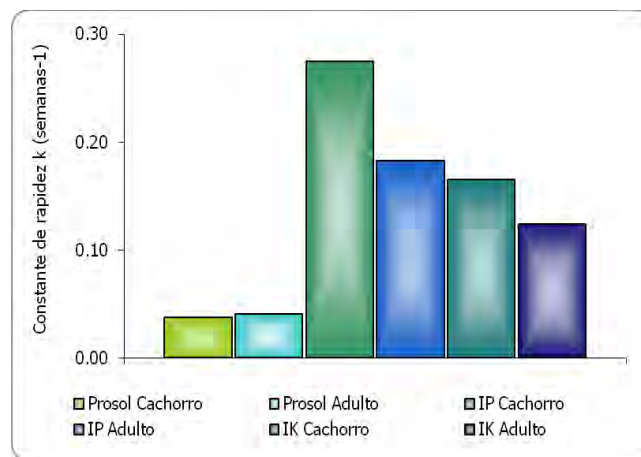


Gráfico 5.6.1. Constantes de rapidez del deterioro de macrocomponentes a 22°C en alimento para mascota.
Prosol: % de proteína soluble, IP: Índice de peróxidos, IK: Índice de Kreis.

Es claro en esta representación gráfica, que las constantes de rapidez de mayor magnitud son las correspondientes a la aparición de peróxidos, es decir que esta reacción ocurre rápidamente con respecto al deterioro de proteína soluble y a la aparición de productos secundarios de la oxidación y que es por tanto la reacción que da la pauta para arrancar la cadena de reacciones responsable del deterioro del resto de los componentes del alimento en ambas formulaciones.

Por otro lado, se observa en los Gráficos 5.6.2 y 5.6.3 el comparativo de las constantes de rapidez correspondientes a los microcomponentes (vitaminas liposolubles e hidrosolubles respectivamente) en ambas formulaciones de alimento para mascota.

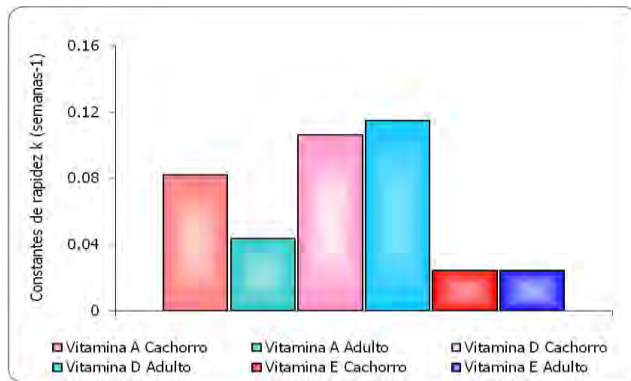


Gráfico 5.6.2. Constantes de rapidez a 22°C del deterioro de vitaminas liposolubles en alimento para mascota.

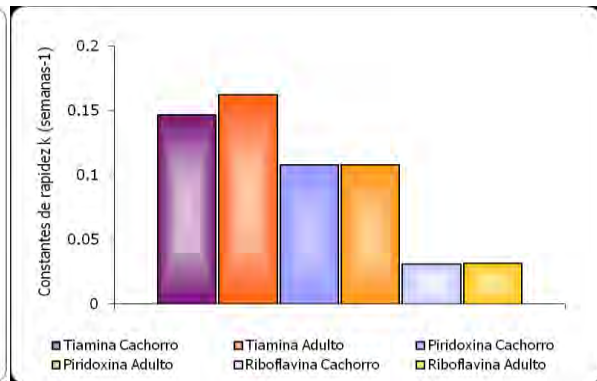


Gráfico 5.6.3. Constantes de rapidez a 22°C del deterioro de vitaminas hidrosolubles en alimento para mascota

En cuanto al deterioro de los microcomponentes y en el caso de las vitaminas liposolubles, es claro que la vitamina que se pierde con mayor rapidez en ambas formulaciones es la Vitamina D, a mayor rapidez en adulto que en cachorro.

La vitamina que le sigue es el retinol, que muestra más estabilidad en la formulación de adulto que en la de cachorro lo que posiblemente esté relacionado con el hecho de que en alimento para cachorro se encuentra facilitada la formación de peróxidos, (tal como se ha hecho notar en el análisis del índice de peróxidos), lo que compromete la estabilidad del retinol ya que tiene función antioxidante.

Por último el α -tocoferol es la vitamina que se pierde con la menor rapidez y tiene prácticamente la misma estabilidad en ambas formulaciones.

De las vitaminas hidrosolubles, aquella que se pierde más rápidamente es la tiamina en ambas formulaciones, aunque en adulto la constante k es de mayor magnitud. En estabilidad le siguen la piridoxina y al último la riboflavina como la más estable de las tres. Para las últimas vitaminas, la rapidez de deterioro es muy similar en ambos alimentos.

Las Tablas 5.5.1 y 5.5.2 contienen los tiempos de vida media y final de cada componente e integran la información necesaria que permite establecer cuál de ellos es el más lábil con base en la energía de activación, para así evaluar el tiempo de vida útil del producto con respecto al limitante.

Con esto se entiende que las reacciones más favorecidas serán aquellas con energía de activación baja, tal es el caso del deterioro de la tiamina y la pérdida de proteína soluble en ambas formulaciones.

Los tiempos de vida media y final se calcularon con base en la ecuación 23:

$$t_u = \ln(C_i/C_o)/k$$

Donde C_o es la concentración inicial, C_i es el mínimo recomendado para cada una de las formulaciones y k es la constante de rapidez establecida a la temperatura dada.

Componente	Temp (°C)	k (semanas ⁻¹)	t _{1/2} (días)	t _f (días)	Ea (kJ/mol)
Macrocomponentes					
Índice de peróxidos	5	0.1637	145.44	196.92	11.15
	22	0.2747	86.67	117.35	
	45	0.3041	78.29	106.01	
Índice de Kreis	5	0.0909	53.41	177.31	21.54
	22	0.1406	34.51	114.66	
	45	0.1993	24.36	80.85	
Proteína soluble	5	0.0355	136.71	454.02	3.57
	22	0.0371	130.76	434.42	
	45	0.0430	112.84	374.85	
Microcomponentes					
Vitamina B ₁ (tiamina)	5	0.1378	35.21	116.97	2.14
	22	0.1469	33.04	109.69	
	45	0.1570	30.87	102.69	
Vitamina B ₆ (piridoxina)	5	0.0358	135.52	450.24	27.19
	22	0.1080	44.94	149.24	
	45	0.1943	24.99	82.95	
Vitamina B ₂ (riboflavina)	5	0.0185	262.29	871.22	10.09
	22	0.0351	138.25	459.21	
	45	0.0380	127.68	424.13	
Vitamina A (retinol)	5	0.0555	87.43	290.43	9.89
	22	0.0819	59.22	196.77	
	45	0.1026	47.32	157.08	
Vitamina D (coleciferol)	5	0.0833	58.24	193.48	7.79
	22	0.1062	45.71	151.76	
	45	0.1340	36.19	120.26	
Vitamina E (α-tocoferol)	5	0.0146	332.36	1,103.97	12.10
	22	0.0245	198.03	657.86	
	45	0.0311	156.03	518.28	

Tabla 5.5.1. Valores de cinéticos para el deterioro de cada uno de los componentes evaluados en alimento para cachorro.

El t_{1/2} se calcula cuando el deterioro alcanza el 50%, y el t_f cuando el deterioro es del 90%. En el caso de IP se calcula t_{1/2} cuando este alcanza un valor de 15 meq/kg y t_f cuando IP=30 meq/kg de acuerdo con lo publicado por Jenkins y Emmons, 1984.

Componente	Temp (°C)	k (semanas ⁻¹)	t _{1/2} (días)	t _f (días)	Ea (kJ/mol)
Macrocomponentes					
Índice de peróxidos	5	0.0774	307.58	416.49	22.06
	22	0.1830	130.10	176.15	
	45	0.2612	91.14	123.42	
Índice de Kreis	5	0.0743	65.31	216.93	22.83
	22	0.1247	38.92	129.22	
	45	0.1736	27.93	92.82	
Proteína soluble	5	0.0331	62.72	208.25	5.63
	22	0.0403	26.53	88.06	
	45	0.0451	18.55	61.67	
Microcomponentes					
Vitamina B ₁ (tiamina)	5	0.1384	35.07	116.48	4.97
	22	0.1623	29.89	99.33	
	45	0.1875	25.90	85.96	
Vitamina B ₆ (piridoxina)	5	0.0592	81.97	272.30	15.92
	22	0.1082	44.87	148.96	
	45	0.1585	30.59	101.70	
Vitamina B ₂ (riboflavina)	5	0.0216	224.63	746.20	7.26
	22	0.0316	153.58	510.09	
	45	0.0343	141.47	469.91	
Vitamina A (retinol)	5	0.0300	161.70	537.25	10.05
	22	0.0435	111.51	340.51	
	45	0.0558	86.94	288.82	
Vitamina D (colecalfiferol)	5	0.0939	51.66	171.64	6.85
	22	0.1149	42.21	140.28	
	45	0.1424	34.09	113.19	
Vitamina E (α-tocoferol)	5	0.0193	251.37	835.10	11.99
	22	0.0243	199.64	663.32	
	45	0.0394	123.13	409.08	

Tabla 5.5.2. Valores de cinéticos para el deterioro de cada uno de los componentes evaluados en alimento para perro adulto.

El t_{1/2} se calcula cuando el deterioro alcanza el 50%, y el t_f cuando el deterioro es del 90%. En el caso de IP se calcula t_{1/2} cuando este alcanza un valor de 15 meq/kg y t_f cuando IP=30 meq/kg de acuerdo con lo publicado por Jenkins y Emmons, 1984.

Como se conoce el límite inferior de vitaminas permitido por la AFFCO (Asociación Americana de Oficiales de Control de Alimentos), es posible para estos fines establecer el tiempo de almacenamiento en el que la vitamina más lábil (tiamina en ambos

alimentos) se pierde al punto de que es imposible garantizar el cumplimiento de lo indicado en la etiqueta mermando de este modo en la calidad de los productos.

Se realiza el cálculo de vida útil para ambas formulaciones con respecto a la vitamina hidrosoluble más inestable, con el fin de cumplir con los estándares. Como la tiamina sigue una cinética de primer orden, la ecuación que corresponde al cálculo de la vida útil será nuevamente la ecuación 23.

A 45°C la constante de rapidez correspondiente al deterioro de tiamina en alimento para cachorro es de 0.1570 semanas⁻¹, por lo que el tiempo de vida útil estimado cuando la concentración de esta vitamina es de 0.095 mg/100g (que corresponde el mínimo recomendado por la AAFCO) será:

$$t_u = (\ln C_o - \ln C_i) / k = \ln(3.29) - \ln(0.095) / 0.1570 = 22.58 \text{ semanas} = 158.06 \text{ días}$$

Es decir que después de 158.06 días de almacenamiento a 45°C, la concentración de tiamina en el alimento para cachorro alcanza el mínimo recomendado.

A continuación se calcula la vida útil a 35°C con ayuda del gráfico de Arrhenius para posteriormente obtener el valor del factor Q₁₀ (Q₁₀ = t_{u,T}/t_{u,T+10}) que facilitará la estimación de la vida útil a cualquier temperatura.

El valor del factor Q₁₀ para la formulación de alimento para cachorro es de 1.0350, y para perro adulto es de 1.0800. Con estos valores es posible construir la Tabla 5.5.3 de tiempo de vida útil en función de la desaparición de tiamina con respecto a la temperatura.

Temperatura (°C)	Vida útil (días)	
	Cachorro	Adulto
45	158.06	119.84
35	163.59	129.43
25	169.32	139.78
15	175.24	150.97
5	181.38	163.04

Tabla 5.5.3 Vida útil calculada para ambas formulaciones a distintas temperaturas con base en la pérdida de tiamina.

Los tiempos de vida media de ambas formulaciones son parecidos, pero muy bajos también, lo que se acentúa en el alimento para adulto. El acortamiento en la vida útil de esta formulación puede asociarse a su menor concentración inicial de Vitamina B₁ (27% menos tiamina en adulto que en cachorro), lo que se relaciona, con el hecho de que en esta formulación a 45°C se alcanza el mínimo recomendado después de 15 semanas de almacenamiento, no así en el alimento para cachorro.

A temperatura ambiente (25°C), que es la temperatura a la que normalmente se almacena este tipo de alimentos, la garantía de que la formulación para cachorro cumple con los límites inferiores de contenido vitamínico establecido por la AAFCO es de solamente alrededor de 170 días (aproximadamente 6 meses) y de 140 días (aproximadamente 5 meses) en alimento para adulto con el empaque aún sin abrir perfectamente sellado. Se sabe que es una práctica común en los pequeños puntos de venta de alimento para mascota *a granel* que los envases son abiertos y el alimento expuesto a luz del sol y al aire, lo que acorta esta vida útil calculada.

Los valores de Q_{10} son también muy bajos, por lo que los tiempos de vida media aumentan muy poco con la disminución de temperatura, esto acorde al análisis estadístico que reveló la no diferencia significativa entre las constantes de rapidez a temperaturas bajas para tiamina, por lo que el almacenamiento en refrigeración no representa una ventaja importante con respecto al almacenamiento a temperatura ambiente cuya ventaja es que no requiere el gasto extra de energía que se emplea en el equipo de enfriamiento. Sin embargo, y acorde a la leyenda impresa en el marbete del empaque, no es recomendable mantener el producto almacenado a temperaturas superiores a 22-25°C, pues varios componentes del alimento son susceptibles a un incremento importante en las rapidezces de reacción de deterioro conforme aumenta la temperatura por arriba de este intervalo.

Como se conocen las constantes del resto de las vitaminas y se cuenta con los gráficos de Arrhenius de todas ellas, vale la pena evaluar si es que al tiempo previsto se encuentran presentes en las cantidades especificadas el resto de los nutrientes reportados en la etiqueta. El objetivo es garantizar que el alimento siga cumpliendo con los valores establecidos por la AAFCO tal y como indica la leyenda en el empaque.

En la Tabla 5.5.4 se encuentran los datos obtenidos para las dos formulaciones evaluadas a temperatura de 25°C.

La concentración C_i al tiempo de vida útil t_u cuando las reacciones de deterioro siguen una cinética de primer orden se calcula de la siguiente manera (despejando de la ecuación 23):

$$C_i = C_o e^{(t u k)} \quad (25)$$

Donde C_0 es la concentración inicial, t_u es el tiempo de vida útil a 25°C y k es la constante de rapidez a la misma temperatura.

Componente	Cachorro		Adulto	
	Mínimo AFFCO	Calculado	Mínimo AFFCO	Calculado
Piridoxina (mg)	0.095	0.764	0.096	4.639
Riboflavina (mg)	0.208	0.067	0.210	0.444
Retinol (μ g)	141.91	629.05	143.53	1,700.00
Colecalciferol (μ g)	1.18	23.68	1.20	32.11
α -tocoferol (mg)	3.17	6.60	3.21	8.12
Índice de peróxidos (meq/kg)	---	153.99	---	15.25
Índice de Kreis (Uabs/g)	---	22.72	---	13.49
Proteína soluble (%)	---	1.14	---	1.21

Tabla 5.5.4 Concentración de vitaminas hidro y liposolubles por cada 100g de alimento en base húmeda en el tiempo de vida útil calculado a 25°C y valores calculados para el deterioro de macrocomponentes.

Es claro que al tiempo de vida útil estimado para la formulación de adulto a 25°C (139.79 días), todas las vitaminas se encuentran por arriba del mínimo, caso contrario para la formulación de cachorro donde al tiempo de vida útil estimado (169.33 días), la riboflavina se pierde hasta quedar por debajo del mínimo.

En la formulación para cachorro, al ser la vida de anaquel estimada más larga, se dispara el índice de peróxidos pudiendo provocar a este tiempo olores y sabores objetables para los animales, lo que podría ocasionar su rechazo, aunque de acuerdo a lo publicado por Jenkins y Emmons en 1984, en un estudio realizado en leche de reemplazo para ternera, los valores altos de Índice de peróxidos en la dieta (hasta 100 meq/kg grasa), no tiene repercusiones graves en el organismo del animal siempre y cuando no se asocie a una deficiencia de Vitamina E.

Destaca en ambos casos que la Vitamina D aún después de este tiempo de almacenamiento se encuentra casi diez veces por arriba del máximo en ambos alimentos.

6. CONCLUSIONES

Ha sido posible establecer el tiempo de vida útil de dos formulaciones de alimento para mascota con base en el componente más labil. Se ha hecho notar que este parámetro puede variar en función del indicador con base en el que se calcule.

La oxidación lipídica es la reacción que dispara la reactividad en el alimento.

La estabilidad de todos los componentes del alimento depende de la temperatura de almacenamiento y en todos ellos las reacciones de deterioro evaluadas siguen una cinética de primer orden, excepto el porcentaje de digestibilidad *in vitro*, para cuyo caso no se encontró correlación lineal entre las variables porcentaje de digestibilidad-tiempo.

La estabilidad de las vitaminas (tanto hidrosolubles como liposolubles), manifestada en función de las constantes de rapidez con respecto a la temperatura, varía en cada una de las formulaciones. En ambas formulaciones, la tiamina es la vitamina más susceptible al deterioro.

La pérdida de solubilidad fue una de las reacciones más afectadas durante el almacenamiento, donde se involucran cambios conformacionales de las proteínas así como un aumento en su peso molecular a todas las temperaturas de trabajo pero de manera más notoria a 45°C de acuerdo a lo observado en el estudio electroforético.

La estabilidad de los carotenoides responsables de la pigmentación en la fracción amarilla de alimento para mascota se vio afectada tanto por la temperatura de almacenamiento como por la oxidación del material lipídico.

De este trabajo se desprende la recomendación de disminuir la concentración de Vitamina D en ambas formulaciones hasta los límites permitidos e incrementar la concentración de riboflavina en alimento para cachorro y tiamina en alimento para adulto, así como el controlar el espacio de cabeza de las bolsas en ambos productos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Albalá, S. Veciana, T. Izquierdo, M. Mariné, A. (1997). Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 778, 247-253.
- A.O.A.C. 1995. Vitamins and other nutrients. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. Internacional 16th Edition. Arlington, Virginia, USA.
- Avery, H. Cinética química básica y mecanismos de reacción. Editorial Reverté S.A. Barcelona, España. 1982.
- Badui, S. Química de los alimentos. Editorial Alambra, 4ª edición, México, D.F. 2006.
- Bureau, G. Multon, J. Embalaje de los alimentos de gran consumo. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1995.
- Case, L. Nutrición canina y felina. Editorial Harcourt, 2ª edición. Madrid, España, 2001.
- Chang, R. Fisicoquímica para las ciencias químicas y biológicas. Editorial Mc Graw-Hill, 3ª edición. México, D.F., 2008.
- Charalambous, G. (ed) (1993) Shelf life studies of foods and beverages: Chemical, biological, physical, and nutritional aspects, *Elsevier Amsterdam*, Holanda.
- Coultate, T. Alimentos: Química de sus componentes. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1984.
- Crowe, T. White, P. (2001). Adaptation of the AOCS Official Method for Measuring Hydroperoxides from Small-Scale Oil Samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 1267-1269.
- Damodaran, S., Paraf, A. Food proteins. At review. Food proteins and their applications. Marcel Dekker Inc. USA. 1997.
- Fennema, O. Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc., 3ª edición. Barcelona, España, 1996.
- Ge, Y. Sun, A. Ni, Y. Cai, T. (2000) Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 , 6215-6218.

- Gray, J. (1978) Measurement of lipid oxidation: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55, 539-546.
- Hand, M. Thatcher, C. Nutrición clínica en pequeños animales. Mark Morris Associates, 4ª Edición. Santa Fé de Bogotá, Colombia, 2000.
- Horn, R. Bronikowski, J. (1979) Economics of extrusion processing. *Cereal Fds. World*, 24, 140-141.
- Jenkins, J. Emmons, D. (1984) Tolerance of calves to fat peroxides in milk replacer. *Journal of Dairy Science*, 67, 592-597.
- Ledesma, "Caracterización de fracciones de proteínas de la semilla de chía (*Salvia hispanica*)" (Tesis Universidad Nacional Autónoma de México, 2008), 30-31.
- Lowry, H. Rosebrough, N. Lewis, E. Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 28, 265-275.
- Madrid, A. Madrid, J. Los aditivos en los alimentos según la unión europea y la legislación española. Ediciones AMV. Madrid, España, 2000.
- Man, C. Jones, A. Shelf life evaluation of foods. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido. 1994.
- Mc Murry, J. Química Orgánica. Editorial Cengage Learning Editores S.A., 7ª edición. México, D.F., 2008.
- Pedrero, P. Fisicoquímica para farmacia y biología. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., Barcelona, España. 1992.
- Pita, G. (1997). Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev Cubana Alimentacion y Nutricion*, 11, 46-57.
- Qian, H. Sheng, M. (1998). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, 825, 127-133.
- Salinas, R. Pirovani, M. Montejó, F. González, G. (2007) Modelación del deterioro de productos vegetales frescos cortados. *Universidad y Ciencia*, 23, 183-196.
- Schagger, H. von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379.

- Socarras, S. Magari, R. (2008) Modeling the effects of storage temperature excursions on shelf life. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 221-226.
- Wheatley, R. (2000) Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in Analytical Chemistry*, 19, 617-628.
- Yizhong, C. (2001) Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 4429-4435

Anexo 1 Materiales y metodología

A1.1 Análisis Químico Proximal

A1.1.1. Determinación de proteína cruda por el método de Kjeldahl

Se pesaron de 0.1-0.5 g de muestra homogeneizada en papel libre de nitrógeno y se colocó en un tubo para digestión de 100 mL. Se añadió una pastilla de Kjeltabs catalizador y 5 mL de ácido sulfúrico.

* Digestión: Se colocó el tubo en el digestor a 420°C hasta total digestión de la materia orgánica y observar coloración azul-verdosa. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.

* Destilación: Se conectó el tubo al equipo de destilación y se agregaron 50 mL de una solución de hidróxido de sodio al 40%.

Se recolectó un volumen de 100 mL en 50 mL de ácido bórico al 4% con mezcla de indicadores (fenoftaleína 3.4×10^{-3} %, verde de bromocresol 3.3×10^{-4} % y rojo de metilo 6.6×10^{-4} %).

Finalmente la solución se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N valorado.

El cálculo del porcentaje de proteína cruda o total se realizó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\%N = (V_m - V_b) \times 0.014 \times N_{HCl} \times 100 / m$$

$$\%P = \%N \times 6.25$$

Donde V_m es el volumen de HCl gastado en la muestra, V_b es el volumen empleado para titular el blanco, 0.014 son los miliequivalentes de NaOH, N_{HCl} es la normalidad del ácido y m es el peso de la muestra en gramos.

6.25 es el factor de conversión del porcentaje de nitrógeno en porcentaje de proteína (AOAC 1995).

A1.1.2. Determinación de humedad por el método de secado en estufa

Se pesaron de 2-3 g de muestra homogeneizada en pesafiltro a peso constante (2 horas a 130°C). La muestra fue secada en estufa a 100-110 °C y se dejó enfriar en desecador. Tan pronto se equilibró la temperatura, la muestra fue pesada. La operación de secado se repitió hasta conseguir peso constante (AOAC, 1995).

A1.1.3. Determinación de grasa cruda por el método de Goldfish

Se pesaron de 4-5 g de muestra homogeneizada sobre papel poroso y se formó un paquete que se colocó dentro del cartucho de celulosa que se tapó con algodón. El cartucho se colocó en un tubo con fondo perforado y fue entonces montado en el equipo.

Se adicionaron aproximadamente 50 mL de éter etílico a un vaso Goldfish a peso constante y se montó en el equipo mediante un anillo de hierro con empaque de hule.

Se calentó durante varias horas hasta extracción completa del material lipídico verificando al dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro que al evaporarse no debía dejar residuo de grasa.

Al finalizar se recuperó el solvente en un tubo sin perforación y el vaso junto con el extracto lipídico, fueron secados en estufa a 100 °C por media hora. Se dejó enfriar en desecador y se pesó (AOAC, 1995).

A1.1.4. Determinación de cenizas totales

Se pesó de 3-5 g de muestra homogeneizada en crisol a peso constante (2 horas en mufla a 200°C).

La muestra fue calcinada con mechero en campana de extracción hasta que ya no se observó la emisión de humos.

Los crisoles fueron colocados en la mufla durante dos horas a una temperatura máxima de 550°C hasta la obtención de cenizas blancas homogéneas o grises. Los crisoles se dejaron enfriar en desecador y fueron pesados (AOAC, 1995).

A1.2 Determinaciones realizadas en cada monitoreo

A1.2.1. Determinación de vitaminas del Complejo B

Para la extracción de las vitaminas, se pesaron 10 g del alimento homogeneizado y se dispersaron en 50 mL de HCl 0.1N con agitación en un homogeneizador a 8000 rpm por 10 min, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se aforó a 50 mL seguido de una filtración en acrodiscos con poro de 0.45 µm.

La cuantificación de piridoxina, tiamina y riboflavina se realizó simultáneamente en un equipo Waters 515 acoplado a un detector Waters UV-Vis 2487 ($\lambda = 254$ nm) y a un

detector de Fluorescencia Waters 454 ($\lambda_{\text{excitación}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 565 \text{ nm}$). La separación se realizó con una columna Thermo Scientific Hypersil ODS (150 x 4.6 mm), la fase móvil fué hexansulfonato de sodio/n-metanol (85:15) y un flujo de 0.6 mL/min. (Albalá, 1997).

A1.2.2. Determinación de vitaminas liposolubles

Para la extracción de vitaminas liposolubles, se pesaron 10 g del alimento en un matraz de yodo al que se añadió 7 g de hidróxido de potasio, 30 mL de agua destilada a 45-50°C, 60 mL de alcohol etílico absoluto y 0.5 g de ácido ascórbico como antioxidante. La mezcla se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.

La extracción del material insaponificable se realizó con cinco lavados sucesivos de 50 mL de n-hexano en embudo de separación y el posterior lavado del pool de fase orgánica con fracciones de 100 mL de agua hasta que ésta no dio reacción colorida con fenoftaleína.

La solución lavada se filtró con 5 g de sulfato de sodio anhidro y el embudo se lavó con 50 mL de n-hexano.

Se evaporó el disolvente a presión reducida con un rotavapor a 40°C hasta sequedad. El residuo fue resuspendido en 3 mL de metanol grado HPLC y se hizo pasar a través de un filtro de 0.45 μm de tamaño del poro.

Las vitaminas A (retinol), D₃ (colecalfiferol) y E (a-tocoferol) se determinaron de manera simultánea por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en Cromatógrafo Beckman System Gold, detector UV $\lambda=325 \text{ nm}$, columna Thermo Scientific Hypersil ODS (150 x 4.6 mm), fase móvil metanol y flujo 1 mL/min (Qian, 1998).

A1.2.3. Determinación del Índice de Peróxidos por micrométodo

Se realizó la extracción de la fracción lipídica transfiriendo 50 g del alimento molido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y adicionando 50 mL de diclorometano. Se agitó durante 15 minutos y se recuperó la fase orgánica por filtración rápida. La extracción se repitió cuatro veces más. Se juntaron los extractos y evaporó el disolvente en rotavapor a 35°C.

Al extracto lipídico obtenido se le determinó la cantidad de peróxidos pesando 0.5 ± 0.05 g de aceite en matraz Erlenmeyer de 125 mL al que se adicionó 2.5 mL de una mezcla de ácido acético/cloruro de metileno 3:2 y 0.05 mL de solución saturada de yoduro de potasio. La mezcla se dejó reposar en la oscuridad por 60 segundos.

Una vez transcurrido el tiempo, se añadió 7.5 mL de agua desionizada hervida y fría y 0.1 mL de solución de almidón.

La solución colorida en azul se tituló lentamente con tiosulfato de sodio 0.001N valorado hasta desaparición total del color.

La cuantificación se basa en la reacción del yoduro de potasio con los peróxidos para liberar yodo, el cual es inmediatamente titulado con tiosulfato de sodio, empleando almidón como indicador.

El Índice de peróxidos se obtiene calculando los miliequivalentes de tiosulfato gastados en la titulación/kg de grasa.

$$IP = \text{mL tiosulfato} \times N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times 1000 / m$$

Donde m es el peso de la muestra en gramos y $N_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$ es la normalidad del tiosulfato valorado (Crowe, 2001).

A1.2.4. Determinación del Índice de Kreis

Se disolvieron 0.05 ± 0.005 g de extracto lipídico en 5 mL de cloruro de metileno y se añadieron 10 mL de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 1 mL de fluoroglucinol al 1% en ácido acético glacial agitando perfectamente en cada adición.

Las muestras se incubaron durante 15 minutos en baño maría a 45°C. Una vez transcurrido el tiempo, se dejó enfriar y se adicionaron 4 mL de alcohol etílico al 96%.

La absorbancia fue medida a 540 nm frente a blanco de reactivos.

El método implica la formación de un color rojo cuando el fluoroglucinol reacciona con el epihidrin aldehído (un isómero del malonaldehído) u otros productos aldehícos de la oxidación en medio ácido.

El índice de Kreis se reporta como unidades de absorbancia a 540 nm / gramos de material lipídico (Gray, 1978).

A1.2.5. Extracción y cuantificación de proteína soluble

Se homogeneizaron 10 g de muestra desengrasada hasta que pasó por malla 40 y se agitó durante 10 min con 50 mL una solución de cloruro de sodio 1.0 M a temperatura ambiente. Terminado este tiempo, se ajustó el pH a 9.5 con hidróxido de sodio 1.0 M con agitación continua durante otros 15 min. El volumen obtenido se centrifugó a 15,000 rpm durante 20 min y el sobrendante se aforó a 50 mL con agua destilada (Ge, 2000).

La cuantificación de proteína soluble se realizó colocando 1 mL de muestra en un tubo de ensaye de tamaño adecuado más 1 mL de reactivo de cobre alcalino (50 mL de una solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N) y 1 mL de solución de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% en tartrato doble de sodio y potasio al 1%.

La mezcla se agitó y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Una vez transcurrido ese tiempo, se adicionaron 0.5 mL de una dilución 1:5 de reactivo de Folin- Ciocalteau (ácido fosfomolibdotúngstico), y se dejó reposar la mezcla durante 30 min.

Transcurrido este tiempo, la muestra fue leída en espectrofotómetro a 750 nm frente a blanco de reactivos (Lowry, 1951).

Para conocer la concentración de proteína soluble en los tubos, se interpoló en curva patrón de albúmina con cinco puntos que abarcaron desde 5-100 $\mu\text{g/mL}$. La muestra fue diluída 1:100 para evitar que se saliera de los valores obtenidos en la curva.

La técnica se fundamenta en que los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos tienen un color azul claro y además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción.

El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.

La reducción en medio básico del reactivo de Folin-Ciocalteau, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, ocurre gracias a que el cobre actúa como catalizador. El reactivo de Folin-Ciocalteau de color amarillo al ser reducido por los grupos fenolicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

A1.2.6. Digestibilidad *in vitro*

*Solución enzimática A: 227,040 unidades BAEE de tripsina pancreática con 1,860 unidades BAEE de α -quimiotripsina y 0.520 unidades L-leucin β -naftilamina de peptidasa en 10 mL de agua destilada.

*Solución enzimática B: 65 unidades caseína de proteasa bacteriana en 10 mL de agua destilada.

Se colocó la cantidad calculada de muestra homogeneizada con un contenido de 10 mg de nitrógeno en un vaso con recirculación de agua y agitación constante con barra magnética y se dejó remojar durante una hora. Lo mismo se hizo con una cantidad apropiada de control de caseína preparado suspendiendo 10 g de caseinato de sodio en 200 mL de agua y ajustando el a pH de 8 por más de una hora. El control se mantuvo almacenado en congelación.

Una vez que transcurrió el tiempo, la muestra y el control fueron ajustados con ayuda de un potenciómetro calibrado a pH 8 ± 0.03 con agitación constante y en baño a 37°C por adición de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio según se requirió.

Alcanzado el pH deseado, se adicionó a 37°C 1 mL de solución enzimática A ajustada a pH 8 ± 0.03 a 37°C y colocada después en baño de hielo. Se dejó en agitación la mezcla durante 10 minutos cronometrados. Lo mismo el control y la muestra.

Una vez transcurridos 10 min exactamente, se adicionó 1 mL de solución enzimática B tratada de la misma forma que la otra solución enzimática y se cambió el baño maría a 55°C donde se dejó en agitación durante 9 minutos exactamente.

Luego de ese tiempo, se regresó el baño a 37°C y se permitió que durante un minuto se estabilizara la temperatura, para luego leer el pH en el minuto 20 de haber colocado la primer solución enzimática.

El control de caseína debió tener una lectura de pH de 6.42 ± 0.05 para calcular el porcentaje de digestibilidad como sigue:

$$\% \text{ Digestibilidad} = 234.84 - 22.56(X)$$

Donde X es el pH de la muestra cuando el pH del control es de 6.42 ± 0.05 (AOAC, 1995).

El método se fundamenta en la disminución del pH en la muestra y el control por la hidrólisis enzimática (o digestión) de las proteínas presentes en la muestra.

A1.2.7. Evaluación instrumental de color

Para hacer la extracción de color se trituraron y pesaron 5 g de muestra color amarillo. Se agregaron 25 mL de éter de petróleo y se homogeneizaron en Ultra-turrax a 8,000 rpm durante 1-2 minutos.

Se centrifugo la muestra a 10,000 rpm durante 5 minutos, se filtró y recuperó la fase orgánica. El volumen obtenido se aforó a 25 mL con éter de petróleo.

Al extracto colorido obtenido se le realizó un barrido espectrofotométrico de 200 a 700 nm para identificar los picos de absorción máxima. Se usó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda UV/Vis con celdas de cuarzo de un centímetro (Yizhong, 2001).

A1.2.8 Estudio electroforético sistema Tris-tricina-SDS (TSDS-PAGE)

Soluciones utilizadas en la electroforesis:

Solución acrilamida/bisacrilamida 30% w/v acrilamida y 2.7% bis-acrilamida

Buffer Tris-HCl/SDS 3 M Tris-HCl, 0.3% SDS

Solución de glicerol al 80%

Persulfato de amonio al 10% recién preparado

TEMED

Buffer de cátodo, reservorio superior (100 mM Tris-HCl, 100 mM Tricina, 0.1% SDS)

Buffer de ánodo, reservorio inferior (200 mM Tris-HCl, pH=8.9)

En la Tabla A1.1 se encuentran desglosadas las proporciones de cada reactivo con los que se prepara cada uno de los geles.

	Gel separador 15%	Gel concentrador 4%
Acrilamida	3.75 mL	486 μ L
Buffer Tris-HCl/SDS	2.5 mL	0.93 mL
Agua	0.45 mL	2.335 mL
Glicerol 80%	0.79 mL	---
Persulfato de amonio♣	37.5 μ L	20 μ L
TEMED	8 μ L	8 μ L

Tabla A1.1 Gel separador y concentrador para electroforesis sistema Tris-Tricina-SDS (TSDS-PAGE).
Cantidades calculadas para la elaboración de dos geles SDS-Laemmli Mini gel (10X8 cm).

♣ Recién preparado.

Los geles se montaron en la cámara MINIPROTEAN II de Bio-Rad una vez gelificados y con los pocillos formados. En el reservorio superior se colocó buffer de cátodo hasta

inundar los pocillos y en el reservorio inferior se colocó el buffer de ánodo hasta un poco más de cubrir 1/3 del volumen de la cámara.

Las mezclas de péptidos empleadas como marcadores fueron los de alto peso molecular Bio-Rad 161-0303, ultra bajo peso molecular Bio-Rad M3546 y el marcador de amplio intervalo de peso molecular de SIGMA S8445. Los péptidos que contiene cada uno de los marcadores son los siguientes:

Proteína	Peso molecular (Da)	Alto intervalo (161-0303)	Ultra bajo intervalo (M3546)	Amplio intervalo (S8445)
Miosina de músculo de conejo	200,000	X		X
β -Galactosidasa de <i>E. coli</i>	116,250	X		X
Fosforilasa b de músculo de conejo	97,000	X		X
Albumina de suero bovino	66,000	X		X
Glutámico deshidrogenasa de hígado bovino	55,000			X
Ovalbúmina de huevo de gallina	45,000	X		X
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo	36,000			X
Anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos	29,000			X
Triosa fosfato isomerasa	26,600		X	
Tripsinogeno de páncreas bovino	24,000			X
Inhibidor de tripsina de frijol de soya	20,000			X
Mioglobina de músculo de conejo	17,000		X	
α -Lactoalbumina de leche bovina	14,200		X	X
Aprotinina de pulmón bovino	6,500		X	X
Insulina cadena B	3,496		X	
Bradiquinina	1,060		X	

Tabla A1.2. Relación de pesos moleculares de los marcadores empleados.

La muestra se preparó mezclando 20 μ L de extracto de proteína soluble (que contiene 10 mg/mL de proteína) con 5 μ L de buffer de tratamiento 4X (0.4g de SDS, 5 mL de glicerol, 2.5 mL de buffer Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 400 μ L de azul de bromofenol al 0.5% en etanol, se lleva a 9 mL con agua y se separa en alícuotas de 900 μ L, a las que se añaden 100 μ L de β -mercaptoetanol al momento antes de usarse). Esta mezcla se calentó a ebullición durante 5 minutos para permitir que el β -mercaptoetanol actuara reduciendo los enlaces disulfuro.

Los geles se cargaron con los 25 μ L de mezcla muestra/buffer de tratamiento 4X o con 5 μ L de marcador. Los marcadores que ya contenían buffer como el de amplio intervalo no requirieron la adición de buffer de tratamiento, a los otros dos marcadores se les adicionó de 1 μ L de buffer de tratamiento 4X por cada 5 μ L de marcador.

Se corrió la electroforesis a una intensidad constante de 100 V hasta que se observó la salida del frente colorido en el caso de los geles cargados con marcadores de amplio y alto peso molecular y hasta que el frente recorrió $\frac{3}{4}$ de la distancia del gel para aquel con marcador de ultra bajo peso molecular (Schagger, 1987).

Los geles de tiempo cero se desmontaron y se tiñeron por la técnica de tinción con plata siguiendo las instrucciones del kit *PlusOne DNA Silver Staining* (Amersham Biosciences, 2002), pasos que a continuación se enumeran:

1. Fijación. Se midieron 100 mL de etanol absoluto y se mezclaron con 25 mL de ácido acético glacial mas 125 mL de agua destilada. Los geles se dejaron en esta solución en agitación suave durante 30 minutos.
2. Sensibilización. Se mezclaron 75 mL de etanol absoluto, 10 mL de tiosulfato de sodio al 5% w/v, 17 g de acetato de sodio y se llevó a un volumen de 250 mL con agua. Al momento se añadieron 1.25 mL de glutaraldehído al 25% w/v. Se desechó la solución de fijación y se dejó los geles en solución de sensibilización durante otros 30 minutos.

Al término de este tiempo se realizaron tres lavados con agua destilada de cinco minutos cada uno.

3. Reacción con plata. A 250 mL de una solución al 0.25% w/v de nitrato de plata se le añadió en el momento 0.1 mL de formaldehído al 37% w/v y se colocaron los geles en esta solución durante 20 minutos. Al término de este tiempo los geles fueron lavados dos veces durante un minuto cada lavado.
4. Desarrollo. Se pesaron 6.25 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 250 mL de agua destilada. Al momento se adicionó a la solución 0.05 mL de formaldehído al 37 % w/v. Los geles se sumergieron en esta solución hasta que se observaron bandas bien definidas color café, la reacción debió ser cuidada de cerca para evitar una tinción excesiva.
5. Para detener. Una vez que el gel alcanzó la tinción deseada, la solución de desarrollo fue desechada y los geles suspendidos en una solución que contenía 3.65 g de EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua destilada durante 10 minutos.

Transcurrido este tiempo los geles se lavaron con agua destilada tres veces durante cinco minutos cada lavado.

6. Para preservar. Se colocaron los geles en una solución de glicerol al 8.7 % durante 20 minutos (Amersham Biosciences).

Los geles de tiempo final se desmontaron y se dejaron tiñendo toda la noche con una solución de Coomassie al 0.025% con 40% de metanol y 1% de ácido acético glacial en agua. Al día siguiente los geles fueron desteñidos con una solución 10% de metanol y 10% de ácido acético glacial en agua hasta que se observaron bandas claras (Schagger, 1987).

Por último se determinó el peso molecular de las bandas utilizando el densitómetro modelo GS 700 Bio-Rad y el programa de computadora Quantity-One.

Anexo 2 Resultados globales

A2.1. Formulación de alimento para perro adulto. Monitoreo a 45°C

Tiempo (semanas)	IP (mEq/Kg)	IK (abs/g)	Prosol (%)	Digestibilidad (%)	Vitaminas hidrosolubles			Vitaminas liposolubles			Repetición
					Tiamina (mg/100g)	Piridoxina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	Retinol (ug/100g)	Colecalciferol (ug/100g)	a-tocoferol (mg/100g)	
0	0.53	0.19	2.65					4306.76	307.63	14.47	
0	0.68	0.25	2.70		2.37			4101.85	335.01	13.14	
0	0.53	0.30	2.70		2.39			3535.51	330.07	13.95	
Prom	0.58±0.07	0.25±0.04	2.68±0.02	80.20	2.38±0.01	8.05	0.79	3964.40±360.49	329.56±11.91	13.90±0.54	
1	1.41	0.23	2.02					3452.28	281.75	14.08	
1	0.88	0.23	2.03					3325.42	268.69	13.99	
1	1.01	0.17	2.00					3302.44	279.96	13.16	
Prom	1.10±0.22	0.21±0.02	2.01±0.01	79.53	1.67	5.45	0.72	3360.04±65.89	276.80±5.78	13.74±0.41	
2	2.27	0.22	1.94					2834.63	231.46	12.35	
2	1.95	0.40	1.79					2808.73	176.23	12.68	
2	2.44	0.16	1.84					2706.30	200.67	12.63	
Prom	2.22±0.20	0.26±0.10	1.86±0.06	81.78	1.16	4.51	0.68	2783.22±55.40	202.78±22.59	12.55±0.14	
3	3.04	0.44	1.65					2627.28	142.96	11.74	
3	2.85	0.42	1.48					2539.98	155.74	11.64	
3	2.66	0.49	1.59					2548.76	160.15	11.56	
Prom	2.85±0.15	0.45±0.03	1.59±0.08	78.62	0.72	3.17	0.63	2557.28±46.32	152.95±7.28	11.65±0.09	
4	4.65	0.71	1.49					2427.80	95.27	11.46	
4	4.43	0.78	1.47					2479.73	97.49	11.36	
4	4.63	0.82	1.47					2463.16	98.57	11.26	
Prom	4.57±0.10	0.77±0.04	1.48±0.01	74.56	0.54	2.98	0.60	2456.89±21.65	97.11±0.61	11.36±0.08	
5	3.98	0.81	1.37					2229.86	76.05	11.14	6.00
5	4.05	0.84	1.31		0.48	2.74	0.57	2121.81	74.03	11.26	5.91
5	4.00	0.87	1.24		0.53	2.66	0.59	2352.66	72.76	10.83	6.03
Prom	4.01±0.03	0.84±0.02	1.31±0.05	80.43	0.50±0.04	2.70±0.04	0.57±0.02	2234.78±115.50	74.28±1.35	11.07±0.18	5.98±0.07
6	4.74	0.96	1.35					2014.73	54.75	11.00	
6	5.48	0.88	1.39		0.45	2.29	0.49	2010.74	54.99	10.86	
6	6.83	1.28	1.26		0.48	2.04	0.61	1968.60	53.28	10.91	

Prom	5.68±0.90	1.04±0.21	1.33±0.05	82.01	0.46±0.02	2.16±0.18	0.55±0.08	1998.02±25.56	54.34±0.93	10.92±0.05
7	6.52	1.36	1.31					2004.09	49.56	10.39
7	7.21	1.22	1.26		0.28	0.00	0.53	1969.68	50.58	10.45
7	6.98	1.37	1.28		0.29	0.00	0.52	1996.34	50.91	10.51
Prom	6.90±0.35	1.32±0.08	1.28±0.02	82.91	0.28±0.01	0.00±0.00	0.53±0.01	1990.04±18.05	50.35±0.71	10.45±0.04
9	10.20	1.31	1.16					1843.80	45.28	10.01
9	10.08	1.33	1.22		0.23	0.00	0.49	1835.80	47.17	9.98
9	9.68	1.40	1.22		0.24	0.00	0.47	1845.36	43.41	10.22
Prom	9.99±0.27	1.35±0.05	1.21±0.03	79.30	0.23±0.01	0.00±0.00	0.48±0.01	1841.65±5.13	45.28±1.53	10.07±0.13
10	16.96	1.43						1725.52	44.37	9.40
10	17.10	1.41			0.23	0.00	0.46	1646.16	31.40	9.53
10	18.30	1.49			0.20	0.00	0.50	1821.99	56.68	9.31
Prom	17.45±0.70	1.45±0.04		79.53	0.21±0.02	0.00±0.00	0.48±0.02	1737.89±67.72	43.48±9.91	9.41±0.09
13	35.41	2.76	1.16					1717.07	29.71	8.28
13	35.12	2.75	1.18		0.17	0.00	0.47	1641.33	33.63	8.26
13	34.29	2.79	1.22		0.18	0.00	0.45	1601.73	53.66	8.36
Prom	34.94±0.58	2.77±0.02	1.19±0.03		0.18±0.01	0.00±0.00	0.46±0.01	1653.37±47.87	39.00±12.84	8.30±0.05
14	38.50	2.94	1.23					1537.18	37.14	7.73
14	42.76	3.13	1.14		0.17	0.87	0.50	1565.86	28.05	7.67
14	45.49	3.15	1.17		0.14	0.96	0.39	1542.75	36.10	7.80
Prom	42.25±3.52	3.07±0.12	1.17±0.05	74.11	0.15±0.02	0.90±0.4	0.45±0.08	1548.59±12.41	33.76±4.97	7.73±0.05
15	57.03	3.45	1.14					1533.89	32.91	7.51
15	53.16	3.99	1.06		0.10	0.00	0.46	1481.07	26.02	7.13
15	53.71	4.01	1.10		0.10	0.00	0.43	1466.52	35.35	7.65
Prom	54.63±2.09	3.81±0.32	1.10±0.03	74.11	0.10±0.00	0.00±0.00	0.44±0.02	1493.82±28.94	31.43±4.84	7.43±0.27
16	47.91	4.11	0.92					1413.84	29.25	7.23
16	45.57	4.18	0.95		0.06	0.00	0.44	1320.74	27.98	7.14
16	48.99	4.12	0.92		0.09	0.00	0.43	1341.37	30.84	7.29
Prom	47.49±1.75	4.14±0.04	0.93±0.01	76.82	0.07±0.02	0.00±0.00	0.44±0.01	1358.65±48.90	29.36±1.43	7.22±0.08

A2.2. Formulación de alimento para perro adulto. Monitoreo a 22°C

Tiempo (semanas)	IP (mEq/Kg)	IK (abs/g)	Prosol (%)	Digestibilidad (%)	Vitaminas hidrosolubles			Vitaminas liposolubles		
					Tiamina (mg/100g)	Piridoxina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	Retinol (ug/100g)	Colecalciferol (ug/100g)	a-tocoferol (mg/100g)
0	0.53	0.19	2.65					4306.76	307.63	14.47
0	0.68	0.25	2.70		2.37			4301.85	335.01	13.14
0	0.53	0.30	2.70		2.39			3535.51	330.07	13.95
Prom	0.58±0.07	0.25±0.04	2.68±0.02	80.20	2.38±0.013	8.05	0.79	3964.40±360.49	329.56±11.91	13.90±0.54
2	0.62	0.35	0.86					2982.77	240.72	13.81
2	0.82	0.28	0.74					2913.24	256.90	13.78
2	0.81	0.32	0.98					2953.62	213.95	13.72
Prom	0.75±0.09	0.32±0.03	0.86±0.09	78.62	1.77	5.08	0.71	2949.87±28.55	237.19±17.71	13.77±0.05
4	1.28	0.57	1.70					2645.41	146.44	12.50
4	0.85	0.44	1.65					2613.37	149.71	12.31
4	1.03	0.55	1.59					2641.50	147.97	12.40
Prom	1.05±0.18	0.52±0.06	1.66±0.04	79.75	0.95	3.92	0.68	2633.43±19.89	148.04±1.33	12.40±0.09
6	2.28	0.74	1.55					2516.23	125.89	11.42
6	1.71	0.76	1.53		0.62	4.37	0.63	2303.03	124.82	11.29
6	1.97	0.62	1.53		0.59	4.84	0.63	2392.91	129.33	11.27
Prom	1.99±0.23	0.70±0.07	1.54±0.01	79.98	0.60±0.02	4.61±0.33	0.63±0.00	2404.05±87.39	126.68±2.35	11.33±0.08
7	2.31	0.98	1.49					2214.36	118.62	11.14
7	2.24	0.93	1.53		0.51	2.92	0.49	2185.07	114.53	10.92
7	2.06	1.05	1.44		0.55	2.78	0.50	2266.86	116.18	11.34
Prom	2.20±0.13	0.99±0.06	1.49±0.04	80.43	0.53±0.033	2.86±0.07	0.60±0.01	2222.09±41.44	116.44±1.68	11.13±0.17
9	3.15	1.15	1.40					2000.21	74.02	11.14
9	3.75	1.28	1.40		0.33	2.21	0.55	1967.55	90.57	10.19
9	3.66	1.36	1.43		0.27	2.19	0.57	1992.07	100.66	10.79
Prom	3.52±0.32	1.26±0.11	1.41±0.01	79.53	0.30±0.045	2.20±0.01	0.55±0.02	1993.27±18.49	88.41±10.98	10.70±0.39
13	7.25	1.41	1.35					1911.84	54.01	10.23
13	6.14	1.27	1.36		0.27	1.67	0.52	1982.74	73.32	10.09
13	6.31	1.36	1.36		0.26	1.69	0.47	1944.87	59.23	10.38
Prom	6.57±0.6	1.35±0.07	1.36±0.01		0.27±5E-3	1.68±0.01	0.50±0.04	1946.48±28.96	62.19±9.99	10.23±0.11
15	7.91	1.58	1.30					1979.86	59.49	9.30

15	6.88	1.55	1.35		0.23	1.51	0.47	1951.17	60.27	9.40
15	7.87	1.51	1.34		0.23	1.40	0.49	1856.34	56.35	9.91
Prom	7.55±0.59	1.54±0.04	1.32±0.02	73.89	0.23±0.00	1.46±0.08	0.48±0.01	1929.12±64.65	58.70±1.69	9.53±0.26

A2.3 Formulación de alimento para perro adulto. Monitoreo a 5°C.

Tiempo (semanas)	IP (mEq/Kg)	IK (abs/g)	Prosol (%)	Digestibilidad (%)	Vitaminas hidrosolubles			Vitaminas liposolubles		
					Tiamina (mg/100g)	Piridoxina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	Retinol (ug/100g)	Colecalciferol (ug/100g)	a-tocoferol (mg/100g)
0	0.53	0.19	2.65					4306.76	307.63	14.47
0	0.68	0.25	2.70		2.37			4301.85	335.01	13.14
0	0.53	0.30	2.70		2.39			3535.51	330.07	13.95
Prom	0.58±0.07	0.25±0.04	2.68±0.02	80.20	2.38±0.01	8.05	0.79	3964.40±360.49	329.56±11.91	13.90±0.54
3	0.20	0.36	1.90					3168.14	274.57	13.69
3	0.21	0.32	1.96					3024.13	221.19	13.86
3	0.20	0.34	1.92					3047.08	253.18	13.47
Prom	0.20±0.00	0.34±0.02	1.92±0.03	76.37	1.88	5.82	0.76	3079.78±73.17	249.64±21.93	13.67±0.15
7	1.01	0.53	1.77					2788.70	142.52	15.06
7	0.90	0.60	1.81		1.16	3.52	0.72	2708.33	176.00	14.73
7	0.99	0.62	1.78		0.48	3.27	0.71	2681.99	112.17	14.99
Prom	0.97±0.06	0.58±0.04	1.79±0.02	80.20	0.82±0.50	3.39±0.18	0.72±0.01	2726.27±45.41	143.56±26.06	12.93±0.17
10	1.58	0.61	1.63					2652.47	112.17	11.77
10	1.64	0.63	1.75					2639.32	100.90	11.78
10	1.65	0.62	1.63					2665.21	99.28	11.72
Prom	1.62±0.04	0.62±0.01	1.67±0.06	79.75				2652.33±10.56	104.12±7.02	11.76±0.03
12										
12					0.50	3.23	0.58			
12					0.50	3.16	0.60			
Prom					0.50±0.00	3.20±0.04	0.59±0.02			
13	3.06	0.76	1.49					2543.14	82.30	12.30
13	3.08	0.77	1.58					2335.92	101.22	11.25
13	3.25	0.75	1.62					2471.14	83.82	10.76
Prom	3.13±0.11	0.76±0.01	1.56±0.05					2450.07±105.21	89.11±10.51	11.43±0.64

16	1.79	0.79	1.46					2359.68	92.00	9.16
16	1.89	0.73	1.34		0.26	3.06	0.59	2303.18	83.36	11.47
16	1.95	0.86	1.58		0.28	3.17	0.56	2324.04	65.16	10.68
Prom	1.88±0.08	0.80±0.06	1.46±0.10	73.44	0.27±0.02	3.12±0.07	0.58±0.02	2328.97±28.57	80.17±13.70	10.43±0.95

A2.4 Formulación de alimento para cachorro. Monitoreo a 45°C.

Tiempo (semanas)	IP (mEq/Kg)	IK (abs/g)	Prosol (%)	Digestibilidad (%)	Vitaminas hidrosolubles			Vitaminas liposolubles		
					Tiamina (mg/100g)	Piridoxina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	Retinol (ug/100g)	Colecalciferol (ug/100g)	a-tocoferol (mg/100g)
0	0.00	0.18	2.89					4103.92	309.74	10.59
0	0.00	0.12	2.94					4355.01	338.19	11.96
0	0.00	0.00	2.90					4169.01	293.74	11.22
Prom	0.00±0.00	0.10±0.07	2.91±0.02	79.08	3.29	7.55	0.80	4221.66±106.4	315.86±18.4	11.43±0.55
1	0.32	0.11	0.87					3488.42	281.75	10.58
1	0.44	0.06	0.91					3412.10	268.69	10.60
1	0.43	0.08	0.89					3366.52	279.96	10.53
Prom	0.40±0.05	0.08±0.01	0.89±0.02	80.66	1.76	6.15	0.69	3422.35±61.59	276.80±5.78	10.57±0.04
2	1.03	0.15	2.24					3151.87	221.46	10.20
2	1.06	0.30	2.21					3067.56	180.23	9.52
2	1.09	0.20	2.27					3155.47	200.67	9.66
Prom	1.06±0.02	0.13±0.10	2.25±0.02	83.81	1.09	4.69	0.64	3124.97±49.75	200.78±16.8	9.80±0.36
3	1.81	0.31	2.02					2853.55	162.96	9.87
3	1.52	0.23	1.93					2735.83	185.74	9.48
3	1.58	0.27	1.99					2836.54	170.15	9.48
Prom	1.64±0.12	0.27±0.03	1.98±0.04	76.59	0.75	3.94	0.61	2808.64±63.63	172.95±16.1	9.61±0.23
4	2.62	0.55	1.93					977.62	155.27	9.31
4	2.73	0.55	1.91					942.38	177.49	9.35
4	2.43	0.54	1.94					1018.06	168.57	9.18
Prom	2.59±0.12	0.55±0.01	1.93±0.01	77.95	0.48	3.67	0.60	979.35±37.87	167.11±9.12	9.28±0.07
5	3.32	0.58	1.72					31080.51	126.05	7.82
5	3.14	0.58	1.79			2.94	0.57	2493.06	130.03	8.89

5	3.06	0.72	1.74			2.96	0.58	2413.34	122.76	9.62
Prom	3.17±0.11	0.63±0.06	1.75±0.03	79.75	0.55	2.95±0.02	0.58±0.02	2695.65±421.8	126.28±2.97	8.77±0.73
6	3.40	0.77	1.66					1282.25	125.93	8.73
6	3.25	0.75	1.71		0.38	2.45	0.56	1301.58	116.96	8.21
6	3.28	0.74	1.69		0.37	2.43	0.55	1292.50	115.00	8.62
Prom	3.31±0.08	0.75±0.02	1.68±0.02	85.39	0.37±0.01	2.44±0.01	0.56±0.01	1292.11±9.67	119.30±5.83	8.52±0.22
7	4.53	0.75	1.72					1046.59	85.10	8.62
7	4.53	0.89	1.69		0.36	1.69	0.54	1030.89	83.99	8.46
7	4.30	0.81	1.67		0.39	1.77	0.52	1086.15	85.11	8.36
Prom	4.45±0.13	0.82±0.07	1.69±0.03	80.88	0.37±0.02	1.75±0.09	0.53±0.02	1054.54±23.25	84.73±0.64	8.48±0.10
9	8.60	0.93	1.61					971.95	76.93	8.50
9	8.86	0.93	1.52		0.34	0.00	0.51	936.30	70.61	8.27
9	8.58	0.91	1.58		0.32	0.00	0.52	971.99	74.42	8.41
Prom	8.86±0.15	0.92±0.01	1.57±0.04	80.43	0.33±0.01	0.00±0.00	0.52±0.01	960.08±20.59	73.99±3.18	8.39±0.12
10	10.82	0.99	2.05					970.78	63.74	8.14
10	10.76	0.94	2.03		0.29	0.00	0.51	936.57	50.06	7.90
10	11.19	0.93	2.12		0.32	0.00	0.51	903.74	71.69	8.73
Prom	10.92±0.23	0.95±0.03	2.07±0.05	83.81	0.31±0.02	0.00±0.00	0.51±0.00	937.03±33.52	61.83±10.94	8.26±0.42
13	34.42	2.38	1.43					928.40	57.83	7.48
13	34.50	2.50	1.46		0.23	0.00	0.46	948.56	55.50	7.10
13	34.57	2.53	1.46		0.23	0.00	0.48	935.21	42.41	7.70
Prom	34.50±0.07	2.47±0.08	1.45±0.01		0.23±0.00	0.00±0.00	0.47±0.02	937.39±8.37	51.88±6.77	7.42±0.24
14	37.54	2.62	1.42					933.76	51.61	7.11
14	37.90	2.54	1.33		0.22	0.00	0.44	873.27	47.46	7.11
14	40.55	2.50	1.20		0.15	0.00	0.44	970.28	46.53	7.02
Prom	38.66±1.64	2.55±0.06	1.33±0.09	73.44	0.19±0.05	0.00±0.00	0.44±0.00	925.77±48.99	48.53±2.20	7.08±0.04
15	42.28	2.63	1.27					913.00	41.94	6.87
15	37.69	2.57	1.29		0.19	0.00	0.41	936.73	35.51	6.60
15	37.80	2.64	1.27		0.17	0.00	0.42	877.16	37.95	6.52
Prom	39.26±1.62	2.61±0.04	1.28±9E-3	76.14	0.18±0.01	0.00±0.00	0.41±0.00	908.96±29.99	38.46±2.65	6.66±0.18
16	38.93	2.89	1.27					733.35	32.24	6.19
16	37.81	2.65	1.25		0.14	0.00	0.40	727.87	33.17	6.23
16	36.25	2.78	1.19		0.18	0.00	0.42	712.31	29.22	6.22
Prom	37.67±1.34	2.77±0.12	1.24±0.03	77.05	0.16±0.02	0.00±0.00	0.41±0.01	724.51±10.92	31.54±2.06	6.21±0.02

A2.5 Formulación de alimento para cachorro. Monitoreo a 22°C.

Tiempo (semanas)	IP (mEq/Kg)	IK (abs/g)	Prosol (%)	Digestibilidad (%)	Vitaminas hidrosolubles			Vitaminas liposolubles		
					Tiamina (mg/100g)	Piridoxina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	Retinol (ug/100g)	Colecalciferol (ug/100g)	a-tocoferol (mg/100g)
0	0.00	0.18	2.89					4103.92	309.74	10.59
0	0.00	0.12	2.94					4355.01	338.19	11.96
0	0.00	0.00	2.90					4169.01	293.74	11.22
Prom	0.00±0.00	0.10±0.07	2.91±0.02	79.08	3.29	7.55	0.80	4221.66±106.4	315.86±18.4	11.43±0.55
2	0.11	0.49	2.37					3669.99	239.72	10.72
2	0.10	0.33	2.39					3794.58	206.90	10.75
2	0.10	0.25	2.30					3795.17	203.95	10.55
Prom	0.10±0.01	0.36±0.09	2.34±0.04	79.30	1.83	5.55	0.74	3753.25±72.10	216.86±19.85	10.68±0.11
4	0.54	0.37	2.02					3049.05	181.89	9.98
4	0.42	0.38	2.02					3063.86	203.86	10.03
4	0.43	0.42	1.98					3031.41	154.82	10.01
Prom	0.46±0.05	0.39±0.02	2.01±0.02	79.30	1.18	4.78	0.67	3048.11±16.24	180.18±20.06	10.00±0.02
6	1.16	0.67	1.80					2262.99	172.96	9.76
6	1.63	0.66	1.82		0.64	2.88	0.63	2214.69	149.97	9.76
6	1.45	0.50	1.82		0.67	3.29	0.62	2262.64	158.89	9.71
Prom	1.41±0.19	0.61±0.09	1.81±0.01	81.78	0.65±0.02	3.09±0.30	0.63±0.02	2246.77±27.78	161.61±11.59	9.74±0.03
7	1.90	0.77	1.80					2070.20	144.99	12.26
7	1.86	0.82	1.77		0.51	2.68	0.60	2065.93	149.68	12.10
7	1.97	0.92	1.67		0.51	2.53	0.62	2065.96	150.71	12.04
Prom	1.91±0.06	0.83±0.08	1.75±0.06	83.14	0.51±0.00	2.61±0.10	0.61±0.01	2067.37±2.46	148.46±3.05	12.13±0.11
9	3.20	0.88	1.67					1990.04	82.68	9.43
9	3.10	0.90	1.75		0.43	2.39	0.57	2002.03	84.26	8.73
9	3.20	0.86	1.72		0.47	2.23	0.56	2019.70	83.22	9.14
Prom	3.17±0.06	0.88±0.02	1.70±0.04	80.20	0.45±0.02	2.31±0.12	0.56±0.00	2003.92±27.62	83.89±0.80	9.10±0.28
13	4.47	0.87	1.58					940.07	66.54	8.23
13	4.85	0.99	1.68		0.28	1.67	0.52	970.65	68.39	8.39
13	4.00	0.92	1.63		0.32	1.81	0.53	924.95	79.11	8.11
Prom	4.44±0.40	0.93±0.06	1.64±0.04		0.31±0.01	1.74±0.10	0.53±0.01	945.22±23.28	71.34±5.54	8.24±0.14
15	4.96	1.31	1.51					1218.81	85.37	8.08

15	5.92	1.44	1.53		0.23	1.51	0.51	1249.94	74.98	7.82
15	5.94	1.40	1.53		0.24	1.49	0.50	1231.13	52.76	7.39
Prom	5.61±0.56	1.38±0.07	1.53±0.01	75.02	0.24±0.05	1.50±0.02	0.50±0.00	1233.29±12.80	71.03±13.60	7.76±0.35

A2.6 Formulación de alimento para cachorro. Monitoreo a 5°C.

Tiempo (semanas)	IP (mEq/Kg)	IK (abs/g)	Prosol (%)	Digestibilidad (%)	Vitaminas hidrosolubles			Vitaminas liposolubles		
					Tiamina (mg/100g)	Piridoxina (mg/100g)	Riboflavina (mg/100g)	Retinol (ug/100g)	Colecalciferol (ug/100g)	a-tocoferol (mg/100g)
0	0.00	0.18	2.89					4103.92	309.74	10.59
0	0.00	0.12	2.94					4355.01	338.19	11.96
0	0.00	0.00	2.90					4169.01	293.74	11.22
Prom	0.00±0.00	0.10±0.07	2.91±0.02	79.08	3.29	7.55	0.80	4221.66±106.4	315.86±18.4	11.43±0.55
3	0.10	0.29	2.58					3952.23	275.09	10.67
3	0.11	0.31	2.67					4100.10	320.99	10.77
3	0.10	0.29	2.48					3606.75	285.83	10.69
Prom	0.10±4E-3	0.30±0.01	2.53±0.04	76.59	1.91	6.30	0.78	3886.36±206.7	293.97±19.60	10.71±0.05
7	0.58	0.35	2.27					2940.02	174.06	10.83
7	0.39	0.42	2.26		1.01	4.77	0.73	2915.19	190.49	10.12
7	0.48	0.41	2.23		1.06	4.43	0.67	2885.29	177.45	10.65
Prom	0.48±0.09	0.39±0.04	2.25±0.02	82.69	1.03±0.04	4.60±0.24	0.70±0.03	2946.83±29.02	180.66±1.54	10.48±53
10	0.59	0.44	2.12					2573.43	125.59	10.71
10	0.60	0.51	2.10					2522.95	119.34	10.25
10	0.67	0.39	2.03					2544.79	103.93	10.35
Prom	0.62±0.04	0.44±0.06	2.08±0.05	80.20				2547.06±25.32	116.28±9.10	10.43±0.19
12										
12					0.67	4.10	0.64			
12					0.68	4.69	0.63			
Prom					0.68±0.01	4.40±0.30	0.63±0.00			
13	1.40	0.53	1.75					1996.86	101.26	9.47
13	1.22	0.46	1.76					1982.64	108.77	9.27
13	1.47	0.48	1.75					1941.47	104.39	9.46
Prom	1.36±0.13	0.49±0.04	1.75±4E-3					1986.43±26.99	104.80±3.08	9.40±0.11
16	0.98	0.56	1.68					1863.53	91.68	9.26

16	0.89	0.56	1.62		0.28	4.33	0.64	1845.86	115.17	8.91
16	1.09	0.56	1.64		0.35	4.18	0.59	1829.67	88.63	8.64
Prom	0.99±0.10	0.56±9E-4	1.65±0.02	74.11	0.32±0.04	4.26±0.11	0.61±0.03	1846.35±16.93	98.49±14.52	8.94±0.31

Anexo 3. Análisis estadístico por prueba t de Student

Se busca determinar la significancia estadística entre los valores obtenidos para las constantes de rapidez a diferentes temperaturas (5, 22 y 45 °C) para cada presentación (Alimento para Cachorro –Jr– y Alimento para Adulto –Sr–), así como para cada uno de los parámetros de calidad estudiados en el orden que se describe a continuación en la Tabla A3.1:

Parámetro	Presentación	Temperatura	Variable	Presentación	Temperatura	Variable
Vitamina B1 (Tiamina)	Cachorro	5 °C	B1_Jr_05	Adulto	5	B1_Sr_05
		22 °C	B1_Jr_22		22	B1_Sr_22
		45 °C	B1_Jr_45		45	B1_Sr_45
Vitamina B2 (Riboflavina)	Cachorro	5 °C	B2_Jr_05	Adulto	5	B2_Sr_05
		22 °C	B2_Jr_22		22	B2_Sr_22
		45 °C	B2_Jr_45		45	B2_Sr_45
Vitamina B6 (Piridoxina)	Cachorro	5 °C	B6_Jr_05	Adulto	5	B6_Sr_05
		22 °C	B6_Jr_22		22	B6_Sr_22
		45 °C	B6_Jr_45		45	B6_Sr_45
Índice de Kreis	Cachorro	5 °C	IK_Jr_05	Adulto	5	IK_Sr_05
		22 °C	IK_Jr_22		22	IK_Sr_22
		45 °C	IK_Jr_45		45	IK_Sr_45
Índice de Peróxidos	Cachorro	5 °C	PO_Jr_05	Adulto	5	PO_Sr_05
		22 °C	PO_Jr_22		22	PO_Sr_22
		45 °C	PO_Jr_45		45	PO_Sr_45
Proteína Soluble	Cachorro	5 °C	PS_Jr_05	Adulto	5	PS_Sr_05
		22 °C	PS_Jr_22		22	PS_Sr_22
		45 °C	PS_Jr_45		45	PS_Sr_45
Vitamina A (Retinol)	Cachorro	5 °C	VA_Jr_05	Adulto	5	VA_Sr_05
		22 °C	VA_Jr_22		22	VA_Sr_22
		45 °C	VA_Jr_45		45	VA_Sr_45
Vitamina D (Colecalciferol)	Cachorro	5 °C	VD_Jr_05	Adulto	5	VD_Sr_05
		22 °C	VD_Jr_22		22	VD_Sr_22
		45 °C	VD_Jr_45		45	VD_Sr_45
Vitamina E (α-Tocoferol)	Cachorro	5 °C	VE_Jr_05	Adulto	5	VE_Sr_05
		22 °C	VE_Jr_22		22	VE_Sr_22
		45 °C	VE_Jr_45		45	VE_Sr_45

Tabla A3.1. Variables a comparar por prueba t de Student.

Con ello, será posible establecer si los cambios en los parámetros de calidad son una función de la temperatura de almacenamiento.

A3.1 Metodología

Las constantes de rapidez obtenidas, fueron usadas para estimar el log natural de la relación (Ci/Co) para un período igual al del estudio -16 semanas-. Con ello se reproducen los patrones de variación de los parámetros de calidad durante el tiempo de almacenamiento para las diferentes temperaturas.

Obtenidos los patrones de comportamiento estimados, se procedió a realizar un Análisis de Varianza en un sentido (ANOVA One Way¹) para completar con una prueba Tukey modificada².

El propósito de realizar el "ANOVA One Way", es determinar si los patrones de tres diferentes grupos (5, 22 y 45 °C) tienen una media común. Es decir, establecer si los grupos son realmente diferentes para el parámetro de calidad considerado³.

El "ANOVA One Way" es un caso especial simple del modelo lineal, y su forma queda representada por:

$$y_{ij} = \mu_j + \epsilon_{ij}$$

Donde:

y_{ij} es una matriz de observaciones (16) en la que cada columna representa un grupo diferente (5, 22 y 45 °C).

μ_j es una matriz cuyas columnas son las medias del grupo (la notación "punto j" significa que μ_j aplica a todas las hileras de la columna j. Es decir, que el valor μ_j es el mismo para toda i).

ϵ_{ij} es una matriz de las perturbaciones aleatorias.

¹ Rutina "anova1.m" de Matlab R2008a.

² Rutina "multcompare" de Matlab R2008a.

³ Es común, en los reportes de investigación, que la determinación de si existe o no diferencia entre las medias no sea suficiente para el proceso de análisis de resultados y, por tanto, sea necesario identificar cuál es la significancia entre pares de medias. Ello lleva a realizar pruebas "t" para cada par de medias, lo que deriva en un proceso laborioso. Por ello han sido desarrollados diferentes métodos de comparación múltiple que permiten en un solo proceso obtener el comparativo para los diferentes pares posibles de entre los grupos estudiados. En una prueba "t", se calcula el estadístico "t" y se compara con un valor crítico. El valor crítico se selecciona tal que cuando las medias son realmente las mismas (cualquier diferencia aparente está determinada por la probabilidad aleatoria), la probabilidad del estadístico "t" exceda el valor crítico es muy pequeña, por ejemplo 5%. Cuando las medias son diferentes, la probabilidad de que el estadístico exceda el valor crítico, es grande. (Ref: Statistics Toolbox™ 6, "User's Guide", Matlab).

El modelo asume que las columnas de y son una constante más una perturbación aleatoria. Así, lo que se quiere conocer es si todas las constantes son las mismas. La ejemplificación del procedimiento, se hace con el patrón de comportamiento estimado para Proteína Soluble, cuya estimación se presenta en la Tabla A3.2:

Proteína Soluble : [Ln (Ci / Co)]_{Estimada}

Semana	Alimento para Cachorro			Alimento para Adulto		
	PS_Jr_05	PS_Jr_22	PS_Jr_45	PS_Sr_05	PS_Sr_22	PS_Sr_45
1	-0.0469	-0.1927	-0.2419	-0.1561	-0.2508	-0.3549
2	-0.0824	-0.2298	-0.2849	-0.1892	-0.2911	-0.4000
3	-0.1179	-0.2669	-0.3279	-0.2223	-0.3314	-0.4451
4	-0.1534	-0.3040	-0.3709	-0.2554	-0.3717	-0.4902
5	-0.1889	-0.3411	-0.4139	-0.2885	-0.4120	-0.5353
6	-0.2244	-0.3782	-0.4569	-0.3216	-0.4523	-0.5804
7	-0.2599	-0.4153	-0.4999	-0.3547	-0.4926	-0.6255
8	-0.2954	-0.4524	-0.5429	-0.3878	-0.5329	-0.6706
9	-0.3309	-0.4895	-0.5859	-0.4209	-0.5732	-0.7157
10	-0.3664	-0.5266	-0.6289	-0.4540	-0.6135	-0.7608
11	-0.4019	-0.5637	-0.6719	-0.4871	-0.6538	-0.8059
12	-0.4374	-0.6008	-0.7149	-0.5202	-0.6941	-0.8510
13	-0.4729	-0.6379	-0.7579	-0.5533	-0.7344	-0.8961
14	-0.5084	-0.6750	-0.8009	-0.5864	-0.7747	-0.9412
15	-0.5439	-0.7121	-0.8439	-0.6195	-0.8150	-0.9863
16	-0.5794	-0.7492	-0.8869	-0.6526	-0.8553	-1.0314

Tabla A3.2. Valores de logaritmo natural de la concentración entre la concentración inicial calculados a partir de los datos globales contenidos en el Anexo 2 para ambas formulaciones y a las tres temperaturas de trabajo.

Los resultados obtenidos para el "ANOVA One Way" de los grupos correspondientes al Alimento para Cachorro se presentan a continuación en la Tabla A3.3:

```

p = 0.0014

tbl = ANOVA One Way - PS_Jr

'Source'   'SS'       'df'       'MS'       'F'         'Prob>F'
'Columns'  [0.5161]   [ 2]       [0.2580]   [7.6133]   [0.0014]
'Error'    [1.5251]   [45]       [0.0339]   []         []
'Total'    [2.0412]   [47]       []         []         []

stats =

gnames: {3x1 cell}
n: [16 16 16]
source: 'anoval'
means: [-0.3131 -0.4709 -0.5644]
df: 45
s: 0.1841

```

Tabla A3.3 "ANOVA One Way" para Proteína Soluble en Alimento para Cachorro.

El estadístico F se usa para aquí, para hacer la prueba de hipótesis con el fin de conocer si los grupos (5, 22 y 45 °C) presentan el mismo patrón de evolución de la Proteína Soluble⁴. El tabular de resultados para el "ANOVA One Way", reporta el valor-p para esta prueba de hipótesis. Para el caso ejemplificado, el valor-p es de 0.0014, un valor pequeño. Ello, es un indicador de que los patrones de evolución de la Proteína Soluble para las diferentes condiciones de temperatura estudiadas, no son los mismos: Un indicador F tan bajo como el valor de F observado, sugiere una probabilidad de 1.4 en 1000 de que los patrones de evolución sean iguales.

El valor-p obtenido del análisis de varianza, depende de las suposiciones acerca de las perturbaciones aleatorias ϵ_{ij} en la ecuación modelo. Para que el valor-p sea correcto, las perturbaciones necesitan ser independientes, normalmente distribuidas y tener varianza constante.

En resumen, considerando un nivel de confianza de $\alpha = 0.5$, se deriva que los grupos presentan diferencia significativa ($\alpha > p$) y en consecuencia el patrón de variación de la Proteína Soluble durante el tiempo de almacenamiento, es dependiente de la temperatura.

Sin embargo, los resultados obtenidos con el "ANOVA One Way" no permiten identificar si la diferencia significativa toma lugar en todas las comparaciones posibles entre los diferentes grupos.

Para ello, se realiza una prueba de Comparación Múltiple (basada en la prueba " t' " entre parejas de grupos) cuyos resultados se presentan en la Tabla A3.4:

c =				
1.0000	2.0000	0.0001	0.1578	0.3155
1.0000	3.0000	0.0935	0.2513	0.4090
2.0000	3.0000	-0.0643	0.0935	0.2512
m =				
-0.3131	0.0460			
-0.4709	0.0460			
-0.5644	0.0460			

Tabla A3.3. Comparación múltiple para Proteína Soluble en Alimento para Cachorro

⁴ Hipótesis Nula, H_0 : No existe diferencia significativa.

El primer bloque de resultados ($c =$) que se obtiene del procedimiento de comparación múltiple, presenta una hilera para cada par de grupos con una estimación de la diferencia de medias en los grupos y un intervalo de confianza para el par. Por ejemplo, la primera hilera contiene los valores

1.0000 2.0000 0.0001 0.1578 0.3155

que indica la media del grupo 1 (5 °C) menos la media del grupo 2 (22 °C) es estimada en 0.1578 y un intervalo de confianza al 95% para esta diferencia es [0.0001, 0.3155]. Este intervalo no contiene a 0, por tanto se puede concluir que las medias de los grupos 1 y 2 son diferentes. El mismo análisis para la segunda hilera permite llegar a la conclusión de que las medias de los grupos 1 (5 °C) y 3 (45 °C) son diferentes. En cambio el análisis de la tercera hilera lleva a la conclusión de que las medias de los grupos 2 (22 °C) y 3 (45 °C) son parecidas.

El segundo bloque ($m =$) contiene la media y el error estándar para cada grupo. Por último, para visualizar más fácilmente la diferencia de medias entre grupos se presenta el Gráfico A3.1 del procedimiento de comparación múltiple.

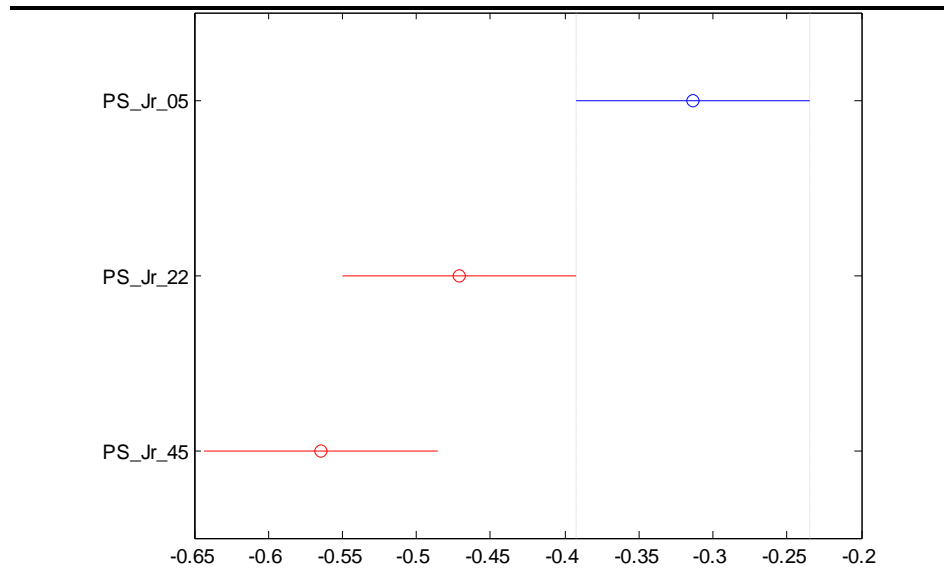


Gráfico A3.1. Comparación múltiple para Proteína Soluble en Alimento para Cachorro.

En donde, con ayuda del análisis visual, se enriquece la identificación del nivel de significancia para la diferencia de medias entre los diferentes pares de grupos posibles que se expresa en un tabular como continuación se ejemplifica en la Tabla A3.5:

Variable	Significancia*	Significancia**
PS_Jr_05	a	a
PS_Jr_22	b	b
PS_Jr_45	b	b

*\ Los valores, por componente, en la misma columna vertical con letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

**\ Los valores, por componente, en la misma columna vertical con letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Tabla A3.5. Diferencia de medias entre los grupos utilizando un código de letras.

A3.2 Resultados

Se presenta la síntesis de acuerdo a la estructura metodológica antes descrita y en el orden establecido en el tabular mostrado en el propósito de este anexo.

A3.2.1 Vitamina B1 (Tiamina) – Alimento para Cachorro.

p = 0.0060

tbl = **ANOVA One Way - B1_Jr** : Vitamina B1 Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[5.6627]	[2]	[2.8313]	[5.7459]	[0.0060]
'Error'	[22.1739]	[45]	[0.4928]	[]	[]
'Total'	[27.8366]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - B1_Jr** : Vit B1 Alimento para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	-0.0516	0.5498	1.1513
1.0000	3.0000	0.2249	0.8264	1.4279
2.0000	3.0000	-0.3249	0.2765	0.8780

m =

-1.2474	0.1755
-1.7973	0.1755
-2.0738	0.1755

Tabla A3.2.1. Vitamina B1 (Tiamina) en alimento para Cachorro.

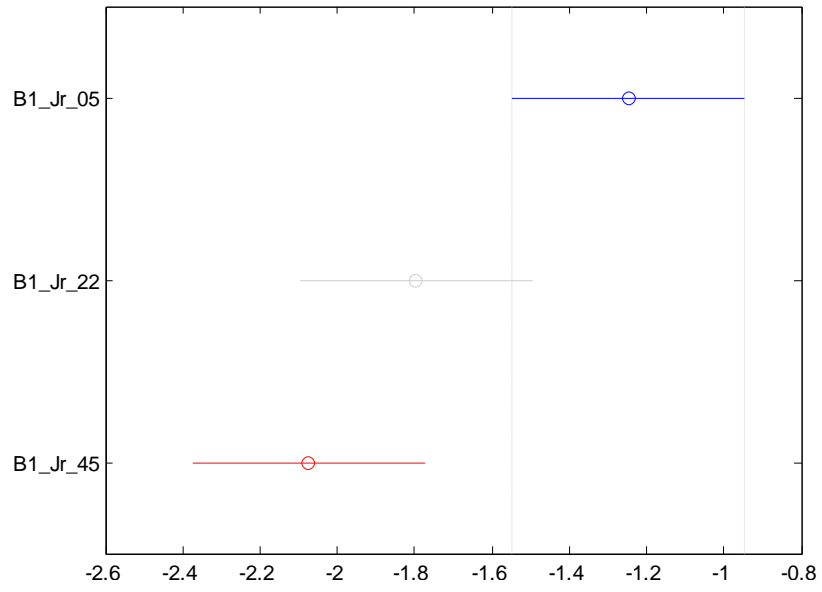


Gráfico A3.2.1. Vitamina B1 (Tiamina) en alimento para Cachorro.

A3.2.2 Vitamina B1 (Tiamina) – Alimento para Adulto.

p = 0.0080

tbl = **ANOVA One Way - B1_Sr** : Vitamina B1 Alimento para Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[6.5704]	[2]	[3.2852]	[5.3912]	[0.0080]
'Error'	[27.4217]	[45]	[0.6094]	[]	[]
'Total'	[33.9921]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - B1_Sr** : Vit B1 Alimento para Adulto

c =

1.0000	2.0000	-0.2513	0.4176	1.0864
1.0000	3.0000	0.2365	0.9054	1.5742
2.0000	3.0000	-0.1811	0.4878	1.1567

m =

-1.1319	0.1952
-1.5495	0.1952
-2.0373	0.1952

Tabla A3.2.2 Vitamina B1 (Tiamina) – Alimento para Adulto.

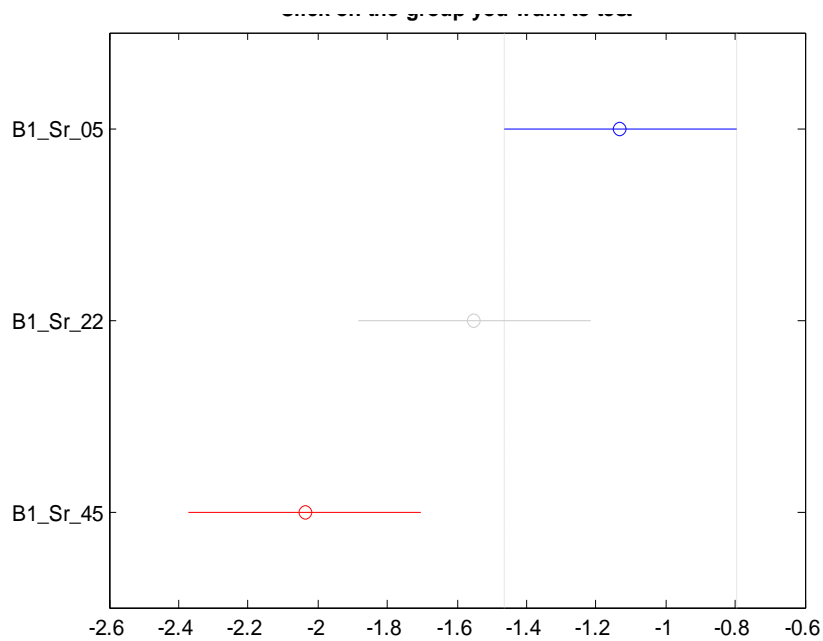


Gráfico A3.2.2 Vitamina B1 (Tiamina) – Alimento para Adulto.

A3.2.3 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Cachorro.

p = 9.0875e-006

tbl = **ANOVA One Way - B2_Jr** : Vitamina B2 Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.5792]	[2]	[0.2896]	[15.1922]	[9.0875e-006]
'Error'	[0.8578]	[45]	[0.0191]	[]	[]
'Total'	[1.4370]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - B2_Jr** : Vit B2 Alimento para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	0.0282	0.1465	0.2649
1.0000	3.0000	0.1504	0.2687	0.3870
2.0000	3.0000	0.0038	0.1222	0.2405

m =

-0.1504	0.0345
-0.2969	0.0345
-0.4191	0.0345

Tabla A3.2.3 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Cachorro.

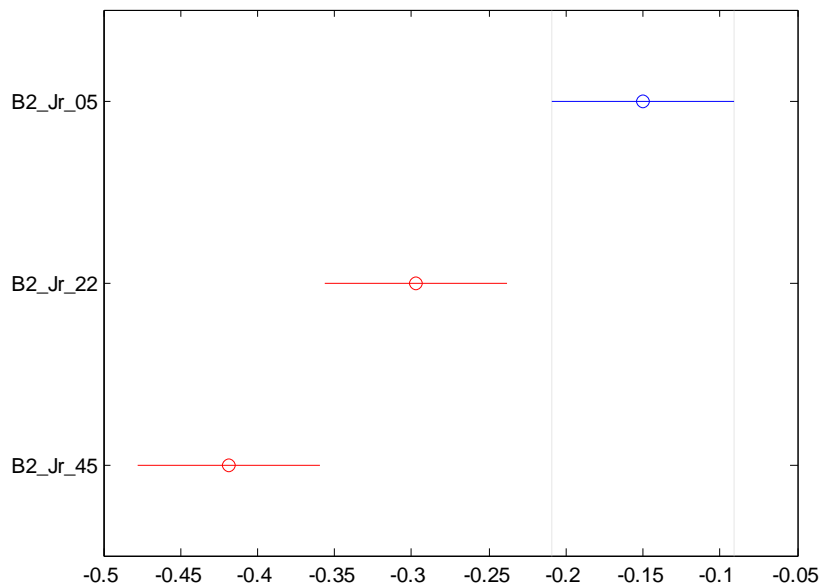


Gráfico A3.2.3 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Cachorro.

A3.2.4 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Adulto.

p = 1.2387e-004

tbl = **ANOVA One Way - B2_Sr** : Vitamina B2 Alimento para Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.4415]	[2]	[0.2208]	[11.0605]	[1.2387e-004]
'Error'	[0.8981]	[45]	[0.0200]	[]	[]
'Total'	[1.3397]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - B2_Sr** : Vit B2 Alimento para Adulto

c =

1.0000	2.0000	0.0251	0.1462	0.2673
1.0000	3.0000	0.1113	0.2323	0.3534
2.0000	3.0000	-0.0349	0.0861	0.2072

m =

-0.1663	0.0353
-0.3125	0.0353
-0.3986	0.0353

Tabla A3.2.4 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Adulto.

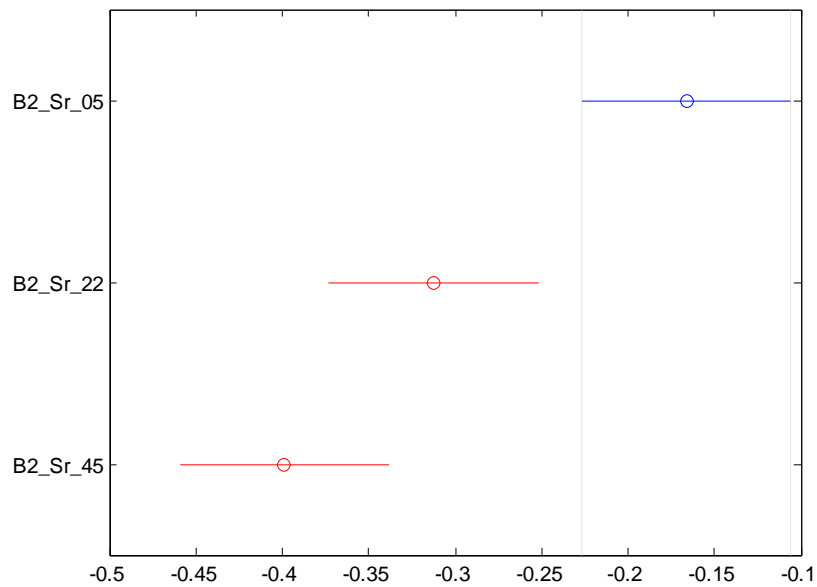


Gráfico A3.2.4 Vitamina B2 (Riboflavina) – Alimento para Adulto.

A3.2.5 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Cachorro.

p = 3.0057e-006

tbl = **ANOVA One Way - B6_Jr** : Vitamina B6 Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[13.0942]	[2]	[6.5471]	[17.0920]	[3.0057e-006]
'Error'	[17.2374]	[45]	[0.3831]	[]	[]
'Total'	[30.3316]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - B6_Jr** : Vit B6 Alimento para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	0.1151	0.6454	1.1757
1.0000	3.0000	0.7490	1.2794	1.8097
2.0000	3.0000	0.1036	0.6340	1.1643

m =

-0.3903	0.1547
-1.0357	0.1547
-1.6697	0.1547

Tabla A3.2.5 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Cachorro.

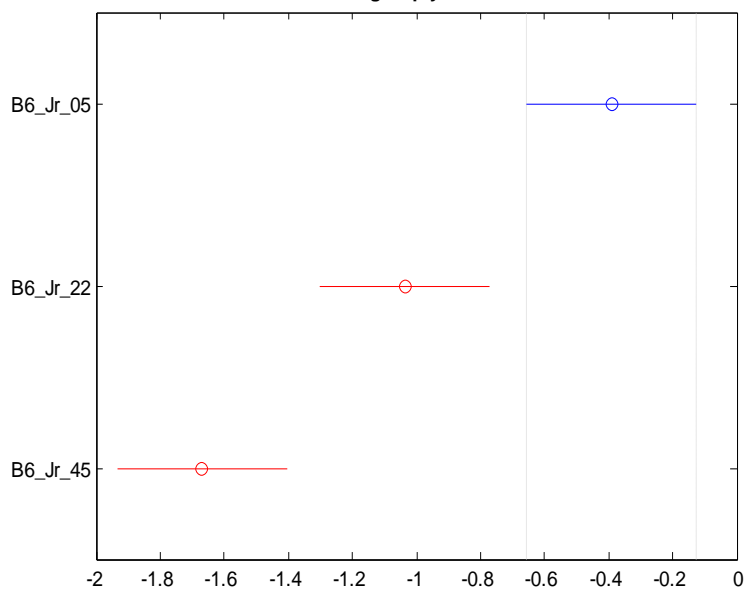


Tabla A3.2.5 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Cachorro.

A3.2.6 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Adulto.

p = 7.9099e-005

tbl = **ANOVA One Way - B6_Sr** : Vitamina B6 Alimento para Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[7.1532]	[2]	[3.5766]	[11.7362]	[7.9099e-005]
'Error'	[13.7136]	[45]	[0.3047]	[]	[]
'Total'	[20.8668]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - B6_Sr** : Vit B6 Alimento para Adulto

c =

1.0000	2.0000	-0.0224	0.4506	0.9236
1.0000	3.0000	0.4722	0.9453	1.4183
2.0000	3.0000	0.0216	0.4947	0.9677

m =

-0.6656	0.1380
-1.1162	0.1380
-1.6109	0.1380

Tabla A3.2.6 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Adulto.

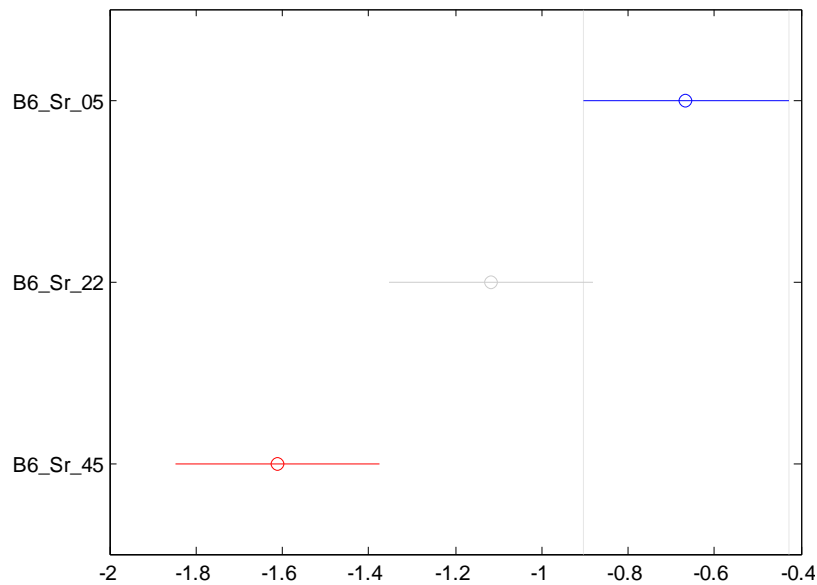


Gráfico A3.2.6 Vitamina B6 (Piridoxina) – Alimento para Adulto.

A3.2.7 Índice de Kreis – Alimento para Cachorro.

p = 0.0034

tbl = **ANOVA One Way - IK_Jr** : Índice de Kreis Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[7.2054]	[2]	[3.6027]	[6.4573]	[0.0034]
'Error'	[25.1068]	[45]	[0.5579]	[]	[]
'Total'	[32.3122]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - IK_Jr** : Índice de Kreis para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	-1.2327	-0.5927	0.0473
1.0000	3.0000	-1.5783	-0.9383	-0.2982
2.0000	3.0000	-0.9856	-0.3456	0.2945

m =

1.2224	0.1867
1.8151	0.1867
2.1606	0.1867

Tabla A3.2.7 Índice de Kreis – Alimento para Cachorro.

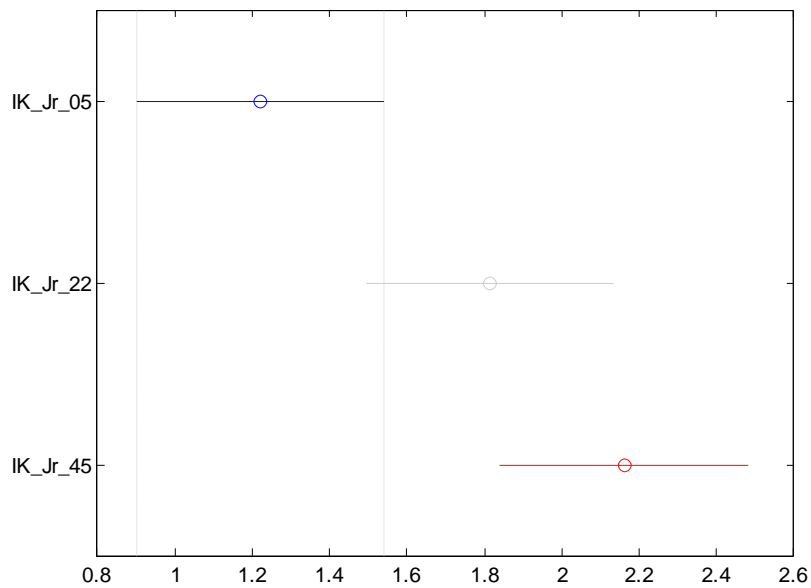


Gráfico A3.2.7 Índice de Kreis – Alimento para Cachorro.

A3.2.8 Índice de Kreis – Alimento para Adulto.

p = 7.1724e-004

tbl = **ANOVA One Way - IK_Sr** : Índice de Kreis Alimento para Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[6.3603]	[2]	[3.1801]	[8.5407]	[7.1724e-004]
'Error'	[16.7558]	[45]	[0.3724]	[]	[]
'Total'	[23.1161]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - IK_Sr** : Índice de Kreis para Adulto

c =

1.0000	2.0000	-1.0134	-0.4905	0.0324
1.0000	3.0000	-1.4130	-0.8901	-0.3672
2.0000	3.0000	-0.9225	-0.3996	0.1233

m =

0.7470	0.1526
1.2375	0.1526
1.6371	0.1526

Tabla A3.2.8 Índice de Kreis – Alimento para Adulto.

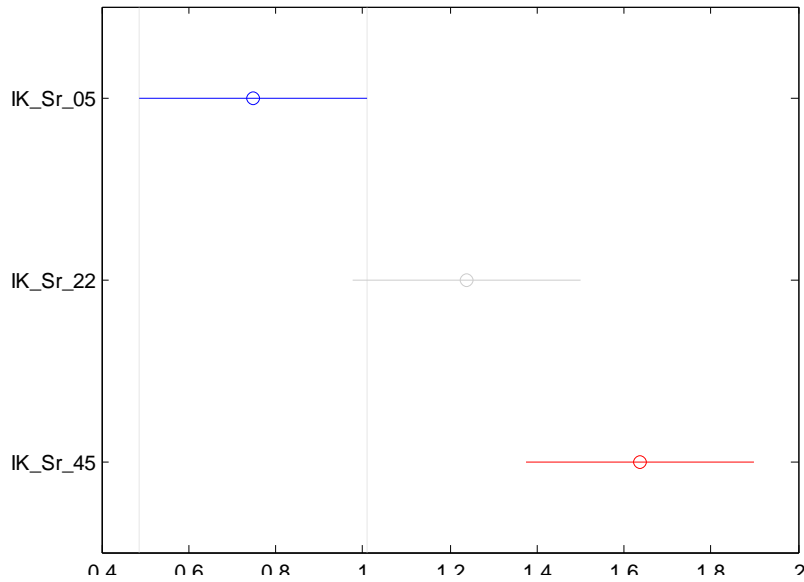


Gráfico A3.2.8 Índice de Kreis – Alimento para Adulto.

A3.2.9 Índice de Peróxidos – Alimento para Cachorro.

p = 8.5083e-008

tbl = **ANOVA One Way - PO_Jr** : Índice de Peróxidos Alimento p' Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[66.7510]	[2]	[33.3755]	[23.8886]	[8.5083e-008]
'Error'	[62.8708]	[45]	[1.3971]	[]	[]
'Total'	[129.6218]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - PO_Jr** : Índice de Peróxidos para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	-2.4388	-1.4260	-0.4132
1.0000	3.0000	-3.9013	-2.8885	-1.8757
2.0000	3.0000	-2.4753	-1.4625	-0.4497

m =

-0.0469	0.2955
1.3791	0.2955
2.8415	0.2955

Tabla A3.2.9 Índice de Peróxidos – Alimento para Cachorro.

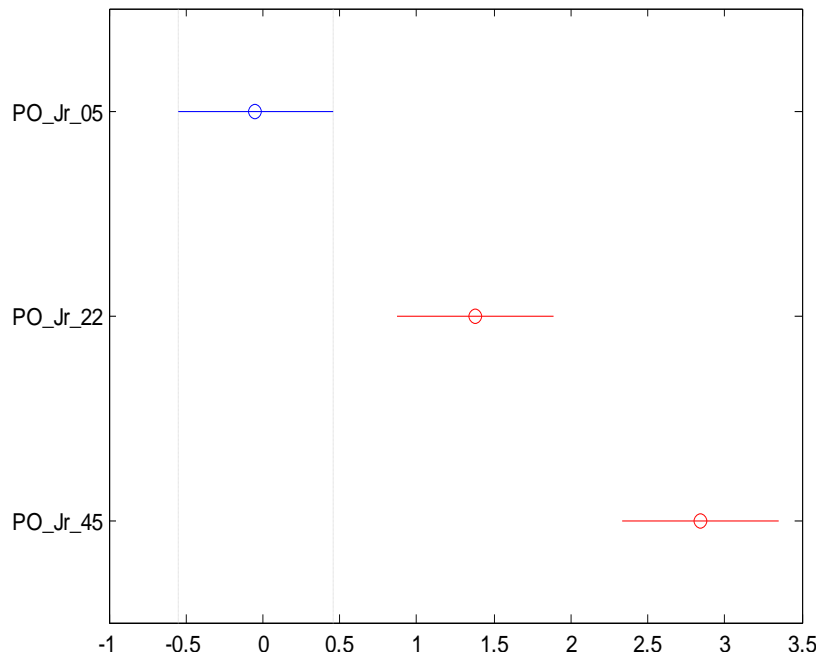


Gráfico A3.2.9 Índice de Peróxidos – Alimento para Cachorro.

A3.2.10 Índice de Peróxidos – Alimento para Adulto.

p = 1.6828e-007

tbl = **ANOVA One Way - PO_Sr** : Índice de Peróxidos Alimento p' Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[36.6257]	[2]	[18.3129]	[22.5037]	[1.6828e-007]
'Error'	[36.6198]	[45]	[0.8138]	[]	[]
'Total'	[73.2455]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - PO_Sr** : Índice de Peróxidos para Adulto

c =

1.0000	2.0000	-1.6252	-0.8522	-0.0792
1.0000	3.0000	-2.8988	-2.1258	-1.3528
2.0000	3.0000	-2.0466	-1.2736	-0.5006

m =

0.6991	0.2255
1.5513	0.2255
2.8249	0.2255

Tabla A3.2.10 Índice de Peróxidos – Alimento para Adulto.

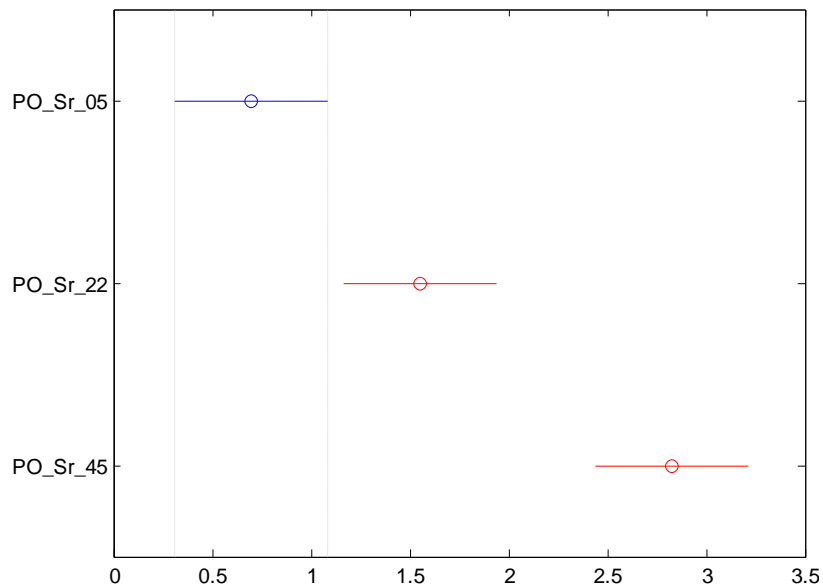


Gráfico A3.2.10 Índice de Peróxidos – Alimento para Adulto.

A3.2.11 Proteína Soluble – Alimento para Cachorro.

p = 0.0014

tbl = **ANOVA One Way - PS_Jr** : Proteína Soluble en Alimento p' Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.5161]	[2]	[0.2580]	[7.6133]	[0.0014]
'Error'	[1.5251]	[45]	[0.0339]	[]	[]
'Total'	[2.0412]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - PS_Jr** : Proteína Soluble en A p' Cachorro

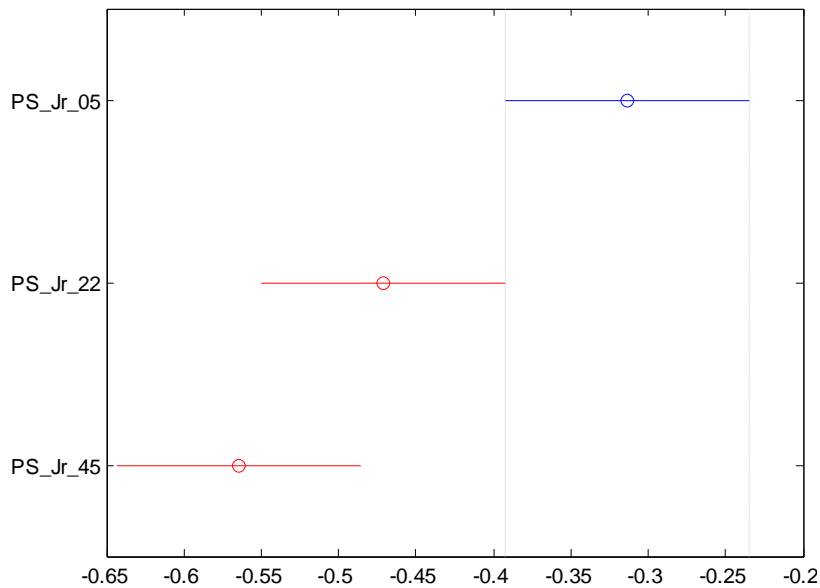
c =

1.0000	2.0000	0.0001	0.1578	0.3155
1.0000	3.0000	0.0935	0.2513	0.4090
2.0000	3.0000	-0.0643	0.0935	0.2512

m =

-0.3131	0.0460
-0.4709	0.0460
-0.5644	0.0460

Tabla A3.2.11 Proteína Soluble – Alimento para Cachorro.



Gráfica A3.2.11 Proteína Soluble – Alimento para Cachorro.

A3.2.12 Proteína Soluble – Alimento para Adulto.

p = 4.1891e-004

tbl = **ANOVA One Way - PS_Sr** : Proteína Soluble en Alimento p' Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.6674]	[2]	[0.3337]	[9.2915]	[4.1891e-004]
'Error'	[1.6163]	[45]	[0.0359]	[]	[]
'Total'	[2.2837]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - PS_Sr** : Proteína Soluble en A p' Adulto

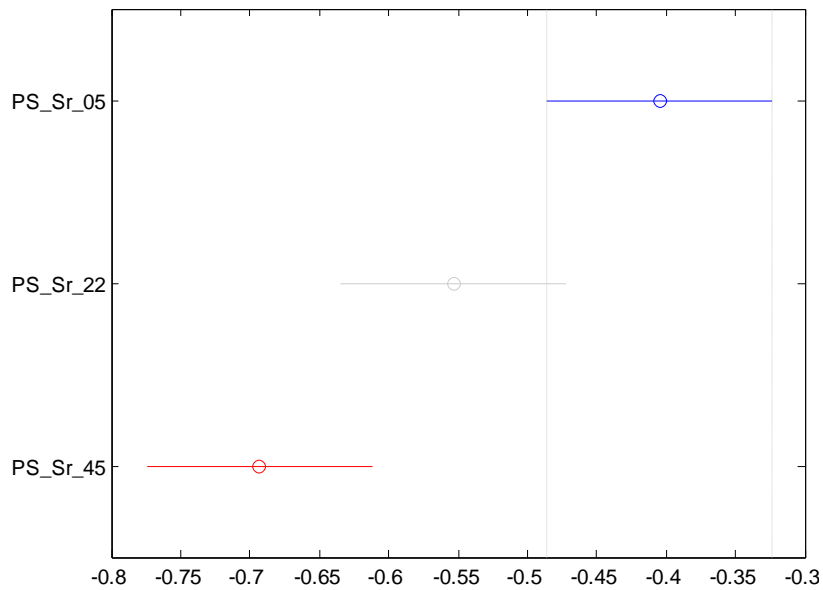
c =

1.0000	2.0000	-0.0137	0.1487	0.3111
1.0000	3.0000	0.1264	0.2888	0.4512
2.0000	3.0000	-0.0223	0.1401	0.3025

m =

-0.4043	0.0474
-0.5531	0.0474
-0.6932	0.0474

Tabla A3.2.12 Proteína Soluble – Alimento para Adulto.



Gráfica A3.2.12 Proteína Soluble – Alimento para Adulto.

A3.2.13 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Cachorro.

p = 5.3405e-005

tbl = **ANOVA One Way - VA_Jr** : Vitamina A en Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[3.7878]	[2]	[1.8939]	[12.3392]	[5.3405e-005]
'Error'	[6.9070]	[45]	[0.1535]	[]	[]
'Total'	[10.6948]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - VA_Jr** : Vit A en Alimento para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	-0.0337	0.3020	0.6377
1.0000	3.0000	0.3507	0.6865	1.0222
2.0000	3.0000	0.0487	0.3844	0.7202

m =

-0.4402	0.0979
-0.7423	0.0979
-1.1267	0.0979

Tabla A3.2.13 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Cachorro.

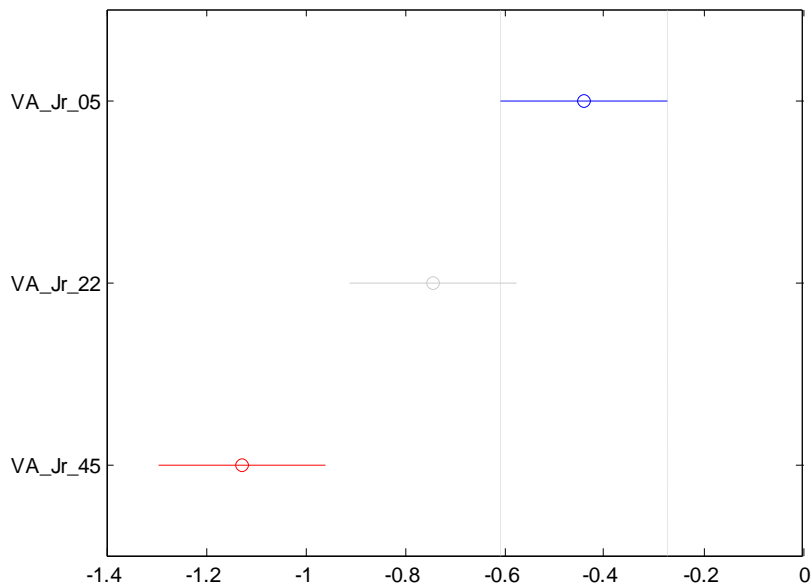


Gráfico A3.2.13 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Cachorro.

A3.2.14 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Adulto.

p = 2.0171e-004

tbl = **ANOVA One Way - VA_Sr** : Vitamina A en Alimento para Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.9229]	[2]	[0.4614]	[10.3411]	[2.0171e-004]
'Error'	[2.0080]	[45]	[0.0446]	[]	[]
'Total'	[2.9309]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - VA_Sr** : Vit A en Alimento para Adulto

c =

1.0000	2.0000	0.0200	0.2011	0.3821
1.0000	3.0000	0.1566	0.3376	0.5186
2.0000	3.0000	-0.0445	0.1366	0.3176

m =

-0.3514	0.0528
-0.5525	0.0528
-0.6890	0.0528

Tabla A3.2.14 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Adulto.

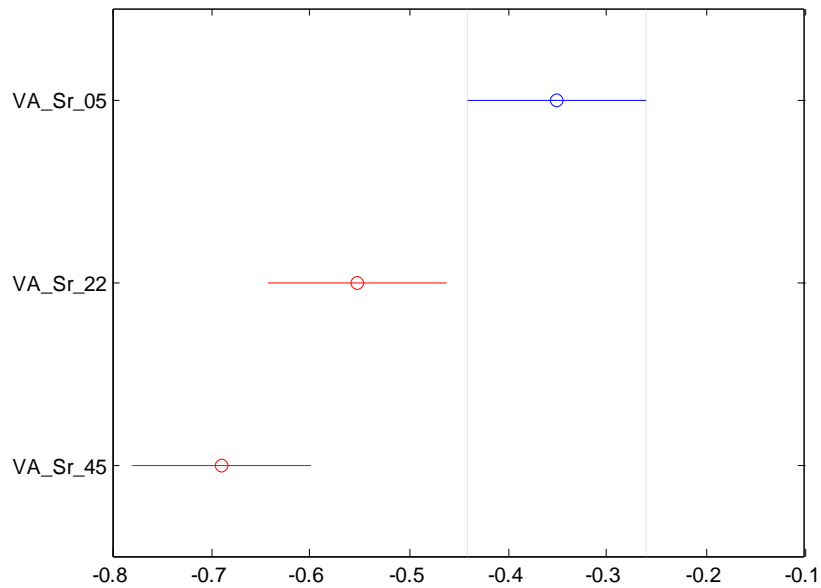


Gráfico A3.2.14 Vitamina A (Retinol) – Alimento para Adulto.

A3.2.15 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Cachorro.

p = 0.0069

tbl = **ANOVA One Way - VD_Jr** : Vitamina D en Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[3.0401]	[2]	[1.5200]	[5.5616]	[0.0069]
'Error'	[12.2989]	[45]	[0.2733]	[]	[]
'Total'	[15.3390]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - VD_Jr** : Vit D en Alimento para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	-0.1407	0.3073	0.7552
1.0000	3.0000	0.1685	0.6164	1.0644
2.0000	3.0000	-0.1388	0.3092	0.7572

m =

-0.6784	0.1307
-0.9856	0.1307
-1.2948	0.1307

Tabla A3.2.15 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Cachorro.

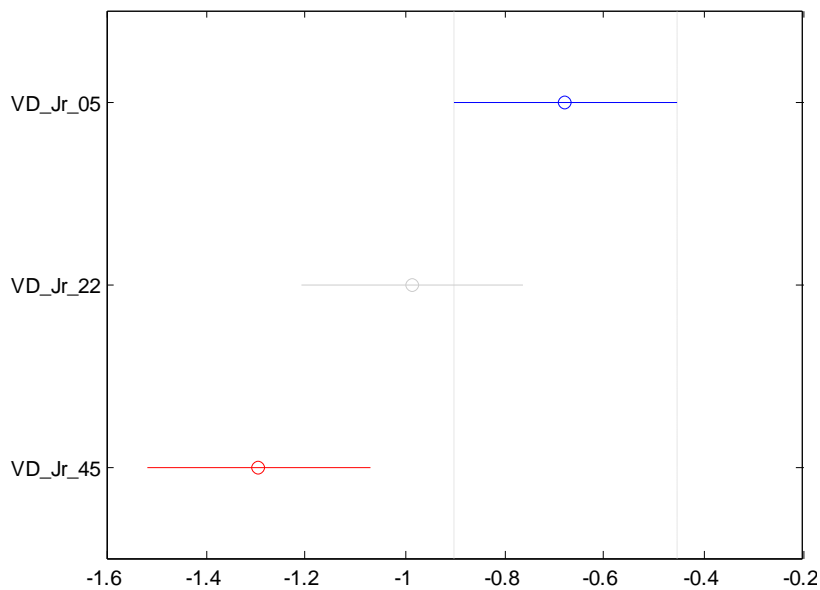


Gráfico A3.2.15 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Cachorro.

A3.2.16 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Adulto.

p = 0.0013

tbl = ANOVA One Way - VD_Sr : Vitamina D en Alimento para Adulto					
'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[4.9648]	[2]	[2.4824]	[7.7678]	[0.0013]
'Error'	[14.3810]	[45]	[0.3196]	[]	[]
'Total'	[19.3458]	[47]	[]	[]	[]

tbl = Comparación Múltiple - VD_Sr : Vit D en Alimento para Adulto

c =

1.0000	2.0000	-0.1917	0.2927	0.7771
1.0000	3.0000	0.2953	0.7798	1.2642
2.0000	3.0000	0.0026	0.4870	0.9715

m =

-0.8606	0.1413
-1.1534	0.1413
-1.6404	0.1413

Tabla A3.2.16 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Adulto.

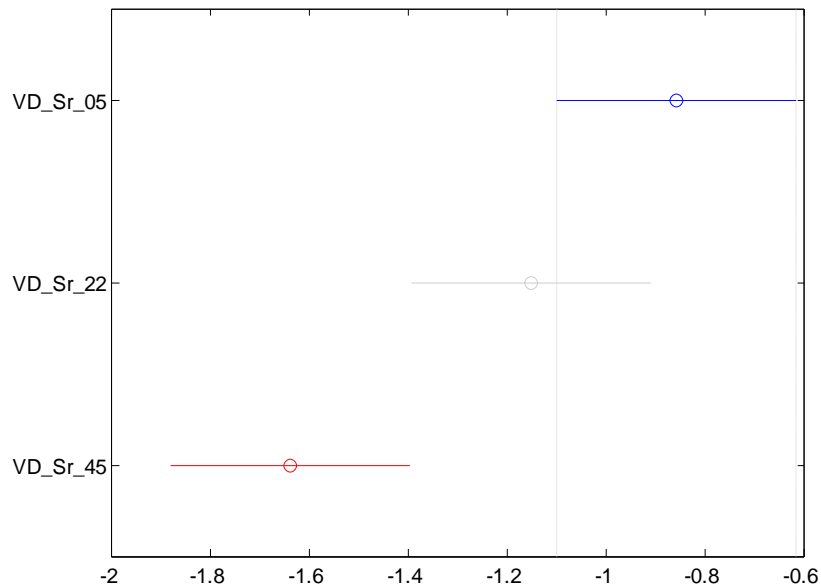


Gráfico A3.2.16 Vitamina D (Colecalciferol) – Alimento para Adulto.

A3.2.17 Vitamina E (α -Tocoferol) – Alimento para Cachorro.

p = 2.6220e-005

tbl = **ANOVA One Way - VE_Jr** : Vitamina E en Alimento para Cachorro

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.3621]	[2]	[0.1811]	[13.4583]	[2.6220e-005]
'Error'	[0.6054]	[45]	[0.0135]	[]	[]
'Total'	[0.9675]	[47]	[]	[]	[]

tbl = **Comparación Múltiple - VE_Jr** : Vit E en Alimento para Cachorro

c =

1.0000	2.0000	0.0085	0.1079	0.2072
1.0000	3.0000	0.1134	0.2128	0.3121
2.0000	3.0000	0.0055	0.1049	0.2043

m =

-0.1146	0.0290
-0.2224	0.0290
-0.3274	0.0290

Tabla A3.2.17 Vitamina E (α -Tocoferol) – Alimento para Cachorro.

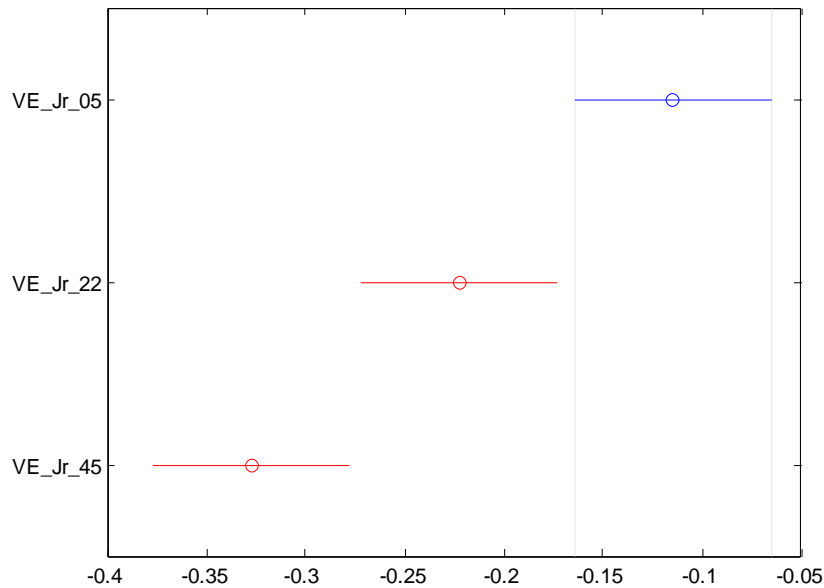


Gráfico A3.2.17 Vitamina E (α -Tocoferol) – Alimento para Cachorro.

A3.2.18 Vitamina E (α -Tocoferol) – Alimento para Adulto.

p = 3.9816e-004

tbl = ANOVA One Way - VE_Sr : Vitamina E en Alimento para Adulto

'Source'	'SS'	'df'	'MS'	'F'	'Prob>F'
'Columns'	[0.3559]	[2]	[0.1779]	[9.3633]	[3.9816e-004]
'Error'	[0.8552]	[45]	[0.0190]	[]	[]
'Total'	[1.2111]	[47]	[]	[]	[]

tbl = Comparación Múltiple - VE_Sr : Vit E en Alimento para Adulto

c =

1.0000	2.0000	-0.0392	0.0789	0.1970
1.0000	3.0000	0.0907	0.2088	0.3270
2.0000	3.0000	0.0118	0.1300	0.2481

m =

-0.1410	0.0345
-0.2198	0.0345
-0.3498	0.0345

Tabla A3.2.18 Vitamina E (α -Tocoferol) – Alimento para Adulto.

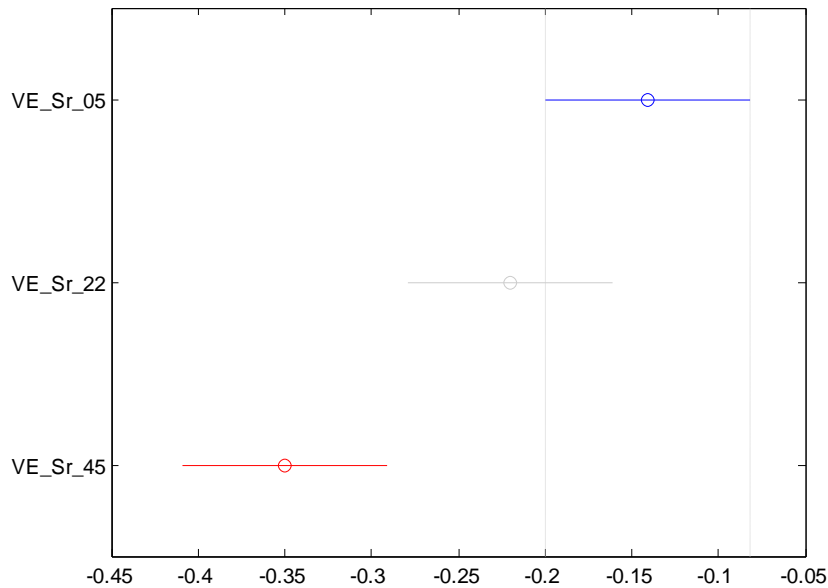


Gráfico A3.2.18 Vitamina E (α -Tocoferol) – Alimento para Adulto.

A3.2.19 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Cachorro

Comparando la pendiente de la curva obtenida al graficar %Digestibilidad *in vitro* vs tiempo a 45°C, contra cero se estima si existe o no correlación lineal entre las variables con un nivel de significancia del 5%, es decir, $\alpha=0.05$ y donde $H_0: \beta_1=0$ y $H_a: \beta_1 \neq 0$

	MS_{Res}	S_{xx}	t_{ol}	$t_{\alpha/2, n-2}$	Criterio de decision
$\beta_1 = -0.2630$ $n=10$	$\frac{\sum Y^2_i}{n-2} =$ 8032.00	$\sum (X_i - X_{prom})^2 =$ 270.50	$\frac{\beta_1}{\sqrt{(MS_{Res}/S_{xx})}} =$ 0.048	$t_{0.025, 8} =$ 2.833	Si $t_{ol} > t_{\alpha/2, n-2}$ Ho se rechaza

Tabla A3.2.19 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Cachorro almacenado a 45°C.

Por lo que H_0 se acepta, es decir que con un nivel de significancia de 5% la pendiente de la curva a 45°C es igual a cero, y el tiempo no tiene valor para explicar la variabilidad de la digestibilidad *in vitro* en alimento para cachorro.

Comparando la pendiente de la curva a 22°C contra cero se estima si existe o no correlación lineal entre las variables con un nivel de significancia del 5%, es decir, $\alpha=0.05$ y donde $H_0: \beta_1=0$ y $H_a: \beta_1 \neq 0$

	MS_{Res}	S_{xx}	t_{ol}	$t_{\alpha/2, n-2}$	Criterio de decision
$\beta_1 = -0.2110$ $n=7$	$\frac{\sum Y^2_i}{n-2} =$ 8898.15	$\sum (X_i - X_{prom})^2 =$ 146.86	$\frac{\beta_1}{\sqrt{(MS_{Res}/S_{xx})}} =$ 0.027	$t_{0.025, 5} =$ 4.773	Si $t_{ol} > t_{\alpha/2, n-2}$ Ho se rechaza

Tabla A3.2.20 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Cachorro almacenado a 22°C.

Por lo que H_0 se acepta, es decir que con un nivel de significancia de 5% la pendiente de la curva a 22°C es igual a cero, y el tiempo no tiene valor para explicar la variabilidad de la digestibilidad *in vitro* en alimento para cachorro.

Comparando la pendiente de la curva a 5°C contra cero se estima si existe o no correlación lineal entre las variables con un nivel de significancia del 5%, es decir, $\alpha=0.05$ y donde $H_0: \beta_1=0$ y $H_a: \beta_1 \neq 0$

	MS _{Res}	S _{xx}	t _{tol}	t _{α/2,n-2}	Criterio de decision
β ₁ =-0.1960 n=5	$\frac{\sum Y^2_i}{n-2}$ 10170.79	$\sum (X_i - X_{prom})^2 =$ 154.80	$\frac{\beta_1}{\sqrt{(MS_{Res}/S_{xx})}} =$ 0.024	t _{0.025,3} = 7.453	Si t _{tol} > t _{α/2,n-2} Ho se rechaza

Tabla A3.2.21 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Cachorro almacenado a 5°C.

Por lo que Ho se acepta, es decir que con un nivel de significancia de 5% la pendiente de la curva a 5°C es igual a cero, y el tiempo no tiene valor para explicar la variabilidad de la digestibilidad in vitro en alimento para cachorro.

A3.2.20 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Adulto

Comparando la pendiente de la curva obtenida al graficar %Digestibilidad *in vitro* vs tiempo a 45°C, contra cero se estima si existe o no correlación lineal entre las variables con un nivel de significancia del 5%, es decir, α=0.05 y donde Ho: β₁=0 y Ha: β₁≠0

	MS _{Res}	S _{xx}	t _{tol}	t _{α/2,n-2}	Criterio de decision
β ₁ =-0.3590 n=12	$\frac{\sum Y^2_i}{n-2}$ 7519.56	$\sum (X_i - X_{prom})^2 =$ 336.67	$\frac{\beta_1}{\sqrt{(MS_{Res}/S_{xx})}} =$ 0.076	t _{0.025,10} = 3.581	Si t _{tol} > t _{α/2,n-2} Ho se rechaza

Tabla A3.2.22 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Adulto almacenado a 45°C.

Por lo que Ho se acepta, es decir que con un nivel de significancia de 5% la pendiente de la curva a 45°C es igual a cero, y el tiempo no tiene valor para explicar la variabilidad de la digestibilidad in vitro en alimento para perro adulto.

Comparando la pendiente de la curva a 22°C contra cero se estima si existe o no correlación lineal entre las variables con un nivel de significancia del 5%, es decir, α=0.05 y donde Ho: β₁=0 y Ha: β₁≠0

	MS _{Res}	Sxx	Itol	t _{α/2,n-2}	Criterio de decision
β ₁ =-0.3410 n=7	$\frac{\sum Y^2_i}{n-2}$ 8725.04	$\sum (X_i - X_{prom})^2 =$ 146.86	$\frac{\beta_1}{\sqrt{(MS_{Res}/Sxx)}} =$ 0.044	t _{0.025,5} = 4.773	Si Itol > t _{α/2,n-2} Ho se rechaza

Tabla A3.2.23 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Adulto almacenado a 22°C.

Por lo que Ho se acepta, es decir que con un nivel de significancia de 5% la pendiente de la curva a 22°C es igual a cero, y el tiempo no tiene valor para explicar la variabilidad de la digestibilidad in vitro en alimento para perro adulto.

Comparando la pendiente de la curva a 5°C contra cero se estima si existe o no correlación lineal entre las variables con un nivel de significancia del 5%, es decir, α=0.05 y donde Ho: β₁=0 y Ha: β₁≠0

	MS _{Res}	Sxx	Itol	t _{α/2,n-2}	Criterio de decision
β ₁ =-0.2880 n=5	$\frac{\sum Y^2_i}{n-2}$ 10150.14	$\sum (X_i - X_{prom})^2 =$ 154.80	$\frac{\beta_1}{\sqrt{(MS_{Res}/Sxx)}} =$ 0.036	t _{0.025,3} = 7.453	Si Itol > t _{α/2,n-2} Ho se rechaza

Tabla A3.2.24 Digestibilidad *In vitro* - Alimento para Adulto almacenado a 5°C.

Por lo que Ho se acepta, es decir que con un nivel de significancia de 5% la pendiente de la curva a 5°C es igual a cero, y el tiempo no tiene valor para explicar la variabilidad de la digestibilidad in vitro en alimento para perro adulto.

A3.3 Síntesis de Resultados y Conclusiones

Síntesis de Resultados:

Parámetro	Presentación	Temperatura	Variable = f(k _i)**	Presentación	Temperatura	Variable = f(k _i)**
Vitamina B1 * (Tiamina)	Cachorro	5 °C	B1_Jr_05 : a	Adulto	5	B1_Sr_05 : a
		22 °C	B1_Jr_22 : a, b		22	B1_Sr_22 : a, b
		45 °C	B1_Jr_45 : b,		45	B1_Sr_45 : b
Vitamina B2 * (Riboflavina)	Cachorro	5 °C	B2_Jr_05 : a	Adulto	5	B2_Sr_05 : a
		22 °C	B2_Jr_22 : b		22	B2_Sr_22 : b
		45 °C	B2_Jr_45 : c		45	B2_Sr_45 : b
Vitamina B6 * (Piridoxina)	Cachorro	5 °C	B6_Jr_05 : a	Adulto	5	B6_Sr_05 : a
		22 °C	B6_Jr_22 : b		22	B6_Sr_22 : a, b
		45 °C	B6_Jr_45 : c		45	B6_Sr_45 : b
Índice de Kreis *	Cachorro	5 °C	IK_Jr_05 : a	Adulto	5	IK_Sr_05 : a
		22 °C	IK_Jr_22 : a, b		22	IK_Sr_22 : a, b
		45 °C	IK_Jr_45 : a		45	IK_Sr_45 : b
Índice de Peróxidos *	Cachorro	5 °C	PO_Jr_05 : a	Adulto	5	PO_Sr_05 : a
		22 °C	PO_Jr_22 : b		22	PO_Sr_22 : b
		45 °C	PO_Jr_45 : c		45	PO_Sr_45 : c
Proteína Soluble *	Cachorro	5 °C	PS_Jr_05 : a	Adulto	5	PS_Sr_05 : a
		22 °C	PS_Jr_22 : a, b		22	PS_Sr_22 : a, b
		45 °C	PS_Jr_45 : b		45	PS_Sr_45 : b
Vitamina A * (Retinol)	Cachorro	5 °C	VA_Jr_05 : a	Adulto	5	VA_Sr_05 : a
		22 °C	VA_Jr_22 : a		22	VA_Sr_22 : b
		45 °C	VA_Jr_45 : b		45	VA_Sr_45 : b
Vitamina D * (Colecalciferol)	Cachorro	5 °C	VD_Jr_05 : a	Adulto	5	VD_Sr_05 : a
		22 °C	VD_Jr_22 : a, b		22	VD_Sr_22 : a
		45 °C	VD_Jr_45 : b		45	VD_Sr_45 : b
Vitamina E * (α-Tocoferol)	Cachorro	5 °C	VE_Jr_05 : a	Adulto	5	VE_Sr_05 : a
		22 °C	VE_Jr_22 : b		22	VE_Sr_22 : a
		45 °C	VE_Jr_45 : c		45	VE_Sr_45 : b

Tabla A3.3.1 Síntesis de resultados de pruebas "t" múltiples realizadas.

*\ Prueba "F" con ANOVA en un sentido muestra la existencia de diferencia significativa, $p < 0.05$, lo que sugiere dependencia de la temperatura de almacenamiento.

**\ Las variables, por componente, en la misma columna vertical con letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

- 1) La evolución de todos los parámetros estudiados, cuando se analizan con el análisis de varianza en un sentido, resultan con diferencia significativa ($p < 0.05$), lo que implica que todos ellos son dependientes de la temperatura de almacenamiento.

- 2) De un análisis global de las pruebas "t" múltiples realizadas, es posible deducir que la dependencia de temperatura toma lugar por arriba de los 22 °C.
- 3) Del análisis estadístico de pruebas "t" para digestibilidad *in vitro*, se deduce que no existe dependencia de la variable % de digestibilidad con el tiempo a ninguna de las temperaturas de trabajo y en ninguna de las formulaciones.