



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estimación de la cinética química en el deterioro  
de alimento animal**

**TESIS**

Que para obtener el título de  
**Química de Alimentos**

**PRESENTA**

Sac-Nicté Yazmín González Mendoza

**DIRECTOR DE TESIS**

M.C. María de los Ángeles Valdivia López



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



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:** M.C. Francisca Aida Iturbe Chiñas.

**VOCAL:** M.C. María de los Ángeles Valdivia López.

**SECRETARIO:** Dr. Hermilo Leal Lara.

**1er. SUPLENTE:** Dr. Alberto Tecante Coronel.

**2° SUPLENTE:** Q.A. 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:**

M.C. María de los Ángeles Valdivia López.

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

Q.A. Bertha Julieta Sandoval Guillén.

**SUSTENTANTE:**

Sac-Nicté Yazmín González Mendoza.

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>Introducción</b>	1
<b>Objetivos</b>	2
Objetivo General	2
Objetivos particulares	2
<b>Hipótesis</b>	2
<b>1. Generalidades</b>	3
1.1 Elaboración de alimento para mascotas	3
1.2 Alimentación Animal	3
1.2.1 Necesidades Nutritivas	3
1.2.2 Energía	4
1.2.3 Macronutrientes	5
1.2.3.1 Proteínas y aminoácidos	5
1.2.3.2 Grasa y ácidos grasos	6
1.2.3.3 Carbohidratos	6
1.2.3.4 Fibra Dietética	7
1.2.4 Micronutrientes	8
1.2.4.1 Vitaminas	9
1.2.5 Agua	10
1.2.6 Problemas Nutricionales y alimenticios	10
1.3 Cambios químicos que ocurren en los componentes del alimento	11
1.3.1 Cambios químicos que ocurren en los macrocomponentes	11
1.3.2 Deterioro químico de los microcomponentes	15
1.3.2.1 Vitaminas hidrosolubles	15
1.3.2.2 Vitaminas Liposolubles	16

1.4 Cinética del deterioro químico y cálculo de vida útil	18
1.4.1 Deterioro dependiente de temperatura	19
1.5 Análisis Estadístico	20
<b>2. Materiales y Métodos</b>	<b>20</b>
2.1 Esquema del trabajo experimental	21
2.2 Almacenamiento	22
2.3 Tiempo cero y Monitoreo	22
• <b>Macrocomponentes</b>	23
Método para la Determinación de Proteína Soluble	23
Método para evaluar Índice de Kreis	23
Método para evaluar Índice de peróxidos	23
Método para evaluar Compuestos Polares	24
Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)	24
Método para evaluar Digestibilidad <i>in vitro</i>	25
Método para determinar Perfil Electroforético	25
• <b>Microcomponentes</b>	25
Método para la Determinación de vitaminas liposolubles	25
Método para la Determinación de vitaminas hidrosolubles (complejo B)	25
<b>3. Resultados y Discusión</b>	<b>26</b>
3.1 Características de la materia prima	26
3.2 Deterioro del material lipídico	26
3.2.1 Índice de peróxidos (IP)	27
3.2.2 Índice de Kreis (IK)	28
3.2.3 Compuestos Polares (CP)	29
3.2.4 Resonancia Paramagnética Electrónica	30
3.3 Deterioro de las proteínas	35
3.3.1 Cambio en la solubilidad de las proteínas (%PS)	35
3.3.2 Evaluación de la digestibilidad <i>in vitro</i>	36
3.3.3 Estudio electroforético	37

3.4 Deterioro de Micronutrientes	39
3.4.1 Vitaminas Liposolubles	40
3.4.2 Vitaminas Hidrosolubles	41
3.5 Cinética de Macrocomponentes y Microcomponentes	44
3.5.1 Macrocomponentes	44
3.5.2 Microcomponentes	48
3.5.2.1 Vitaminas Liposolubles	48
3.5.2.2 Vitaminas Hidrosolubles	49
<b>4. Conclusiones</b>	<b>50</b>
<b>5. Bibliografía</b>	<b>51</b>
<b>6. Anexos</b>	<b>53</b>
<b>Anexo A</b>	<b>53</b>
A. Cinética de Primer Orden	53
<b>Macrocomponentes</b>	<b>54</b>
A.1 Peróxidos (meq/ kg)	54
A.2 Índice de Kreis (U abs/g)	55
<b>Microcomponentes</b>	<b>56</b>
A.3 Vitamina A ( $\mu\text{g}$ / 100g)	56
A.4 Vitamina D ( $\mu\text{g}$ / 100g)	57
A.5 Vitamina E (mg / 100g)	58
A.6 Tiamina (mg / 100g)	59
A.7 Piridoxina (mg / 100g)	60
A.8 Riboflavina (mg / 100g)	61
<b>Anexo B</b>	<b>62</b>
B. Energía de Activación	62
B.1 Indicadores Macro en Alimento para Cachorro	63
• Índice de Kreis	
• Peróxidos	

B.2 Indicadores Macro en Alimento para Adulto	63
• Índice de Kreis	
• Peróxidos	
B.3 Vitaminas Liposolubles en Alimento para Cachorro	64
• Vitamina A	
• Vitamina D	
• Vitamina E	
B.4 Vitaminas Liposolubles Alimento para Adulto	64
• Vitamina A	
• Vitamina D	
• Vitamina E	
B.5 Vitaminas Hidrosolubles en Alimento para Cachorro	65
• Tiamina	
• Piridoxina	
• Riboflavina	
B.6 Vitaminas Hidrosolubles en Alimento para Adulto	65
• Tiamina	
• Piridoxina	
• Riboflavina	

## **Introducción**

Lejos han quedado aquellos días en que era común destinar los sobrantes de la comida familiar a las mascotas; en la actualidad estas pueden consumir alimentos comerciales, cuya variedad ha crecido en los últimos tiempos.

Con el propósito de cumplir con un suministro idóneo las mascotas deben alimentarse con productos que cubran las necesidades nutricionales de su especie, edad, estado y peso. En el caso de los perros, la alimentación de los cachorros debe realizarse desde el destete hasta los 9 meses 2 o 3 veces al día, y posteriormente una vez al día. Por lo tanto los alimentos deben estar acordes con la edad del animal, estado fisiológico del mismo y grado de actividad que realiza.

Cualquiera que sea su presentación. Los alimentos para mascotas deben cubrir completamente las necesidades energéticas, incluso las más elevadas, que corresponden a animales muy activos o estresados, cachorros o adultos.

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, pues al 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 (lípidos, proteínas y vitaminas) pueden repercutir en la pérdida del valor nutritivo y aceptabilidad por parte del animal. De estos cambios pueden derivar las reacciones que sufren principalmente los lípidos por la oxidación (por la dependencia de ésta con las temperaturas y tiempos de proceso y almacenaje), generándose así las consecuentes pérdidas del valor nutrimental en proteínas y vitaminas.

Por consiguiente y a través del cálculo de la cinética química y del cálculo de las constantes de velocidad para los macro y microcomponentes que conforman el alimento, se busca determinar cuáles son los ingredientes más susceptibles a los efectos de la temperatura y el tiempo, con el fin de establecer parámetros que nos permitan controlar la estabilidad del alimento, permitiendo así que el producto conserve por mayor tiempo sus propiedades nutrimentales.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Determinar la vida de anaquel y tiempo de vida media de dos formulaciones de alimento canino: Alimento para Cachorro y Alimento para Adulto.

### **Objetivos particulares**

- Establecer el efecto de la temperatura sobre la velocidad de deterioro químico de los componentes principales en las dos formulaciones de alimento bajo estudio.
- Determinar la cinética de deterioro oxidativo de los lípidos mediante la evolución de los productos primarios y secundarios de la oxidación.
- Determinar las cinéticas de deterioro químico de vitaminas liposolubles (A, D y E) así como de las del complejo B (B1, B2 y B6).
- Estimar la pérdida de digestibilidad y solubilidad proteínica para establecer la cinética de reacción.
- Determinar, mediante el estudio electroforético a tiempo inicial y final del almacenamiento, cambios en los pesos moleculares de las proteínas presentes en la muestra.

### **Hipótesis**

La oxidación lipídica y la temperatura de almacenamiento del alimento para mascotas influyen directamente en el deterioro de los componentes (macrocomponentes y microcomponentes) del mismo y por tanto se reduce la calidad del producto.

## **1. Generalidades**

### **1.1 Elaboración de alimento para mascotas.**

De acuerdo a su textura el alimento que se fabrica comercialmente para mascotas puede ser de 3 tipos: húmedo, semi-seco o seco. Dominando el mercado la línea de alimentos secos.

La mayor parte de los alimentos secos preparados comercialmente se elaboran utilizando un sistema de lotes que muele y mezcla ingredientes crudos en cantidades predeterminadas que oscilan entre 1 a 5 toneladas, dependiendo de su capacidad, posteriormente la matriz resultante se coloca dentro un pre-acondicionador que contiene paletas mezcladoras/transportadoras 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 agregados son retenidos en el pre-acondicionador por aproximadamente 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 compartimientos donde se rocían o espolvorean con grasas y saborizantes. Una vez el producto terminado es enviado a las maquinas envasadoras que las colocan en contenedores adecuados para el transporte y distribución (Hand y Thatcher, 2000).

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 anti-nutricionales tales como el inhibidor de tripsina. (Hand y Thatcher, 2000).

### **1.2 Alimentación Animal**

#### **1.2.1 Necesidades Nutritivas**

Como toda criatura con vida, los animales de compañía necesitan alimentos para mantenerse sanos y salvos. Alimento debería definirse como “cualquier sustancia capaz de nutrir a los seres vivos”. Una descripción más completa es la que define como cualquier sólido o líquido que, al ingerirse, puede aportar:

- Materiales energéticos a partir de los que el animal puede producir movimiento, calor u otras formas de energía.
- Materiales para el crecimiento, reparación o reproducción.
- Sustancias necesarias para iniciar o regular los procesos implicados en las dos categorías anteriores.

Los componentes de los alimentos que representan estas funciones se denominan nutrientes y los alimentos o la mezcla de alimentos que son ingeridos realmente constituirán la dieta. Cualquier nutriente que puede ser requerido por el animal y no puede ser sintetizado por el mismo se denomina esencial y debe provenir de una fuente dietética. Si una dieta carece de un nutriente esencial o éste no se encuentra en cantidad suficiente, dicha dieta deberá considerarse inadecuada. (Kelly y Willis, 2002).

Los perros domésticos alimentados con dietas secas *ad libitum* ingieren de 10 a 13 alimentos diarios, y consumen la mayoría de tales alimentos durante el día. Puede haber preferencia por las dietas enlatadas a base de carne, pero las dietas secas son equivalentes desde el punto de vista nutricional, son más baratas y tienen menor probabilidad de provocar acumulación de placa y cálculos. El buen sabor de las dietas secas puede mejorarse un poco al añadir cantidades pequeñas de sacarosa, pero el sabor de las dietas secas rociadas con material digerido de grasa y carne mejora de manera notable. (Church y Pond, 2006).

### 1.2.2 Energía

Además de proveer de los nutrientes específicos, el alimento también aporta energía. El contenido energético de la dieta se basa en los carbohidratos, grasas y proteínas y proporciones y cantidades de los mismos en el alimento determinarán su contenido energético. (Kelly y Willis, 2002).

Las necesidades energéticas de los perros se expresan con frecuencia en unidades de energía metabolizable (EM). El National Research Council (NRC) establece que las necesidades de EM (en kcal/PC 0.75kg/día) son 274 durante el destete, 200 para perros a la mitad de su crecimiento, 132 para el mantenimiento de adultos, 188 para el final de la gestación y 470 para la lactación. Los perros pequeños tienen mayores necesidades de EM por unidad de peso corporal que los perros grandes. Pero el NRC propone que los perros de tamaños distintos tienen necesidades de EM similares por unidad de tamaño corporal metabólico (PC 0.75kg). (Church y Pond, 2006).

La ingesta de energía debe ser controlada con cuidado y mantenida a niveles cercanos a las necesidades. Una ingesta excesiva de energía puede ser perjudicial y producirá obesidad o en algunos perros jóvenes anomalías de crecimiento. Una ingesta inadecuada de energía da como resultado un crecimiento pobre en animales jóvenes y una pérdida de peso en adultos. No obstante, la mayoría de los animales son eficientes autorreguladores de su propia ingesta de energía. (Kelly y Willis, 2002).

## 1.2.3 Macronutrientes

### 1.2.3.1 Proteínas y aminoácidos

Las proteínas son grandes moléculas compuestas de largas cadenas de sus unidades constitutivas: los aminoácidos. Existen únicamente unos veinte aminoácidos, pero éstos pueden combinarse de cualquier manera, de forma que proporcionan casi una infinita variedad de posibilidades de construcción de proteínas, cada una con sus propias características. Las proteínas son componentes esenciales de toda célula viva que presente funciones vitales como la de control de metabolismo (enzimas y hormonas) y funciones estructurales en las paredes celulares y fibras musculares. Son, por lo tanto, necesidades importantes para el crecimiento y reparación tisular. Las proteínas son también una fuente de energía de la dieta.

Los animales necesitan una fuente dietética de proteína para proveerse de los aminoácidos específicos que sus tejidos son incapaces de sintetizar a niveles apropiados. Los aminoácidos pueden clasificarse en esenciales (indispensables) y no esenciales (dispensables). Dentro de los aminoácidos esenciales están: Arginina, Fenilalanina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Treonina, Triptófano y Valina, los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo en cantidades suficientes y deben, por lo tanto, ser ingeridos con la dieta. Los aminoácidos no esenciales son igualmente importantes como componentes de las proteínas corporales, pero sí pueden ser sintetizados a partir de un exceso de aminoácidos en la dieta u otras fuentes de nitrógeno dietético. (Kelly y Willis, 2002).

Las necesidades dietéticas de proteínas dependen de la calidad de las proteínas (contenido de aminoácidos esenciales), la digestibilidad de las proteínas, la ingesta de energía, el estado nutricional previo, el patrón de alimentación, la edad, la tasa de crecimiento, el estado reproductivo y la concentración de grasas de la dieta (proporción proteínas/energía). La Association of American Feed Control Officials (Asociación de Autoridades Americanas de Control de Alimentos, AAFCO) considera un mínimo de 18% de proteínas, en la materia seca (MS) de la dieta para mantenimiento de perros adultos.

El mínimo de proteínas aceptado por la AAFCO para el crecimiento y la reproducción es de 22% de MS dietética. (Church y Pond, 2006).

La deficiencia proteica generalmente es debida a una ingesta inadecuada de proteína, o bien a una limitación de algún aminoácido. Encontraremos como síntomas crecimiento pobre o pérdida de peso, pelo rudo y sin brillo, anorexia, mayor susceptibilidad a enfermedades, gasto muscular y emaciación, edema y, finalmente, muerte. La deficiencia de un aminoácido en particular dará como resultado anorexia y un balance nitrogenado negativo.

El exceso de proteína en la dieta no se deposita en forma de masa muscular, sino que será convertido en grasa y almacenado como tejido adiposo. La proteína es una importante materia bruta y debería ser utilizada lo más eficazmente posible. (Kelly y Willis, 2002).

### 1.2.3.2 Grasa y ácidos grasos

La grasa dietética consiste principalmente en la mezcla de triglicéridos, donde cada triglicérido es una combinación de tres ácidos grasos unidos a un glicerol. Las características de cada triglicérido están determinadas por sus diferentes ácidos grasos. Estos pueden ser saturados, cuando no existen dobles enlaces entre carbonos, o insaturados, cuando está presente uno o más enlaces dobles. Aquellos que contengan más de un doble enlace se denominarán poliinsaturados.

La mayoría de grasas contienen todos estos tipos de ácidos grasos, pero varían las proporciones. La grasa dietética tiene diversas funciones. Es la fuente energética más concentrada de la dieta y proporciona una textura aceptable a la dieta. Sin embargo, sus funciones más importantes son las de aportar ácidos grasos esenciales (AGE) y la de portador de vitaminas liposolubles A, D, E y K. Existen tres AGE ampliamente reconocidos, los cuales son insaturados: ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico y ácido araquidónico. Los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico son compuestos precursores, a partir de los cuales se sintetizan otros compuestos más complejos.

Los ácidos grasos están implicados en muchos aspectos de la salud, incluido la función renal y reproductora. Son componentes esenciales de las membranas celulares y resultan necesarios para la síntesis de prostaglandinas. Los síntomas asociados a la deficiencia de ácidos grasos esenciales en los perros son pelaje sin brillo y áspero, pérdida de pelo, hígado graso, anemia y fertilidad disminuida.

Debería remarcarse que las dietas con un elevado nivel de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) pueden enranciarse debido a la oxidación, llevando a la destrucción de otros nutrientes. La vitamina E es un antioxidante que protege a los PUFA de la oxidación. (Kelly y Willis, 2002).

Por lo anterior, los perros no requieren determinada cantidad de grasa en la dieta, aunque la grasa tiene un efecto positivo en el buen sabor del alimento y favorece la absorción de vitaminas liposolubles. Los alimentos secos y semi-húmedos para perros contienen, 8-12% de grasa en una base de MS. (Church y Pond, 2006).

### 1.2.3.3 Carbohidratos

Los carbohidratos aportan energía al organismo y pueden ser transformados en grasa corporal. Este grupo incluye azúcares simples (como la glucosa) y azúcares complejos (como el almidón), que consisten en cadenas de azúcares simples.

Todos los animales presentan necesidades metabólicas de glucosa, pero con una dieta que tenga un contenido suficiente en precursores de glucosa (aminoácidos y glicerol), la mayoría pueden sintetizar la glucosa necesaria para satisfacer sus necesidades metabólicas, sin ningún tipo de fuente dietética de carbohidrato. Durante la gestación y

la lactación, las demandas de glucosa se incrementan, pero trabajos recientes han demostrado que en el perro los carbohidratos dietéticos no son necesarios, incluso en esta época, si es que existe un aporte suficiente de aminoácidos glucogénicos. (Kelly y Willis, 2002).

#### **1.2.3.4 Fibra Dietética**

La fibra dietética, o forraje, es el término aplicado a los polisacáridos no digeribles como la celulosa, la pectina e incluso al polímero lignina por su intrínseca asociación a la celulosa. Suelen estar afiliados a plantas y generalmente constituyen las paredes celulares de las plantas. Estos materiales por lo general escapan de la digestión y pasan a través del tracto digestivo sin cambios evidentes. El papel de la fibra dietética depende en gran medida de la fisiología del tracto digestivo del animal, pero en la mayoría de especies una cantidad limitada de fibra dietética puede proporcionar volumen fecal, regulando los movimientos del intestino y ayudando a prevenir el estreñimiento o la diarrea. (Kelly y Willis, 2002).

#### **1.2.4 Micronutrientes**

##### **1.2.4.1 Vitaminas**

Las vitaminas son compuestos orgánicos que ayudan a regular los procesos corporales. Muchas vitaminas no pueden ser sintetizadas y deben, por lo tanto, estar presentes en la dieta. Se pueden clasificar en liposolubles (vitaminas A, D, E y K) e hidrosolubles (complejo B y vitamina C). Es necesario un aporte frecuente de vitaminas hidrosolubles debido a la escasa capacidad de ser almacenadas en el organismo; así los excesos de eliminarán por la orina. Las vitaminas liposolubles se almacenan en cantidades mayores y, consecuentemente, no es tan necesaria su ingestión diaria, mientras que sí es más habitual el riesgo de toxicidad. Su función y efecto se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Vitaminas. Función y Efecto en la ingesta animal.

### Vitaminas Liposolubles

Vitamina	Función	Efectos del desequilibrio
<b>Vitamina A</b>	Componente de los pigmentos visuales (transmisores de luz) del ojo e importante para una adecuada visión. Implicado en la diferenciación celular y en el mantenimiento de la estructura normal de la célula, por lo tanto es importante para mantener saludables la piel, el pelaje, las membranas mucosas y para el desarrollo óseo y de los dientes.	<p><b>Deficiencia:</b> Anomalías del epitelio escamoso (seborrea); xeroftalmia (sequedad ocular); ceguera nocturna; mayor susceptibilidad a infecciones microbianas; lesiones costrosas en las narinas acompañadas de descarga nasal; infertilidad.</p> <p><b>Toxicidad:</b> Daño hepático; enfermedad ósea que provoca exostosis ósea y anquilosis en las articulaciones, particularmente en vértebras cervicales y en huesos largos de las extremidades anteriores.</p>
<b>Vitamina D</b>	Sus metabolitos estimulan la absorción de calcio en el intestino y, junto con la hormona paratiroidea, estimulan la reabsorción de calcio del hueso. Las necesidades están íntimamente ligadas a las concentraciones dietéticas de calcio y fósforo. La vitamina D3 puede sintetizarse a partir de componente lipídicos en la piel después de la exposición al sol.	<p><b>Deficiencia:</b> Extremadamente rara, pero suele confundirse por un desequilibrio de calcio y fósforo. Causa raquitismo en animales jóvenes y osteomalacia en adultos, caracterizada por un fallo en la mineralización del tejido osteoide formado. En animales jóvenes, la osificación endocondrial de las placas de crecimiento se encuentra interrumpida, provocando un engrosamiento de la metáfisis, particularmente de radio, peroné y costillas.</p> <p><b>Toxicidad:</b> Hipercalcemia, que prolongada provoca una calcificación extensa de tejidos blandos, pulmones, riñón y estómago. Puede haber deformaciones de dientes y mandíbula, y si la ingesta de vitamina D es particularmente elevada puede ocurrir la muerte del animal.</p>
<b>Vitamina E</b>	Actuando con el selenio, la vitamina E protege las membranas celulares del ataque de compuestos oxidantes. Las necesidades del vitamina E aumentan a medida que se incrementan los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) que son fácilmente oxidados.	<p><b>Deficiencia:</b> Inflamación dolorosa de la grasa corporal (especialmente la grasa subcutánea). Puede inducirse con dietas de pescado graso, rico en PUFA, o grasa rancia. Distrofia del músculo esquelético, fallo reproductivo e inhibición de la respuesta inmunitaria en perros.</p> <p><b>Toxicidad:</b> No es probable que tenga lugar ya que se toleran dosis relativamente elevadas.</p>

<b>Vitamina K</b>	Regula la formación de varios factores de coagulación (Factores VII, IX, X,y XII).	<p><b>Deficiencia:</b> No es probable ya que normalmente los animales sanos presentan necesidades de vitamina K que son cumplidas por la síntesis de la microflora intestinal.</p> <p>Algunos animales presentan hipoprotrombinemia y hemorragia cuando la síntesis bacteriana se encuentra reprimida, o si antagonistas de la vitamina K (como warfarina u otros compuestos de cumarinas están presentes en la dieta.</p> <p><b>Toxicidad:</b> Una toxicidad baja, pero la ingestión de grandes cantidades de vitamina K produce anemia y otras anomalías en sangre en animales jóvenes.</p>
-------------------	--	---

### Vitaminas Hidrosolubles (Complejo B)

<b>Vitamina B<sub>1</sub></b> <b>(Tiamina)</b>	Implicado en el metabolismo de carbohidratos. La necesidad es dependiente del contenido de carbohidratos de la dieta	<p><b>Deficiencia:</b> Anorexia, desórdenes neurológicos (especialmente de mecanismos posturales) seguidos finalmente de debilidad, fallo cardíaco y muerte. Además, la vitamina es progresivamente destruida a temperaturas elevadas y bajo condiciones determinadas de procesado.</p> <p><b>Toxicidad:</b> Baja toxicidad.</p>
<b>Vitamina B<sub>2</sub></b> <b>(Riboflavina)</b>	Constituyente de dos co-enzimas esenciales en los sistemas enzimáticos oxidativos. Esencial para el crecimiento celular.	<p><b>Deficiencia:</b> lesiones oculares, desórdenes en la piel e hipoplasia testicular.</p> <p><b>Toxicidad:</b> No reportada.</p>
<b>Vitamina B<sub>6</sub></b> <b>(Piridoxina)</b>	Implicación en muchos sistemas enzimáticos asociados al metabolismo de nitrógeno y aminoácidos.	<p><b>Deficiencia:</b> Anorexia, pérdida de peso y anemia.</p> <p><b>Toxicidad:</b> No se considera tóxica.</p>

\*(Kelly Noel, Willis Josephine; 2002).

Como se observa en la tabla 1, la disminución de las vitaminas (liposolubles e hidrosolubles) en la dieta (alimento), trae como consecuencia en el individuo zoológico una nutrición deficiente, cuya repercusión se presenta mayoritariamente en un mal desarrollo, baja energía y en un cuadro clínico desfavorable para su crecimiento y para su adecuada función fisiológica y metabólica en las diferentes etapas de su desarrollo.

### **1.2.5 Agua.**

El agua es el nutriente más importante en el perro, como lo es en el caso de todos los seres vivos. Los perros obtienen agua líquida, a partir de alimentos y a partir de la oxidación del hidrógeno durante el metabolismo (agua metabólica). Se producen cerca de 10 a 16 g de agua metabólica por cada 100 kcal de energía metabolizada. Un perro que consume 2 000 kcal de energía metabolizable al día producirá 200 a 320 g de agua metabólica. Puesto que los alimentos semi-húmedos y enlatados para perros contienen alrededor de 30 y 78% de agua, respectivamente, un perro que ingiere estos productos necesitaría consumir menos agua líquida que un perro que ingiere un alimento seco que contiene 10% de agua. (Church y Pond, 2006).

### **1.2.6 Problemas Nutricionales y alimenticios en el individuo zoológico.**

- Debido a que la piel de los perros carecen del 7-dehidrocolesterol necesario para la síntesis de la vitamina D3, ésta debe estar siempre presente en el alimento de los animales para prevenir raquitismo. Se recomienda poner especial atención en evitar la rancidez de las grasas, ya que entre otros nutrimentos puede destruirse dicha vitamina.
- La avitaminosis E se manifiesta como ceguera en grados diversos, que se agrava al conjuntarse con la deficiencia de vitamina A.
- El aminoácido taurina (sintetizado a partir de cisteína y metionina, aminoácidos azufrados) aparenta ser esencial para la especie. Pues su deficiencia provoca insuficiencia cardíaca y ceguera. La carencia de tal aminoácido es producida debido a las menores cantidades de proteínas animales y mayor dependencia de los hidratos de carbono en la dieta.
- Las proteínas son especialmente vulnerables al calor, y se dañan, o “desnaturalizan”, cuando se cocinan. Debido a que los ingredientes se cocinan dos veces, primero durante la mezcla y de nuevo en la extrusora en los alimentos secos (piensos), los problemas son mucho más frecuentes que con los alimentos enlatados o preparados en casa. Las proteínas alteradas pueden contribuir a las intolerancias alimentarias, alergias a los alimentos, y la enfermedad inflamatoria del intestino.
- Los almidones provenientes de los tubérculos no los desdobra bien el perro, además reducen la digestibilidad de las proteínas alimenticias. Como desventajas adicionales se tiene un aumento en la producción de flatulencias y que las heces pierdan consistencia.
- Los cereales deben someterse a procesos de cocción previos a su incorporación como alimento para perros. De lo contrario se observa un sobre consumo y diarreas.

- La ingesta excesiva de energía en un perro en crecimiento causa obesidad en razas pequeñas y tasas de crecimiento realmente elevadas en razas grandes y gigantes. Esto último no es necesariamente beneficioso para el animal, y por su parte el incremento prematuro del peso corporal produce estrés al esqueleto. Ello puede provocar enfermedades multifactoriales caracterizadas por anomalías en el desarrollo y el crecimiento óseo.

### **1.3 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).

#### **1.3.1 Cambios químicos que ocurren en los macro-componentes.**

Los cambios químicos más importantes se asocian con las reacciones de oxidación, particularmente las de los lípidos, que promueven el desarrollo de sabores y olores objetables. (Ver figura 1) .De igual manera puede presentarse alteración en el color y degradación proteínica, así como el oscurecimiento no enzimático que provoca cambios en la apariencia del alimento. Los cambios químicos mencionados pueden provocar pérdida nutricional por la disminución de solubilidad de las proteínas, oscurecimiento y desarrollo de sabores amargos (Charalambous, 1993).

#### **I. Oxidación de lípidos.**

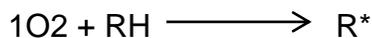
La rancidez de lípidos se divide en hidrolítica o lipólisis y rancidez oxidativa. La primera ocurre a través de lipasas o cuando los ácidos grasos son expuestos a temperaturas muy altas en presencia de agua, como en la fritura de alimentos con alto contenido de humedad. La rancidez oxidativa se divide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

#### **I.I Autooxidación.**

La velocidad de reacción o constante de velocidad depende esencialmente de factores intrínsecos como la composición de ácidos grasos, grado de insaturación, la concentración y actividad de pro y antioxidantes presentes y de factores extrínsecos como la presión parcial de oxígeno, presencia de pro-oxidantes (metales de transición), las condiciones de almacenamiento tales como temperatura ambiental, exposición a la luz y contenido de humedad. (Fennema, 1996).

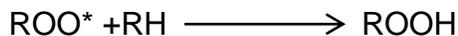
La autooxidación, es la reacción directa del oxígeno molecular (triplete,  $^3\text{O}_2$ ) con compuestos orgánicos bajo determinadas condiciones. En el mecanismo de oxidación de los lípidos se pueden diferenciar tres etapas o fases:

**1ª etapa Iniciación:** El oxígeno existe en dos estados, el estado más estable es el triplete ( $^3\text{O}_2$ ), el cual tiene dos electrones sin aparear con el mismo sentido de espín; y el oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), que es un estado excitado y más reactivo, con los electrones sin aparear con sentidos opuestos de espín. Las moléculas de oxígeno en estado singulete oxidan directamente al grupo  $-\text{CH}$  del ácido graso insaturado (RH) a la vez que desplazan el doble enlace y forman un radical alquilo ( $\text{R}^*$ ). La velocidad de reacción inicial es lenta. El oxígeno en estado fundamental (triplete), no puede llevar a cabo esta reacción, sin embargo, por efecto de la radiación (luz), se puede transformar en singulete.



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 reacción.

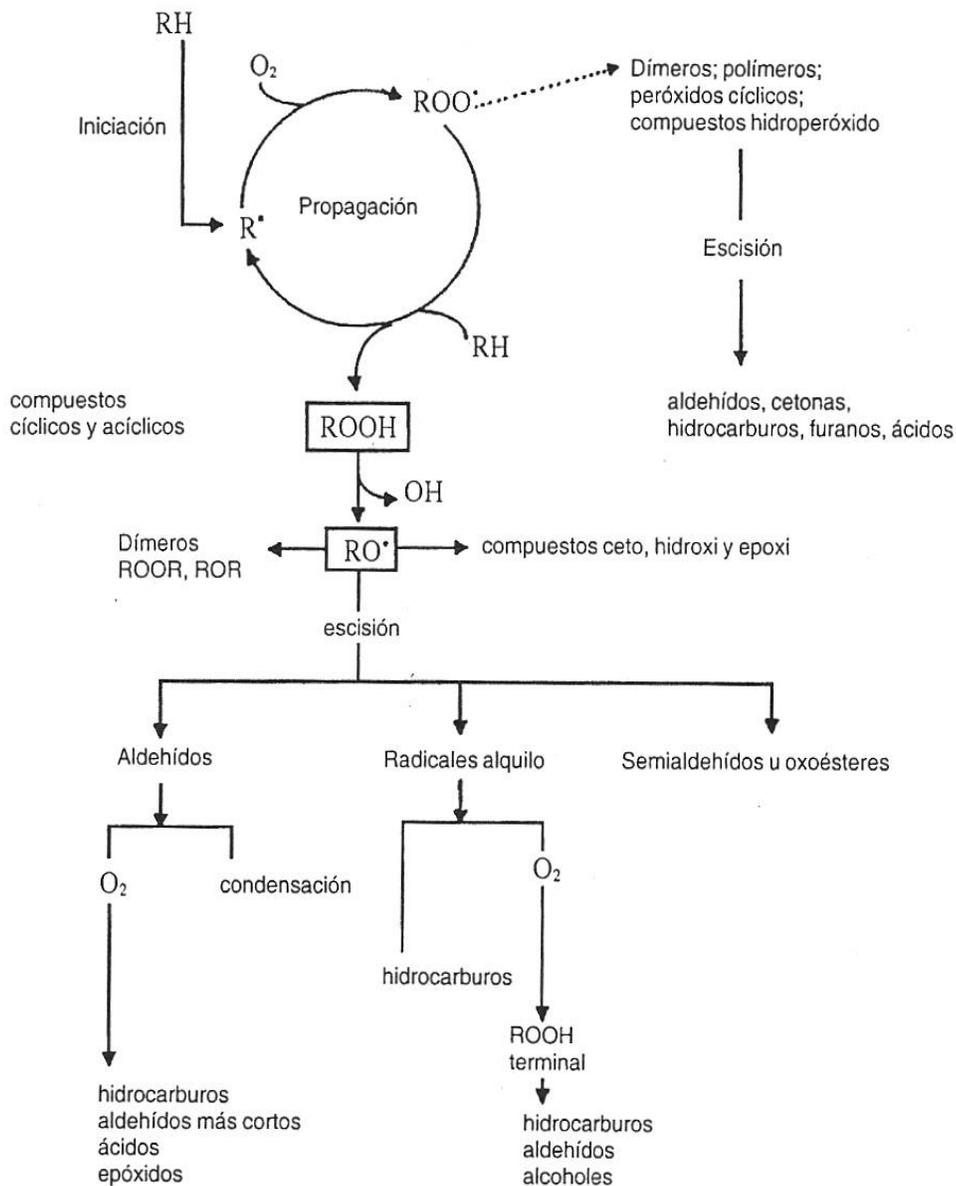
**2ª etapa Propagación:** Los radicales alquilo ( $\text{R}^*$ ), generados en el proceso de iniciación bajo sistemas de arreglos estructurales de dienos interrumpidos por metilenos a dienos conjugados reactivos en presencia de oxígeno triplete, producen radicales peroxi ( $\text{ROO}^*$ ) a una velocidad alta en la cadena lipídica. El radical peroxi desaparece a una velocidad lenta formando un hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) y un nuevo radical libre puede propagar la reacción en cadena.



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, 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, afectando su solubilidad y por ende su digestibilidad.

**3ª etapa Terminación:** La cadena termina por reacciones entre radicales, produciendo así dímeros y polímeros de mayor peso molecular cada vez. En presencia de un exceso de oxígeno, la combinación entre radicales libres alquilo, alcoxi ( $\text{RO}^*$ ) y peróxido ( $\text{ROO}^*$ ) 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 poli-insaturados de cadena larga tales como el ácido araquidónico (Wheatley, 2000).



**Figura 1.** Esquema completo de la oxidación de lípidos. Muestras sus 3 etapas y productos de oxidación. (Fennema, 1996).

## **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, ya que conforme se pierde la solubilidad, se considera que la proteína se encuentra menos disponible para su aprovechamiento, debido a que la aglomeración dificulta el encuentro de las proteínas proteolíticas con los sitios específicos de corte (Ledesma, 2008).

Los tratamientos térmicos en alimentos con alto contenido proteico, pueden tener como consecuencia desulfuraciones, desaminaciones (calentamiento superior a los 100°C), isomerizaciones (calentamiento superior a 200°C) u otras modificaciones químicas de los aminoácidos, seguidas algunas veces de la formación de sustancias tóxicas.

La desaminación no afecta el valor nutritivo de las proteínas pero puede ir seguida de la formación de nuevos enlaces covalentes entre restos de aminoácidos. El tratamiento térmico superior a los 200°C isomeriza al azar los restos de aminoácidos a las formas D y L, y como la mayoría de los D aminoácidos carecen de valor nutritivo, la racemización total de un aminoácido esencial reduce su valor nutritivo al 50%, afectando así también a la digestibilidad por los enlaces peptídicos en los que participan restos D.

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 lisina y asparagina, la formación de estos enlaces desde el punto de vista nutricional lleva a un descenso en la digestibilidad del nitrógeno, el coeficiente de eficacia proteínica 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 la proteasas alcanzar los puntos de hidrólisis por impedimento estérico de los enlaces cruzados frenando la digestión in vivo de toda la proteína (Damodaran y Paraf, 1997).

Otro mecanismo ocurre mediante reacciones carbolamina y en él los diversos derivados aldéhdicos como el malonaldehído, proveniente de la oxidación de lípidos, puede reaccionar con los grupos amino libres de diferentes cadenas polipeptídicas, estableciendo enlaces covalentes del tipo 1-amino-3-imino propeno que afectan las propiedades funcionales de las proteínas, como su solubilidad o capacidad de retención de agua, así como dificultan en gran medida la hidrólisis por proteasas.

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 haya visto dañado. (Fennema, 1996).

### **1.3.2 Deterioro químico de los microcomponentes.**

De manera simultánea otros micronutrientes y componentes como las vitaminas pueden sufrir cambios debido a la reactividad simultánea de macro-componentes así como a la influencia de los factores extrínsecos mencionados.

En general, las vitaminas se agrupan por su capacidad para solubilizarse en medios de naturaleza distinta en hidrosolubles y liposolubles.

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).

Las vitaminas hidrosolubles de importancia canina son las pertenecientes al Complejo B, las cuales actúan como coenzimas involucradas en el metabolismo energético y en la síntesis tisular. Son pequeñas moléculas orgánicas sin las cuales la enzima jamás podría llevar a cabo la reacción específica (Case, 2001).

El método de fabricación de los alimentos (extrusión) produce pérdida de nutrientes debido a las altas temperaturas y a las fuerzas de deslizamiento, por lo cual puede ocurrir una pérdida de vitaminas A, E y tiamina del 21, 26 y 12% respectivamente. Un agregado de niveles altos de estas vitaminas compensa las pérdidas ocurridas en el proceso de extrusión (Hand y Thatcher, 2000).

#### **1.3.2.1 Vitaminas hidrosolubles.**

Las vitaminas del complejo B que fueron objeto de nuestro estudio durante esta investigación fueron: Tiamina (B<sub>1</sub>), Riboflavina (B<sub>2</sub>) y Piridoxina (B<sub>6</sub>).

##### **I. Tiamina (Vitamina B<sub>1</sub>).**

Esta vitamina tiene importancia en el metabolismo oxidativo de los glúcidos y lípidos (a-cetoácidos y de los carbohidratos), es decir, en la producción de energía, por lo que la presencia de esta vitamina en el animal depende de la proporción de azúcares en la dieta. La deficiencia de tiamina puede alterar significativamente el funcionamiento del sistema nervioso central (Case, 2001).

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

La vitamina B<sub>1</sub> es una de las vitaminas más lábiles, por lo cual su estabilidad depende de la temperatura, el pH, la fuerza iónica, el tipo de amortiguador y otros agentes reactivos. (Fennema, 1996).

## **II. Riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>).**

Es una sustancia de color amarillo, cristalina, relativamente estable al calor e insensible al oxígeno atmosférico y a las soluciones ácidas, se destruye en medio alcalino y con la luz ultravioleta. Debe su nombre a su color amarillo (flavina) y a que contiene el azúcar D-ribosa en su estructura. La vitamina B<sub>2</sub> es estable a casi todas las condiciones de procesado o cocinado (Badui, 2006).

Forma parte de las coenzimas FAD y FMN, que participan en los procesos de obtención de energía (metabolismo de hidratos de carbono, grasas) y especialmente en el metabolismo de las proteínas que participan en el transporte de oxígeno, en la respiración celular (Case, 2001).

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

## **III. Piridoxina (Vitamina B<sub>6</sub>).**

La piridoxina o vitamina B<sub>6</sub> es necesaria para la absorción y el metabolismo de aminoácidos. También actúa en la utilización de grasas del cuerpo y en la formación de glóbulos rojos. Esta vitamina engloba tres compuestos: piridoxina, piridoxamina y piridoxal. Su forma activa, el piridoxal fosfato, actúa como coenzima de las enzimas transferasas implicadas en el metabolismo (transaminaciones) de los aminoácidos y en menor medida en el metabolismo de glucosa y ácidos grasos. Muchas de estas acciones están encaminadas a la síntesis de neurotransmisores. La cantidad de piridoxina necesaria de un animal es proporcional a la cantidad de proteína consumida en la dieta. (Case, 2001).

Las tres formas de la vitamina B<sub>6</sub> son termoestables, pero se descomponen por la acción de álcalis y por irradiación con luz UV y presencia de oxígeno se transforman en sustancias biológicamente inactivas. 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 B<sub>6</sub> pueden analizarse simultáneamente por HPLC.

### **1.3.2.2 Vitaminas Liposolubles.**

Las vitaminas del grupo liposoluble que fueron objeto de nuestro estudio durante esta investigación son: Retinol (Vitamina A), Colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub>) y  $\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E).

## **I. Retinol (Vitamina A).**

Todos los animales requieren fisiológicamente de vitamina A activa. La cual puede presentarse como un alcohol libre (retinol), como un aldehído (retinal) o como ácido retinoico, sin embargo la mayoría de los mamíferos como el perro pueden convertir precursores tales como el  $\beta$ -caroteno en vitamina A activa. Las formas más habituales de esta vitamina preformada en los alimentos son los derivados del retinol como el palmitato y acetato de retinil.

La vitamina A es una vitamina antioxidante, ya que elimina radicales libres y protege al ADN de su acción mutágena, contribuyendo, por tanto, a frenar el envejecimiento celular, la sensibilidad a la oxidación es debida a la gran cantidad de dobles enlaces presentes en su estructura. Es sensible a la luz y se oxida fácilmente debido a la gran cantidad de dobles enlaces que poseen sus moléculas.

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  $0.3\mu\text{g}$  de retinol ó  $0.6\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno (Hand y Thatcher, 2000).

Al igual que la oxidación lipídica, la velocidad de la desactivación de la vitamina A depende de enzimas, actividad acuosa, atmosfera de almacenamiento y de la temperatura (Fennema, 1996).

## **III. Colecalciferol (Vitamina D<sub>3</sub>).**

Muchos animales poseen la capacidad de sintetizar vitamina D a partir de 7-dehidrocolesterol cuando la piel recibe radiación UV.

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 representan unos requerimientos de colecalciferol muy bajos.

Durante el crecimiento, la vitamina D es muy importante para el desarrollo normal y la mineralización del hueso.

El límite máximo establecido por la AAFCO para vitamina D es de 5,000 UI/Kg de alimento seco, donde 40 UI de vitamina D<sub>3</sub>, equivalente a  $1\mu\text{g}$  de colecalciferol (Case, 2001).

#### IV. $\alpha$ -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  $\alpha$ -tocoferol y el selenio actúan sinérgicamente. La vitamina E se oxida con carácter preferente antes que los ácidos grasos insaturados, protegiéndolos así de la rancidez.

La AFFCO recomienda un mínimo de 50UI/Kg de vitamina E por cada kg de masa seca de alimento para cualquier etapa de desarrollo, donde 1 UI equivalente a 1 mg de acetato de  $\alpha$ -tocoferol y 1.49UI son equivalentes a 1mg de RRR- $\alpha$ -tocoferol que es el más abundante en los alimentos y el más activo biológicamente (Case, 2001).

##### 1.4 Cinética del deterioro químico y cálculo de vida útil.

Los resultados obtenidos para los parámetros estudiados, se sometieron a un tratamiento de datos que corresponde a un modelo cinético de primer orden expresado mediante la siguiente ecuación diferencial (Brimberg, 1993; Labuza, 1971, 1979):

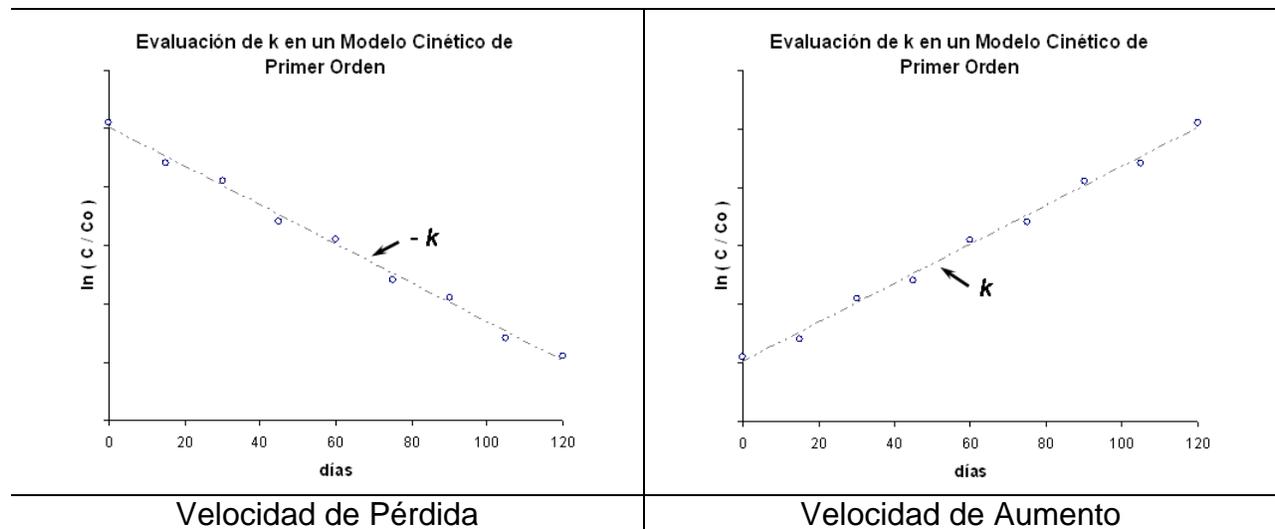
$$-\frac{dC}{dt} = kC$$

En donde  $dC/dt$  es la velocidad de pérdida y/o aumento del parámetro,  $k$  es la constante de velocidad de pérdida y/o aumento ( $\text{días}^{-1}$ ),  $C$  es el valor del parámetro a cualquier tiempo  $t$  (días). La integración de esta ecuación conduce a:

$$-\ln \frac{C}{C_0} = kt \quad \text{ó} \quad C = C_0 \exp(-kt)$$

Donde  $C_0$  es el valor del parámetro al tiempo cero.

Con la expresión anterior es posible entonces evaluar la constante de velocidad de pérdida y/o aumento mediante la regresión lineal del par:  $X = t$  (semanas) y  $Y = \ln (C/C_0)$ , para la que adicionalmente se incorpora la representación gráfica (ver Anexo B) para una mejor interpretación de los datos como puede analizarse con la ayuda de los dos siguientes gráficos:



Determinada la constante de velocidad de pérdida y/o aumento del parámetro medido, se determinó la vida media que, para propósitos del estudio se establece como la vida de anaquel recomendada para el parámetro específico, en tanto que ello representa (para el caso de pérdida o deterioro), el tiempo necesario para que el valor del parámetro alcance el 50 % de su valor inicial.

Esta variable se expresa en tiempo (días), calculado mediante la expresión:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

Asimismo, se calculó una variable adicional que permite determinar un tiempo estimado para el que el valor de parámetro alcance un 90 % pérdida de su valor inicial:

$$t_f = \frac{2.303}{k}$$

Todos estos resultados obtenidos, de la forma antes descrita, para cada uno de los componentes (parámetros) considerados en el estudio, se sintetizan en la expresión siguiente:

$$C = C_0 * \exp (-k * t)$$

#### 1.4.1 Deterioro dependiente de temperatura

La dependencia a la temperatura del deterioro de los componentes (parámetros), se modeló mediante la ecuación cinética de Arrhenius, bajo la que la mayoría de los datos reportados muestran un despliegue del incremento en la velocidad de deterioro de 1.5 a

3.0 para cada 10 °C de aumento en temperatura (Calligaris et al., 2004; Labuza, 1971). La ley de Arrhenius se representa en la siguiente ecuación:

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{ó} \quad \ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT}$$

Donde  $E_a$  es la energía de activación;  $R$  es la constante universal de los gases (8.314 kJ mol<sup>-1</sup> °K<sup>-1</sup>);  $T$  es la temperatura absoluta (°K),  $k$  es la constante de velocidad y  $k_0$  es una constante asociada a un factor de ocurrencia (Brimberg, 1993).

## 1.5 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El Análisis de Varianza en un sentido se usó para establecer diferencia significativa entre medias ( $p < 0.05$ ) para las fases de resistencia, inducción y propagación del deterioro (pérdida/aumento del componente) empleando para ello Statgraphics Centurion XV Version 15.2.06 (2007).

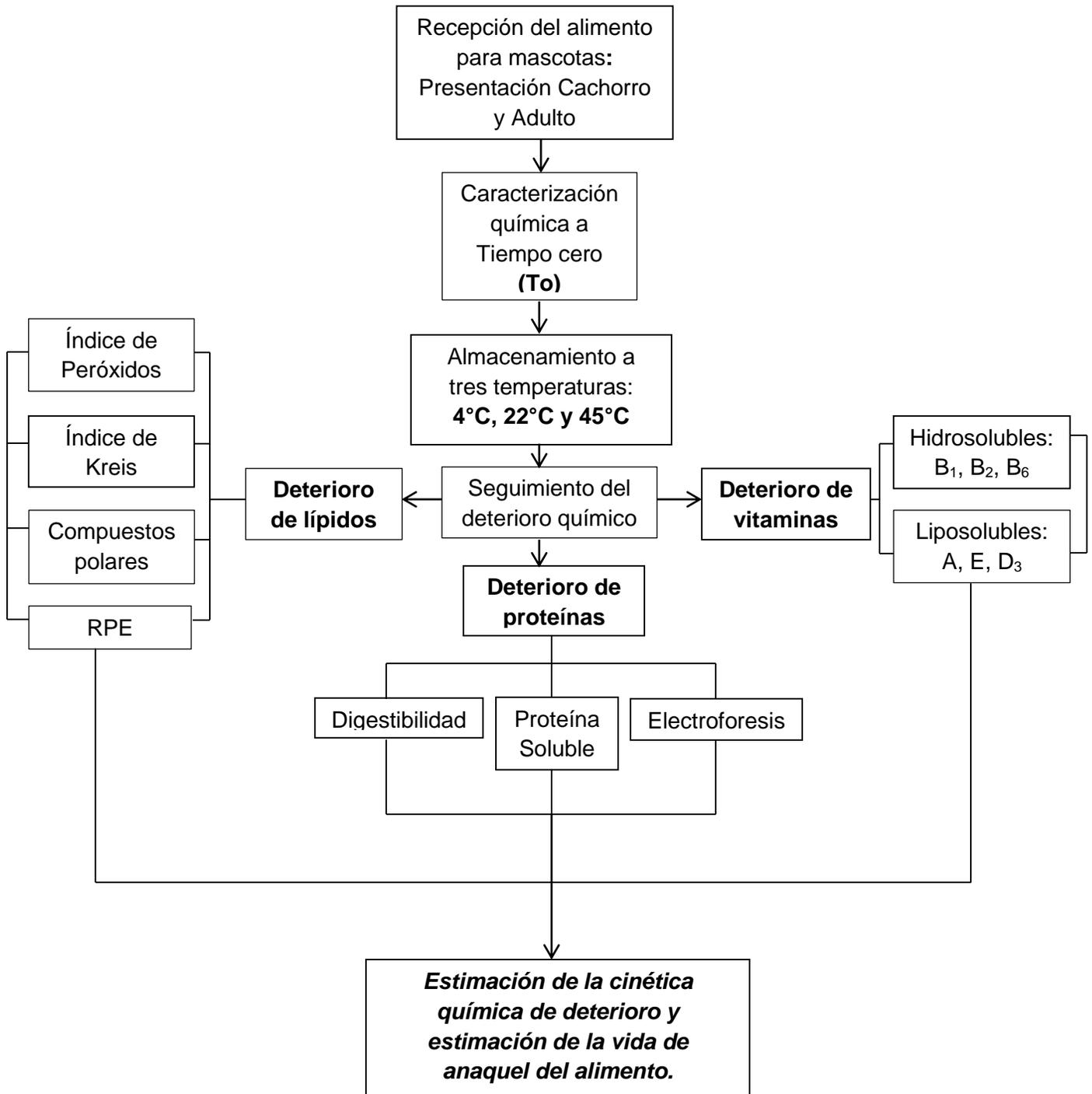
## 2. Materiales y Métodos.

Se recibieron 25 bolsas de alimento de cada una de las formulaciones correspondientes (cachorro y adulto). Con un contenido de 2Kg de alimento respectivamente. Se presume las bolsas fueron entregadas en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo el mismo día en el que se elaboró el producto, en otras palabras el producto en estudio no presentó un almacenamiento previo al que se reporta en este experimento. Cada una de las bolsas y formulaciones correspondió a un mismo lote, reportando una fecha de caducidad de 12 meses, así como la leyenda “Consérvese en un lugar fresco y seco” como condición de almacenamiento.

La bolsa de empaque que contiene el alimento, es una bolsa de polipropileno de doble capa coextruída (que presenta polipropileno de alta densidad en su exterior y polipropileno de baja densidad en su interior con un recubrimiento color blanco de cloruro de polivinilideno (PVDC)) de tres soldaduras donde la soldadura puede ser también polipropileno. El polipropileno es un polímero termoplástico totalmente permeable a gases como N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, por lo que las propiedades de impermeabilidad están dadas por el revestimiento interno de PVDC o EVOH que proporciona una barrera alta a los gases citados con anterioridad. (Bureau y Multon, 1995).

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

## 2.1 Esquema del trabajo experimental.



## 2.2 Almacenamiento.

Las muestras de alimento, en sus dos presentaciones y como el esquema 2.1 lo muestra, fueron almacenadas a tres temperatura diferentes (Cada muestra respectivamente se dividió en 3 lotes):

- Refrigeración:  $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Ambiente<sup>1</sup>:  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Incubación:  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

En cada monitoreo se abrió una nueva bolsa sellada almacenada a la temperatura y tiempo correspondiente.

En adición, al inicio del estudio se empacó al vacío una muestra control de cada producto para almacenarse en congelación<sup>2</sup>.

## 2.3 Tiempo Cero y Monitoreo.

Los indicadores de referencia (mediciones a tiempo cero) y las determinaciones de seguimiento semanal, se llevaron a cabo para:

- Proteína soluble % de Proteína Soluble
- Vitaminas liposolubles:
  - Vitamina A – Retinol  $\mu\text{g} / 100\text{ g de muestra}$
  - Vitamina D<sub>3</sub> – Colecalciferol  $\mu\text{g} / 100\text{ g de muestra}$
  - Vitamina E –  $\alpha$ -Tocoferol  $\text{mg} / 100\text{ g de muestra}$
- Vitaminas hidrosolubles (Complejo B):
  - Vitamina B<sub>1</sub> – Tiamina  $\text{mg} / 100\text{ g de muestra}$
  - Vitamina B<sub>6</sub> – Piridoxina  $\text{mg} / 100\text{ g de muestra}$
  - Vitamina B<sub>2</sub> – Riboflavina  $\text{mg} / 100\text{ g de muestra}$
- Índice de Kreis U de Abs / g de muestra
- Peróxidos mEq peróxido / kg grasa
- Compuestos Polares % de Compuestos Polares
- Resonancia Paramagnética Electrónica Intensidad
- Digestibilidad % de Digestibilidad

---

<sup>1</sup> Cuarto de temperatura controlada en ausencia de luz.

<sup>2</sup> Las muestras control fueron empleadas al término del seguimiento semanal, para realizar las determinaciones que permitieran corroborar los parámetros de referencia empleados para el análisis de resultados.

El total de mediciones se realizó por triplicado. El promedio de las mediciones, se empleó para el tratamiento de los datos/resultados con que se construyeron los gráficos correspondientes a cada una de las diferentes determinaciones. Las gráficas se encuentran en cada una de las secciones a las cuales corresponde la medición.

En los posteriores monitoreos al tiempo cero ( $t_0$ ) se evaluó la variación de concentración para cada una de las determinaciones citadas con anterioridad en relación al contenido medido como indicador de referencia.

Las muestras pertenecientes al lote almacenado a  $45^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  fueron monitoreadas cada 2 semanas y las muestras de los lotes a  $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  fueron monitoreadas cada 4 semanas respectivamente.

Al final del tiempo de almacenamiento se llevó a cabo un estudio electroforético de las proteínas de las muestras de alimento para cachorro y adulto que permanecieron a las tres temperaturas (Se comparó tiempo inicial contra tiempo final).

## **Macrocomponentes**

- **Método para la Determinación de Proteína Soluble**

Se homogenizan 10 g de muestra desengrasada (malla 40) y se agita durante 10 min con NaCl 1.0 M a temperatura ambiente. Terminado este tiempo, se ajusta el pH a 9.5 con NaOH 1.0 M y se agita durante otros 15 min. El volumen obtenido se centrifuga a 15,000 rpm durante 20 min (Ge et al, 2000). Se filtra el sobrenadante y se determina proteína soluble (Lowry et al, 1951).

- **Método para evaluar Índice de Kreis**

Al extracto lipídico obtenido se le determina índice de Kreis para evaluar los compuestos secundarios de oxidación de la grasa. El método implica la formación de un color rojo cuando el fluoroglucinol reacciona con la grasa oxidada en medio ácido. Se utiliza el método descrito por Gray, 1978.

- **Método para evaluar Índice de Peróxidos**

Para evaluar el índice de peróxidos, primero se realiza 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 agita durante 15 minutos y se recupera filtrando la fase orgánica. La extracción se repite tres veces más con diclorometano. Se juntan los extractos y evapora el disolvente en rotavapor a  $35^{\circ}\text{C}$ .

Al extracto lipídico obtenido se le determina la cantidad de peróxidos. 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. Para la cuantificación se utiliza el método descrito por Crowe y White, 2001.

- **Método para evaluar Compuestos Polares**

Compuestos polares AOCS Método Oficial Cd 20-91, con una modificación por Schulte en 2004.

Para evaluar los compuestos polares en la muestra, primero se realiza 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 agita durante 15 minutos y se recupera filtrando la fase orgánica. La extracción se repite tres veces más con diclorometano. Se juntan los extractos y evapora el disolvente en rota vapor a 35°C.

Se toman 0.5gr del extracto lipídico obtenido y se colocan en un matraz aforado, aforándose este con Tolueno (se hace por triplicado). Se agita perfectamente la muestra preparada. Se adiciona un gramo de sílica gel hidratada al 5% (24hrs previo a usarla) en una columna, a la cual se le coloca en la parte interior inferior un "tapón" de algodón de aproximadamente 1cm.

Posteriormente se le agrega el gramo de sílica y se coloca otra capa de algodón de 0.5cm. Las columnas se montan de manera vertical y se coloca debajo de cada una un pesafiltro a peso constante. A continuación se adiciona a cada una de las columnas 1ml de la muestra preparada (mezcla lípidos-tolueno) y 3.5ml de éter de petróleo- éter etílico (85:15). Se deja que se lleve a cabo la elución por completo y se colocan los pesafiltros con el filtrado recibido en una estufa a 80°C hasta que se evapore el disolvente. Se dejan enfriar y se pesan. La fracción recibida en los pesa filtros conforma la cantidad de compuestos no polares. A partir de estos se calcula la cantidad de compuestos polares.

- **Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)**

Se evaluaron los radicales libres, empleando RPE (método reportado por Papadimitriou *et al*, 2006)

Se pesaron 2 g del extracto lipídico en un vaso de 50mL y se adicionaron 3 mg de atrapador de espín electrónico (N-T- butil-fenil-nitrona), y se disolvió perfectamente. Se vertió la mezcla de aceite con el atrapador en un capilar de vidrio (2mm de diámetro y 20cm de largo) y se realizó la determinación de radicales libres en un equipo de Resonancia Paramagnética Electrónica (Broken Modelo Elexys E500) bajo las siguientes condiciones de trabajo.

- Intensidad: Doble.
- Campo: Doble.
- Intervalo del Campo (G): 3262.7 a 3562.7, 1024 puntos.
- Centro: 3512.7
- Amplitud: 0.0007.
- Frecuencia (Hz): 1000000
- Frecuencia de microondas (Hz):  $9.857561 \times 10^9$
- Potencia de microondas (W): 0.0201

- Resonador: SHQE

- **Método para evaluar Digestibilidad in vitro**

Se calcula el porcentaje de digestibilidad de una muestra con respecto a un control de caseína donde tanto las muestras como el control son tratados enzimáticamente y cuyas lecturas de pH permiten calcular el porcentaje de digestibilidad. (AOAC, 1995).

- **Método para determinar Perfil Electroforético**

Se realiza electroforesis cargando en geles de poliacrilamida al 15%, 10 mg/mL de proteína soluble y se determina el peso molecular de las bandas utilizando el densitómetro modelo GS 700 Bio-Rad y el programa Quantity-One de acuerdo a la metodología descrita por Schagger & Von Jagow, 1987.

## **Microcomponentes**

- **Método para la Determinación de vitaminas liposolubles**

Para la extracción de las vitaminas liposolubles, se pesan 10 g del alimento en un matraz de yodo, se añade hidróxido de potasio, alcohol y ácido ascórbico como antioxidante y se deja toda la noche a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Posteriormente se extrae el material insaponificable con n-hexano. Se evapora el disolvente a presión reducida en rotavapor a 40°C hasta sequedad. El residuo se resuspende en 3 mL de n-metanol y se filtra a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m.

Las vitaminas A (retinol), D<sub>3</sub> (colecalfiferol) y E ( $\alpha$ -tocoferol) se determinan de manera simultánea por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de acuerdo al método descrito por Qian & Sheng, 1998.

Condiciones: Cromatógrafo Beckman System Gold, Detector UV  $\lambda = 325$  nm, columna Thermo Scientific Hypersil ODS (150 x 4.6 mm), fase móvil metanol, flujo 1 mL/min.

- **Método para la Determinación de vitaminas hidrosolubles (complejo B)**

Para la extracción de las vitaminas, se pesan 10 g del alimento y se dispersan en 50 mL de HCl 0.1N con agitación en un homogenizador a 8,000 rpm por 10 min, posteriormente se afora a 50 mL y se centrifuga a 10,000 rpm por 10 min seguido de una filtración en acrodiscos con poro de 0.45  $\mu$ m.

La cuantificación de Vitamina B<sub>6</sub>, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> se realiza en un equipo Waters 515 acoplado a un detector Waters UV-Vis 2487 ( $\lambda$  254 nm) y a un detector de Fluorescencia Waters 454 ( $\lambda$  excitación = 440 nm,  $\lambda$  emisión = 565 nm). La separación se realiza con una columna Thermo Scientific Hypersil ODS (150x 4.6 mm), la fase móvil es hexansulfonato de sodio/n-metanol (85:15) y un flujo de 0.6 mL/min (Albalá-Hurtado et al 1997).

### 3. Resultados y Discusión.

#### 3.1 Características de la materia prima.

A continuación se presenta la lista de ingredientes reportados en las etiquetas así como los valores del AQP teóricos del alimento canino en sus dos presentaciones:

**Tabla 2. Análisis de garantía del alimento.**

<b>Componente</b>	<b>Adulto (%)</b>	<b>Cachorro (%)</b>
Proteína cruda	21 (min)	27 (min)
Grasa cruda	9 (min)	10 (min)
Fibra cruda	4 (máx)	3 (máx)
Humedad	12 (máx)	12(máx)

**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 anti-oxidantes, 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 anti-oxidantes, suplemento de vitamina A, Pantotenato de calcio, Biotina, mononitrato de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), suplemento de riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>), suplemento de piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>), suplemento de cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>), suplemento de vitamina D<sub>3</sub> y vitamina K, sulfato de zinc, sulfato de cobre, ioduro de potasio, minerales quelatos y colorantes.

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

#### 3.2 Deterioro del material lipídico.

El seguimiento del deterioro del material lipídico se llevó a cabo por medio del monitoreo de la concentración de los diferentes productos de oxidación (peróxidos, así como la aparición de productos carbonílicos como productos secundarios de esta) producidos en el alimento durante su tiempo de almacenamiento. Los métodos empleados para dicho fin fueron los siguientes: Índice de Peróxidos, Índice de Kreis, Compuestos polares y Resonancia Paramagnética Electrónica.

### 3.2.1 Índice de peróxidos (IP)

El índice de peróxidos es un testigo de la calidad de la grasa en un alimento. Este índice nos permite apreciar los compuestos peroxidados lábiles que se forman en las fases iniciales de la rancidez (Iniciación y propagación) donde los valores tienden a disminuir si la oxidación lipídica se encuentra en un estado avanzado.

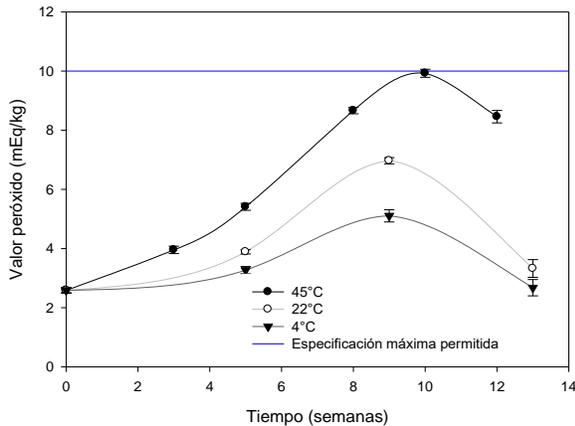


Figura A.1a. Evolución de la oxidación lipídica evaluada como peróxidos en croquetas para cachorros.

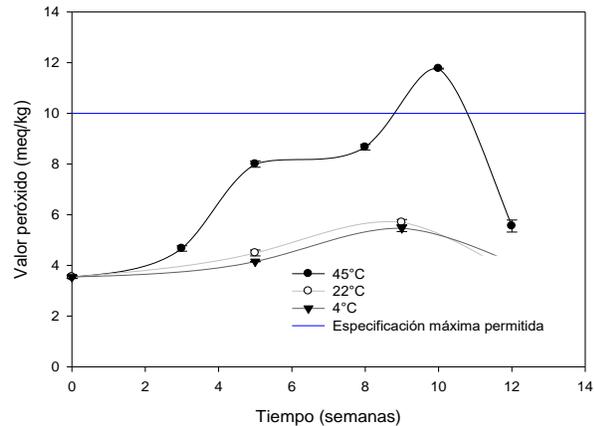


Figura A.1b. Evolución de la oxidación lipídica evaluada como peróxidos en croquetas para perros (adultos).

Como puede observarse en las Fig. A.1a y Fig. A.1b el valor inicial ( $T_0$ ) tanto en el alimento para cachorro como en el alimento para adulto se presentan valores iniciales de 2.58meq/kg y 3.54meq/kg de grasa respectivamente, los cuales son valores altos si se considera que las muestras correspondientes fueron analizadas a recepción y no tenían almacenamiento previo.

En el almacenamiento a 45° C la etapa de iniciación de la auto-oxidación es más corta que en las otras dos temperaturas (22°C y 4°C) para ambas presentaciones, pero más gradual en el alimento para cachorro, pues en el de adulto presenta una meseta que indica que el alimento por tres semanas (semanas 5-8) se mantuvo estable, es decir, no aumento su concentración de peróxido de manera visible; mientras que la de cachorro fue incrementando con el tiempo en concentraciones mayores; sin embargo, se observa que la concentración máxima de peróxidos la alcanza el alimento para adulto en la semana 10, en comparación al alimento de cachorro para dicho tiempo (cachorro 9.92meq/kg alimento, adulto 11.76meq/kg alimento). Con lo anterior se observa que es el alimento para adulto el que rebasa los niveles máximos permitidos de peróxidos en el alimento (10meq/Kg de alimento), mientras que el de cachorro roza apenas dicha especificación. En otras palabras, es el alimento para adulto el que se oxida más en el periodo de tiempo citado a 45°C.

A temperatura de refrigeración (4 °C) la concentración de peróxidos para ambas formulaciones permanece casi sin cambios, incrementándose ligeramente más en el

alimento para cachorro (semana 9), respecto al alimento para adulto, partiendo de que el valor inicial ( $T_0$ ) es casi 1 meq/kg menor en el alimento para cachorro.

A temperatura ambiente ( $22^\circ\text{C}$ ), la concentración de peróxidos en la comida para cachorro muestra una marcada diferencia respecto a la concentración reportada a  $4^\circ\text{C}$  para esa misma presentación; más no así en la comida para adulto, donde se observa que la concentración de peróxidos es casi igual a los  $22^\circ\text{C}$  y  $4^\circ\text{C}$ , siendo el valor a  $4^\circ\text{C}$  ligeramente menor. Lo anterior indica una mayor oxidación en el alimento para cachorro a  $22^\circ\text{C}$  que en el alimento para adulto a esa misma temperatura. Sin embargo, ambas presentaciones guardan cierta tendencia en cuanto a la temperatura de almacenamiento se refiere. Oxidándose mayormente el alimento almacenado a  $22^\circ\text{C}$  respecto al almacenado a  $4^\circ\text{C}$ , para ambas presentaciones.

Por lo anterior se observa que el contenido de peróxidos (Tendencia a la rancidez) producto de la reacción entre el material lipídico y el oxígeno son proporcionales a la temperatura y al tiempo de almacenamiento.

### 3.2.1 Índice de Kreis (IK).

El índice de Kreis al igual que el IP, es un indicador de la evolución de la auto-oxidación que se basa en la detección de compuestos carbonílicos producidos en el deterioro del material lipídico como productos secundarios de esta, los cuales son más estables que los peróxidos.

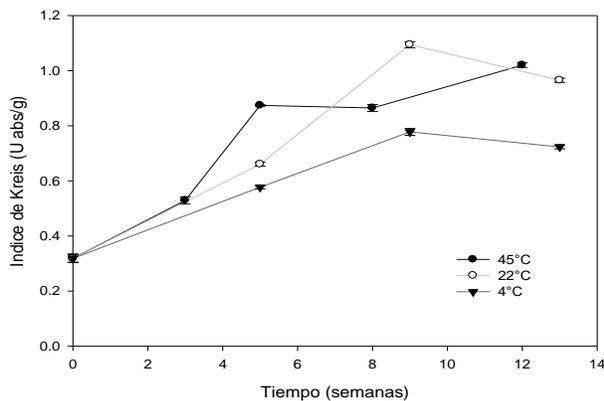


Figura A.2a. Evolución de la oxidación lipídica evaluada como compuestos de oxidación secundaria (Índice de Kreis) en croquetas para perros (cachorros).

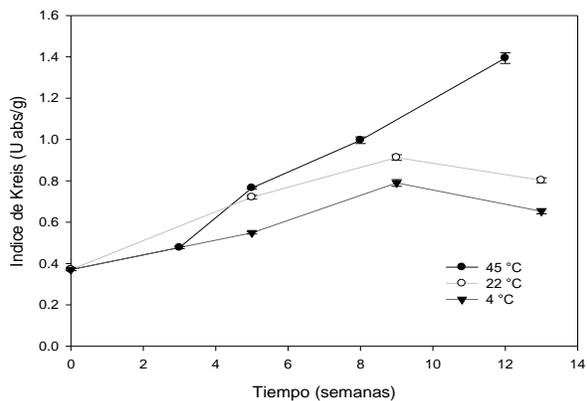


Figura A.2b. Evolución de la oxidación lipídica evaluada como compuestos de oxidación secundaria (Índice de Kreis) en croquetas para perros (adultos).

Como se puede observar en las figs. A.2a y A.2b, el indicador en su punto de inicio ( $T_0$ ) para el alimento para cachorro es de 0.32 U abs/gr y de 0.37 U abs/gr para la presentación de adulto. A temperatura de  $45^\circ\text{C}$ , la concentración de compuestos de oxidación secundaria (carbonílicos) se incrementa en ambos casos, pero de manera más marcada en el alimento para adulto; pues es en el alimento para cachorro

notoriamente visible una meseta que nos indica que la concentración de compuestos secundarios para tal presentación permaneció constante y sin aumentar por alrededor de 3 semanas (semana 5 a la 8), comportamiento no seguido por el alimento para adulto, el cual, mantuvo una tendencia a aumentar hasta alcanzar un valor de 1.39 U abs/g por un valor de 1.02U abs/g en el alimento para cachorro en el mismo tiempo (semana 12); ya que este último comenzó a aumentar de nueva cuenta después de la 8va semana, para terminar así con el valor citado. El alimento para adulto es el que presenta una mayor oxidación a esta temperatura.

A 4°C, se observa que en ambos casos (cachorro y adulto) se tiene un comportamiento similar, siendo así, la semana 9 el tiempo en el que ambas presentaciones alcanzaron su concentración máxima de compuestos secundarios: 0.78U abs/g y 0.79 U abs/g para cachorro y adulto respectivamente. A 22°C, el incremento de compuestos de oxidación secundaria entre ambas presentaciones guardan notoria similitud; y es en la semana 9 en la que las concentraciones tienen su punto máximo: 1.09 U abs/g para cachorro y 0.91U abs/g para adulto. Por lo expuesto, era de esperar que a una temperatura más elevada (45°C) y tiempo de almacén mayor (semana 12-13), la descomposición del material lipídico y por ende el valor del índice de Kreis (productos de oxidación secundaria) haya sido mayor a tales condiciones.

### 3.2.1 Compuestos Polares (CP).

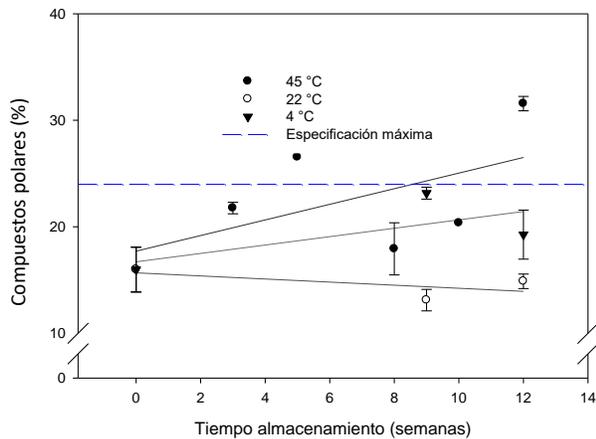


Figura A.3a. Compuestos polares producidos por la oxidación lipídica de croquetas para perros (cachorros).

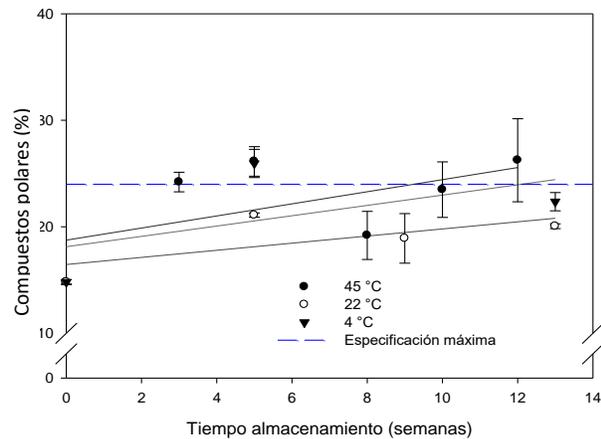


Figura A.3b. Compuestos polares producidos por la oxidación lipídica de croquetas para perros (adultos).

En la fig. A.3a y A.3b se observa que el valor inicial ( $T_0$ ) en el alimento para cachorro es de 17.19% de CP, mientras que en el caso del alimento para adulto es de 14.81% de CP. A 45°C, se observa (a pesar de la dispersión de los puntos para cada temperatura) que a partir de la semana 9 los valores para ambas presentaciones rebasan la especificación máxima permitida (24%), elevándose por valores superiores a esta,

respectivamente. A temperatura de refrigeración (4°C), los valores son más bajos en el alimento para cachorro y aumentan ligeramente en el caso del alimento para adulto, rebasando el alimento para adulto la especificación máxima permitida en la última semana (semana 12). En el caso del alimento almacenado a temperatura ambiente (22°C), se observa también, un incremento mayor en la concentración de CP en el alimento para adulto en comparación en el alimento para cachorro, pero sin rebasar la especificación máxima permitida. Se observa también que los valores de CP obtenidos a 4°C son mayores que los obtenidos a 22°C, debido posiblemente a un deficiente manejo en la técnica de medición o quizá a que el estado de oxidación lipídica en los alimentos a 22°C se encontraba más avanzado que en los alimentos a 4°C. Sin embargo, es la temperatura de 45°C la que presenta un mayor porcentaje de CP ya que los compuestos de alteración formados durante la oxidación lipídica se encuentran en mayor cantidad (ácidos grasos libres, compuestos secundarios de oxidación, etc.) y presentan una mayor polaridad que los lípidos intactos o poco oxidados presentes en las muestras de alimento almacenadas a 4°C y 22°C.

Las variaciones que se observan en las determinaciones (dispersión) pueden ser producto de un manejo deficiente en el control y dominio de los factores que influyen en la exactitud y reproducibilidad del análisis, como lo es la naturaleza y humedad de adsorbente, la velocidad de la elución, la naturaleza y volumen de los eluyentes y el tipo, tamaño y material de la columna, entre otros.

### **3.2.1 Resonancia Paramagnética Electrónica.**

La Resonancia paramagnética electrónica (RPE) o resonancia de espín electrónico (REE) es una técnica espectroscópica sensible a electrones desapareados. Esto es, generalmente, un radical libre, para moléculas orgánicas o un ion de un metal de transición, si es un compuesto inorgánico. En el campo alimentario esta técnica se emplea en el control de la degradación de los alimentos como lo es el caso del enranciamiento de aceites y grasas comestibles. En líneas generales, estos procesos de degradación se deben a oxidaciones que dan lugar a radicales libres muy reactivos. Estos radicales, al reaccionar con componentes alimentarios, dan lugar a aldehídos y cetonas, compuestos que resultan ser los responsables de la pérdida de las propiedades organolépticas iniciales de los alimentos. La detección de estos radicales, de corta persistencia por su alta reactividad, se lleva a cabo mediante el empleo de trampas de espín y permite determinar el grado de oxidación y, en consecuencia, de degradación, de los alimentos.

Esta técnica complementa otras técnicas analíticas y es la única que permite la detección directa de radicales libres formados en varios sistemas químicos o biológicos. Además la RPE es una técnica muy sensible, que permite detectar radicales aun a concentraciones muy bajas ( $10^{-14}$  M). El espectro de RPE se obtiene monitoreando la absorción de microondas de frecuencia fija por parte de la muestra al variar el campo magnético externo (barrido de campo). En el espectro, se observa la intensidad del

radical libre atrapado (por una trampa de espín) a determinado tiempo y el cambio que éste presenta en comparación con el indicador de referencia a tiempo inicial.

### Almacenamiento a 4°C

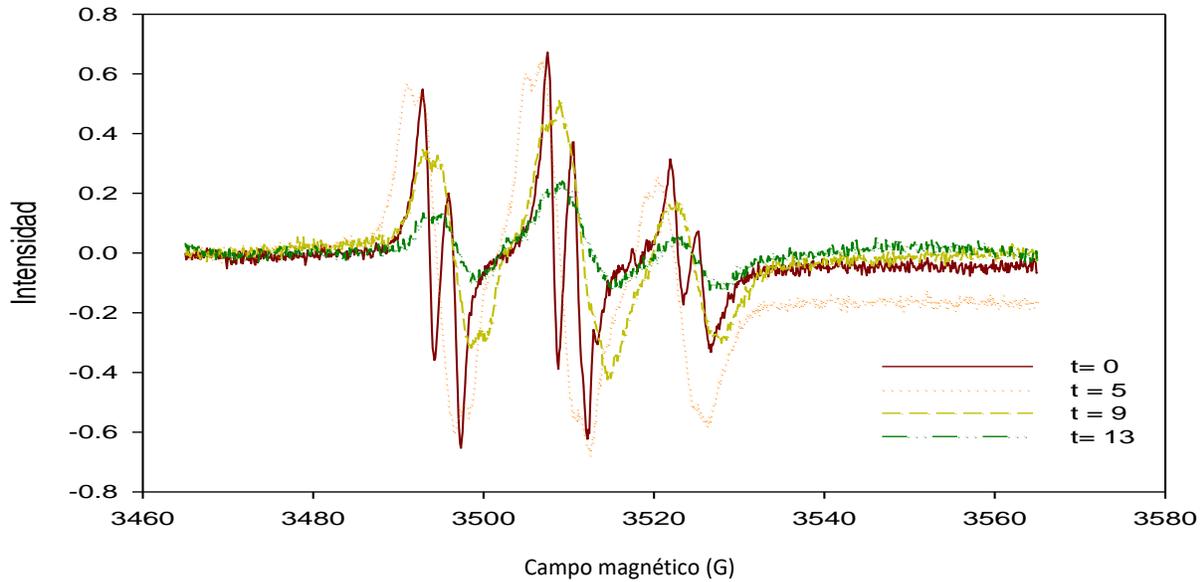


Figura A.4a. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica de extractos lipídicos de croquetas para perros (cachorros) almacenadas a 4°C. Tiempo (t= semanas).

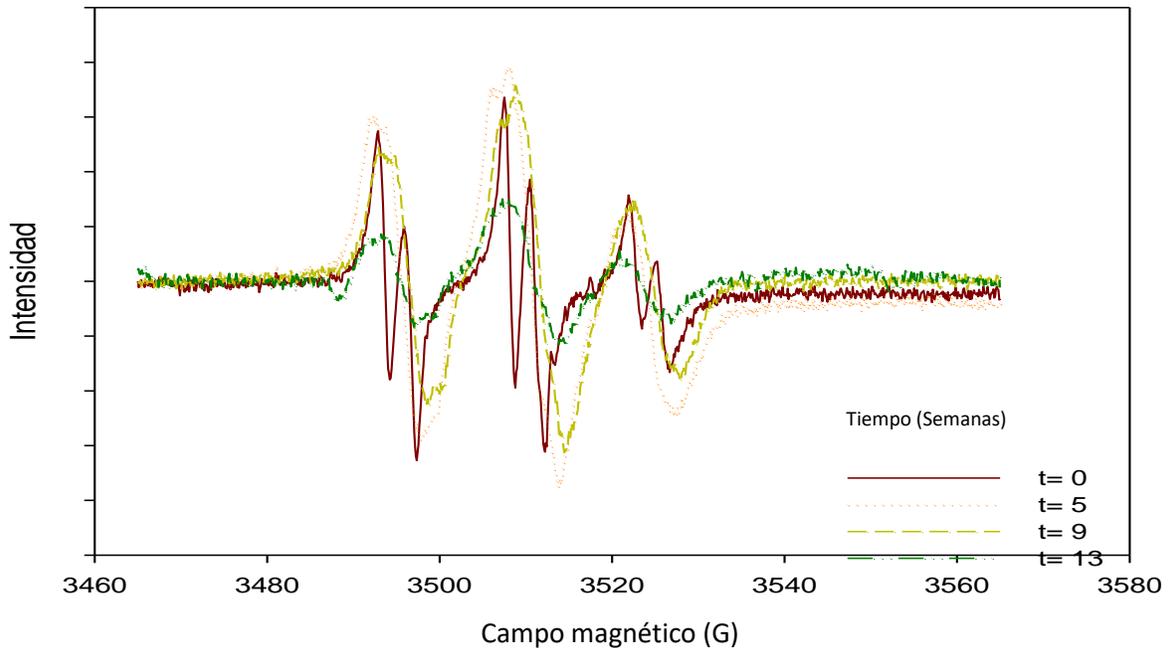


Figura A.4b. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica de extractos lipídicos de croquetas para perros (adultos) almacenadas a 4°C. Tiempo (t= semanas).

En los espectros de las figuras A.4a y A.4b, se observa de manera clara que el deterioro del alimento (aumento en la concentración de radicales libres) a 4°C para cada una de las presentaciones se mantiene constante casi por 5 semanas con respecto al  $T_0$  (indicador de referencia), disminuyendo así de manera gradual hasta la semana 13, en la que la concentración disminuye visiblemente en ambas presentaciones. Tal disminución encuentra una explicación en el hecho de que la oxidación lipídica es un proceso que puede ser analizado en tres etapas: iniciación, propagación y terminación, en el cual al inicio del mismo, las reacciones de iniciación y propagación de radicales libres son las dominantes, siendo las velocidades de formación mayores que las de descomposición.

A medida que el proceso oxidativo avanza, el incremento en la concentración de radicales libres determina que la probabilidad de ocurrencia de las reacciones de terminación sea mayor, por lo cual en este caso, las velocidades de descomposición se vuelven preponderantes y la concentración de radicales libres en la muestra disminuye.

### Almacenamiento a 22°C

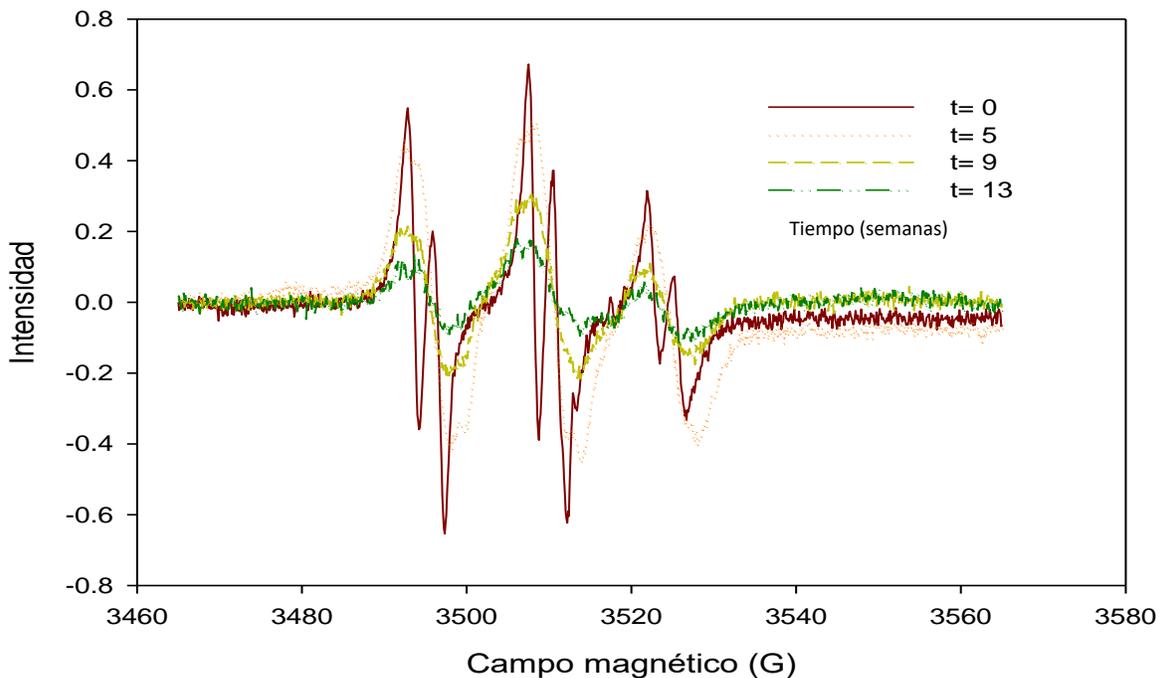


Figura A.4c. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica de extractos lipídicos de croquetas para perros (cachorros) almacenadas a 22°C. Tiempo (t= semanas).

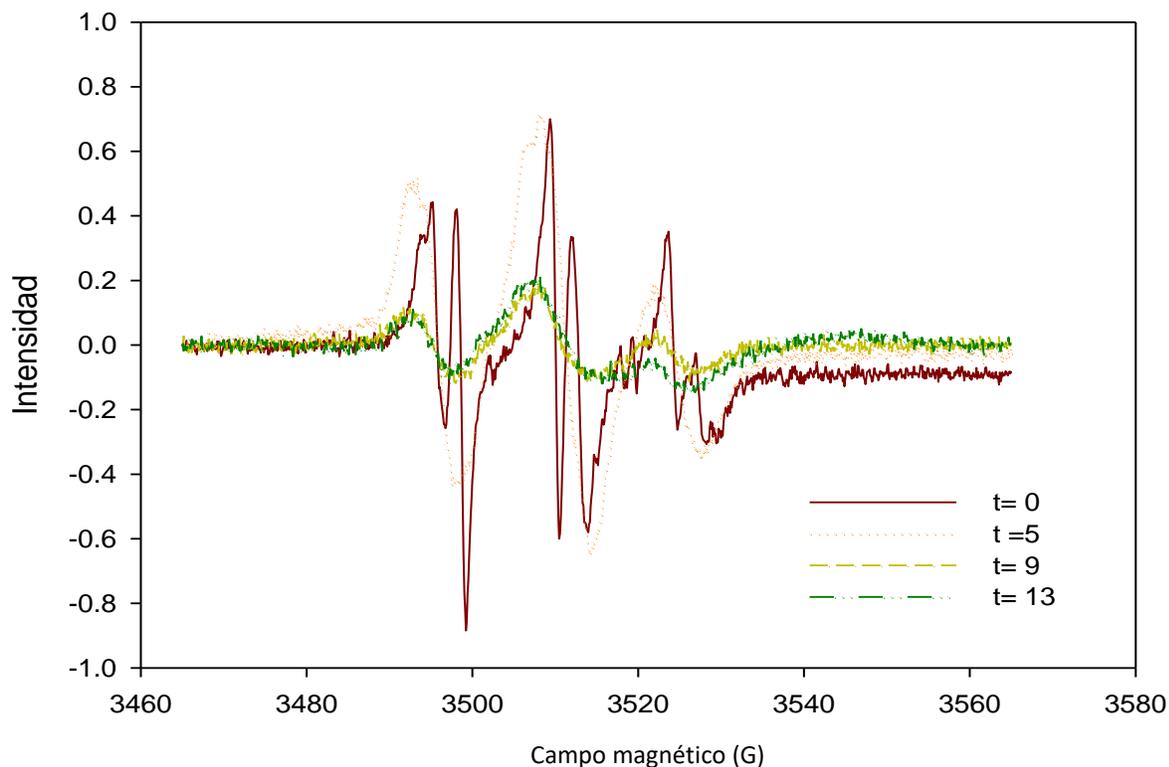


Figura A.4d. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica de extractos lipídicos de croquetas para perros (adultos) almacenadas a 22°C. Tiempo (t= semanas).

A temperatura de 22°C, se observa que durante las primeras 5 semanas la concentración de radicales libres se mantiene prácticamente constante en ambas presentaciones, salvo por un ligero incremento de éstos en el alimento para adulto con respecto al alimento para cachorro, pero disminuyendo en ambas presentaciones su concentración a partir de la semana 9. En comparación entre el alimento almacenado a T de 4°C y el almacenado a 22°C, se observa un cambio evidente en la concentración de radicales libres, en ambas presentaciones, pues si bien en la semana 5 las concentraciones son mayores a T de 22°C, en las semanas posteriores (t=9 y t=13) a ésta, disminuyen respecto a las presentaciones almacenadas a T de 4°C. Lo cual indica un mayor deterioro en las presentaciones almacenadas a 22°C. Por lo que se deduce que el deterioro de la muestra depende de la temperatura.

## Almacenamiento a 45°C

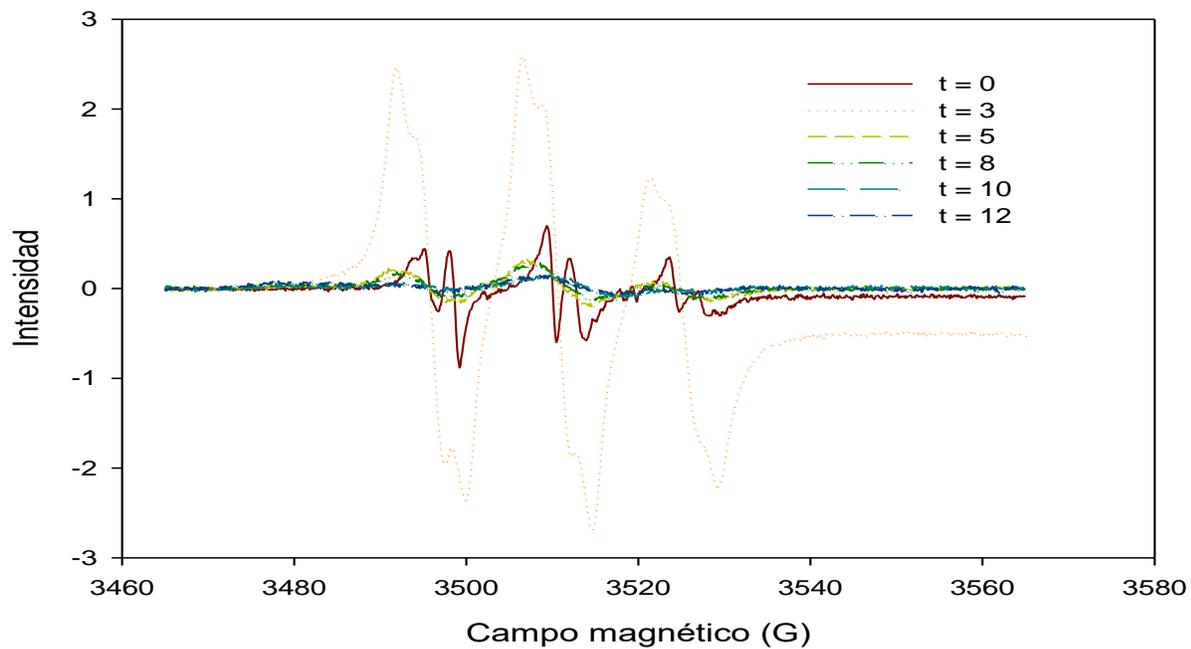


Figura A.4e. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica de extractos lipídicos de croquetas para perros (cachorros) almacenadas a 45°C. Tiempo (t= semanas).

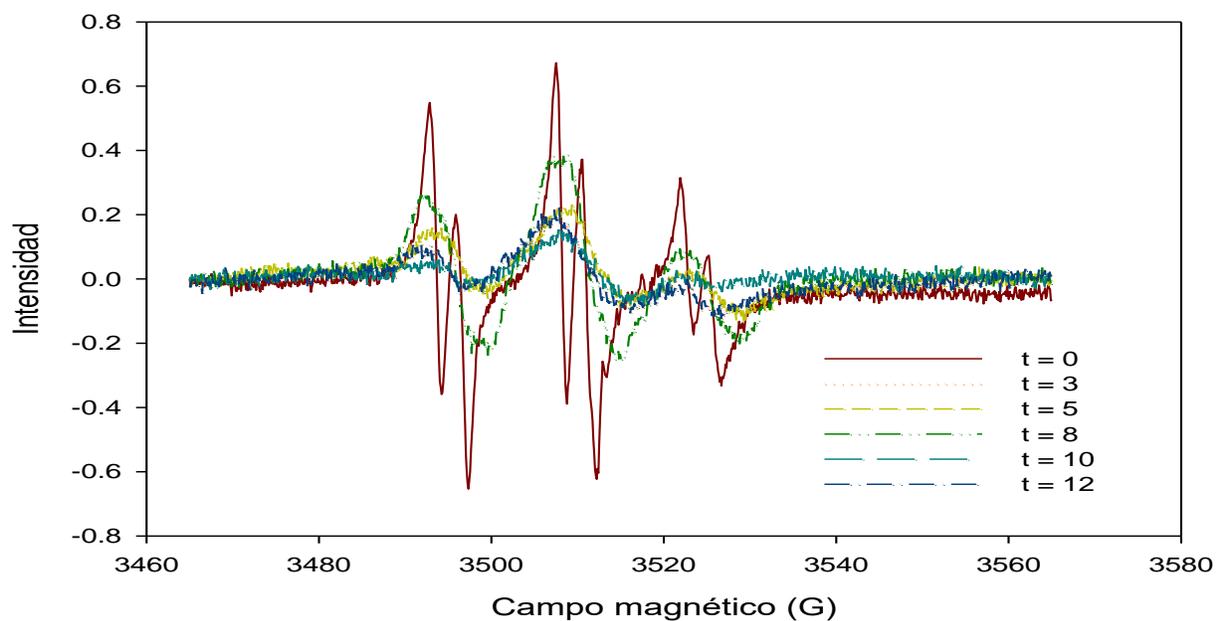


Figura A.4f. Espectros de Resonancia Paramagnética electrónica de extractos lipídicos de croquetas para perros (adultos) almacenadas a 45°C. Tiempo (t= semanas).

A 45°C. Se observa en el alimento para cachorro, un notorio aumento de radicales libres en la semana 3 (periodo de inducción), lo cual no ocurre con el alimento para adulto en este mismo tiempo, pues se observa que su concentración está por debajo del T=0 (referencia). Lo anterior indica, como se explica con anterioridad que: a medida que el proceso oxidativo avanza, la ocurrencia de las reacciones de terminación es mayor, por lo cual la concentración de radicales libres en la muestra disminuye.

Al comparar las 3 diferentes temperaturas de almacén se observa claramente que es la temperatura a 45°C donde el cambio en la concentración de radicales libres es más aparente. Eso era lo esperado. Por lo anterior, se puede decir que las croquetas almacenadas a una mayor temperatura, presentan un mayor incremento en la concentración de radicales libres y por ende un mayor deterioro de su material lipídico en sus diferentes etapas.

### 3.3 Deterioro de las proteínas

#### 3.3.1 Cambio en la solubilidad de las proteínas (%PS).

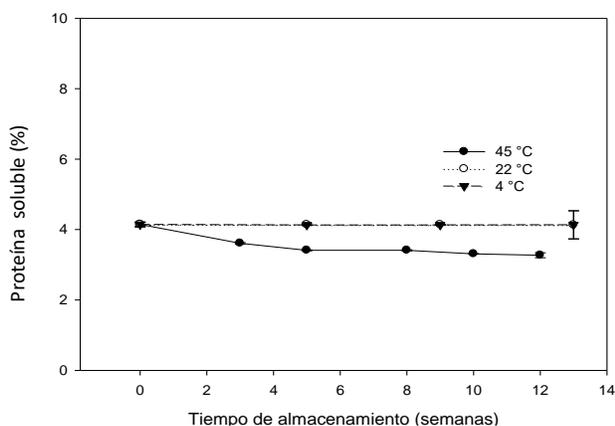


Figura A.5a. Pérdida de solubilidad de las proteínas de croquetas para perros (cachorros).

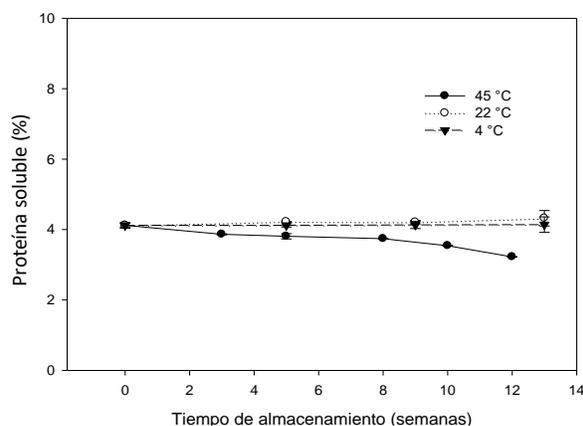


Figura A.5b. Pérdida de solubilidad de las proteínas de croquetas para perros (adultos).

Se observa claramente en las figuras A.5a y A.5b, que la solubilidad de las proteínas no presenta cambios significativos en función del tiempo, más si un efecto ligero de la temperatura (sobre todo la de 45°C) sobre la solubilidad, para ambas presentaciones (cachorro y adulto) en los tiempos finales de almacenamiento. Lo anterior era de esperarse, pues debido a la interacción de las proteínas con los compuestos producto de la oxidación lipídica, la solubilidad de éstas decrece con el aumento de la temperatura. Cuando se comparan los resultados de proteína soluble con la prueba de digestibilidad (Figuras A.6a y A.6b), se observa que esta última sufrió solo pequeñas disminuciones por efecto del almacenamiento a excepción del tiempo final, para el caso del alimento para adulto, en donde se alcanzó un valor de 64%. Es importante mencionar, que la proteína soluble solo representa una pequeña fracción del total de proteína presente en el alimento, sin embargo, refleja de manera clara la influencia de

la temperatura y la reactividad de los lípidos sobre la modificación de esta fracción. 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, con cambios únicamente conformacionales producto de la ruptura de interacciones débiles que estabilizan la estructura nativa; es decir sin que se produzca una ruptura de enlaces peptídicos, ni de puentes disulfuro.

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 aumenta con la temperatura. Así pues, las reacciones de interacción proteína-lípido oxidado (en donde los residuos de lisina, cisteína, metionina, triptófano, fenilalanina, tirosina e histidina los más afectados por estas reacciones) dan lugar a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares, lo que trae como consecuencia la pérdida de valor nutricional en el alimento y la formación de compuestos que pueden ser potencialmente tóxicos.

### 3.3.2 Evaluación de la digestibilidad *in vitro*.

La digestibilidad representa la proporción del alimento que es asimilado por el organismo, es decir, la que no es eliminada con las heces. Por lo anterior la cantidad real de energía y alimento utilizado por el animal depende de su digestibilidad.

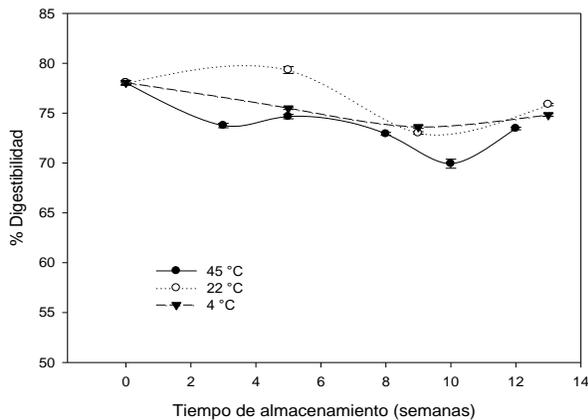


Figura A.6a. Digestibilidad *in vitro* de croquetas para perros (cachorros).

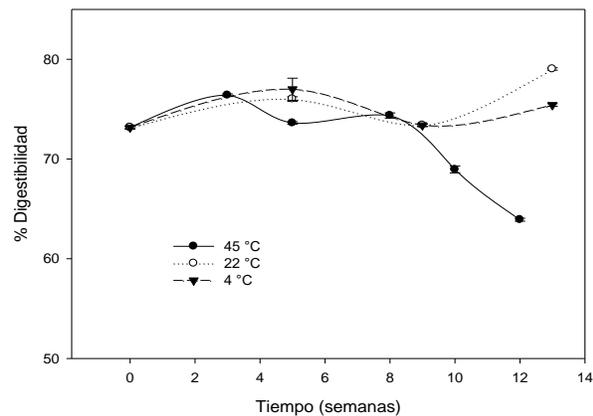


Figura A.6b. Digestibilidad *in vitro* de croquetas para perros (adultos).

En las gráficas (Figs. A.6a y A.6b) que evalúan la digestibilidad *in vitro* para ambas formulaciones, se muestra que los valores para cada uno de los alimentos varía sin guardar una tendencia lineal en función del tiempo o la temperatura, pero si un comportamiento constante a lo largo del periodo de estudio. Se observa que en el alimento para cachorro, el porcentaje de digestibilidad *in vitro* se mantiene en un

intervalo de valores que va de 70-78 % aproximadamente, donde el valor más bajo no corresponde al tiempo final y el más alto de igual manera no corresponde al tiempo cero. Lo mismo ocurre en la formulación para adulto, con la diferencia de que en dicha presentación los valores fluctúan entre un 64-76% durante todo el monitoreo. Dicha variabilidad entre una presentación y otra, puede deberse a la interacción de las proteínas con el grado de oxidación que presentan los lípidos en el alimento respectivo, a la diferencia porcentual que existe en sus componentes (proteína cruda 21% y 27%, grasa cruda 9% y 10%, fibra cruda 4% y 3% para adulto y cachorro respectivamente) o a un mal muestreo del producto en cada una de sus presentaciones, así mismo, cabe señalar que la variabilidad que se observa en cada una de las presentaciones no representan diferencia significativa, aun cuando los valores finales tienden a estar por encima del valor inicial  $t_0$  (lo que indicaría una falta de confiabilidad en la manipulación del método analítico y estadístico empleado, debido a un muestreo poco representativo). Una baja digestibilidad puede derivarse de la exposición de este a altas temperaturas ya sea en el procesado o almacenamiento y de la presencia de algunos minerales en el mismo.

De acuerdo a los datos obtenidos en el laboratorio, un estudio publicado por el Lams Technical Center en Lewisburg, Ohio realizado en 1993 (Case, 2001), donde se comparó la variabilidad de la digestibilidad de tres alimentos secos para canino, reporta un porcentaje de digestibilidad de la proteína de 70.25- 85.86 para diferentes dietas datos que coinciden con los de este estudio. Es importante hacer notar que los datos de digestibilidad realizados con el método *in vitro* empleado, no reflejan una correlación con los cambios químicos que se presentaron durante el almacenamiento. Es decir, que la reactividad de lípidos y proteína, que se detectó, en las pruebas paralelas no afectaron de manera significativa el grado de digestibilidad, en las dos formulaciones, por lo menos en el tiempo que comprendió el estudio. Esto probablemente sea debido a que las pruebas de digestibilidad se realizaron en el alimento completo.

### **3.3.3 Estudio electroforético**

La electroforesis es una técnica que se utiliza para separar moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. Es la variante de uso más común en el análisis de mezclas de proteínas y utiliza como soporte un gel, habitualmente de poliacrilamida. Las proteínas se cargan al unirse con sustancias como el SDS (detergente) que incorpora cargas negativas a la proteína. Al poner la mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán hacia el ánodo y deberán ir pasando por la malla del gel (una red tridimensional de fibras cruzadas), por lo que las proteínas pequeñas se moverán mejor, más rápidamente y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

En esta investigación, ambas muestras de trabajo (alimento para mascota) incluyen en sus ingredientes proteínas de origen vegetal y origen animal, por tanto en esta muestra compleja de proteínas, se pretende evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre el perfil de pesos moleculares de éste macrocomponente.

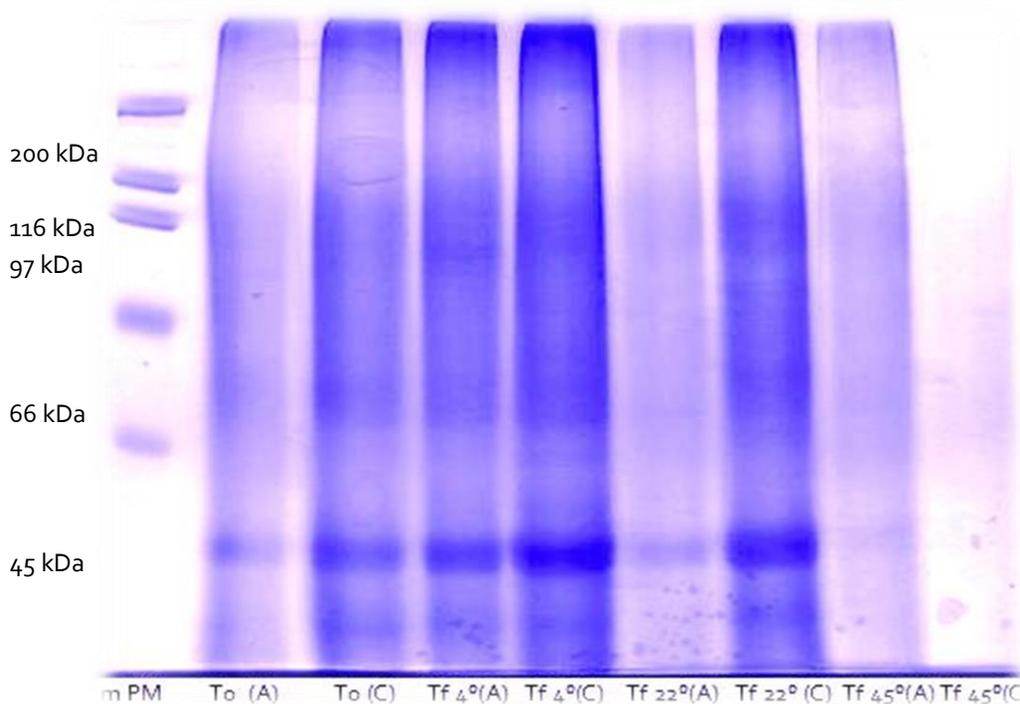
Es importante recordar que la electroforesis solo se realizó para el tiempo cero y el tiempo final de almacenamiento.

Se observa en la figura 7, que a  $T_{f4^{\circ}\text{C}}$  y  $T_{f22^{\circ}\text{C}}$  no se presenta un cambio aparente en el perfil de pesos moleculares de las proteínas del alimento, con respecto al  $T_{0^{\circ}\text{C}}$  para ambas presentaciones; siendo más intensa la coloración de estas bandas a  $T_{f22^{\circ}\text{C}}$  en el alimento para cachorro.

A  $T_{f45^{\circ}\text{C}}$ , las bandas peptídicas iniciales presentes (73, 54 y  $<45$  kDa) a  $T_{0^{\circ}\text{C}}$ , tienden a desaparecer en ambos alimentos; sin embargo es el producto para adulto el más susceptible a cada una de las temperaturas de almacén.

Lo anterior se explica argumentando que el aumento de la temperatura induce la desnaturalización de las proteínas y la interacción de éstas con los lípidos oxidados presentes en el alimento, lo que trae como consecuencia un reacomodo de los pesos moleculares, para dar un nuevo perfil de proteínas, afectando en gran medida a la solubilidad ya que los residuos hidrofóbicos del interior aparecen en la superficie.

Figura 7. Electroforesis Tiempo 0 y 12 semanas: Marcador de alto Peso Molecular.



Dónde:

To: Tiempo inicial. Tf: Tiempo final. A-adulto: C-cachorro.

### 3.4 Deterioro de Micronutrientes

El alimento para mascota objeto de nuestro estudio reporta en su empaque para ambas presentaciones (cachorro y adulto) la leyenda siguiente: “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 anterior nuestro análisis se basó en las tablas que publica esta asociación para establecer los intervalos de concentraciones mínimas y máximas de vitaminas hidrosolubles y liposolubles y poder compararlos con los obtenidos experimentalmente.

**Tabla 2.0 Perfiles nutricionales de la AAFCO de alimentos para perros. Vitaminas Hidrosolubles.**

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

La tabla supone una densidad energética de 3.5-4.0kcal de energía metabolizable/g de materia seca (Case2001).

\*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 3.

\*\*\* Conversión a mg/100g de alimento en base húmeda considerando 4.51% de humedad de acuerdo a la tabla 3.

**Tabla 2.1 Perfiles nutricionales de la AAFCO de alimentos para perros. Vitaminas Liposolubles.**

		Cualquier edad*		Cachorro**		Adulto***	
Vitamina	Unidad	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
A	µg	1,500	75,000	141.9	7,095.5	143.53	7,176.5
D	µg	12.5	125	1.18	11.82	1.20	11.96
E	mg	33.55	671	3.17	63.48	3.21	64.20

La tabla supone una densidad energética de 3.5-4.0kcal de energía metabolizable/g de materia seca (Case2001).

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

\*\*Conversión por cada 100g de alimento en base húmeda considerando 5.70% de humedad de acuerdo a la tabla 3.

\*\*\* Conversión por cada 100g de alimento en base húmeda considerando 4.51% de humedad de acuerdo a la tabla 3.

### 3.4.1 Vitaminas Liposolubles

En las gráficas que miden la pérdida de vitamina A (Retinol). Figuras A.8a y A.8b se observa de manera clara que la concentración de éste nutriente disminuye más conforme aumenta la temperatura de almacén y el tiempo transcurrido. Se observa de igual forma el mismo comportamiento para la pérdida de vitamina D (Colecalciferol) Figuras A.9a y A.9b y vitamina E (a-Tocoferol) Figuras A.10a y A.10b. Manteniendo una mayor estabilidad la vitamina E (ver tabla 4). Estas observaciones son congruentes con el comportamiento de deterioro que siguen las vitaminas sobre todo cuando son presas de factores como la luz, temperatura y oxígeno entre otros.

#### Vitamina A

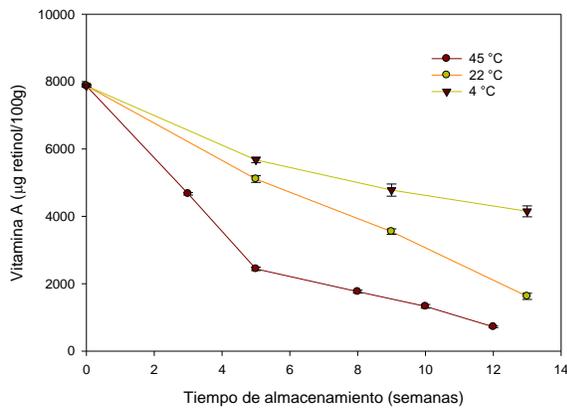


Figura A.8a. Pérdida de vitamina A (retinol) en croquetas para perros (cachorros).

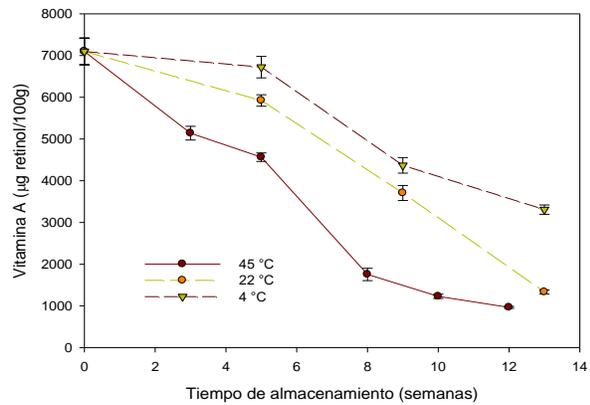


Figura A.8b. Pérdida de vitamina A (retinol) en croquetas para perros (adultos).

#### Vitamina D

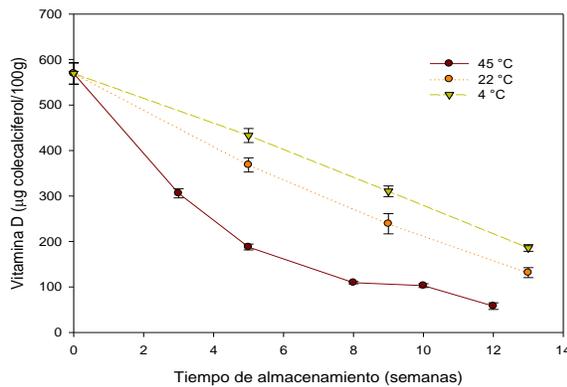


Figura A.9a. Pérdida de vitamina D (colecalfiferol) en croquetas para perros (cachorros).

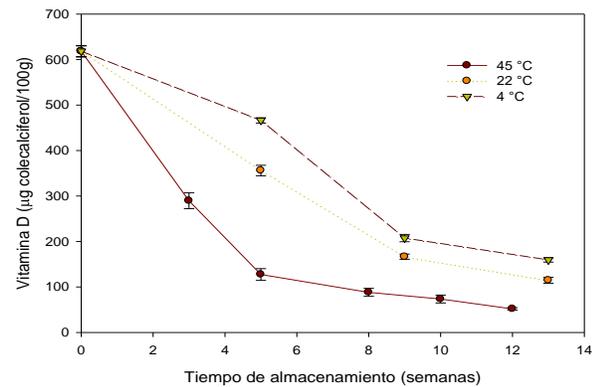


Figura A.9b. Pérdida de vitamina D (colecalfiferol) en croquetas para perros (adultos).

## Vitamina E

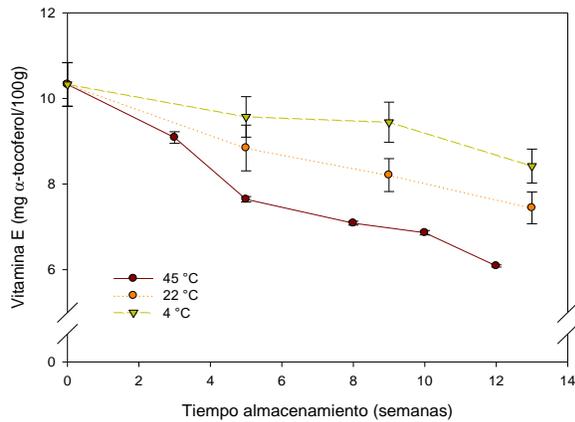


Figura A.10a. Pérdida de vitamina E (a-tocoferol) en croquetas para perros (cachorros).

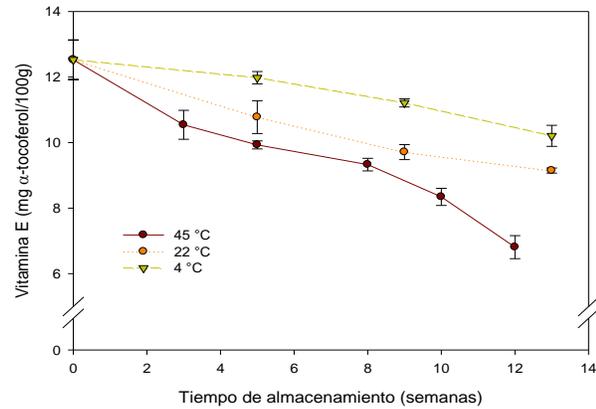


Figura A.10b. Pérdida de vitamina E (a-tocoferol) en croquetas para perros (adultos).

En el caso de las vitaminas A y E, el comportamiento observado era el esperado, ya que ambas vitaminas actúan como agentes antioxidantes en el alimento, oxidándose así al eliminar los radicales libres, producto del deterioro de los lípidos presentes en el alimento, por lo que protegen a los ácidos grasos de la rancidez. Por lo anterior es la vitamina D, la vitamina más susceptible a la temperatura y por lo tanto la que representa un mayor deterioro y pérdida; esto puede traer como consecuencia la pérdida de densidad ósea en nuestra mascota si no se cumple con la cantidad mínima recomendada en su ingesta.

### 3.4.1 Vitaminas Hidrosolubles

La pérdida de todas las vitaminas hidrosolubles sigue una cinética de primer orden (anexo B.6); lo que indica que su desaparición en el tiempo depende de la concentración del reactivo presente en el medio independientemente de la temperatura de almacenamiento.

### Vitamina B<sub>1</sub>

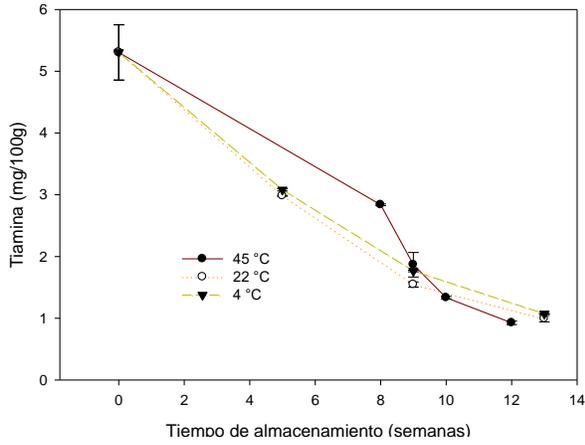


Figura A.11a. Pérdida de vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) en croquetas para perros (cachorros).

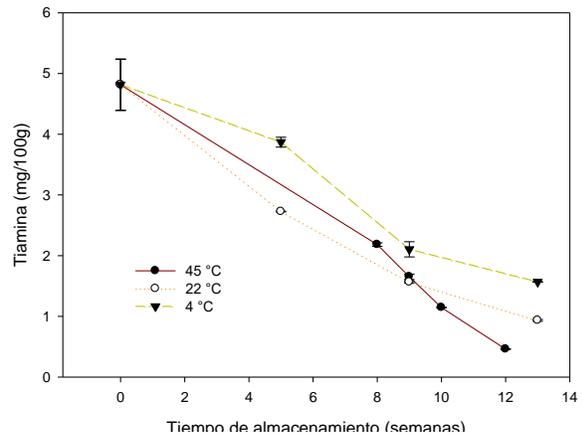


Figura A.11b. Pérdida de vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) en croquetas para perros (adultos).

### Vitamina B<sub>6</sub>

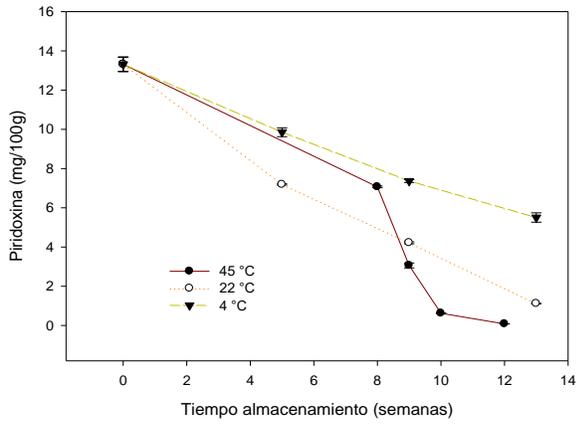


Figura A.12a. Pérdida de vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) en croquetas para perros (cachorros).

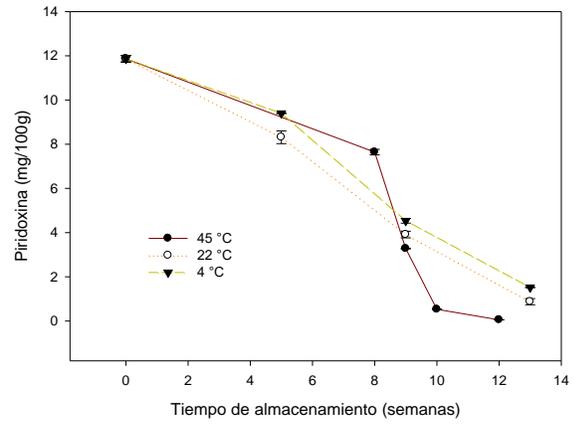


Figura A.12b. Pérdida de vitamina B<sub>6</sub> (piridoxina) en croquetas para perros (adultos).

## Vitamina B<sub>2</sub>

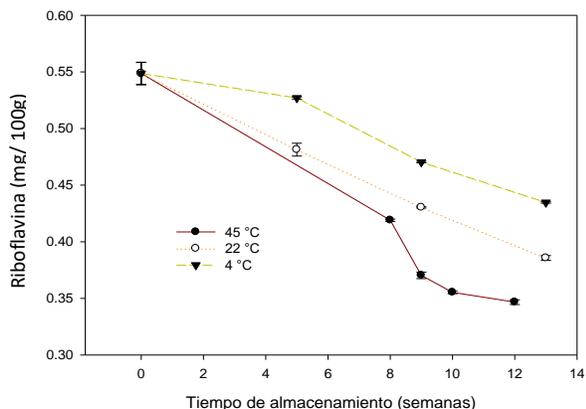


Figura A.13a. Pérdida de vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) en croquetas para perros (cachorros).

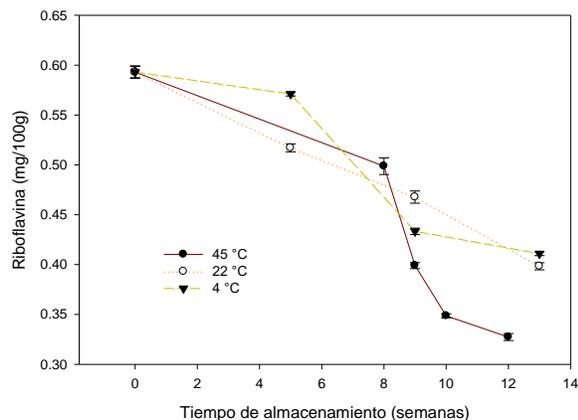


Figura A.13b. Pérdida de vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) en croquetas para perros (adultos).

En las gráficas que miden la pérdida de las vitaminas hidrosolubles (figuras A.11a, A.11b; A.12a, A.12b y A.13a, A.13b), se observa de manera clara, que la concentración de las vitaminas no depende directamente de la temperatura de almacén; más si del tiempo transcurrido. Se observa además una marcada disminución en las vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>6</sub>) en la semana 8 a 45°C, debido posiblemente a que en esta semana la oxidación del alimento se encontraba en su máximo nivel y los radicales libres generados por tales reacciones interaccionaron con otras de las moléculas de la matriz alimenticia en estudio, teniendo así repercusión directa sobre las vitaminas del complejo B. Cabe resaltar que la vitamina B<sub>6</sub>, es altamente sensible respecto a la conservación de su contenido por almacenamiento (independientemente de la temperatura). Así mismo la vitamina B<sub>2</sub> disminuye visiblemente porque sirve como complemento antioxidante de la vitamina E, por lo que la presencia de radicales libres la disminuye oxidándola. Siendo así la vitamina B<sub>1</sub> la más inestable y la más sensible a la temperatura del almacenamiento. Sin embargo, la tendencia de las constantes k (ver tabla 4), indica en todos los casos un ligero aumento en la rapidez de pérdida de vitaminas con la temperatura. Siendo finalmente la temperatura de 45°C, la que presenta la mayor pérdida en la semana 12 para cada uno de los casos.

Así mismo, se observa que las vitaminas hidrosolubles tienen una mayor estabilidad en la presentación para cachorro con respecto a la presentación para adulto (ver tabla 5); con excepción de la tiamina cuya energía de activación (2.09 kJ/gmol para cachorro y 11.22 kJ/gmol para adulto) es a simple vista de mayor magnitud (aproximadamente el quintuple) en el alimento para adulto, por lo que en esta formulación la tiamina es menos susceptible a su pérdida. Este hecho, puede deberse a que en el caso del alimento para adulto, el mayor contenido de fibra cruda (tabla 3), protege hasta cierto punto a la vitamina B<sub>1</sub> 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.

### 3.5 Cinética de Macro-componentes y Micro-componentes.

#### 3.5.1 Macro-componentes

En la tabla 3, se presentan los valores de las constantes de velocidad obtenidas para Índice de peróxidos e Índice de Kreis a las diferentes temperaturas de trabajo experimental, así como la vida media y vida final del producto (presencia de productos secundarios de la oxidación).

Los resultados muestran que la evolución de las reacciones de los macrocomponentes, responde una cinética de Primer Orden (ver Anexo A: Figs. A.1 y A.2).

**Tabla 3: Resumen de la evaluación cinética**

Componente	Temp (°C)	Alimento para cachorro			Alimento para adulto		
		k (semanas <sup>-1</sup> )	t <sub>vida media</sub> (semanas)	t <sub>final</sub> (semanas)	k (semana <sup>-1</sup> )	t <sub>vida media</sub> (semanas)	t <sub>final</sub> (semanas)
Índice Peróxidos	4	0.0744	9.31	30.95	0.0475	14.58	48.44
	22	0.0990	7.00	23.26	0.0520	13.33	44.29
	45	<b>0.1394</b>	4.97	16.52	<b>0.1193</b>	5.81	19.30
Índice de Kreis	4	0.0999	6.94	23.05	0.0415	16.68	55.44
	22	0.1373	5.05	16.77	0.0552	12.55	41.72
	45	<b>0.1442</b>	4.81	15.97	<b>0.1145</b>	6.05	20.11
<b>Microcomponentes</b>							
Vitaminas Liposolubles	Temp (°C)	k (semanas <sup>-1</sup> )	t <sub>vida media</sub> (semanas)	t <sub>final</sub> (semanas)	k (semanas <sup>-1</sup> )	t <sub>vida media</sub> (semanas)	t <sub>final</sub> (semanas)
Vitamina A (Retinol)	4	-0.0491	14.11	46.90	-0.0622	11.14	37.03
	22	-0.1174	5.90	19.62	-0.125	5.54	18.42
	45	<b>-0.1901</b>	3.65	12.11	<b>-0.1815</b>	3.82	12.69
Vitamina D (Colecalciferol)	4	-0.0850	8.15	27.09	-0.1124	6.17	20.49
	22	-0.1116	6.21	20.64	-0.1349	5.14	17.07
	45	<b>-0.1817</b>	3.81	12.67	<b>-0.2019</b>	3.43	11.41
Vitamina E (α-Tocoferol)	4	-0.0144	48.13	159.93	-0.0156	44.42	147.63
	22	-0.0247	28.06	93.24	-0.0245	28.29	94.00
	45	<b>-0.0423</b>	16.38	54.44	<b>-0.0449</b>	15.43	51.29

**Vitaminas  
Hidrosolubles**

Vitamina B1 (Tiamina)	4	-0.1242	5.58	18.54	-0.0915	7.57	25.17
	22	-0.1319	5.25	17.46	-0.1270	5.46	18.13
	45	<b>-0.1396</b>	4.96	16.50	<b>-0.1716</b>	4.04	13.42
Vitamina B6 (Piridoxina)	4	-0.0682	10.16	33.77	-0.1575	4.40	14.62
	22	-0.1833	3.78	12.56	-0.1958	3.54	11.76
	45	<b>-0.3878</b>	1.79	5.94	<b>-0.4075</b>	1.70	5.65
Vitamina B2 (Riboflavina)	4	-0.0187	37.06	123.16	-0.0294	23.57	78.33
	22	-0.0271	25.57	84.98	-0.0299	23.18	77.02
	45	-0.0402	17.24	57.29	<b>-0.0492</b>	14.09	46.81

En la tabla 3a, se puede observar el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción para el índice de peróxidos. Se puede establecer de manera inicial, que como era esperado, el incremento en la temperatura de almacenamiento aumentó la velocidad de reacción. Lo cual es perfectamente lógico ya que la formación de peróxidos a mayor temperatura ocurre a mayor rapidez. Esto es sensiblemente notorio para el caso de peróxidos y para la formulación para cachorros en donde se requiere de menor tiempo para alcanzar la máxima especificación (10meq/kg).

Esto es sumamente importante de considerar si se analiza desde la perspectiva de la vida media, ya que a 45 °C las formulaciones tienen solo 5 semanas y a 22°C únicamente 7-13 semanas de estabilidad lipídica para alcanzar el doble de la concentración inicial y estar muy cerca del valor máximo permitido de 10 mEq/kg de grasa que indica la normatividad para alimentos humanos, la cual es alcanzada a las 10 semanas aproximadamente (ver tabla 3a).

**Tabla 3a:** Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción en la determinación del índice de Peróxidos (expresados en semanas para alcanzar mEq / kg de grasa) comparados con niveles permisibles para consumo humano.

Temperatura (°C)	Alimento para cachorro		Alimento para adulto	
	t <sub>1/2</sub> (semanas)	t <sub>10 mEq</sub> (semanas)	t <sub>1/2</sub> (semanas)	t <sub>10 mEq</sub> (semanas)
4	9.31	18.18	14.58	28.45
22	7.00	13.66	13.33	26.01
45	4.97	9.70	5.81	11.33

Donde t<sub>1/2</sub> es el tiempo (en semanas) necesario para que el valor del parámetro alcance el 50% de su concentración inicial de peróxidos y t<sub>10 mEq</sub> es el tiempo estimado para que el alimento analizado alcance la concentración permisible de peróxidos para aceites de consumo humano (*Codex Alimentarius*)

Las diferencias entre el comportamiento de las formulaciones, probablemente se deban a factores tales como el grado de instauración de los ácidos grasos presentes en la grasa empleada. Sin embargo, las tendencias en los deterioros son muy similares, tanto para productos primarios como para los productos secundarios de la oxidación, medidos a través del método de Kreis (ver Anexo A: Figs. A.1 y A.2).

En relación a los compuestos polares, estos también son un indicativo de la oxidación de los lípidos, esencialmente cuantifican compuestos volátiles carbonílicos como el hexanal y el malonaldehído. Se observa así mismo, que la temperatura ejerce un efecto directo en la producción de CP y es la temperatura de 45°C donde se alcanza la especificación máxima permitida de CP de 24% (entre las semanas 8-10), siendo la semana 9 donde se cruza la especificación máxima en ambas presentaciones del alimento. Éstos datos son congruentes con los obtenidos en la resonancia paramagnética electrónica (RPE), en donde se observa (Figuras A.4) que desde el tiempo cero se detectan ya cantidades apreciables de radicales libres, característicos éstos de la etapa de iniciación en la oxidación de lípidos insaturados, tales resultados explican también los obtenidos en la cuantificación del índice de peróxidos, en donde a  $T_0$  estaban también por arriba de los 2 meq/kg.

Por otra parte, dado el esquema experimental seguido para determinar la evolución de macro y microcomponentes a diferentes temperaturas, se hace posible determinar el efecto de la temperatura sobre las constantes de velocidad (de incremento o disminución), ( Ver Tabla 4) lo que a su vez permite evaluar las energías de activación ( $E_a$ ) mediante la ecuación de Arrhenius, donde R es la constante universal de los gases ideales  $8.314472 \cdot 10^{-3}$  kJ/(K·mol). La energía de activación se puede interpretar como la energía mínima necesaria para que una reacción proceda. Por lo que a un valor menor de  $E_a$  la reacción se lleva a cabo más rápido.

**Tabla 4:** Determinación de constantes de velocidad con la Ley de Arrhenius.

Componente	Alimento para cachorro			Alimento para adulto		
	$-E_a/R$	$E_a$ (kJ/gmol)	R	$-E_a/R$	$E_a$ (kJ/gmol)	R
<b>Macrocomponentes</b>						
Índice de peróxidos	1,351.32	11.235	0.9997	2,005.73	16.67	0.9194
Índice de Kreis	778.33	6.47	0.9085	2,195.69	18.25	0.9764
<b>Microcomponentes</b>						
<b>Vitaminas Liposolubles</b>						
Vitamina A (retinol)	2,893.74	24.06	0.9809	2,288.59	19.027	0.9792
Vitamina D (colecalfiferol)	1,640.63	13.64	0.9914	1,266.98	10.53	0.9832
Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)	2,315.29	19.25	0.9999	2,277.46	18.93	0.9986

### Vitaminas Hidrosolubles

Vitamina B <sub>1</sub> (Tiamina)	251.03	2.09	0.9988	1,350.14	11.22	0.9984
Vitamina B <sub>6</sub> (Piridoxina)	3,725.37	30.97	0.9939	2,062.35	17.15	0.9631
Vitamina B <sub>2</sub> (Riboflavina)	1,645.39	13.68	0.9999	1,124.82	9.35	0.8943

Para el caso de macro componentes, los resultados se muestran en el Anexo B: Figs. B.1 y B.2, donde se relaciona el inverso de la temperatura contra el Ln de las constantes de velocidad. La síntesis de resultados obtenidos para macro y microcomponentes se muestra en la tabla 4.

En el caso del índice de peróxidos, las energías  $E_a$  entre las formulaciones cachorro y adulto presentaron diferencias no muy marcadas, pero evidenciando de cualquier manera que el alimento para adulto presenta una mayor oxidación lipídica. Más no así en el caso del índice de Kreis, donde la  $E_a$  para la formulación de adulto (18.25 kJ/gmol) es casi el triple que la de la formulación para cachorro (6.47 kJ/gmol). Lo que indica que se requiere de una mayor energía para llevar a cabo la reacción en el alimento para adulto que en el alimento para cachorro. Lo anterior se explica por el hecho de que es precisamente el alimento para cachorro el que presenta una menor oxidación en el tiempo de estudio, por lo que una mayor producción de radicales durante el proceso indicaría que el alimento se encuentra aún en una fase de propagación, contrario al alimento para adulto que podría encontrarse en una fase de propagación-terminación, es decir, el alimento para adulto presenta un mayor grado de oxidación lipídica y por tanto presenta una mayor estabilidad puesto que el índice de Kreis mide compuestos aldehídicos secundarios los cuales son más estables que los peróxidos.

Para el caso de Peróxidos y de acuerdo a la bibliografía, la  $E_a$  necesaria para llevar a cabo la reacción  $RH + O_2 \rightarrow$  Radicales libres es de alrededor de 42.6 kJ/mol (López-Duarte, 2008), para la oxidación de ácido linoleico en harina de maíz. En el caso de las formulaciones se obtuvieron valores ligeramente menores de 11 a 16 kJ/mol, es decir se requiere menor energía para llevar a cabo la reacción. Esto puede deberse como se mencionó anteriormente a factores intrínsecos esencialmente la composición del alimento; un exceso de promotores que influyan en la formación de radicales libres. Adicionalmente una mayor producción de radicales durante el proceso, la presencia de trazas de metales de transición en los equipos, así como una alta presión parcial de oxígeno en el envase. (Claramente el espacio de cabeza en los empaques es significativo y éste difería ampliamente en todas las bolsas recibidas).

Del análisis de los resultados anteriores se desprende que la oxidación de lípidos es uno de los principales causantes de la disminución de la vida útil del alimento, en ambas formulaciones. En este punto se puede sugerir que un estudio de selección de antioxidantes o diversas mezclas de agentes quelantes/antioxidantes (evaluando el Factor de Protección a través de pruebas aceleradas), sería lo conveniente para aumentar la vida útil de ambas formulaciones.

### 3.5.2 Microcomponentes

Los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad para los microcomponentes se muestran en las Tablas 3 y 4, como síntesis de los resultados detallados que se presentan en los Anexos A y B.

Del análisis de resultados se pudo establecer que la reacción del deterioro de las vitaminas estudiadas, siguió un modelo cinético de primer orden. Cuando se efectuó la estimación de la constante de velocidad se comprobó el orden de reacción mediante el análisis de los coeficientes de correlación, así como mediante el análisis de varianza de la correlación (ver anexos). Es importante señalar que conociendo el orden de reacción, se tienen las condiciones para extrapolar o conocer las concentraciones que alcanzarán los compuestos (pérdida) a cualquier tiempo de almacenamiento deseado.

Para facilitar la discusión de los resultados en este apartado, se hace referencia a cuadros y gráficos –mencionados con anterioridad como Anexos – que sintetizan los resultados de vida media y de estabilidad a los 90 días de almacenamiento (Tabla 4).

#### 3.5.2.1 Vitaminas Liposolubles

Del análisis de estos datos, se pueden hacer las siguientes inferencias:

- Las constantes de velocidad entre las vitaminas liposolubles a las tres temperaturas estudiadas muestran un comportamiento congruente entre las dos formulaciones. Esto es de esperarse ya que las concentraciones de estos micronutrientes son muy similares en las dos formulaciones.
- Se establece que las reacciones siguieron un modelo de pérdida que se ajusta a una cinética de Primer Orden, donde se observa el efecto de la temperatura en las constantes de velocidad. (ver Tabla 3)
- El período para la pérdida de la mitad de concentración inicial de las vitaminas consideradas en el estudio, muestra que las liposolubles resultan con mayor estabilidad si las comparamos con las hidrosolubles. De las tres liposolubles la vitamina E es la de mayor estabilidad. En contraste la A y la D son más lábiles (Ver Tabla 4). Esto resulta importante ya que la vitamina E actúa como antioxidante. Protegiendo así al material lipídico de la rancidez y por tanto retrasa la oxidación aumentando la vida útil del producto.
- Las formulaciones pueden estar en poco tiempo muy por debajo de los niveles recomendados por organismos de nutrición y por las propias especificaciones del fabricante. Por lo anterior es de vital importancia establecer el tiempo de almacenamiento en que la vitamina más sensible a la temperatura (Vitamina D) se pierde, al punto que es imposible garantizar el cumplimiento de lo indicado en la etiqueta. A 45°C, la constante de rapidez (K) correspondiente al deterioro de la vitamina D en el alimento para cachorro es de 0.1817 semanas<sup>-1</sup> y de 0.2019 semanas<sup>-1</sup> en el alimento para adulto, por lo que la vida útil estimada cuando la concentración de las respectivas vitaminas son de 1.18 µg/100g y de

1.20µg/100g para cachorro y adulto y que corresponden a lo mínimo recomendado por la AAFCO será:

$$t_{\text{vida útil cachorro}} = \ln(569.35) - \ln(1.18) / 0.1817; t_u = 34 \text{ semanas o } 238 \text{ días.}$$

$$t_{\text{vida útil adulto}} = \ln(618.26) - \ln(1.20) / 0.2019; t_u = 31 \text{ semanas o } 216 \text{ días.}$$

Por lo anterior se observa que se necesitan 238 y 216 días para que la vitamina D en los respectivos alimentos esté por debajo de la especificación requerida. Y de 4 y 3 semanas (26 y 24 días) para que el alimento de cachorro y adulto tenga un deterioro del 50%.

### 3.5.2.2 Vitaminas Hidrosolubles

Del análisis de estos datos, se pueden hacer las siguientes inferencias:

- Las constantes de velocidad entre las vitaminas hidrosolubles a las tres temperaturas estudiadas muestran un comportamiento congruente entre las dos formulaciones; esto es de esperarse ya que las concentraciones de estos micronutrientes son muy similares en las dos formulaciones.
- Se establece que las reacciones siguieron un modelo de pérdida que se ajusta a una cinética de Primer Orden, y se observa el efecto de la temperatura en las constantes de velocidad. (ver tabla 3).
- Los resultados muestran que la Piridoxina resulta con mayor estabilidad en ambos alimentos, y requiere de mayor  $E_a$  (ver tabla 4) para iniciar la reacción de degradación sobre todo en el alimento para cachorro. En general es importante resaltar que la Tiamina es la vitamina hidrosoluble más lábil a la pérdida.
- En este punto se sugiere especial atención ya que las formulaciones pueden estar en poco tiempo muy por debajo de los niveles recomendados por organismos de nutrición y por las propias especificaciones del fabricante. Lo anterior repercute de manera directa en el individuo zoológico. (Ver inciso 6.5.2 de las generalidades). Por tanto es de vital importancia establecer el tiempo de almacenamiento en que la vitamina más lábil (Tiamina) se pierde al punto que es imposible garantizar el cumplimiento de lo indicado en la etiqueta. A 45°C, la constante de rapidez correspondiente al deterioro de tiamina en el alimento para cachorro es de 0.1396 semanas<sup>-1</sup> y de 0.1716 semanas<sup>-1</sup> en el alimento para adulto, por lo que la vida útil estimada cuando la concentración de la vitaminas es de 0.095mg/100g y de 0.096mg/100g para cachorro y adulto y que corresponden a lo mínimo recomendado por la AAFCO será:

$$t_{\text{vida útil cachorro}} = \ln(5.30) - \ln(0.095) / 0.1396; t_{\text{vida útil}} = 29 \text{ semanas o } 201 \text{ días.}$$

$$t_{\text{vida útil adulto}} = \ln(4.81) - \ln(0.096) / 0.1716; t_{\text{vida útil}} = 23 \text{ semanas o } 160 \text{ días.}$$

Por lo anterior se observa que se necesitan de 201.66 y 159.66 días para que la tiamina en los respectivos alimentos estén por debajo de la especificación requerida. Y de 5 y 4 semanas (35 y 28 días) para que el alimento de cachorro y adulto tenga un deterioro del 50%. Para un deterioro del 90% se necesitan de 16

semanas en el alimento para cachorro y 13 semanas en el alimento para adulto (115 y 94 días respectivamente).

#### 4. Conclusiones

- Fue posible establecer el tiempo de vida útil de dos formulaciones de alimento para mascota con base en el componente más lábil. Haciéndose notar que este parámetro puede variar en función del indicador con base al que se calcule.
- Se demostró, dentro de los macrocomponentes, que la oxidación de lípidos es uno de los principales causantes de la disminución de la vida útil en ambas formulaciones y que los modelos de reacción tanto para productos primarios (Peróxidos) como secundarios (Kreis) se ajustan a una cinética de Primer Orden.
- La reactividad de los componentes estudiados no afectó de manera significativa la digestibilidad *in vitro* de los dos alimentos y este se mantuvo en un intervalo de valores que va desde 64-78 % de digestibilidad.
- Del análisis de resultados se pudo establecer que la reacción del deterioro de las vitaminas estudiadas, siguió un modelo cinético de primer orden y se pudo establecer un efecto claro de la temperatura de almacenamiento, sobre la rapidez de pérdida en las tres hidrovitaminas.
- Los resultados muestran que la Piridoxina es la vitamina que presenta mayor estabilidad en ambos alimentos y requiere de mayor Ea para llevar a cabo la reacción de degradación, haciéndola esto la vitamina menos lábil. Mientras que la tiamina es la vitamina hidrosoluble más lábil a la pérdida, incluso a la temperatura de refrigeración.
- Se estableció que las reacciones siguieron un modelo de pérdida que se ajusta a una cinética de Primer Orden y que se comprobó un efecto claro de la temperatura en las constantes de velocidad.
- El período para la pérdida de la mitad de concentración inicial de las vitaminas consideradas en el estudio, muestra que las liposolubles resultan con mayor estabilidad si se comparan con las hidrosolubles.
- De las tres liposolubles la vitamina A es la que muestra mayor estabilidad, en contraste con la E que arrojó menor tiempo para alcanzar la mitad de concentración inicial. Esto resulta importante ya que la vitamina E actúa como antioxidante, lo que explica igual su disminución debido a las reacciones de oxidación de los lípidos.

Para aumentar la vida útil de ambas formulaciones se recomienda una modificación en el antioxidante o mezcla de quelantes/antioxidantes con respecto a los utilizados o en dado caso un incremento en la concentración de estos, además de controlar el espacio de cabeza de las bolsas de empaque para ambos productos y controlar la temperatura de almacenamiento.

## 5. 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
- Albalá S., Veciana T., Vidal C., Mariné A., (2000). Stability of vitamins A, E and B complex in infant milks claimed to have equal final composition in liquid and powdered formulas. *Journal of Food Science*, 65, 1052-1055.
- A.O.A.C. Vitamins and Other Nutrients. Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International 16<sup>th</sup>. Arlington Virginia USA; Vol. II, chapter 45.
- Badui, S. Química de los alimentos. Alambra, 4<sup>a</sup> edición, México, D.F. 2006.
- Brimberg I. (1993). On the kinetics of the autoxidation of fats. Monounsaturated substrates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 11, 1063-1067.
- Case, L. Nutrición Canina y Felina. Harcourt, 2<sup>a</sup> edición, Madrid España. 2001.
- Calligaris S., Manzocco L., Conte S., Nicoli C. (2004). Application of a modified Arrhenius equation for the evaluation of oxidation rate of sunflower oil at sub-zero temperature. *Journal of Food Science*, 69, 361-366.
- Charalambous G. (1993). Shelf life studies of foods and beverages: Chemical, biological, physical, and nutritional aspects, *Elsevier* Amsterdam, Holanda.
- Church C., Pond G., Pond R. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Limusa Wiley. 2<sup>a</sup> edición. México 2006.
- Coultate T. Alimentos: Química de sus componentes. Acribia. Zaragoza, España, 1984.
- Crowe D., White J. (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., 3<sup>a</sup> 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, 4<sup>a</sup> edición, Santa Fé de Bogotá, Colombia, 2000.

- Kelly N., Wills J. Manual de nutrición y alimentación en pequeños animales. Ediciones S. España, 2002.
- Labuza T. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. CRC Food and Nutrition Press, 2, 355-404.
- Ledesma. Caracterización de fracciones de proteínas de la semilla de chía (salvia hispánica) (Tesis UNAM, 2008), 30-31.
- López L., Vidal L. (2009). Oxidation of linoleic acid as a marker for shelf life of corn flour. *Food Chemistry*. 114, 478-483.
- Lowry H., Rosebrough N., Lewis E., Randall R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 28, 265-275.
- Papas M. (1999). Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health CRC Series in Contemporary Food Science. CRC Press.
- Papadimitriu V., Sotiroudis T., Xenakis A., Sofikiti V., Stavyiannoudaki N., Chaniotakis N. (2006). Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Analytica Chimica*. 453-458.
- Qian H., Sheng M. (1998). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D<sub>2</sub> in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, 825, 127-133.
- Schägger H., Von Jagow G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100kDa". *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379
- Schulte E. (2004). Economical micromethod for determination of polar components in frying fats, *European Journal of Lipid Science Technology*. 772–776.
- Shimada A. Nutrición animal. 2ª edición. Trillas. México, 2009.
- Wheatley R., (2000). Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Trends in Analytical Chemistry*. 19, 617-628.

## 6. Anexos

### Anexo A. Cinética de Primer Orden

#### Macrocomponentes

A.1 Peróxidos, (mEq / kg )

A.2 Índice de Kreis (U abs/g)

#### Microcomponentes

A.3 Vitamina A, ( $\mu\text{g}$  / 100g)

A.4 Vitamina D, ( $\mu\text{g}$  / 100g)

A.5 Vitamina E, (mg / 100g)

A.6 Tiamina, (mg / 100g)

A.7 Piridoxina, (mg / 100g)

A.8 Riboflavina, (mg / 100g)

## Macrocomponentes.

### A.1 Índice de Peróxidos (meq/kg).

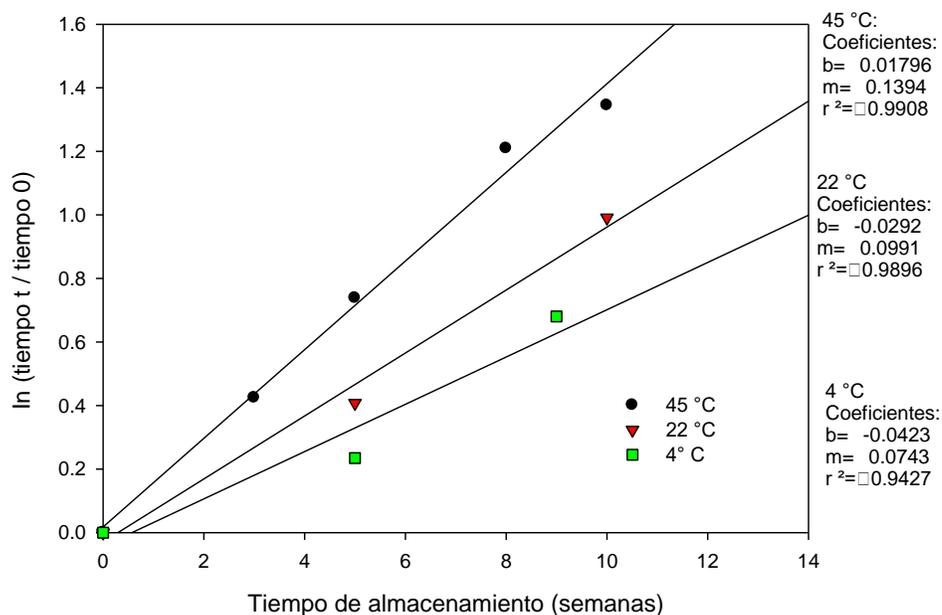


Figura A.1a. Cinética de primer orden para formación de peróxidos en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas

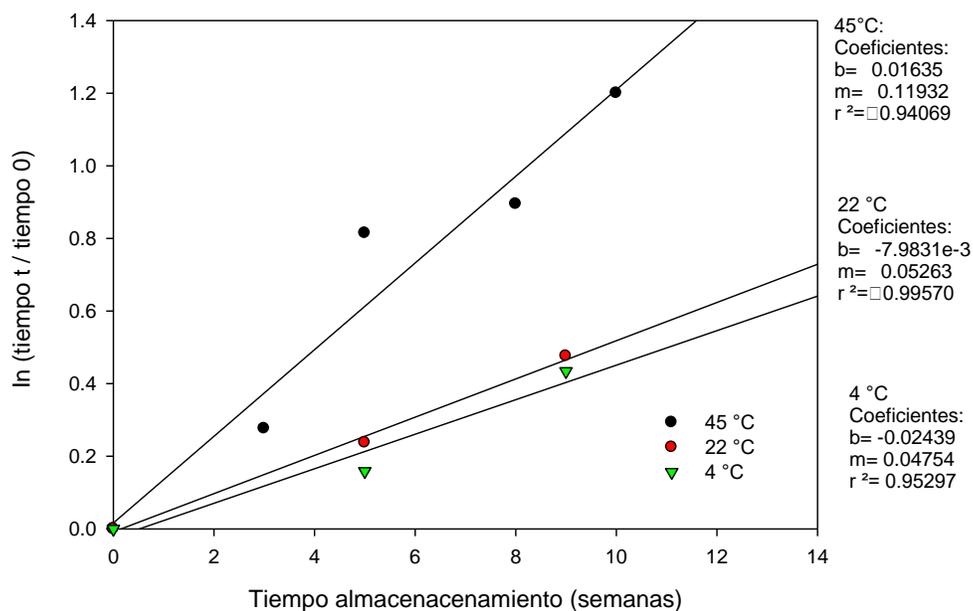


Figura A.1b. Cinética de primer orden para formación de peróxidos en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

## A.2 Índice de Kreis (U abs/g)

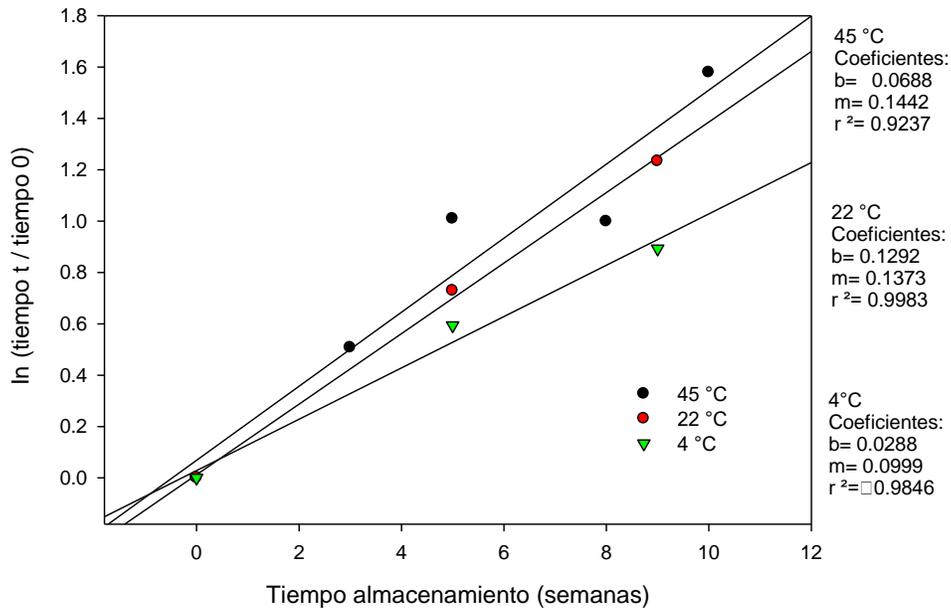


Figura A.2a. Cinética de primer orden para formación de compuestos de oxidación secundaria (Índice de Kreis) en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas.

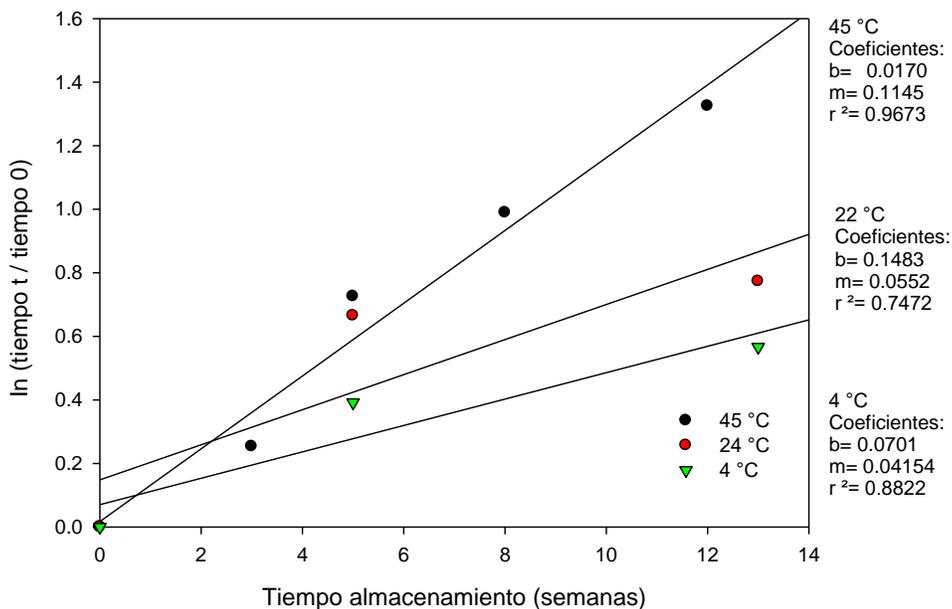


Figura A.2b. Cinética de primer orden para formación de compuestos de oxidación secundaria (Índice de Kreis) en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

## Microcomponentes

### A.3 Vitamina A, ( $\mu\text{g} / 100\text{g}$ )

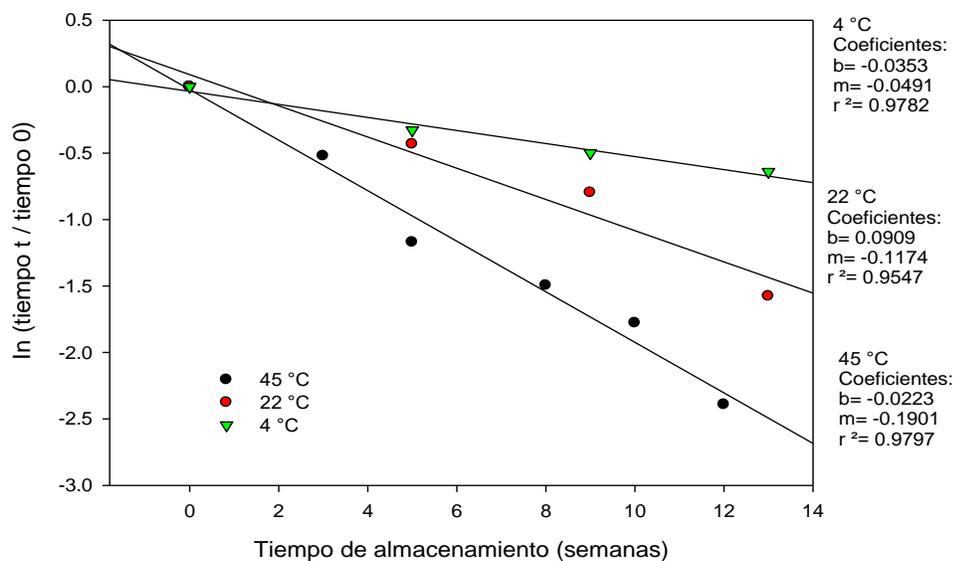


Figura A.3a. Cinética de primer orden para pérdida de Vitamina A en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas

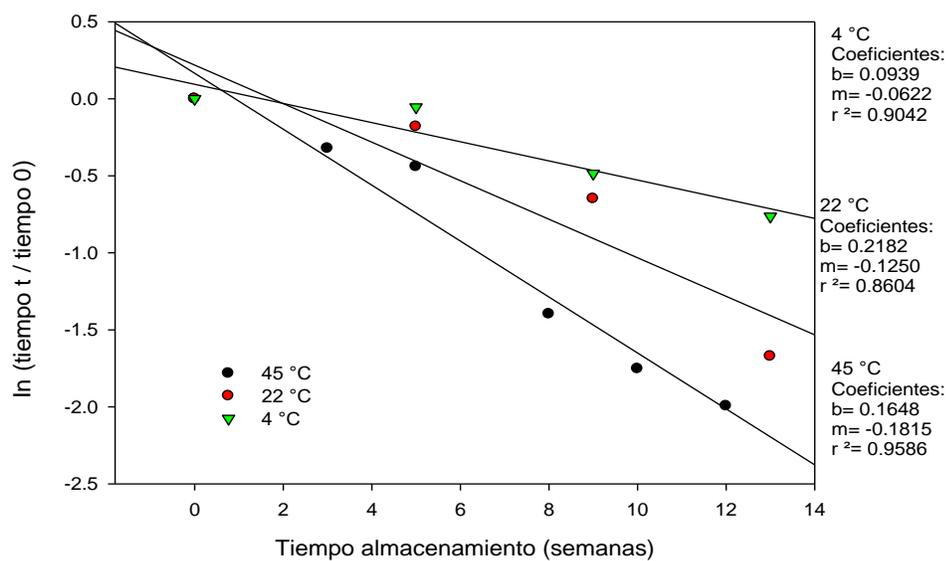


Figura A.3b. Cinética de primer orden para pérdida de Vitamina A en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

#### A.4 Vitamina D, ( $\mu\text{g} / 100\text{g}$ )

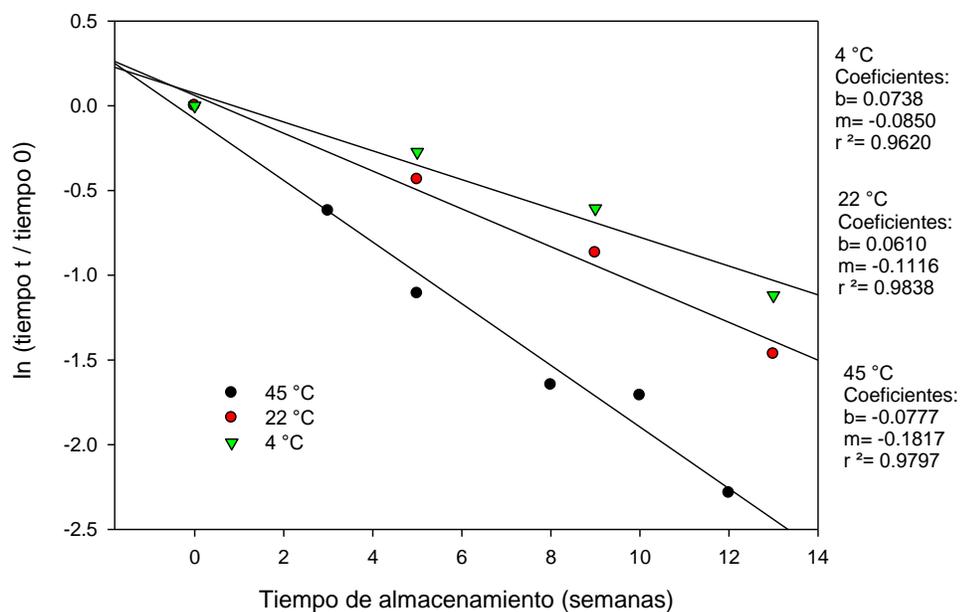


Figura A.4a. Cinética de primer orden para pérdida de Vitamina D en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas.

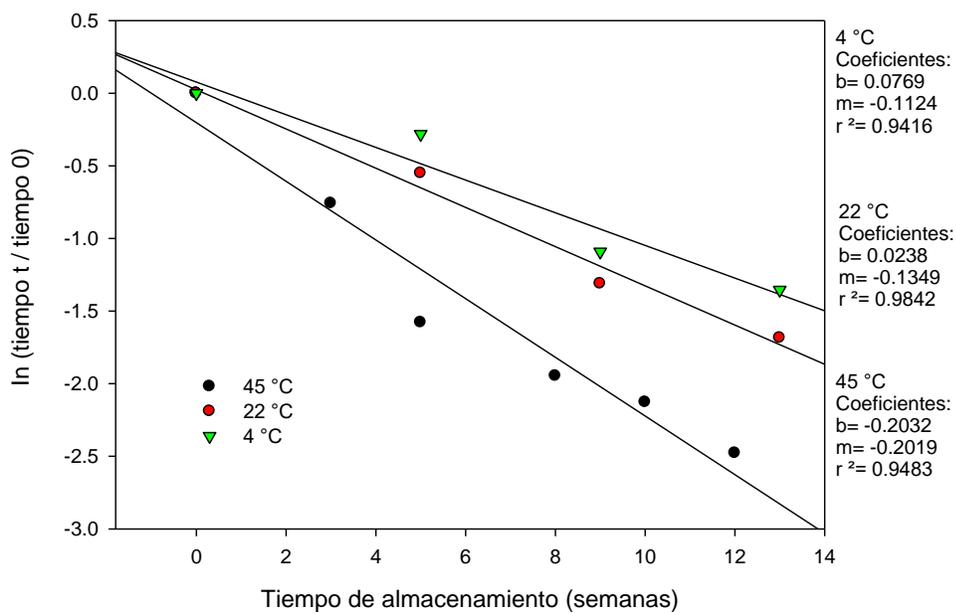


Figura A.4b. Cinética de primer orden para pérdida de Vitamina D en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

### A.5 Vitamina E, (mg / 100g)

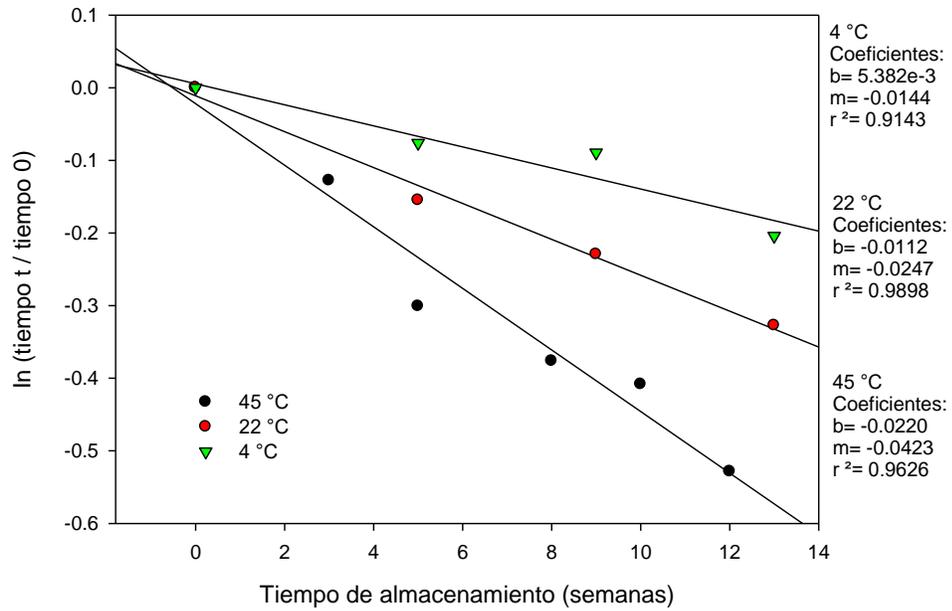


Figura A.5a. Cinética de primer orden para pérdida de Vitamina E en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas

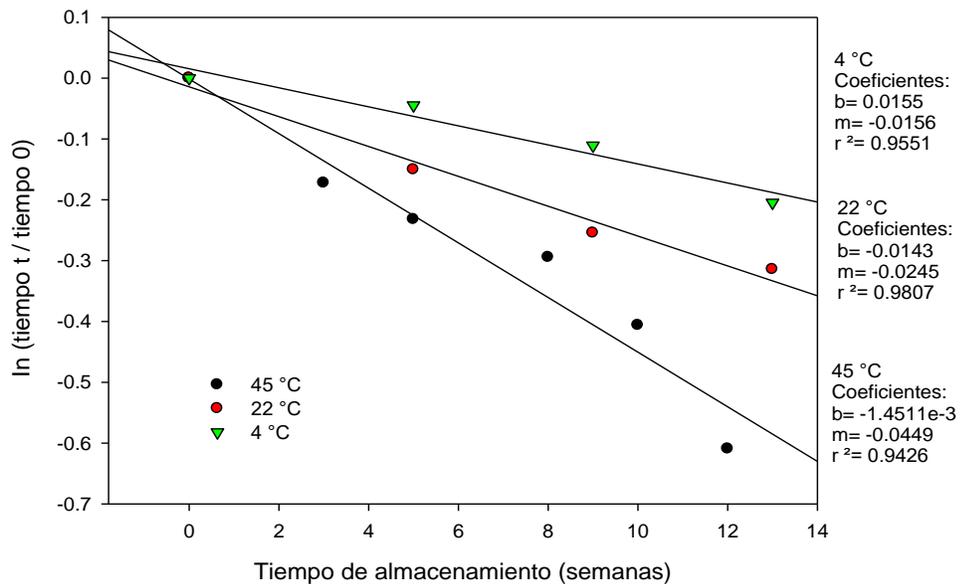


Figura A.5b. Cinética de primer orden para pérdida de Vitamina E en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

## A.6 Tiamina, (mg / 100g)

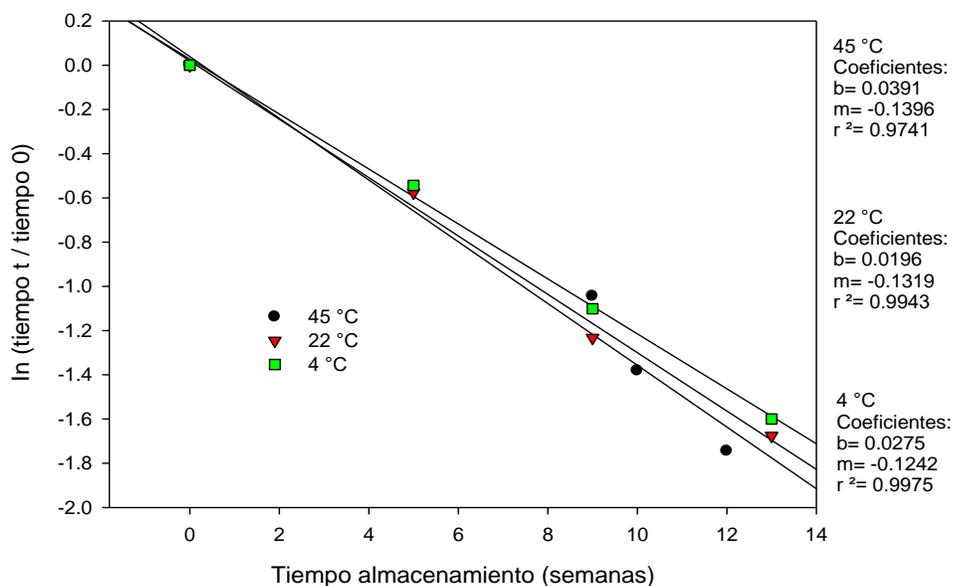


Figura A.6a. Cinética de primer orden para pérdida de tiamina en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas

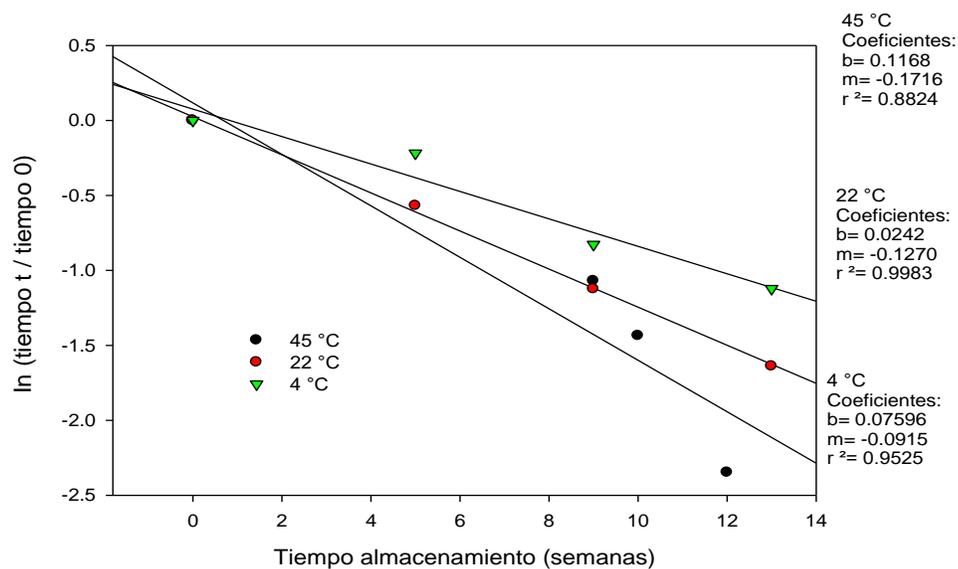


Figura A.6b. Cinética de primer orden para pérdida de tiamina en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

## A.7 Piridoxina, (mg / 100g)

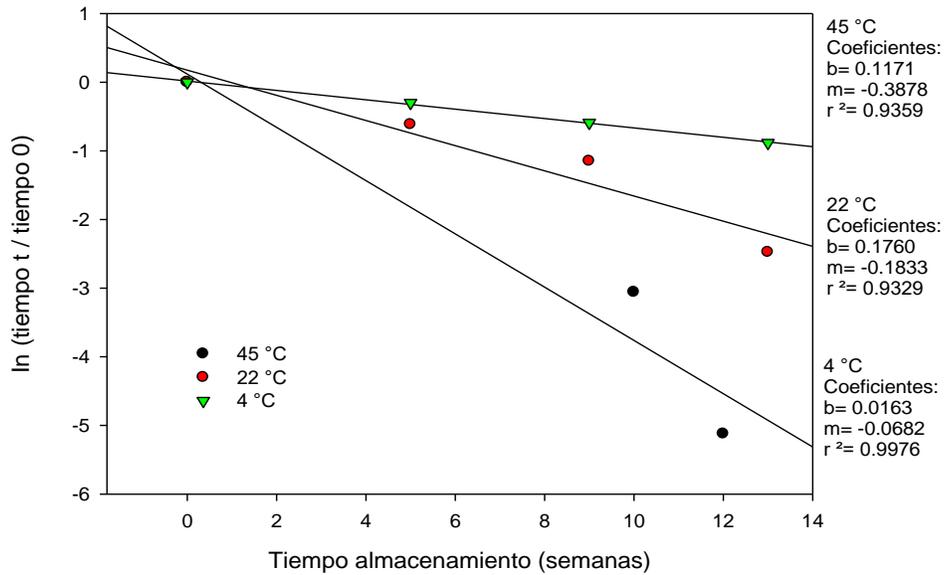


Figura A.7a. Cinética de primer orden para pérdida de piridoxina en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas

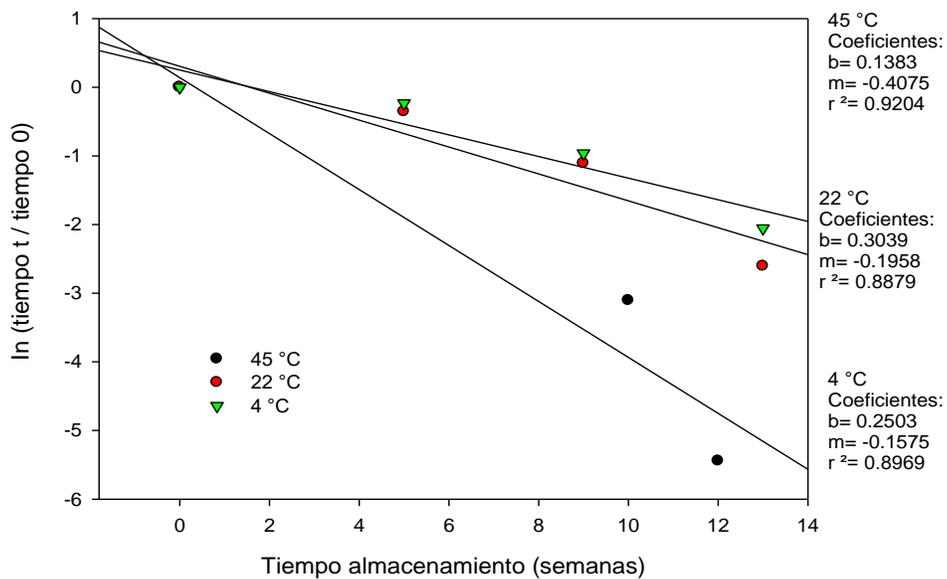


Figura A.7b. Cinética de primer orden para pérdida de piridoxina en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

## A.8 Riboflavina, (mg / 100g)

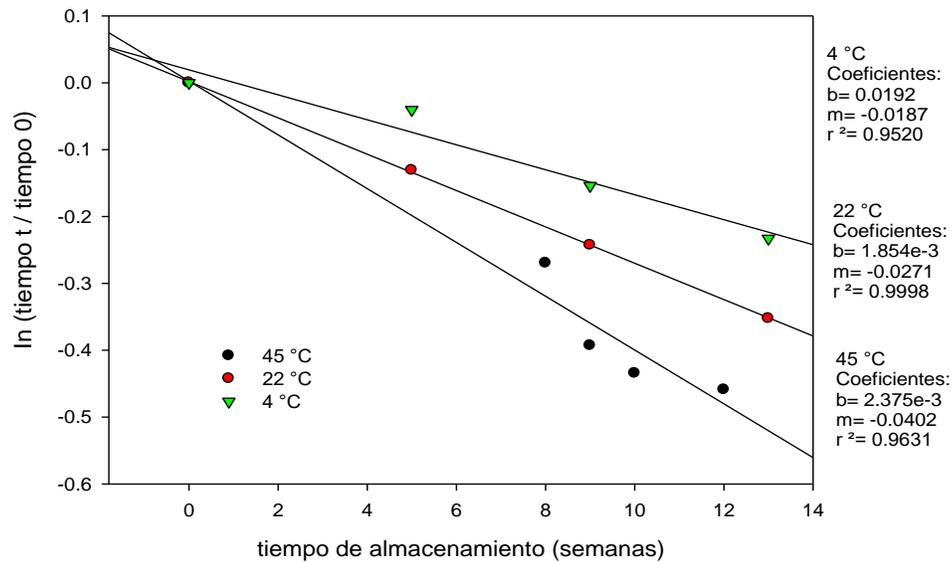


Figura A.8a. Cinética de primer orden para pérdida de riboflavina en croquetas para cachorro almacenadas en distintas temperaturas

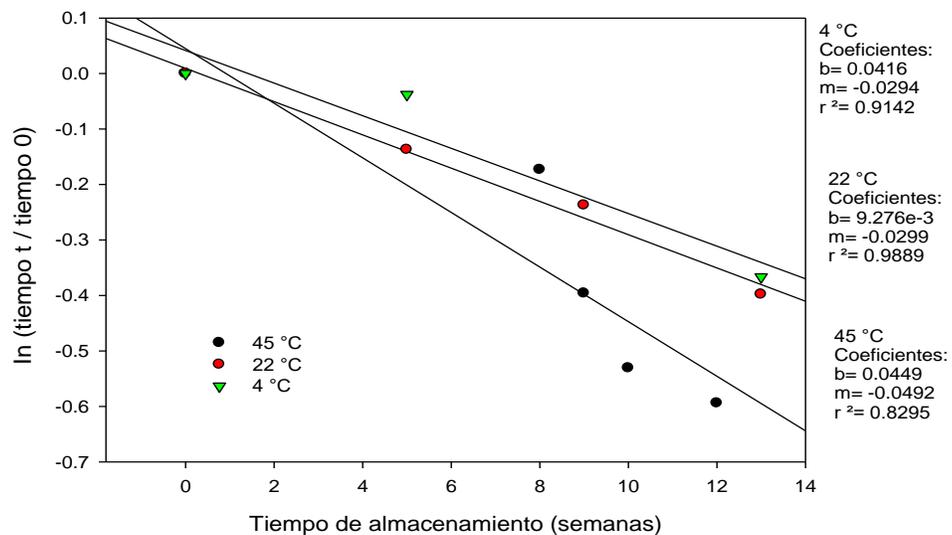


Figura A.8b. Cinética de primer orden para pérdida de riboflavina en croquetas para adulto almacenadas en distintas temperaturas.

## **Anexo B. Energía de Activación (Cinética dependiente de la temperatura).**

- B.1 Indicadores Macro en Alimento para Cachorro
  - Índice de Kreis
  - Peróxidos
- B.2 Indicadores Macro en Alimento para Adulto
  - % Proteína Soluble
  - Índice de Kreis
  - Peróxidos
- B.3 Vitaminas Liposolubles en Alimento para Cachorro
  - Vitamina A
  - Vitamina D
  - Vitamina E
- B.4 Vitaminas Liposolubles Alimento para Adulto
  - Vitamina A
  - Vitamina D
  - Vitamina E
- B.5 Vitaminas Hidrosolubles en Alimento para Cachorro
  - Tiamina
  - Piridoxina
  - Riboflavina
- B.6 Vitaminas Hidrosolubles en Alimento para Adulto
  - Tiamina
  - Piridoxina
  - Riboflavina

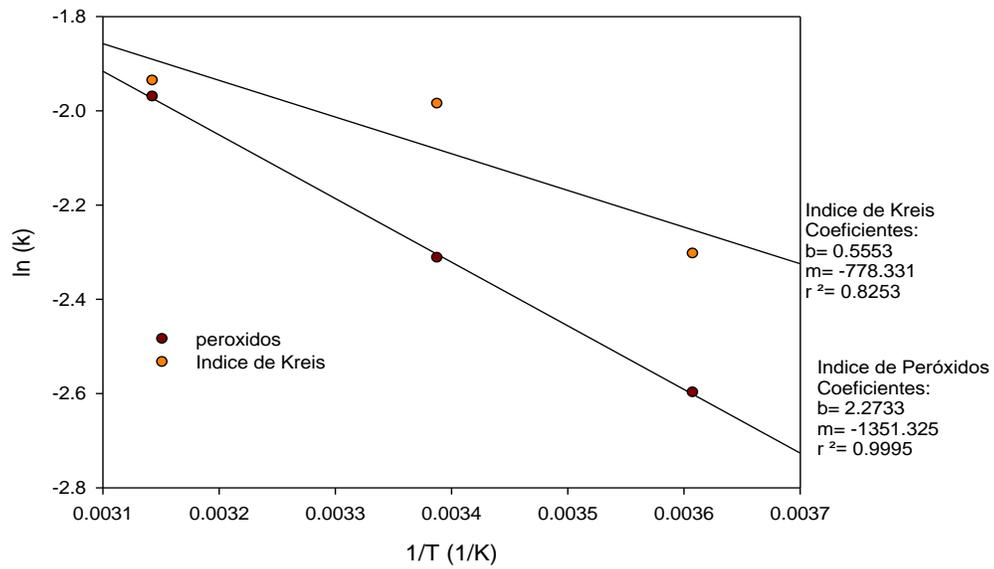


Figura B.1. Indicadores macro en alimento para cachorro

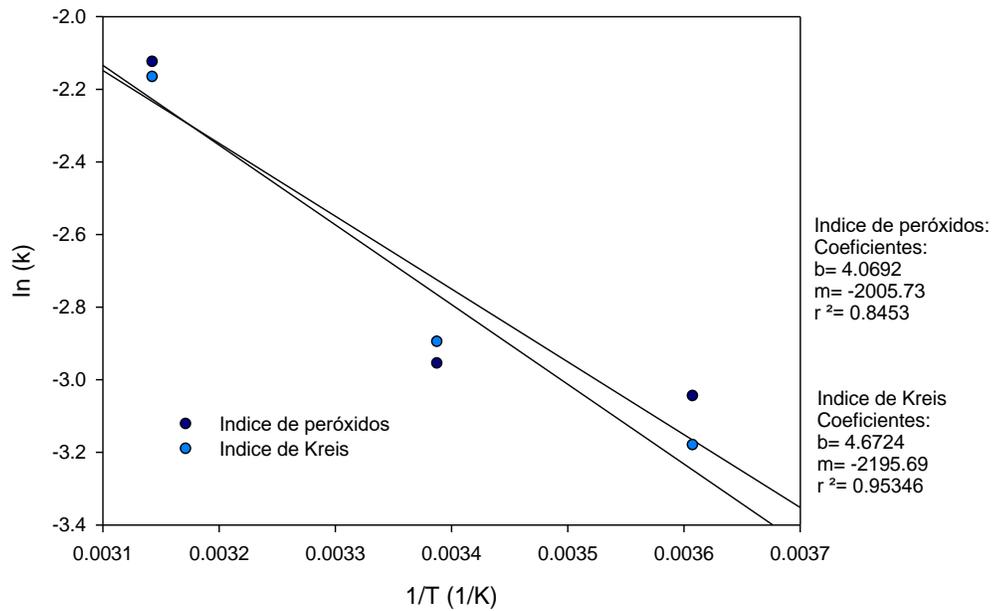


Figura B.2. Indicadores macro en alimento para adulto

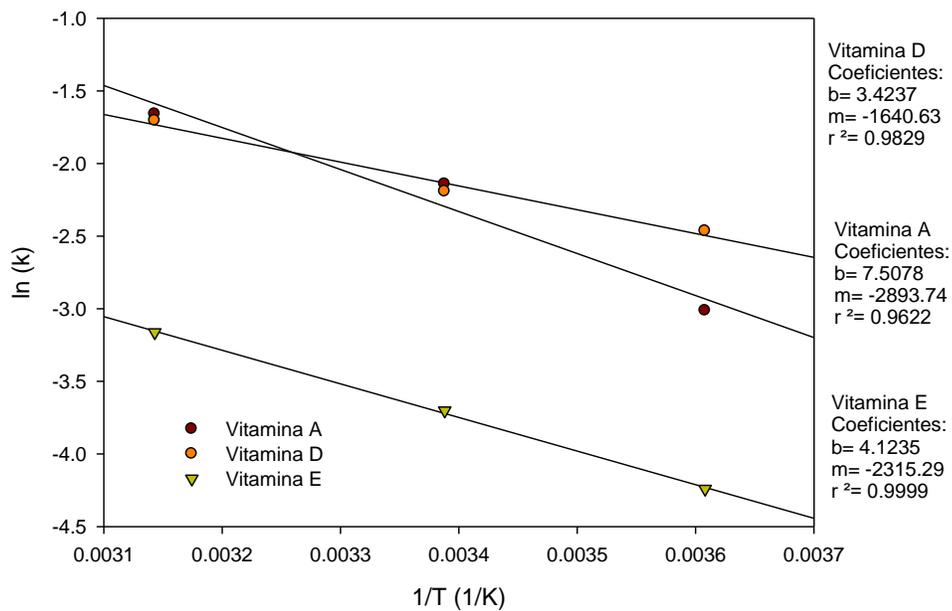


Figura B.3: Vitaminas Liposolubles en Alimento para Cachorro.

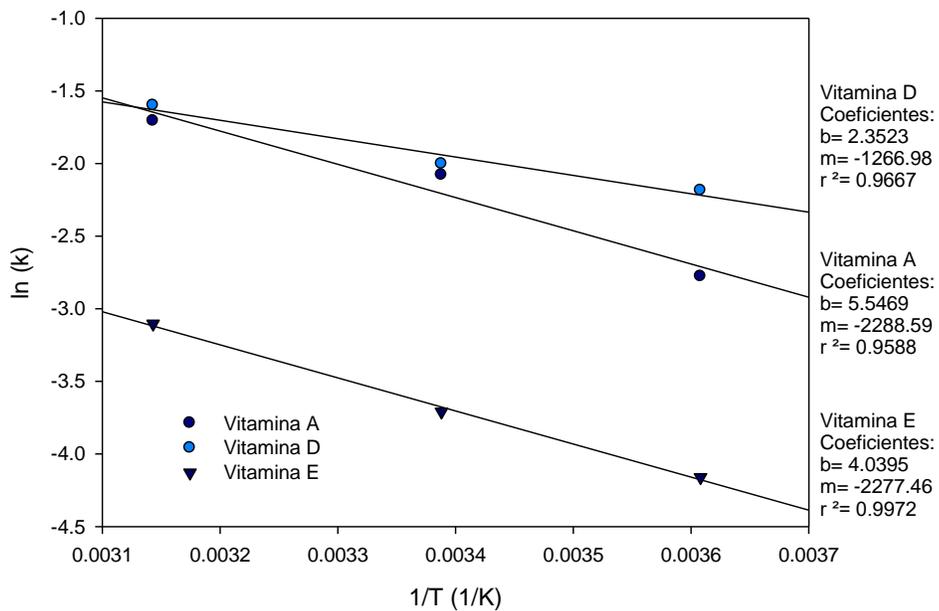


Figura B.4: Vitaminas Liposolubles en Alimento para Adulto.

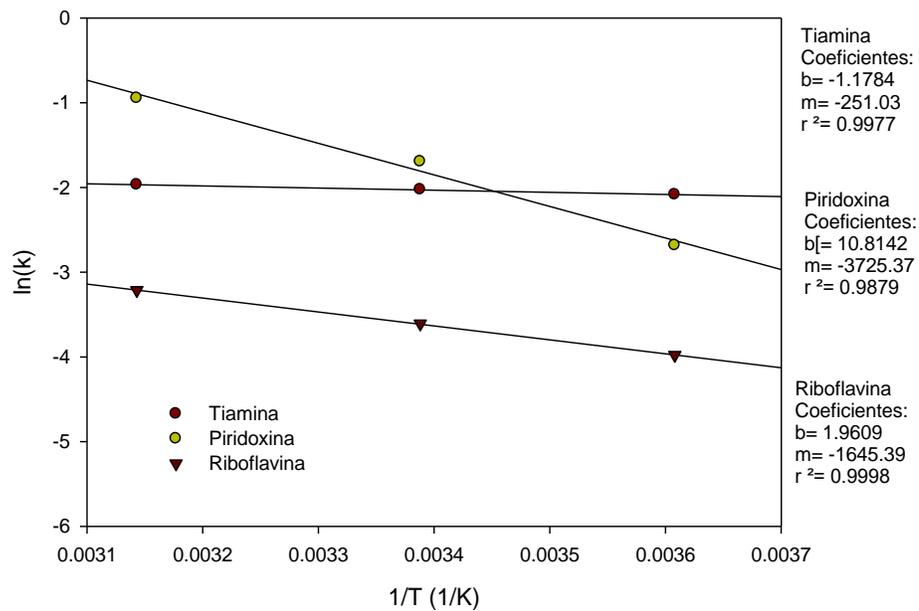


Figura B.5: Vitaminas Hidrosolubles en Alimento para Cachorro.

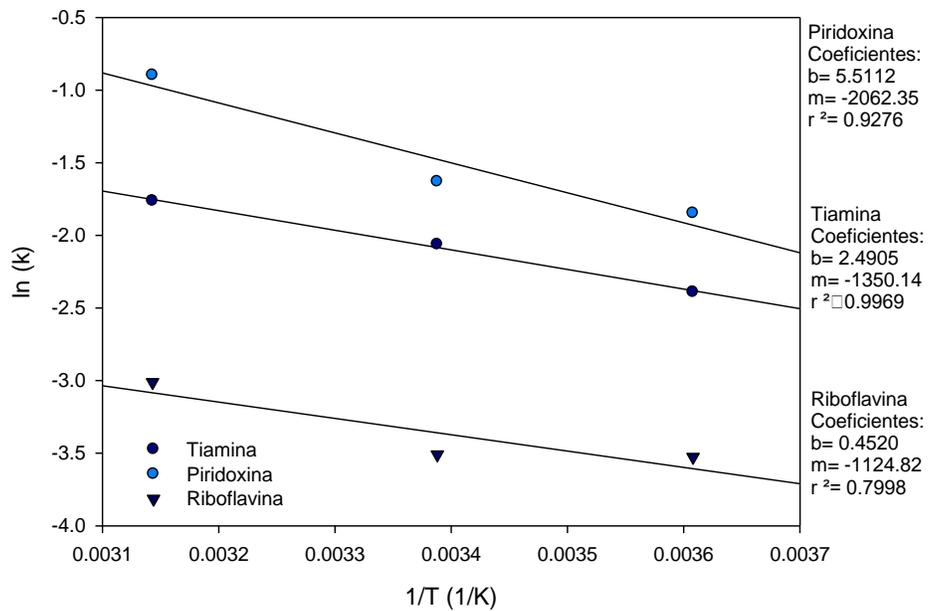


Figura B.6: Vitaminas Hidrosolubles en Alimento para Adulto.