

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LA OXIDACION DE LIPIDOS EN HARINA DE  
SUBPRODUCTOS DE ATUN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL  
CAMARON BLANCO (*Penaeus vannamei* Bone) EN  
CONDICIONES DE LABORATORIO**

**T E S I S**

como requisito parcial para optar al  
Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en  
**RECURSOS ALIMENTICIOS Y PRODUCCION ACUICOLA**

**P R E S E N T A**

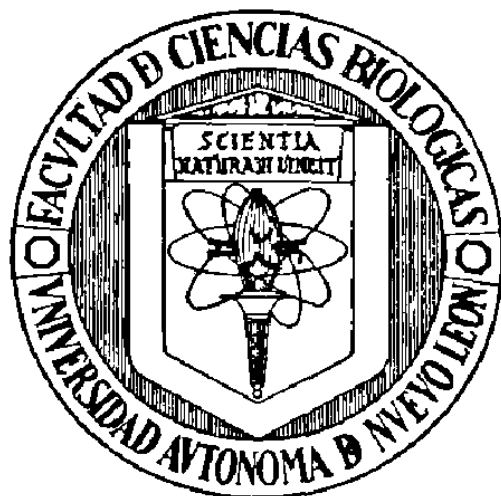
**Ing. Pesq. David Miguel Angel Montaña Aguilar**

IM  
SH38  
M65  
c.1



1080087061

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LA OXIDACION DE LIPIDOS EN HARINA DE  
SUBPRODUCTOS DE ATUN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL CAMARON  
BLANCO (*Penaeus vannamei* Bone) EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**TESIS**

**Como requisito parcial para optar al Grado de**

**Maestro en Ciencias con Especialidad en  
Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

**PRESENTA**

**Ing. Pesq. David Miguel Angel Montaña Aguilar**

**San Nicolás de los Garza, N.L.**

**Mayo de 1998**





**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**EFFECTO DE LA OXIDACION DE LIPIDOS EN HARINA DE  
SUBPRODUCTOS DE ATUN SOBRE EL CRECIMIENTO DEL CAMARON  
BLANCO (*Penaeus vannamei* Bone) EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**Por**

**Ing. Pesq. David Miguel Angel Montaña Aguilar**

**Como requisito parcial para optar al Grado de**

**Maestro en Ciencias con Especialidad en  
Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

**Comité de Tesis:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez.**  
**Presidente**

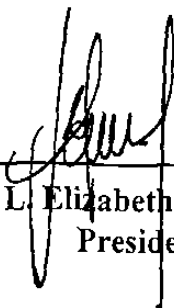
  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Denis Ricque Marie.**  
**Secretario**

  
\_\_\_\_\_  
**M.S.P. Graciela García Díaz.**  
**Vocal**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Rahim Foroughbahkch**  
**Vocal**


## A P R O B A C I O N

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del C. Ing. Pesq: David Miguel Angel Montaña Aguilar, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Recursos Alimenticios y Producción Acuícola.



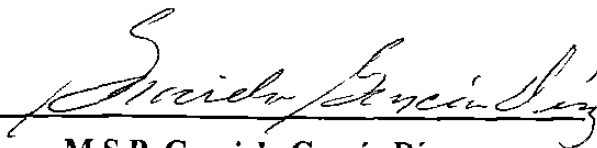
---

Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez.  
Presidente



---

Dr. Denis Ricque Marie.  
Secretario



---

M.S.P. Graciela García Díaz.  
Vocal



---

Dr. Rahim Foroughbahkch  
Vocal

## DEDICATORIA

*A Dios que me ha dado la oportunidad de vivir y realizar mis metas*

*A mi madre que siempre me ha apoyado y me ha enseñado que sólo trabajando duro se logran alcanzar los objetivos que nos fijamos*

*A mi esposa Beatriz E. por su amor y la gran paciencia que demostro durante todo el desarrollo de la tesis y porque a pesar de todo siempre ha confiado en mi.*

*A mi hijo D. Armando un motivo más para culminar esta etapa de mi vida, con amor.*

*A mis hermanos Araceli, Victor, Angélica, Laura, Alejandro y Claudia que con su apoyo y cariño me impulsaron a tomar la decisión de cursar la maestría*

*A mis abuelos Ana y Gregorio que con su ejemplo me han enseñado que nunca hay que darse por vencido*

*A Ma. Elena y Fidel por todo la ayuda y confianza que me han brindado*

*A los que ya no estan conmigo pero que siempre los llevo en mi corazón*

*A mis amigos que siempre me han apoyado*



# AGRADECIMIENTOS

A la Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez por confiar en mi y brindarme la oportunidad de ingresar al programa de maestría, así como por su apoyo económico, paciencia y dedicación durante la fase final del trabajo de tesis.

Al Dr. Denis Ricque Marie, por su tiempo y dedicación durante el desarrollo del trabajo.

A la M.S.P. Graciela García Díaz por su amistad, confianza y sus consejos durante la estandarización de las técnicas de oxidación.

Al Dr. Rahim Foroughbakhch por sus atinados comentarios en la redacción del trabajo y el diseño estadístico, así como por su amistad y confianza durante toda mi estancia en la maestría.

Ing. Oscar Manuel Loaiza Jiménez y Biol. Sara Uresti Ramos, por los momentos compartidos y la gran amistad que nos une.

A la empresa Atúnes y Derivados S.A. y en especial a su director el Ing. Armando Coopel por proporcionarme las muestras de harinas de atún.

A INVE-Aquaculture por haber realizado los análisis químicos en las harinas de atún.

Al Dr. Robert G. Ackman del Technical University of Nova Scotia en Nova Scotia, Canadá, por su gran interés y su asesoría durante el desarrollo del trabajo, así como por la literatura proporcionada.

Al Dr. Johanes Opstvedt y el Dr. Jan Pettersen del Norwegian Herring Oil and Meal Industry Research Institute en Bergen, Noruega, por sus comentarios para mejorar la metodología y la literatura proporcionada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca para realizar este postgrado durante el período Agosto-1994 a Febrero-1997.

A la Comunidad Europea por su apoyo económico del proyecto C11\*-CT93-0300. "Determination of some factors affecting the nutritional and biotoxicological value of fish meal for use in feed for shrimp culture and establishment of quality control norms".

A mis maestros: Dra. Leticia Hahud M., Dra. Guadalupe Alanís, Dr. Roberto Mendoza A., Dr. Guillermo Compean J. y Dr. Ramón Pacheco A.

A mis compañeros del programa Maricultura: M.C. Alma Melo del Angel, M.C. Lourdes Castillo M., Biol. Martha Nieto L, Biol. Alejandra Rocha E., M.C. Mireya Tapia S., M.C. Mario Pelcastre V., M.C. Gerardo Cruz R., M.C. Jesús Montemayor L., M.C. Carlos Aguilera, Biol. Alfredo Tobias C., M.C. Antonio de Dios, Q.B.P. Joel Hernández Aguilar, Ing. Martín Camarena Conchas, Biol. Adrián Salgado, Biol. Pablo González, Biol. Manuel Hernández, Biol. Daniel Iruegas, Ing. Carlos Luna G y a la C. Adriana García secretaria del programa por sus atenciones brindadas durante mi estancia en el programa y a los que en este momento escapan a mi memoria.

Un agradecimiento especial para la familia Hernández Aguilar por su hospitalidad y sincera amistad.

# INDICE

<b>ABRÉVIATURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 Producción y precios de harinas de pescado.....	3
2.2 Composición y valor nutricional de la HP.....	4
2.3 Composición química de las HSA.....	5
2.4 Función de los lípidos en la nutrición del camarón.....	6
2.5 Requerimientos cualitativos y cuantitativos de los lípidos en organismos acuáticos.....	7
2.6 Oxidación de la harina de pescado.....	8
2.7 Efecto nutricional de la rancidez.....	10
2.7.1 Efecto de la rancidez en alimentos para peces.....	11
2.7.2 Efecto de la rancidez en alimentos para crustáceos.....	14
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>5. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>18</b>
5.1 Harinas de subproductos de atún.....	18
5.2 Análisis químico de la materia prima, torta de prensa y las HSA con y sin antioxidante.....	20
5.3 Análisis de frescura en la materia prima, torta de prensa y las HSA con y sin antioxidante.....	20
5.4 Inducción y monitoreo de la oxidación de las HSA.....	20
5.5 Diseño experimental.....	22
5.5.1 Formulación de las dietas experimentales.....	24
5.5.2 Preparación de las dietas experimentales.....	25
5.5.3 Análisis de las dietas experimentales.....	26
5.6 Condiciones experimentales.....	27
5.6.1 Selección de los organismos experimentales.....	27
5.7 Evaluación de la calidad en la proteína.....	30
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
6.1 Análisis químico proximal de la materia prima, torta de prensa y harinas de subproductos de atún (HSA) con y sin antioxidante.....	34

6.2	TVN de la materia prima, torta de prensa y harinas de subproductos de atún (HSA).....	35
6.3	TVN y aminos biogénicos en las harinas experimentales.....	36
	6.3.1 <i>Conteo microbiológico</i> .....	36
6.4	Evaluación química del grado de oxidación en las harinas de subproductos de atún.....	37
6.5	Análisis químico proximal de las harinas de pescado experimentales.....	38
6.6	Análisis químico proximal de las dietas elaboradas con las harinas de pescado experimentales.....	38
6.7	Resultados del bioensayo de crecimiento a los 14 días.....	39
	6.7.1 <i>Resultados del bioensayo de crecimiento a los 28 días</i> .....	42
6.8	Pruebas de evaluación de la calidad de la proteína.....	45
	6.8.1 <i>Bioensayo de digestibilidad in vivo con las dietas experimentales</i> .....	45
<b>7.</b>	<b>DISCUSIONES</b> .....	<b>48</b>
7.1	Composición química proximal de las muestras.....	48
7.2	Nitrógeno volátil total (TVN) en la materia prima, torta de prensa y HSA.....	50
7.3	Evaluación de la calidad de las harinas experimentales.....	50
7.4	Evaluación química del grado de oxidación en las harinas de subproductos de atún.....	51
7.5	Análisis químico proximal de las dietas elaboradas con las harinas de pescado experimentales.....	52
7.6	Bioensayo de crecimiento.....	52
7.7	Calidad de la proteína en las harinas experimentales.....	54
	7.7.1 <i>Pruebas de digestibilidad in vivo con las dietas experimentales</i> .....	55
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>59</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.	Toma de muestras en la planta de Atunes y Derivados S.A. de C.V.....	19
Fig. 2.	Inducción a la oxidación en las HSA .....	22
Fig. 3.	Nitrógeno volátil total en las muestras de subproductos de atún (n=6).....	35
Fig. 4.	Consumo promedio por organismo a los 14 días del bioensayo .....	40
Fig. 5.	Tasa de crecimiento promedio a los 14 días de bioensayo .....	40
Fig. 6.	Tasa de conversión alimenticia promedio a los 14 días de bioensayo .....	41
Fig. 7.	Tasa de sobrevivencia promedio a los 14 días de bioensayo .....	41
Fig. 8.	Consumo promedio por organismo a los 28 días del bioensayo .....	42
Fig. 9.	Tasa de crecimiento promedio a los 28 días de bioensayo .....	43
Fig. 10.	Tasa de conversión alimenticia promedio a los 28 días de bioensayo .....	44
Fig. 11.	Tasa de sobrevivencia promedio a los 28 días de bioensayo .....	44
Fig. 12.	Digestibilidad aparente de la materia seca de la dieta.....	46
Fig. 13.	Digestibilidad aparente de la proteína de la dieta .....	46
Fig. 14.	Digestibilidad aparente de la materia seca del ingrediente .....	47
Fig. 15.	Digestibilidad aparente de la proteína del ingrediente .....	47

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Composición de las materias primas utilizadas en la formulación de las dietas. ....	24
Tabla 2.	Composición de las dietas experimentales .....	25
Tabla 3.	Composición bromatológica de las muestras.....	34
Tabla 4.	Indices de frescura en las harinas experimentales.....	36
Tabla 5.	Análisis microbiológico en las harinas de subproductos de atún (HSA).....	36
Tabla 6.	Indices de rancidez en harinas de subproductos de atún (HSA) .....	37
Tabla 7.	Análisis químico proximal de las harinas experimentales.....	38
Tabla 8.	Análisis químico proximal de las dietas experimentales.....	39
Tabla 9.	Resultados del bioensayo a los 14 días .....	39
Tabla 10.	Resultados del bioensayo a los 28 días .....	42
Tabla 11.	Indices de calidad de la proteína en las harinas experimentales .....	45
Tabla 12.	Digestibilidad aparente de las dietas experimentales.....	45

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Determinación de Nitrógeno Volátil Total (TVN). Técnica ASN 3140 del Manual de Técnicas Tecator, Kjeltex 1026 Dist. Unit, Manual Part No. 1000 2790, T 8806, Prabin & Co AB, Klippan.....	66
Anexo 2.	Extracción y Purificación de Lípidos Método de Bligh and Dyer (1959).....	67
Anexo 3.	Índice de Péroxido - Método Oficial de la A.O.A.C. 965.33, (1991).....	69
Anexo 4.	Valor Anisidina. (IAFMM, 1981. Fish oil Bulletin No. 8 "Método de análisis recomendado para la determinación del Valor Anisidina en aceites de pescado"). List <i>et al.</i> , 1974. ....	72
Anexo 5.	Número del Ácido Tiobarbitúrico (TBA). Modificado por Botsoglou, N.A. ; J. Fletouris D. ; E. Papageorgiou G. ; N. Vassilopoulos V. ; J.Mantis A. and G. Trakatel-lis A. J. Agric. Food Chem. 1994 : 42, 191-197.....	75
Anexo 6.	Determinación de la Digestibilidad de la Proteína por Métodos <i>in vitro</i> : Torry Modificado (Olsen, 1969).....	79
Anexo 7.	Base de datos del programa Mixit II, lista de nutrientes y restricciones de ingredientes.....	81
Anexo 8.	Resultados del análisis químico proximal, realizado en los laboratorios de INVE-Aquaculture.....	82
Anexo 9.	Datos en bruto del bioensayo (14 y 28 días) y análisis estadístico: consumo promedio por organismo, tasa de crecimiento, TCA y sobrevivencia.....	83

## ABREVIATURAS

$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g/}$	Microgramo
$\eta\text{m}$	Nanómetro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
$^{\circ}\text{T}$	Temperatura
20:5 $\omega$ 3	Acido Eicosapentaenóico -EPA- (5 dobles ligaduras, a partir del carbón 3, comenzando por el carbono terminal metilo)
20:6 $\omega$ 3	Acido Docosahexaenóico -DHA- (6 doble ligaduras, a partir del carbón 3, comenzando por el carbono terminal metilo)
ANOVA	Análisis de Varianza
CFU	Colony Forming Units (Unidad Formadora de Colonias)
cm	Centímetros
DAMS	Digestibilidad Aparente de la Materia Seca
DAMSI	Digestibilidad Aparente de la Materia Seca del Ingrediente
DAP	Digestibilidad Aparente de la Proteína
DAPI	Digestibilidad Aparente de la Proteína del Ingrediente
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
ETQ	Ethoxyquin (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,-trimethylquinoline)
$\text{Fe}^{++}$	Hierro
Fl	Fosfolípidos
g	Gramos
Ha	Hectárea
HP	Harina de Pescado
HSA	Harina de Subproductos de Atún
HSAAO	Harina de Subproductos de Atún Altamente Oxidada
HSAF	Harina de Subproductos de Atún Fresca
HSAMO	Harina de Subproductos de Atún Medianamente Oxidada
IFOMA	International Fish Oil Manufacturers Association
kg	Kilogramos
km	Kilómetro
l	Litros
LN	Lípidos Neutros
LT	Low Temperature (Baja Temperatura)
m	Metros
MDA	Malonaldehído
meq/kg	Miliequivalentes/kg de aceite
mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
MPN	Most Probable Number
PC	Fosfatidil Colina
pH	Potencial Hidrógeno
Pl	Postlarva



ppb	$\mu\text{g/l}$
S‰	Salinidad, en partes por mil
TBA	Número del Acido Tiobarbitúrico (Thiobarbituric Acid Number)
TCA	Tasa de Conversión Alimenticia
TM	Toneladas métricas
TOTOX	Representa la Suma del Valor Anisidina + 2 Valor Peróxido
TVN	Nitrógeno Volátil Total (Total Volatil Nitrogen)
USD	Dólares
USD	Dólares Americanos
VA	Valor Anisidina
VP	Valor Peróxido

## RESUMEN

La harina de subproductos de atún (HSA) está ampliamente disponible en diferentes países y es una fuente de proteína potencialmente utilizable en la nutrición del camarón. La HSA se obtiene de una mezcla de subproductos del-enlatado del atún y contiene alrededor de un 8% de grasa residual, la cual es particularmente propensa a la oxidación, debido a los altos niveles de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (i.e. eicosapentaenóico y docosaheptaenóico) y al alto contenido en hierro del músculo rojo (agente pro-oxidante). Sin embargo, la información sobre los efectos de la harina de pescado oxidada en la nutrición del camarón es escasa. Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento de alimentación en camarón con HSA, a la cual se le adicionó ETQ inmediatamente después de la producción denominada HSAF (VP = 9.85 meq/kg; VA = 10.65  $\delta$ op; TBA= 6.39 mg/kg); y después de obtener dos diferentes niveles de oxidación: medianamente oxidada denominada HSAMO (VP = 47.55 meq/kg; VA = 36.29  $\delta$ op; TBA = 8.00 mg/kg) y harina altamente oxidada, denominada HSAAO (VP = 97.52 meq/kg; VA = 59.03  $\delta$ op; TBA = 10.32 mg/kg). Una harina de pescado entero de Chile -de alta calidad - (HPCH) fue usada como control externo. Las muestras de HSA fueron obtenidas de una compañía en México durante los últimos pasos de un proceso de producción y provenientes de un sólo lote. La frescura de la materia prima y de la torta de prensa fue determinada midiendo el contenido de nitrógeno volátil total antes del proceso (TVN 34 y 30 mgN/100g respectivamente). Las harinas de pescado fueron incluidas en dietas experimentales a un nivel de 20% del alimento, contribuyendo con el 33% de la proteína de la dieta. La proteína en las dietas fue de 36.7-38.4%, 9.6-10.2% de grasa y 6.2-7.5% de cenizas (excepto 10.4% de ceniza en las dietas con HSAF). Cada dieta fue evaluada por 28 días, en acuarios de fibra de vidrio de 60 l, con cuatro replicados por dieta y diez camarones por replicado (peso inicial 0.50g). Al final del experimento se evaluó el consumo promedio por organismo, la tasa de crecimiento, la TCA y la sobrevivencia. Los resultados promedio por acuario por dieta a los 14 y 28 días, fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza simple y los valores promedio de los parámetros evaluados fueron comparados mediante una prueba de Rango Múltiple de Tuckey ( $p < 0.05$ ). Los camarones alimentados con la dieta conteniendo HPCH mostraron un mayor crecimiento (+ 36%), consumo del alimento (+ 14%) y TCA (-20%), que los camarones alimentados con las HSA. Los camarones alimentados con la HSAAO consumieron menos alimento (1.3 g/camarón) y crecieron menos (98%), que los alimentados con HSAF y HSAMO. Sin embargo, las diferencias entre las harinas no fueron significativas y las tasas de conversión alimenticia fueron muy similares (2.6). Se observó una buena sobrevivencia (92%) en todos los tratamientos. La digestibilidad aparente de la proteína fue significativamente menor en las HSA (75, 85 y 84% en la HSAF, HSAMO y HSAAO respectivamente) que en la HPCH (91%), la digestibilidad en las HSA posiblemente fue más afectada por el contenido de ceniza que por la oxidación de la grasa residual. Los parámetros de producción del camarón fueron menos afectados por el grado de oxidación que por el tipo de materia prima y el proceso, como fue demostrado por la gran diferencia encontrada con la HPCH.

## ABSTRACT

Tuna meal (TM) is readily available in many different countries and it is a potentially useful protein source for shrimp nutrition. TM is obtained from mixed lots of tuna cannery waste and contains residual fat (approximately 8%) which is particularly prone to oxidation, due to the high levels of long-chain polyunsaturated fatty acids (e.g. EPA and DHA) and to the high iron content in the red muscle (pro oxidative-agent). Data on the effect of oxidized fishmeal on shrimp nutrition are scarce. Therefore, a feeding experiment was conducted with shrimp fed TM with antioxidant (AO ethoxyquin) added immediately after production and after attaining different oxidation levels. A whole high quality fishmeal from Chile (CHFM) was used as external control. The TM samples were obtained from a fish meal manufacturer in Mexico during the final steps of a single fish meal production run. The freshness of the raw material and of the pressed cake was assessed by measuring total volatile nitrogen content before processing (TVN 34 and 30 mgN/100g respectively). Two samples of fresh TM were obtained: the first was immediately treated with 500 mg/kg ethoxyquin and named FTM [Peroxide Value (PV)= 9.85 meq/kg; Anisidine Value (AV)= 10.65 optic density (od); Tiobarbituric Acid Number (TBA)= 6.39 mg/kg]; the other was not treated with antioxidant. Both meals were stored at -4°C for 180 days. At this stage, one portion of the non stabilized tuna meal, already mildly oxidized TM, was treated with 500 mg/kg ethoxyquin and named MOTM (PV = 47.55 meq/kg; AV = 36.29 od; TBA = 8.00 mg/kg); the other one was stored for a further 21 days at room temperature to obtain a highly oxidized, named HOTM (PV = 97.52 meq/kg; AV = 59.03 od; TBA = 10.32 mg/kg). The ash content was higher in the FTM (28%) than in the MOTM (21%) and CHFM (14%), due to a high and variable proportion of bone in the tuna by-products. The fish meals were included in the experimental diets at a level (about 20% as fed) such as they contributed with 33% of the dietary protein. Other ingredients were wheat meal (around 36%), wheat gluten (10%), soybean meal (23.3%), crude lecithin (around 7%), shrimp meal (around 5%), vitamin mix (vit. e 150 ppm, stable vit. C 100 ppm), cholesterol 0.020%, ethoxyquin (0.025%) and DL-methionine (0.025% in the TMs diets). Diets dry matter ranged 36.7-38.4% protein, 9.6-10.2% fat and 6.2-7.5% ash (except 10.4% ash in the FTM diet). Each diet was fed for 4 weeks to four replicate tanks with ten shrimp each (0.50g initial weight). Good survival (92%) was observed with all treatments. The shrimp fed on CHFM showed significantly improved growth (+ 36%), feed consumption (+ 14.8%), and feed conversion (- 20%) to those fed TMs. Shrimp fed on HOTM displayed numerically lower feed consumption (1.3 g/shrimp) and growth (98%) than those fed FTM and MOTM, but differences between TMs were not significant, and feed conversion ratios were very similar (2.6). Apparent protein digestibility was significantly lower in TMs (75, 85 and 84% respectively in FTM, MOTM and HOTM) than in CHFM (91%). Apparent digestibility of the tuna meal protein may be affected more by the ash content than by the level of oxidation of residual fat. With these degrees of oxidation, the effect on the production parameters of the shrimp was small, much smaller than the effect of the fish source and process, as demonstrated by the clear difference with the CHFM.

## 1. INTRODUCCION

En México el cultivo de camarón representa una actividad acuícola generadora de divisas que esta en crecimiento reportándose para 1997, una producción de 16,000 TM , 33% por arriba de la producción de 1996 (Rosenberry, 1997).

Para generar esta producción, existe una demanda de alimentos balanceados, mismos que llegan a constituir hasta el 50% de los costos de producción por lo que cualquier deterioro o mejora en su calidad resulta en un impacto económico importante para el productor.

La harina de pescado es la principal fuente de proteína en dietas para peces y camarones por su alto contenido de proteínas, su adecuado balance de aminoácidos y su aporte en otros nutrientes como ácidos grasos esenciales, energía, minerales y vitaminas; además de poseer un bajo contenido de carbohidratos y fibra. Los lípidos en la harina de pescado presentan altos valores de digestibilidad y energía, además de contener altos niveles de ácidos grasos altamente insaturados. La mayoría de las especies de peces y crustáceos requieren de este tipo de ácidos grasos de manera esencial. Sin embargo, la harina de pescado contiene lípidos residuales altamente reactivos, que pueden oxidarse fácilmente durante el proceso de secado y de almacenamiento dañando su valor nutricional. Los productos de la oxidación, como son los peróxidos y el malonaldehído (MDA), pueden actuar sobre algunas proteínas afectando su utilización por la reacción con aminoácidos y generar sustancias dañinas para el organismo que las consume. Diversos estudios, han demostrado efectos nocivos por el uso de aceites de pescado oxidados sobre la salud de los peces. Hasta la fecha no se conoce la sensibilidad de los camarones al consumo de harinas de pescado oxidadas.

Para la producción de alimentos acuícolas en México, se utilizan harinas y aceites de pescado, nacionales e importadas, debido a que la producción nacional no llega a cubrir la demanda interna. Las harinas de pescado en el mercado nacional se elaboran a partir de anchoveta, sardina, macarela y subproductos del congelado y enlatado de atún y sardina. En 1996, la producción reportada de harina y aceite de pescado fue de 67,806 y 10,242 TM respectivamente (SEMARNAP, 1996), de las cuales las harinas y aceites de subproductos de atún, participaron en aproximadamente un 15% (CANAINPES, 1997). Actualmente la harina

de subproductos del enlatado de atún se produce en los estados de Baja California y Sinaloa. Debido a su disponibilidad y menor costo, con respecto a una harina de pescado entero su inclusión en alimentos acuícolas es por demás interesante.

Sin embargo, se ha mostrado que el reemplazo (proteína por proteína) de la harina de pescado entero por harina de subproductos de atún, en dietas para camarón blanco (*Penaeus vannamei*) da como resultado un efecto negativo en el crecimiento, debido posiblemente al alto grado de rancidez encontrado en la harina de atún (ya que es muy propensa a la oxidación por su alto contenido en hierro) y al daño causado a la calidad de la proteína (Cruz *et al.*, 1992).

Considerando estos antecedentes el presente estudio tuvo como objetivo, aprovechar la capacidad oxidativa de la harina de subproductos de atún, para obtener harinas con diferente grado de oxidación y evaluar el efecto nutricional de los productos de la rancidez sobre el crecimiento, el consumo, la TCA, sobrevivencia y la digestibilidad aparente del camarón blanco *P. vannamei*, usando como control externo, una harina de pescado entero de origen chileno de alta calidad.

## 2. ANTECEDENTES

Pike (1994), comenta que para muchos peces y crustáceos cultivados, particularmente los que son carnívoros, la harina y el aceite de pescado son los mayores componentes de la dieta.

La HP generalmente es un polvo café que contiene un alto nivel de proteína y apreciables cantidades de materia grasa y minerales. Es la principal fuente de proteínas en dietas para peces y crustáceos por presentar un adecuado balance de aminoácidos. Es particularmente rica en lisina y aminoácidos azufrados. La presencia de HP en una dieta complementa cualquier deficiencia de los aminoácidos en las proteínas vegetales, además de que aporta nutrientes tales como ácidos grasos esenciales, energía, fósforo biodisponible, calcio y selenio y una fuente rica de vitaminas (particularmente colina), también tiene un bajo contenido de carbohidratos. Las harinas de buena calidad no presentan sustancias tóxicas o perjudiciales, tales como ureasa, antitripsinas, tioglucósidos, fibra cruda, etc., presentes en otros ingredientes de origen vegetal (Opstvedt, 1985; Abdo de la Parra *et al.*, 1993).

Los aceites de pescado poseen dos propiedades únicas que no tienen otros aceites. La primera es la presencia de una gran cantidad de ácidos grasos de cadena larga, con número impar de carbonos (15, 17 ó 19). La segunda es la presencia de una gran proporción de ácidos grasos poli-insaturados con más de cuatro dobles ligaduras, principalmente de la familia  $\omega$ -3 que tienen entre 5 y 6 dobles ligaduras (Nettleton, 1985) y que son muy propensos a la oxidación.

### 2.1 Producción y precios de harinas de pescado

La producción mundial de harina y aceite de pescado se ha mantenido desde hace varios años en 6.5 y 1.2 millones de toneladas respectivamente, de esta, alrededor del 90% se produce a partir de especies de pescado graso como la anchoveta, capelina, sáballo (menhaden) y sardina, y menos del 10%, de desechos de pescado blanco como bacalao (cod) y merluza (hake); el 1% de la harina es elaborada a partir de ballenas, atún y ciertos crustáceos (Bimbo, 1990; Barlow y Windsor, 1984, Pike, 1997).

Perú y Chile, son los más grandes productores de HP para exportación, juntos contabilizan alrededor de las dos terceras partes de los 3.8 millones de TM comercializadas internacionalmente cada año. En estos países a finales de 1994, el precio de la HP fue de 450-500 U.S.D./TM. Para 1996, el precio en el mercado fluctuó de 450 U.S.D./TM para la harina de calidad estándar y de 600 U.S.D./TM para la harina con calidad premium (Fish Farming International, 1996). Sin embargo, en 1997 los precios fluctuaron entre los 750 y 1.500 U.S.D., dependiendo principalmente de la calidad de la harina (Tapia *et al.*, 1997).

En México, la industria reductora inició en 1953 procesando los desperdicios del enlatado de atún y sardina. Actualmente se reducen anchoveta, sardina y macarela, y subproductos del enlatado de atún y sardina. Las principales zonas reductoras se encuentran en las costas de Baja California, Sonora y Sinaloa.

En 1996, la producción obtenida de harina y aceite de pescado fue de 67,806 TM y 10,242 TM respectivamente (aproximadamente un 30% de la HP fue elaborada de subproductos del congelado y enlatado). Esta producción fue derivada de 362,710 TM de materia prima procesada, que incluyen 84,214 TM de desperdicio provenientes del congelado y enlatado (SEMARNAP, 1996). El costo de las harinas de subproductos en México en 1996 era de \$3,200.00/TM, siendo de mayor costo la harina de anchoveta entera con un valor entre \$ 4,220.00 y \$ 4,800.00 pesos/TM (CANACINTRA, 1996). Actualmente, en 1998, los precios han aumentado pero las diferencias en precio siguen persistiendo, por lo que no deja de ser interesante, la posibilidad de usar HSA en las fórmulas comerciales para engorda de camarón.

## **2.2 Composición y valor nutricional de la HP**

La composición química de algunas de las HP elaboradas con sardina, pescado blanco, anchoveta, atún y ciertos crustáceos varía en base a la relación entre hueso, grasa y carne magra, área geográfica y si se procesan peces enteros o subproductos de los mismos. La variación en las HP en el contenido de grasa total entre especies se debe a factores genéticos básicamente, pero también pueden existir diferencias entre la misma especie por razones geográficas, el proceso, temperatura y grado de extracción del aceite. Es importante conocer



con exactitud el nivel de grasa y determinar el valor energético del material, ya que de ello dependerá el nivel de uso en la fórmula (evitar sabor desagradable en carne y huevo), prevenir el síndrome del vómito negro (erosión de la molleja), así como para establecer el nivel de antioxidante a usar y por ende las condiciones de almacenaje (Castro, 1989).

Las diferencias entre especies son importantes ya que justifican ajustes en la maquinaria para lograr la calidad deseada del producto final. Por lo que el nutriólogo o formulador debe conocer las variaciones en contenido de nutrientes de las harinas de pescado para hacer los ajustes pertinentes en las matrices nutricionales que maneje. Estas diferencias se dan principalmente en componentes como aminoácidos, minerales y energía (Pike *et al.*, 1990).

La composición de la grasa de la HP difiere de la mayoría de los aceites vegetales por sus altos niveles de ácidos grasos poli-insaturados de la familia linolénica (C20 y mayores). Ciertas especies de organismos acuáticos, entre los que se encuentran los crustáceos, requieren de este tipo de ácidos grasos, por lo cual, se les considera como esenciales para su desarrollo y crecimiento (Barlow y Windsor, 1984).

El contenido de fosfolípidos (Fl) es relativamente constante para las distintas especies animales y a lo largo del año, mientras que los lípidos neutros (LN) varían dependiendo del rango de energía almacenada. El aceite de pescado está compuesto casi exclusivamente por LN (97%) mientras que los lípidos de la HP contienen (60%) de LN y (24%) de Fl (Opstvedt, 1985).

### **2.3 Composición química de las HSA**

Kifer *et al.* (1969), realizaron un estudio para evaluar el contenido nutritivo de harina de subproductos de atún -HSA- (de especies mezcladas), y mencionan que debido a que se trata de una especie altamente migratoria, su contenido de grasa varía en función de: la temperatura donde se desarrolla (en un rango de 13-28°C dependiendo de la especie), y de su alimentación (el atún es una especie principalmente carnívora ya que se alimenta de peces, crustáceos y moluscos). Por lo que la materia prima con la que es fabricada la HSA presenta a

menudo importantes diferencias en el contenido de aceite (0.7-15%). De acuerdo con Kifer *et al.* (1969) la composición química promedio de una HSA es la siguiente:

Humedad (%)	Prot. Cruda (%)	Grasa Cruda (%)	Cenizas (%)	Calcio (%)	Fósforo Tot. (%)
7	60	10	23	8.9	4.7

Tomado de Kifer *et al.* (1969). Los valores son el promedio del resultado del análisis de 40 harnas. Valores en base húmeda

Composición de Aminoácidos:

Met %	Cys %	Lys %	Try %	Thr %	Ile %	His%	Val %	Leu %	Arg %	Phe %	Gly %
1.5	0.4	3.9	.71	2.5	2.4	1.8	2.8	3.8	3.2	2.5	4.3

Valores en % de la proteína

Composición de Minerales:

Na %	K %	Mg %	S %	Mn p.p.m	Fe p.p.m	Cu p.p.m	Zn p.p.m	Se p.p.m
0.7	0.7	0.2	N.A.	8.7	368	10	213	4-6

## 2.4 Función de los lípidos en la nutrición del camarón

Los lípidos en la dieta son importantes en la nutrición del camarón. Constituyen un concentrado y una fuente altamente digestible de energía, son una fuente de ácidos grasos esenciales necesarios para el crecimiento y sobrevivencia de todos los animales, sirven como acarreadores de vitaminas liposolubles y de otros compuestos tales como los esteroides y fosfolípidos, los cuales son esenciales para el funcionamiento metabólico normal en los camarones. La función esencial de los ácidos grasos, está relacionada con su rol como componentes de los fosfolípidos y como precursores de las prostaglandinas (Kanazawa, 1984; Akiyama *et al.*, 1991).

Los fosfolípidos son importantes en el mantenimiento, la flexibilidad y permeabilidad de las membranas biológicas, en el transporte de lípidos, y en la activación de ciertas enzimas. Como precursores de las prostaglandinas, probablemente, ellos están involucrados en diversas

funciones fisiológicas y metabólicas. Los fosfolípidos consisten de un glicerol que está esterificado en las posiciones 1 y 2 con ácidos grasos y en la posición 3 con un ácido fosfórico y una base nitrogenada. Si la base nitrogenada es la colina o la etanolamina, son llamados lecitinas o cefalinas respectivamente. Ambos son componentes de la membrana celular y tienen un rol en la digestión, absorción y el transporte de lípidos a la hemolinfa. Los efectos benéficos de los fosfolípidos en el crecimiento y la sobrevivencia del camarón están bien documentados (Cruz-Suárez *et al.*, 1994). Se ha reportado que si los fosfolípidos contienen colina o inositol son más benéficos; la posición de los ácidos grasos afecta la efectividad de los fosfolípidos; y se piensa que la tasa de síntesis de fosfolípidos por el camarón es baja (Kanazawa, 1984; Akiyama *et al.*, 1991).

## **2.5 Requerimientos cualitativos y cuantitativos de los lípidos en organismos acuáticos**

Estudios conducidos durante las dos últimas décadas han demostrado que el requerimiento de ácidos grasos esenciales varía entre las diferentes especies de organismos acuáticos y que difiere de aquel de los animales de sangre caliente. El requerimiento de ácidos grasos esenciales probablemente está estudiado en forma más extensa en la trucha arcoiris (*Onchorynchus mikiss*). Se ha demostrado claramente que los ácidos grasos  $\omega$ -3 son nutritivamente esenciales y que el requerimiento puede ser satisfecho cuando la dieta contiene 0.5-10% de los lípidos en forma de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga contenidos en la harina y/o aceite de pescado. Se ha demostrado que el langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) tiene requerimientos de ácidos grasos  $\omega$ -3, los cuales son satisfechos en mejor forma por los ácidos grasos  $\omega$ -3 contenidos en lípidos de pescado, que por el ácido  $\alpha$ -linolénico (Opstvedt, 1985b).

Evidentemente estos organismos tienen una capacidad metabólica limitada para elongación de cadenas y desaturación del ácido  $\alpha$ -linolénico para transformarlos en ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (Kanazawa, 1984). Estudios nutricionales recientes, hechos con crustáceos, indican que la mejor sobrevivencia y ganancia en peso se obtiene cuando el nivel de inclusión de un aceite o una mezcla de aceites en la dieta es de un 5 a 8% (D'Abramo, 1997).

Los niveles de lípidos recomendados para alimentos comerciales de camarón están entre el 6 y 7.5% y no deben exceder el 10%, ya que la reducción en el crecimiento y el incremento en la mortalidad están asociadas con los niveles de lípidos que exceden el 10%. Sin embargo, es probable que los desbalances o deficiencias en los nutrientes estén relacionados con la energía y los estándares de calidad de los lípidos. Cuatro ácidos grasos están considerados como esenciales para el camarón: linoléico (18:2 $\omega$ 6); linolénico (18:3 $\omega$ 3); eicosapentaenóico (20:5 $\omega$ 3) y docosahexaenóico (22:6 $\omega$ 3), todos a un nivel de 0.4% del alimento (Kanazawa, 1984 ; Akiyama *et al.*, 1991). Los requerimientos totales de fosfolípidos recomendados son del 2.0%, sin embargo, si la lecitina (PC) es usada, los requerimientos se reducen al 1%. De la misma forma, si los fosfolípidos contienen 20:5 $\omega$ 3 o 22:6 $\omega$ 3 en la posición número 2 del fosfolípido, sólo será necesario 0.4% (Kanazawa, 1984; Tacon, 1989; Akiyama *et al.*, 1991).

Los crustáceos, a diferencia de otras especies, requieren de fuentes de esteroles en las dietas para un crecimiento y sobrevivencia normal, ya que carecen de una síntesis de *novo*, para sintetizar esteroides a partir del acetato y el mevalonato. Los experimentos usando dietas artificiales han demostrado que los requerimientos de esteroides para un buen crecimiento y sobrevivencia, son del 0.5% de la dieta (Kanazawa, 1984).

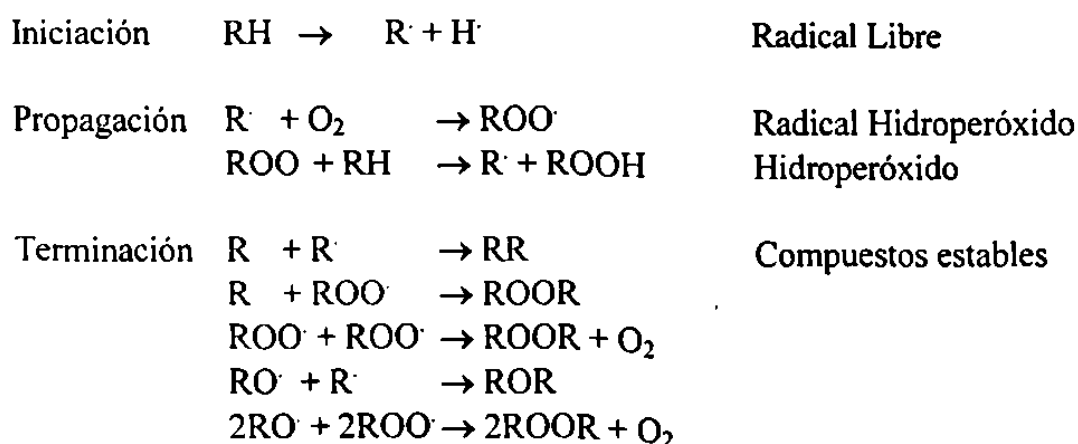
## **2.6 Oxidación de la harina de pescado**

Raramente un fabricante de alimentos puede obtener beneficios totales de los nutrientes en HP debido a la oxidación del aceite residual, el cual rápidamente degrada el producto. El calor generado durante esta rápida oxidación daña adicionalmente al valor nutricional de la HP. La oxidación de la HP causa la pérdida de energía metabolizable en dos formas: destruye parte de la grasa y hace que la grasa residual contenga menos ácidos grasos esenciales, disminuyendo el valor de grasa extraíble y también el índice de yodo, que refleja una pérdida en grasa insaturada (Opstvedt, 1985a).

Los aceites comienzan a descomponerse desde el momento en que son aislados de su ambiente natural. La presencia de ácidos grasos libres es una indicación de la acción hidrolítica. Durante el almacenamiento ocurren cambios, de los cuales resulta la producción

de un sabor y olor desagradable, se dice entonces, que estos aceites se han enranciado. Las características organolépticas desagradables son originadas en parte por la presencia de ácidos grasos libres, pero el desarrollo principal de la rancidez es llevado a cabo por auto-oxidación (Abdo de la Parra *et al.*, 1993).

Entre los productos sintetizados durante la oxidación, se encuentran algunos de peso molecular bajo que le confieren el olor característico a las grasas oxidadas, y otros cuya toxicidad todavía está en estudio. La auto-oxidación se favorece cuando la concentración de ácidos grasos insaturados (o el índice de yodo) es elevada. Debido a que los fosfolípidos contienen una concentración alta de ácidos grasos poli-insaturados, la oxidación de los lípidos se inicia generalmente en esta fracción (cuando está presente) y son más susceptibles a esta reacción que los propios triacilglicéridos. La auto-oxidación funciona a través de la producción de radicales libres y tiene un gran número de derroteros; sin embargo, se considera que se lleva a cabo en tres etapas; iniciación (radical libre del ácido graso), propagación (radical libre de peróxido) y terminación (hidroperóxido) generando la formación de aldehídos y cetonas, compuestos muy estables (Badui, 1993). La reacción de iniciación es catalizada principalmente por la presencia de metales, oxígeno, luz y temperatura. En términos generales, siempre se requiere de algún agente catalizador para efectuar este primer paso. Durante la etapa de iniciación, se sustrae uno de los átomos de hidrógeno adyacente a la doble ligadura, formándose un radical libre al cual el oxígeno se puede unir fácilmente de la siguiente manera:



En la etapa de propagación, la adición de una molécula de O<sub>2</sub> a cada radical libre genera la formación de otro radical libre y de una molécula de hidroperóxido. La formación de radicales libres perdura así hasta agotar los ácidos grasos poli-insaturados mientras se acumulan los hidroperóxidos, sustancias muy inestables y reactivas. La oxidación es amplificada con la presencia de compuestos que contienen hierro o cobre, como lo es parte del músculo rojo de la carne del atún, así como los implementos utilizados durante el procesamiento. En la etapa de terminación, los radicales libres de ácidos grasos e hidroperóxidos se asocian o se rompen para dar lugar a compuestos no radicales estables, entre los cuales están los aldehídos y cetonas de bajo peso molecular, responsables del olor rancio (Labuza, 1970; Badui, 1993).

Durante la producción de harinas y aceites de pescado, la materia prima es sometida a altas temperaturas durante su cocimiento y secado, lo cual puede causar peroxidación, resultando en la pérdida del valor nutricional y energía digestible de los lípidos. Los peróxidos y radicales libres pueden reaccionar con el radical épsilon del grupo amino de la lisina y afectar la utilización de la proteína (Subramanyam, 1994).

Sin embargo, cambios en el valor nutricional pueden ocurrir durante el periodo de captura, mientras que el pez es almacenado y durante el proceso de fabricación. La Asociación Internacional de Productores de Harinas y Aceites de Pescado (IFOMA por sus siglas en inglés), ha estado analizando sistemáticamente los cambios que puedan ocurrir, para tratar de ordenar u optimizar el manejo y procesamiento del pescado para producir harina y aceite de alta calidad, y su utilización en acuicultura. En particular, se han investigando los siguientes campos: 1) Frescura de la Materia Prima; 2) Temperatura de exposición durante el procesamiento; 3) Formación de Mollerosina (Escore Biotoxicológico) y 4) Calidad de los Lípidos.

## **2.7 Efecto nutricional de la rancidez**

Badui (1993), menciona que los peróxidos pueden actuar sobre algunas proteínas generando sustancias cuya naturaleza química puede ser dañina para el organismo que las consume. Su efecto en estos nutrimentos es muy importante, ya que se reduce su calidad

debido a pérdidas de ciertos aminoácidos como metionina, triptofano, histidina y lisina. La reacción de los peróxidos con la proteína, también provocan la polimerización, la agregación y la fragmentación de los polipéptidos, lo que a su vez se refleja en sus propiedades funcionales pues causa cambios en la hidrofobicidad y la solubilidad. Estos cambios se han observado en diversos sistemas modelo, como el del ácido linoléico y caseína; la oxidación del ácido provoca, a su vez, que la proteína pierda aminoácidos, se vuelva menos aprovechable y se polimerice. Estas transformaciones causan que las enzimas pierdan su actividad biológica. La polimerización de las proteínas se lleva a cabo ya sea mediante enlaces covalentes carbono-carbono, que se establecen al condensarse los grupos amina (i.e. de la lisina) con los dialdehídos provenientes de la oxidación (i.e. MDA), o bien, por un mecanismo que implica los radicales libres de las proteínas, este segundo es importante en los alimentos deshidratados (i.e. harinas de pescado).

La oxidación y la formación de los radicales libres puede resultar en la reducción de la palatabilidad, una pobre conversión alimenticia, depresión del crecimiento, disminución de la inmunocompetencia y la salud del animal. La oxidación de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), puede también conducir a una deficiencia nutricional ya que estas vitaminas son esenciales para la nutrición y la salud de los organismos acuáticos (Subramanyam, 1994).

Los efectos toxicológicos de lípidos oxidados de HP en animales de sangre caliente han sido revisados por Barlow y Pike (1977, citado por Opstvedt, 1985), concluyendo que los valores de peróxido encontrados generalmente en las HP comerciales no producen ningún efecto adverso en aves, cerdos, ganado u ovejunos, siempre que las dietas hayan sido adecuadamente fortificadas con vitaminas, particularmente con vitamina E. Los peces, los visones y posiblemente los cerdos destetados, por otra parte, parecen ser susceptibles a productos de oxidación de la grasa (Barlow y Windsor, 1984).

### ***2.7.1 Efecto de la rancidez en alimentos para peces***

Debido a que se utilizan grandes cantidades de harina y aceite de pescado en alimentación de peces, en este caso, la oxidación y rancidez de los lípidos de pescado han sido de mayor interés. Ha sido a través de experimentos nutricionales, como se ha demostrado que



la rancidez de las grasas reduce la tasa de crecimiento del animal, incrementa el peso de algunos órganos (i.e. en camarón se presenta un aumento en la relación hepatosomática con el alto grado de oxidación en el aceite, según San Martín, 1995) y puede causar necrosis en el hígado o atrofia muscular en los peces (Kaneda *et al.*, 1987 citado por Pettersen y Olsen, 1989), e incrementar la mortalidad en peces (Murai y Andrews, 1974).

Ketola *et al.* (1989) evaluaron seis dietas comerciales para alevines de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) y encontraron variaciones importantes e inesperadas en las tasas de crecimiento, así como mortalidades tempranas en ambas especies de salmón. Al analizar el grado de oxidación de los lípidos en estas dietas, se dieron cuenta que, aunque los niveles de rancidez fueron bajos (8.6-63 mg de MDA/kg de dieta) van ligados a las variaciones de crecimiento y mortalidad, sugiriendo que los alevines de estas especies de salmón pueden ser afectados adversamente por bajos niveles de rancidez oxidativa en las dietas. En este caso, es probable que se hayan acabado los antioxidantes naturales y sintéticos de las dietas para que sus lípidos puedan empezar a oxidarse.

Los efectos del aceite de pescado oxidado en la dieta de diferentes especies de peces, han sido estudiados por Murai y Andrews (1974) en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*). En un experimento, el aceite de pescado oxidado a un VP = 60 meq/kg, fue agregado en niveles de 0, 1.0 ó 10% a dietas semi-sintéticas que contenían niveles variables de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (0.25 y 100 mg/kg en la dieta) o ETQ (0 y 125 mg/kg en la dieta). Observaron que los bagres alimentados con aceite oxidado hasta 1%, sin adición de acetato de  $\alpha$ -tocoferol o de ETQ presentaron una disminución en el crecimiento, TCA, un aumento en la mortalidad y exhibieron síntomas de deficiencia de vitamina E. Los efectos toxicológicos del aceite oxidado fueron evitados totalmente mediante la adición de 25 mg de  $\alpha$ -tocoferol acetato más 125 mg de ETQ o mediante 100 mg de  $\alpha$ -tocoferol acetato solo, pero no con ETQ sola.

Hung y Slinger (1980); Hung *et al.* (1980) y Hung *et al.* (1981), en tres experimentos diferentes con trucha arco-iris (*Oncho. yincho. mikiss*), utilizaron dietas que contenían aceite de pescado con diferente grado de oxidación aceite fresco (VP = 7 meq/kg); aceite débilmente oxidado (VP = 25 meq/kg); medianamente oxidado (VP = 51 meq/kg); altamente oxidado (VP = 120 meq/kg) y extremadamente oxidados (VP = 314 meq/kg). El aceite fue agregado a

un nivel de 7.5% del alimento en los tres estudios, así como diferentes niveles de  $\alpha$ -tocoferol acetato (33 - 100 mg/kg de dieta) y ETQ (0 y 125 mg/kg). No observaron diferencias entre los peces alimentados con aceites frescos u oxidados, cuando existió suplementación con  $\alpha$ -tocoferol acetato, con respecto al incremento en peso vivo, TCA, mortalidad, valores hematológicos o concentración de ascorbato en el hígado. Solo observaron un incremento en la mortalidad, cuando las truchas fueron alimentadas con aceites de pescado extremadamente oxidados sin suplementación de  $\alpha$ -tocoferol acetato o de ETQ. Sin embargo, en cada uno de los experimentos, en las dietas conteniendo aceite oxidado, se observó una reducción en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol y de ácidos grasos esenciales (HUFA) después del peletizado y al final de 24 semanas de almacenaje. Ellos concluyen que la suplementación con  $\alpha$ -tocoferol acetato y etoxiquín previenen las deficiencias de vit. E y muestran algunos efectos benéficos para los peces cuando fueron alimentados con dietas conteniendo aceite de pescado altamente oxidado.

Estos datos coinciden con los obtenidos por Stéphan *et al.* (1995) al investigar los efectos del aceite oxidado en la dieta y el contenido de  $\alpha$ -tocoferol acetato en el músculo del turbot (*Scophthalmus maximus*) en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Koshio *et al.* (1994b) evaluaron el efecto en crecimiento, sobrevivencia y sabor del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de la adición de aceites oxidados de arenque y canola en la dieta, en una prueba de 52 días. Ellos alimentaron con dietas conteniendo 10% de aceites de arenque y canola a dos niveles de oxidación. Para las dietas con aceite de arenque el VP en los aceites fue de <1, 14 y 40 meq/kg para el aceite fresco, ligeramente oxidado y medianamente oxidado respectivamente. Mientras que para las dietas conteniendo aceite de canola el VP fue de <1, 5.5 y 17 meq/kg respectivamente. Encontraron que el grado de oxidación en ambos aceites no afectó su composición de ácidos grasos y que no tuvo un efecto en los ácidos grasos totales de las dietas para ningún grupo. No se presentó mortalidad y los peces en todos los tratamientos crecieron bien. Ellos concluyen que el tipo de aceite no fue un factor importante para afectar la sobrevivencia y el crecimiento de los peces, pero la ganancia en peso de los alimentados con los aceites medianamente oxidados fue significativamente menor que en los alimentados con aceites frescos.

Obach y Laurencin (1992) determinaron el efecto del aceite oxidado en la dieta y la deficiencia de antioxidante en la respuesta inmune del turbot (*Scophthalmus maximus*). El aceite oxidado fue agregado en un 7% de la dieta, la cual fue deficiente en vit. E, vit. C y antioxidante sintético. Los peces fueron vacunados contra *vibro anguillarum* 408, justo antes de iniciar el experimento. Después de 9 meses, la resistencia a la infección bacteriana y la producción de anticuerpos fue evaluada. La producción de anticuerpos en plasma no fue afectada por el tratamiento alimentario, pero la respuesta inmune fue significativamente más baja y la mortalidad aumentó, en los peces alimentados con aceite oxidado.

Pettersen *et al.* (1996) evaluaron el efecto nutricional de los lípidos oxidados en harina y aceite de macarela en dietas para salmón. Ellos llevaron a cabo dos experimentos de alimentación utilizando aceites y harinas de jurel con y sin antioxidante (ETQ). Fabricaron alimentos extruídos con las harinas y aceites de pescado con y sin ETQ y las probaron con salmón en jaulas marinas. En el primer experimento los tratamientos no tuvieron un efecto en la salud de los peces, los peces alimentados a partir de harina y aceite tratados tuvieron tasas de crecimiento y ganancias en peso más altas comparados con los peces alimentados con harina y aceite sin tratar, pero sólo encontraron diferencias estadísticas significativas en el peso corporal. Sin embargo, la digestibilidad de la proteína en mink fue más baja en la harina sin tratar que en la harina tratada con ETQ, tanto al tiempo de producción como después de 10 meses de almacenamiento. En el experimento dos, la oxidación de los lípidos en la HP sin ETQ fue mayor que en la harina tratada con ETQ (TOTOX: 40 vs. 24) al momento de la fabricación y todavía más después de 9 meses de almacenaje, aunque la oxidación en el aceite no fue afectada por el tratamiento con ETQ. La digestibilidad de las harinas al momento de su fabricación y después de medio año de almacenadas a temperatura ambiente, no fue diferente en las harinas tratadas y sin tratar. La tasa de crecimiento y el peso final de los salmones fue significativamente más alto con las dietas con aceite y HP tratados con ETQ.

### 2.7.2 Efecto de la rancidez en alimentos para crustáceos

Cruz *et al.* (1992), evaluaron la HSA (estándar de 53% de proteína, 25% de cenizas y 19.3% de contenido de lípidos) como una fuente de proteína para la alimentación de juveniles de camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Elaboraron seis dietas isoproteicas con porcentajes

crecientes de HSA (0% - 34.9%) sustituyendo la HP entero de la dieta control. La digestibilidad con pepsina fue mucho más baja para la harina de atún, mientras que el grado de rancidez de los lípidos fue alto (TBA = 40.6 mg/kg). Los resultados zootécnicos mostraron diferencias significativas entre los pesos promedios finales de los camarones de los diferentes tratamientos, el crecimiento disminuyó y la TCA aumentó con el incremento de inclusión de harina de atún en la dieta, posiblemente debido a la rancidez de los lípidos, así como al mayor contenido de ceniza.

Koshio *et al.* (1994a) estudiaron en el camarón *P. japonicus* el efecto de niveles medianos de oxidación de lípidos (PV = 45 meq/kg). Un primer experimento se realizó sobre el periodo de desarrollo larval, incorporando los aceites al 10% en dietas microparticuladas. Las larvas alimentadas con aceites oxidados alcanzaron el estadio postlarva (PL1) en un tiempo mayor. El comportamiento de las larvas fue afectado (actividad natatoria débil) y su longitud fue significativamente reducida por el grado de oxidación de los aceites. Un segundo experimento consistió en alimentar juveniles de un peso inicial de 0.19 g durante 30 días, con dietas conteniendo 10% de los aceites experimentales, sin suplementación en ácidos grasos poliinsaturados. Se usaron aceites de maíz y pescado con valores de peróxidos crecientes de 0.6, 29.9, 44.3 y 1.9, 35.3, 45.8 meq/kg respectivamente. La oxidación del aceite generó una disminución sensible del porcentaje de ácidos grasos 20:5  $\omega$ 3 y 22:6  $\omega$ 3 en los lípidos neutros de las dietas con aceite de maíz, a cualquier nivel de oxidación. En los lípidos polares, la oxidación disminuyó el nivel de ácidos grasos  $\omega$ 3 tanto en la dieta con aceite de pescado, como de maíz. Al final del experimento el peso promedio, la sobrevivencia y la TCA fueron más afectados en las dietas con aceite de maíz oxidado que con aceite de pescado oxidado. Los autores concluyen que, el mayor efecto de la oxidación para las dietas con aceite de maíz fue debido a que los animales se encontraban bajo condiciones limitantes en el aporte dietario de ácidos grasos  $\omega$ 3 y los niveles críticos de peróxidos serían de 1 meq/kg y 5 meq/kg respectivamente para larvas y juveniles de *P. japonicus*.

San Martín (1995) llevó a cabo un bioensayo nutricional con dos diseños factoriales A) 3 x 2 dietas conteniendo aceite fresco, medianamente oxidado y altamente oxidado (V.P. = 6, 50 y 100 meq/kg respectivamente), suplementadas con dos niveles de vitamina E (0 y 100

mg/kg DL- $\alpha$ -tocoferol acetato) y B) 2 x 2 dietas conteniendo aceite altamente oxidado suplementadas con dos niveles de vitamina E (0 y 130 mg de DL- $\alpha$ -tocoferol acetato) y dos niveles de suplementación de antioxidante ETQ (0 y 130 mg/kg de dieta), alimentando a juveniles de *Penaeus vannamei* de 250 mg de peso promedio durante 56 días. Los resultados del experimento lo llevaron a concluir, que un alto grado de oxidación (V.P. = 100 meq/kg) del aceite de pescado disminuye el consumo de alimento y por ende el crecimiento. Por otro lado las dietas no suplementadas con vitamina E a cualquier nivel de oxidación provocan mortalidades importantes, y la suplementación con ETQ es benéfica en reducir la mortalidad (protección de la vitamina E en la dieta) y en mantener las tasas de consumo y crecimiento normales (protección de los ácidos grasos poli-insaturados).

Recientemente Bautista y Subosa (1997) en un estudio para determinar la sensibilidad del camarón (*Penaeus monodon*) al grado de oxidación de los lípidos, evaluaron 5 dietas con diferentes niveles de oxidación provocada por la adición de 1, 10, 20, 50 y 100 g de tetraetoxipropano (TEP producto de oxidación que al hidrolizarse produce MDA, que a su vez induce la oxidación de los lípidos). Los cambios en la calidad del alimento fueron evaluados monitoreando los valores de TBA y composición de ácidos grasos, así como los efectos en crecimiento y sobrevivencia. A las 6 y 8 semanas, observaron que las dietas conteniendo 50 y 100 g/kg de TEP mostraron los valores más altos de TBA (913 y 1262 mg de MDA/kg de grasa) y un menor contenido de ácidos grasos insaturados. La ganancia en peso fue significativamente más baja en los camarones alimentados con estas dietas, mientras que la sobrevivencia no se vio afectada. Concluyen que camarones juveniles de *Penaeus monodon*, son capaces de tolerar valores de TBA hasta 800 mg de MDA/kg de grasa sin afectar el crecimiento y la sobrevivencia.

### 3. HIPOTESIS

La HSA por su alto contenido en hierro ( $Fe^{++}$ ) se oxida fácilmente. La oxidación de los lípidos disminuye la calidad de la proteína y su uso en la dieta provoca una disminución en el crecimiento, en la digestibilidad aparente de la proteína y un aumento en la TCA.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo Particular:

Evaluar el efecto del grado de oxidación en harinas elaboradas con el subproducto del enlatado de atún (*Thunnus albacores*), sobre la calidad de la proteína en la harina y el crecimiento del camarón blanco (*Penaeus vannamei*, Bone) cuando es usada como uno de los ingredientes dietarios de aporte proteico en dietas para su alimentación.

#### Objetivos Particulares:

1. Determinar la composición química de las harinas de HSA.
2. Inducir la oxidación de los lípidos contenidos en la HSA y estandarizar las técnicas para monitorear los niveles de oxidación.
3. Determinar el efecto de la rancidez en los lípidos de la HSA, sobre la calidad de la proteína a través de:
  - A) Determinación de lisina disponible
  - B) Un bioensayo de crecimiento en juveniles de camarón blanco *P. vannamei*.
  - C) Pruebas de digestibilidad *in vitro* e *in vivo*.
4. Comparar el valor nutricional de una HSA y una harina de pescado entero.

## **5. MATERIAL Y METODOS**

### **5.1 Harinas de subproductos de atún**

Se trabajó con muestras de materia prima, torta de prensa y harina terminada, de subproductos del enlatado de atún, proporcionadas por la empresa Atunes y Derivados en Mazatlán, Sinaloa. La fecha de elaboración de las harinas fue el 17 de Septiembre de 1995.

Una muestra de 15 kg de subproductos de atún (materia prima), fue tomada inmediatamente después de ser vaciada, de los contenedores en la planta. Se buscó que la muestra incluyera la cabeza, el esqueleto, la carne pegada al hueso (músculo rojo) y las vísceras. Justo después de tomar la muestra, se adicionaron 500 mg/kg de ETQ (antioxidante), el cual fue mezclado manualmente. Ya mezclada con el antioxidante, la materia prima se colocó en una bolsa plástica bien sellada y se almacenó en hielo para su traslado a la ciudad de Monterrey.

La materia prima fue paleada a una banda transportadora para ser llevada al cocedor, el cual se encontraba a 80°C, el tiempo de cocción fue de 5 min, ya cocida fue llevada a una prensa horizontal, donde fue prensada durante 5 min. Una muestra de 10 kg de torta de prensa, fue tomada inmediatamente después de salir del prensado y se le adicionó el ETQ mezclando manualmente, el tratamiento de la muestra fue igual que para la materia prima, hasta su traslado a la ciudad de Monterrey.

Continuando con el proceso, la torta de prensa fue llevada por una banda transportadora hacia el secador de flama directa tipo rotatorio, el cual es calentado por una mezcla de combustóleo-aire a 85°C. El tiempo que estuvo la materia húmeda dentro del secador fue de 15 minutos, justo después de salir del secador se adicionaron 500 g/TM de ETQ de manera mecánica por un rociador automático, homogenizándose la materia seca y el antioxidante por completo, dentro del molino de martillos. La materia ya seca fue llevada por una banda transportadora a un molino de martillos donde fue pulverizada finamente para después ser almacenada en sacos de poliuretano de 50 kg. En este momento se tomo una muestra de 20 kg de la harina y fue almacenada en una bolsa de plástico negra bien sellada para su traslado a la ciudad de Monterrey, está se consideró como HSA con Antioxidante

(HSA Fresca). Otra muestra de 20 kg de harina, a la cual no se le adiciono ETQ al salir del secador, fue tomada de este mismo lote de producción y almacenada en una bolsa negra bien sellada para su traslado a la ciudad de Monterrey, esta última muestra se consideró como HSA sin antioxidante (Fig 1)

Las muestras de materia prima y torta de prensa fueron almacenadas en congelación a -20°C por 30 días hasta su análisis en el laboratorio, al mismo tiempo las HSA fueron almacenadas en refrigeración a -4 °C durante 180 días.

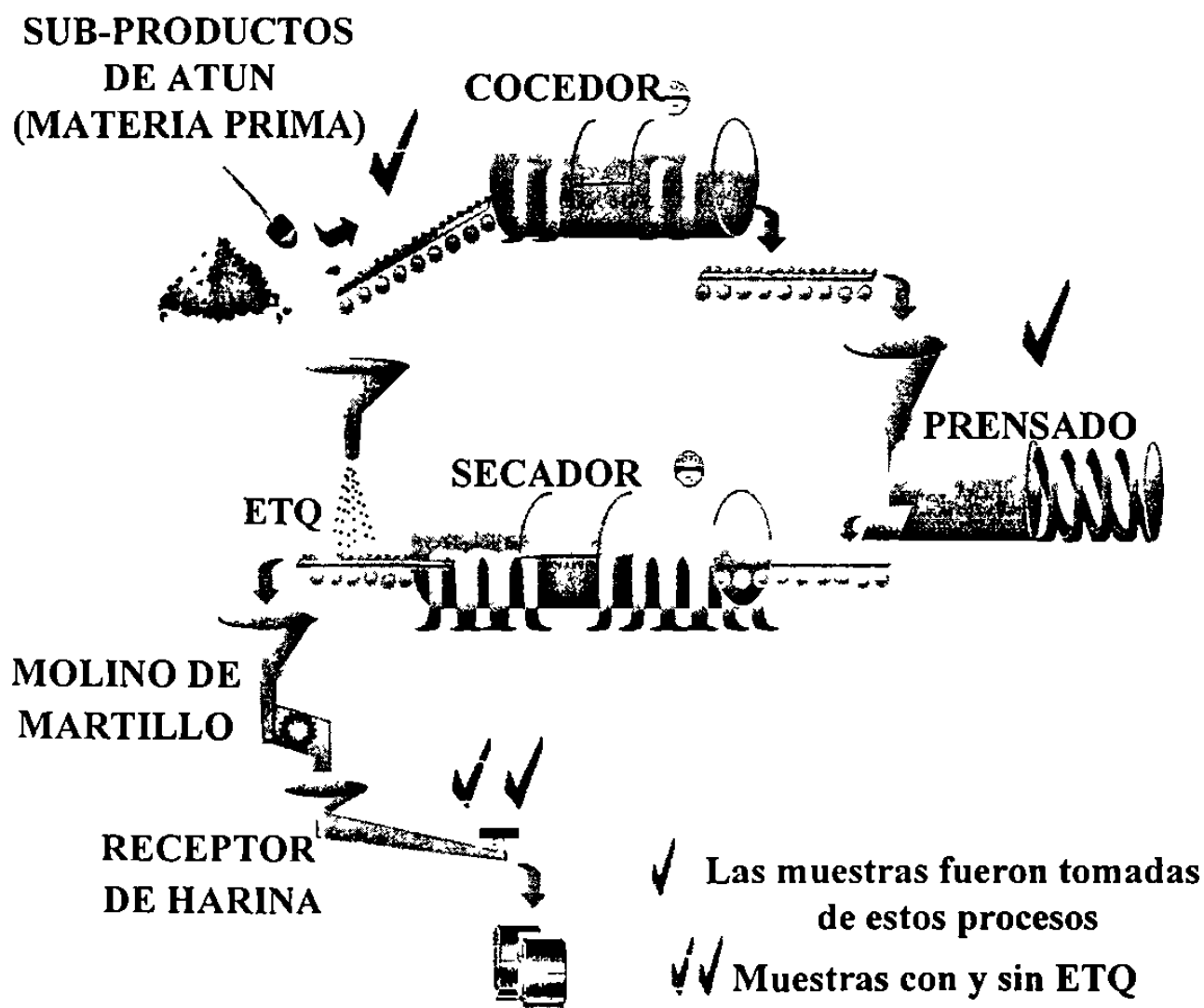


Fig. 1. Toma de muestras en la planta de Atunes y Derivados S.A de C.V.



## 5.2 Análisis químico de la materia prima, torta de prensa y las HSA con y sin antioxidante

Se llevo a cabo el análisis químico proximal de cada una de las muestras colectadas, el cual fue realizado en el laboratorio de análisis químicos del Programa Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, determinando humedad, cenizas totales, proteína bruta, grasa bruta y extracto libre de nitrógeno (ELN). Esto, con el fin de caracterizar la harina y poder contar con información acerca de su composición química, la cual fue utilizada más adelante en la formulación de las dietas. En el cuadro se muestran las determinaciones efectuadas y las metodologías aplicadas:

ANALISIS	METODO
Humedad	Secado a 132°C durante 2 hrs (A.O.A.C., 1990 #920.36)
Extracto etéreo	Soxhlet (Tecator, 1983)
Proteína	Kjeldahl (Tecator, 1987)
Ceniza	Incineración a 600 °C (A.O.A.C., 1990 #942.05)
Extracto Libre de Nitrógeno	Por diferencia
Materia Seca	Por diferencia

## 5.3 Análisis de frescura en la materia prima, torta de prensa y las HSA con y sin antioxidante

Ya caracterizada químicamente cada una de las muestras, se evaluó el grado de frescura en la materia prima, torta de prensa y las harinas de subproductos de atún, mediante la determinación de Nitrógeno Volatil Total (TVN) con la técnica ASN 3140 del manual de técnicas TECATOR y llevada a cabo en un destilador tecator 1026 (Anexo 1). El análisis de TVN mide las bases volátiles de bajo peso molecular y compuestos aminados producidos por la descarboxilación microbiana de los aminoácidos y ha sido usado comunmente como una medición de la calidad y frescura de los productos de origen marino (Woyewoda *et al.*, 1986; Siang y Kim, 1992).

## 5.4 Inducción y monitoreo de la oxidación de las HSA

La inducción a la oxidación en la harina no estabilizada con antioxidante, se realizó por almacenamiento, monitoreando el grado de oxidación, con las técnicas de valor peróxido (VP) método de la A.O.A.C., 1990 (Anexo 3), valor de anisidina (VA) método de IAFMM,

1981 (Anexo 4) y número del ácido tiobarbitúrico (TBA) método de Botsoglou *et al.*, 1994 (Anexo 5), hasta obtener tres niveles de oxidación: fresco, medianamente oxidado y altamente oxidado, definidas de acuerdo al modelo de San Martín (1995).<sup>1</sup> Para el análisis de VP y VA, fue necesario extraer los lípidos en la harina de atún, con el método de Bligh and Dyer, (1959, Anexo 2).

Después de 180 días de almacenamiento en refrigeración el grado de oxidación en la harina con antioxidante no había aumentado, pero de manera preventiva se le adicionó ETQ (500 mg/kg) en una batidora Kitchen Aid de 5 l; a esta harina se le denominó harina de subproductos de atún fresca (HSAF). Por otra parte la harina sin antioxidante presentó un grado de oxidación mediano, por lo que fue separada en dos lotes de 10 kg; a uno de ellos se le agregó ETQ (500 mg/kg) denominándosele HSAMO. Los otros 10 kg fueron almacenados a temperatura ambiente (32°C - 36°C) buscando con ello que los niveles de oxidación en la harina se incrementarán hasta alcanzar un alto nivel de oxidación, lo cual se logró al término de 21 días, momento en el cual se estabilizó con 500 mg/kg de ETQ, a esta harina se le denominó HSAO. Todas las harinas se almacenaron en bolsas plásticas de un kg en refrigeración a -4°C (Fig 2).

Las harinas de subproductos de atún con diferente grado de oxidación también se enviaron al laboratorio de INVE Aquaculture en Oeverstraat, Bélgica, donde se realizaron las determinaciones de TVN, VP y el Análisis Químico Proximal; y al laboratorio de CEAT N.V. en Bélgica, para el análisis de TBA, con la finalidad de corroborar nuestros resultados.

---

<sup>1</sup> En un principio se había considerado llevar a cabo la oxidación sometiendo a esta harina a un periodo de calentamiento a 60°C durante 3 horas, pero el Dr. Johannes Opstvedt del Norwegian Herring Oil and Meal Industry Research Institute de la ciudad de Bergen, Noruega, quien tiene una amplia y reconocida experiencia en lo que se refiere a lípidos de origen marino, recomendó que era mejor dejar que la oxidación se diera en condiciones de almacenamiento.

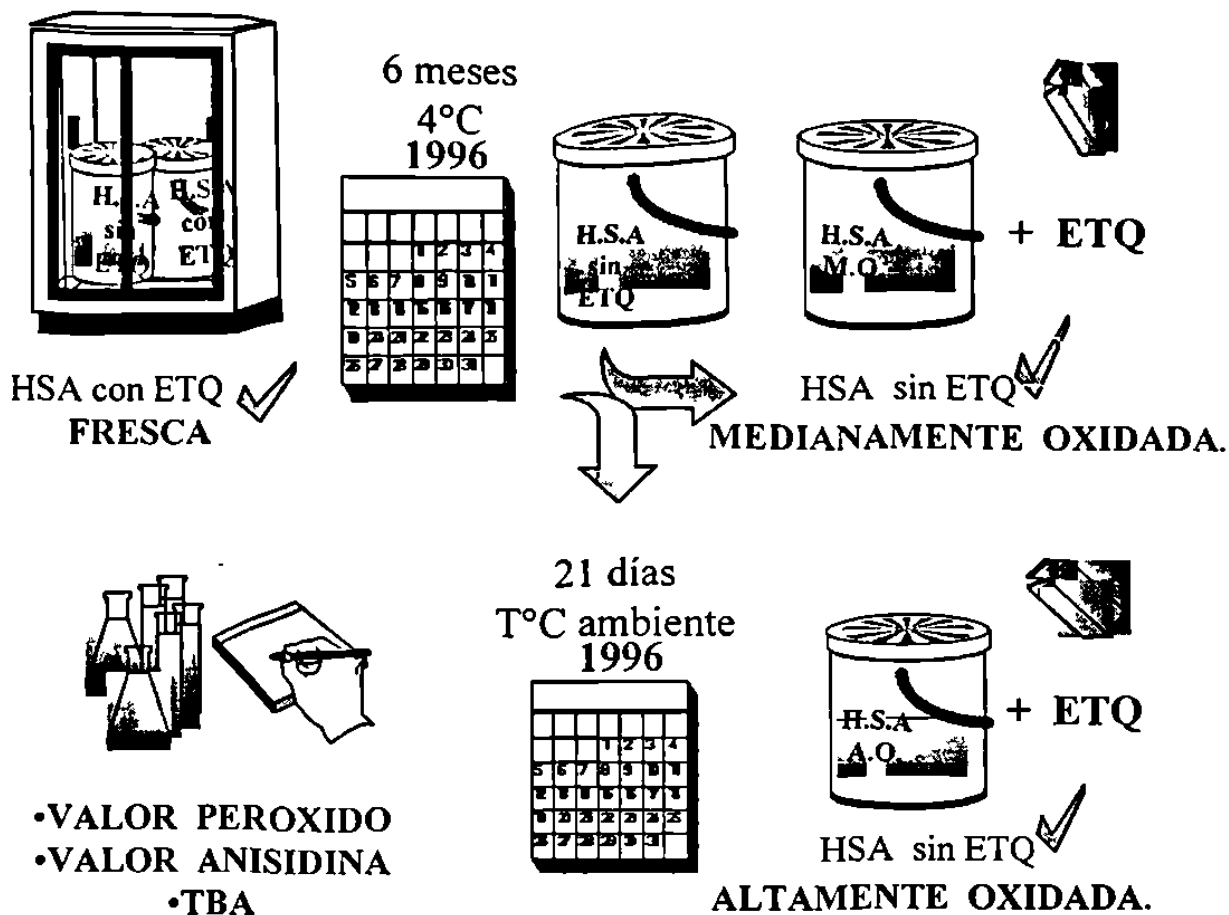


Fig. 2. Inducción a la oxidación en las HSA

### 5.5 Diseño experimental

Con la finalidad de poder evaluar el daño de la oxidación de los lípidos sobre la calidad de la proteína, al inicio del experimento se contemplo utilizar un diseño factorial 3x2 utilizando dos fracciones obtenidas por extracción de los lípidos de las harinas, a través de un equipo de extracción en condiciones supercríticas. que se combinarían para reconstituir la HSA, de tal forma de obtener por una parte los lípidos de diferente grado de oxidación con la proteína fresca y por otra parte la proteína de diferente grado de oxidación con los lípidos frescos. Se formularían 9 dietas isoproteicas, isolípídicas e isocalóricas, de las cuales dos serían las dietas control. una elaborada con HP entero de Chile (Tepual) y la otra con la harina original de HSA (Fresca); y las otras siete. tendrían un nivel de inclusión de HSA reconstituida del 30%. Sin embargo, el equipo de extracción supercrítico con el que se iba a trabajar se descompuso sin posibilidades de reparación.

Para tratar de conservar este diseño, se probaron otros métodos de extracción de los lípidos (Isopropanol/hexano. Extracción Soxhlet con Isopropanol, Bligh y Dyer, 1959). Sin embargo, al final se llegó a la conclusión de que las condiciones de extracción en cada uno de los métodos (calentamiento, exposición prolongada a los solventes, etc.) afectaría la calidad de la proteína.

De ahí que solo se considerará finalmente la mitad del diseño experimental, en un arreglo de bloques completos al azar, comparando solo las dietas elaboradas con HSA con diferente grado de oxidación y una HP entera de Chile (Tepual) y una dieta de base sin harina de pescado, esta última, para poder calcular la digestibilidad *in vivo* de las HP. Con este diseño el objetivo se enfocó más a determinar el efecto global de la rancidez sobre los parámetros productivos del camarón que a la evaluación del daño en la calidad de la proteína de la misma.

Las dietas se evaluaron en un bioensayo de 28 días con camarones de un peso promedio de 500 mg, en acuarios de fibra de vidrio de 60 l, con 10 camarones por acuario y cuatro replicados por dieta. Los resultados promedio por acuario por dieta a los 14 y 28 días, fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza simple utilizando el paquete computacional SPSS © para Windows ver. 2.0. Los valores promedios de los parámetros evaluados fueron comparados mediante una Prueba de Rango Múltiple de Tuckey (Zar, 1996). El arreglo de las dietas se muestra en el cuadro siguiente:

BASE (1)	CONTROL (2)	TRATAMIENTO (3)	TRATAMIENTO (4)	TRATAMIENTO (5)
Con los mismos ingredientes que las otras dietas pero sin Harina de Pescado	Control externo positivo (HPCH) TEPUAL	Harina de Subproductos de Atún Fresca estabilizada (HSAF)	Harina de Subproductos de Atún Medianamente Oxidada estabilizada (HSAMO)	Harina de Subproductos de Atún Altamente Oxidada estabilizada (HSAAO)

### 5.5.1 Formulación de las dietas experimentales

Para la formulación de las dietas experimentales, además de las HP, se utilizaron harina de camarón, harina de trigo y gluten de trigo, todos ellos de uso comercial, los cuales fueron proporcionados por diferentes proveedores nacionales e internacionales (Chile y E.U.A.).

Cada uno de los ingredientes utilizados para la elaboración de las dietas fue analizado químicamente (Tabla 1) mediante el método de análisis proximal descrito por la A.O.A.C. (1990). En función de los resultados del análisis de los ingredientes se formularon 5 dietas isoproteicas e isolipídicas, excepto una, utilizando para ello el programa computacional para balanceo de raciones Mixit-2© (Anexo 7), buscando obtener una dieta que cumpliera con los requerimientos nutricionales para camarón propuestos por Akiyama *et al.* (1991).

**Tabla 1. Composición de las materias primas utilizadas en la formulación de las dietas.**

Componente %	HPCH (Tepual)	HSAF	HSAMO	HSAAO	Harina Camarón (Tepual)	Harina Trigo	Pasta Soya	Gluten de Trigo
Humedad	6.66	2.94	3.75	3.36	8.22	11.85	8.00	3.99
Proteína	68.25	59.40	64.71	64.60	40.75	11.42	47.29	81.33
Grasa	7.47	8.63	9.26	7.58	11.27	0.79	0.29	0.18
Fibra	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.16	0.12
Ceniza	13.72	27.63	21.04	21.36	19.60	0.61	6.69	0.72
ELN	3.90	1.40	1.24	3.1	20.15	75.33	34.57	13.65
Energía	4.72	4.23	4.58	4.50	4.19	3.80	4.09	5.13

- Valores en Base Húmeda

- La energía presente en los ingredientes se calculó teóricamente de acuerdo a los coeficientes mencionados por Tacon (1989): Lípidos 9.5 Kcal/g, Proteínas 5.6 Kcal/g y Carbohidratos 4.1 Kcal/g.

De las 5 dietas, 3 contenían la HSA con diferente grado de oxidación, la cuarta una HP completo originaria de Chile (Tepual, composito No. 5) y la quinta (considerada como base) fue formulada en el programa Mixit II con los mismos ingredientes de las otras pero sin HP.

Las dietas que contenían harina de pescado fueron formuladas teóricamente a un 35% de proteína (contribuyendo en un 33% del contenido total de proteína en la dieta) y un 9% de

grasa (la inclusión de lecitina de soya líquida se hizo en sustitución del aceite de pescado). A excepción de la harina de trigo los demás ingredientes se mantuvieron constantes en las cuatro dietas.

Las vitaminas y minerales fueron adicionados a través de una premezcla vitamínica proporcionada por INVE Aquaculture, poniendo especial interés en que se cumpliera con el nivel óptimo de vitamina E (150 ppm dietario) para dar un buen crecimiento (He y Lawrence, 1993) y la dosis de vitamina C (100 ppm dietario) recomendada por Akiyama (1991), quedando las dietas como sigue (Tabla 2):

**Tabla 2. Composición de las dietas experimentales**

Ingredientes	Dieta Base	Dieta HPCH	Dieta HSAF	Dieta HSAMO	Dieta HSAAO
HP Tepual, (composito 5)		18.220			
Harina Sub-p de Atún Fresco			21.400		
Harina Sub-p de Atún Mediana Oxid				19.820	
Harina Sub-p de Atún Alta Oxid					20.300
Harina de camarón (Tepual Chile)	5.018	4.000	4.000	4.000	4.000
Pasta de soya	29.190	23.270	23.270	23.270	23.270
Gluten de trigo	10.037	8.000	8.000	8.000	8.000
Harina de trigo	47.907	38.422	35.655	36.446	35.888
Lecitina (F100 Central Soya)	6.381	6.802	6.381	7.151	7.232
Colesterol Solvay (Inve I)	0.233	0.250	0.242	0.250	0.250
Metionina	0.208		0.026	0.027	0.025
Mezcla vitamínica y mineral (INVE)	1.000	1.010	1.000	1.010	1.010
Antioxidante (ETQ)	0.025	0.026	0.025	0.025	0.025
<b>Total</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>	<b>100.000</b>

■ Mezcla de Vitaminas y Minerales: Vit. A 1'000.000 IU/kg; Vit. B<sub>1</sub> 6.000 ppm; Vit. B<sub>2</sub> 2.500 ppm; Ca Pant. 7.500 ppm; Vit. B<sub>6</sub> 7.500 ppm; Vit. B<sub>12</sub> 20 ppm; Vit. C 10.000 ppm; C PY P 10.000 ppm; Vit. K<sub>1</sub> 4.000 ppm; Vit. D<sub>3</sub> 800.000 IU/kg; Vit. E 15.000 ppm; Vit. K 100 ppm; Niacina 2.500 ppm; Ac. Fólico 1.000 ppm; Co 500 ppm; Mg 0.001 %; Mn 4.000 ppm; Zn 10.000 ppm; Cu 5.000 ppm; Fe 0.250 ppm; Se 25 ppm; I 500 ppm.

■ Para estabilizar las dietas se agregaron 250 mg /Kg de ETQ. que es la cantidad utilizada por la Fundación Chile en sus Harinas de pescado.

### 5.5.2 Preparación de las dietas experimentales

Se preparó un kg de cada una, todos los ingredientes fueron molidos finamente en un molino de café Moulinex™ hasta pasar por un tamiz del número 35 (500 μ de luz de malla) y se pesaron conforme lo indicado en la fórmula, para mezclarlos posteriormente en una batidora Kitchen Aid™ modelo K45SS de 5 l de capacidad. Primero se realizó un

premezclado de los ingredientes de mayor proporción en la fórmula (macros) dentro de una bolsa plástica, haciendo agitaciones hacia arriba y abajo hasta obtener una mezcla homogénea. De esta se tomó una pequeña porción para mezclarla con los ingredientes de menor proporción (micros) los cuales fueron colocados en la batidora y agregándose el resto de la mezcla poco a poco. La lecitina de soya se añadió después de haber adicionado los macroingredientes a los microingredientes, esto fue de forma lenta para permitir así, que la mezcla fuera uniforme. Al final se adicionaron 300 ml de agua por kg de dieta. El tiempo total de mezclado por dieta fue de 30 min.

Para obtener los pellets se utilizó un molino de carne Tor-Rey™, mod. 22 con un cedazo de 2 mm de diámetro, alcanzando el alimento una temperatura cercana a los 75°C, al salir del barril del molino; estos pellets se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas y se conservaron en refrigeración a -4°C dentro de recipientes plásticos y sellados herméticamente.

### *5.5.3 Análisis de las dietas experimentales*

Una vez elaboradas las 5 dietas, se determinó en cada una de ellas la composición química proximal; el análisis fue realizado en el laboratorio de análisis químico del Programa Maricultura de la F.C.B. de la U.A.N.L., mediante los métodos propuestos por la A.O.A.C., (1990).

Para determinar la estabilidad de la dieta y el porcentaje de pérdida de materia seca del alimento se realizaron pruebas de lixiviación a cada una de las dietas aplicando el método de Aquacop (1978) modificado por Cruz-Ricque (1987). Utilizando para ello canastillas de tela metálica con una luz de malla de 1 mm, las cuales fueron puestas a peso constante en la estufa a 70°C durante 24 horas, dentro de ellas se colocaron 5 gr de la dieta. Estas canastillas ya con el alimento fueron colocadas en un eje conectado a un motor eléctrico que le confería un movimiento rotatorio (alrededor de 5 r.p.m.) e introducidas en agua marina preparada artificialmente con una salinidad de 35 g/l a una temperatura de 28°C durante una hora de inmersión en el agua. Después de este tiempo, las canastas con el alimento lixiviado fueron secadas nuevamente en la estufa, para después ser pesadas y así evaluar la pérdida de materia seca conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de materia seca (\%)} = \frac{\text{Peso Materia Seca inicial} - \text{Peso Materia Seca despues de lixiviar}}{\text{Peso Materia Seca inicial}} \times 100$$

## 5.6 Condiciones experimentales

El bioensayo se llevó a cabo en la sala de Zootecnia del programa Maricultura, ubicado en la unidad B de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Las instalaciones cuentan con un circuito cerrado (recirculación del agua), con agua marina artificial. Consta de 48 acuarios de fibra de vidrio, que miden 60 x 30 x 35 cm, con una capacidad de 60 lts cada uno. Cada acuario tiene un doble fondo cubierto con tela de gasa, y está abastecido por aire y agua marina artificial la cual es renovada 9 veces al día. También se cuenta con 3 tanques de aclimatación y/o pre-engorda, con dimensiones de 1.4 x 1.5 x 0.4 m con un capacidad de 500 lts. Cuenta además, con 5 tanques de 1,500 lts, 3 son colectores y 2 de almacenamiento, que por gravedad abastecen de agua a los acuarios.

Cada tanque de almacenamiento está equipado con un “contactor” biológico rotatorio para oxidar el amonio y materia orgánica soluble presente en el sistema. La sala está equipada además, con 2 filtros de cartucho y 2 de carbón activado y 2 espumadores. Para mantener la temperatura constante se cuenta con un sistema cerrado de agua dulce e intercambiador de calor en los tanques reservorios.

Los acuarios cuentan con un sistema de aereación “Air-Water-Lift”, alimentado por una bomba de aire, así como de todo el material y equipo necesario para determinar la calidad del agua; potenciómetro, oxímetro, refractómetro y Kit colorimétrico para la determinación de amonio, nitritos y nitratos.

### 5.6.1 Selección de los organismos experimentales

Para este bioensayo, se utilizaron camarones juveniles de la especie *Penaeus vannamei*, provenientes la empresa Acuacultores de la Paz S.A. de C.V., pre-engordados hasta 150 mg en el laboratorio del Biólogo Francisco Magallón y el Biólogo Guillermo Portillo del Centro de Investigaciones Biológicas del Norte (C.I.B.) de la Paz, Baja California Sur; después fueron mantenidos en la sala de zootecnia del programa maricultura hasta un peso



promedio de 500 mg (un mes y medio), peso con el cual se inicio el bioensayo. La selección de la talla y el número de organismos por acuario se realizó por medio de un muestreo basado en el peso individual de los camarones tomados de un único lote (el peso fue tomado en una balanza *Ohaus®* E400D), el número de organismos muestreados fue de 150.

Posteriormente los datos de peso, arrojados por el muestreo, fueron capturados en el paquete estadístico SPSS© para Windows ver 2.0, donde se realizó una distribución de frecuencia y se establecieron las diferentes clases de talla. Tomando en cuenta este resultado se eligieron los camarones con un peso de 400 - 680 mg y fueron distribuidos en 20 acuarios. En cada acuario se distribuyeron 10 organismos procurando obtener la misma distribución de tallas, el número de acuarios por dieta fue de cuatro. Una vez distribuidos los camarones, se llevo a cabo un análisis de varianza de una sola vía utilizando el mismo paquete estadístico SPSS© para Windows ver 2.0, esto fue con el fin de conocer si los camarones fueron distribuidos de forma homogénea en cada acuario. Un día después de la distribución, los organismos que murieron debido al manejo al que fueron objeto, fueron reemplazados. Los tratamientos se distribuyeron aleatoriamente e iniciándose la alimentación con las dietas experimentales el día 22 de Diciembre de 1996 y concluyendo el día 19 de Enero de 1997 (28 días de bioensayo). La tasa de alimentación fue *ad libitum*, iniciando con una tasa del 15% de la biomasa por acuario, misma que fue distribuida en dos raciones por día. Esta tasa se fue ajustando durante todo el bioensayo en base a el consumo de alimento.

Todos los días por la mañana fueron contados los camarones y cuantificados los restos de muda y la cantidad de alimento no consumido. Posteriormente, los acuarios fueron sifoneados para eliminar residuos, restos de mudas o camarones muertos. El registro de estas observaciones se llevó a cabo durante todo el bioensayo. Un registro diario por acuario del número de organismos, número de mudas, número de muertos, la biomasa total, tasa de alimentación, cantidad de alimento suministrado, % de alimento consumido, % de alimento consumido por organismo, % de heces, así como los parámetros de calidad del agua, salinidad (refractómetro  $S^{0/_{\infty}}$ ) y temperatura ( $^{\circ}C$ ). Semanalmente se midió el pH, así como la cantidad de nitritos, nitratos y amonio del agua en la sala de zootecnia. Los nitritos, nitratos y amonio se determinaron con ayuda de las pruebas colorimétricas de *Aquarium System®*.

Cada uno de los organismos se pesó al inicio, a los 14 días (05 de Enero de 1997) y a los 28 días (19 de Enero de 1997) con el fin de evaluar y comparar los pesos promedio de los organismos que siguieron los diferentes tratamientos. Tomando en cuenta el peso de cada organismo y los datos del registro por acuario, número de muertos, biomasa total, tasa de alimentación, cantidad de alimento suministrado, y % de alimento consumido, los cuales fueron capturados en una hoja de cálculo del paquete computacional Excel© para Windows ver. 5.0, se realizaron las siguientes evaluaciones para cada acuario: Consumo Promedio por Organismo, Tasa de Crecimiento, Tasa de Conversión Alimenticia y la Tasa de Supervivencia, mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Consumo Promedio por Organismo} = \left( \frac{\sum_{i=1}^{28} \text{Cantidad de alimento consumido en el acuario (g) durante el día } i}{\text{No. de organismos en el acuario durante el día } i} \right)$$

$$\text{Tasa de Crecimiento} = \frac{\text{Peso promedio final (g)} - \text{Peso promedio inicial (g)}}{\text{Peso promedio inicial (g)}} \times 100$$

$$\text{Tasa de conversión alimenticia} = \frac{\text{Consumo promedio por organismo}}{\text{Incremento en peso (g)}}$$

$$\text{Tasa de Supervivencia (\%)} = \frac{\text{No. final de organismos}}{\text{No. inicial de organismos}} \times 100$$

Los resultados por acuario a los 14 y 28 días, de cada una de estas variables fueron analizadas estadísticamente por medio de un análisis de varianza simple, con el mismo paquete computacional SPSS© para Windows ver. 2.0, para determinar la eventual existencia de diferencias significativas entre las dietas. Los valores promedio de las dietas fueron comparados mediante una Prueba de Rango Múltiple de Tuckey (Zar, 1996), para clasificar los tratamientos.

## 5.7 Evaluación de la calidad en la proteína

Para evaluar la calidad de la proteína de la harina se realizaron pruebas de digestibilidad *in vitro*, de lisina disponible y proteína soluble, que fueron llevadas a cabo en el laboratorio de INVE Aquaculture en Oeverstraat, Bélgica. Las pruebas de digestibilidad *in vitro* también se realizaron en el laboratorio de análisis químicos del programa Maricultura, mediante la técnica de la A.O.A.C. (1990) modificada por Torry (Anexo 6).

También se llevo a cabo la determinación de la digestibilidad *in vivo* de acuerdo al método descrito por Nieto (1995), usando un marcador inerte indigerible (óxido crómico), a través de un bioensayo de 10 días con camarones juveniles de un peso promedio de 800 mg en acuarios de fibra de vidrio de 10 litros con 8 camarones por acuario y 3 replicados por dieta. Los resultados promedio de digestibilidad de la proteína y materia seca para cada dieta fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza simple.

Para hacer la evaluación de la digestibilidad se prepararon 500 g de cada una de las dietas experimentales, de acuerdo a las formulas indicadas en la Tabla 2, agregando el 1% de óxido de cromo (5.0 g), el cual se uso como marcador. procediéndose a mezclarlo hasta obtener un producto homogéneo; posteriormente se agregó agua caliente para extruir y elaborar los pellets, mismos que se secaron a temperatura ambiente por 24 horas.

El bioensayo de digestibilidad se llevó a cabo en acuarios pequeños de fibra de vidrio con fondo color negro de 20×30×20 cm y un volumen de 10 litros, los cuales fueron colocados dentro de los tanques de pre-engorda para mantener la temperatura del agua constante. La aireación fue continua utilizando un difusor de sílica por cada acuario. Se realizaron tres recambios de agua por día (de 90%). Los organismos experimentales fueron juveniles de camarón blanco (*Penaeus vannamei*).

Estos camarones fueron los mismos con los que se realizó el bioensayo de crecimiento, los cuales contaban ya con un peso promedio de 0.8 g. La selección de tallas y el número de camarones por acuario se hizo eliminando de los acuarios del bioensayo de crecimiento, el de mayor y menor peso quedando solo 8 organismos por acuario. Para cada dieta se colocaron tres replicados y antes de iniciar el bioensayo de digestibilidad, los

camarones fueron acondicionados a las dietas experimentales con óxido de cromo, durante tres días a una tasa de alimentación del 10%. El cuarto día no se alimentaron con el fin de eliminar completamente el alimento del tracto digestivo e iniciar al día siguiente.

El alimento se distribuyó en tres raciones diarias para sumar el 10% de la biomasa por acuario, se les dejaba el alimento por 1 h para proceder posteriormente con la colecta de las excretas y evitar así su degradación, lo cual se realizó directamente de los acuarios sifoneando las heces con una pipeta Pasteur. Una vez realizada la colecta de las heces, los acuarios fueron limpiados por medio de un sifón para eliminar los excedentes de alimento, restituyendo el agua eliminada durante este proceso.

Una vez colectadas las heces estas fueron lavadas dos veces con agua destilada, con el fin de eliminar las sales y evitar con ello las interferencias durante su análisis. Una vez lavadas las heces fueron almacenadas en frascos individuales previamente etiquetados, para después ser conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un congelador horizontal Frigidaire™ modelo CF25EW hasta su análisis en el laboratorio. La colecta se realizó durante 10 días hasta obtener una cantidad mínima de 100 mg (en base seca) por acuario.

Las dietas y las heces se analizaron de acuerdo al método descrito por Bolin (1952 modificado por Nieto, 1995), utilizando un equipo de digestión y destilación Tecator® modelo 1026. A la muestra ya digerida se le estimó colorimétricamente la cantidad de cromo hexavalente que contenía, esto con la ayuda de un espectrofotómetro Beckman® DU 650 (409 nm). Se preparó una solución madre a una concentración de 0.5 mg/ml, de ésta, se realizaron dos soluciones de trabajo, la primera a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  (dietas) y la segunda a 30  $\mu\text{g/ml}$  (heces).

De cada una de estas soluciones se realizaron diluciones para elaborar dos curvas estándar, una para las dietas experimentales y otra para las heces colectadas, las cuales fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Beckman ® DU 650 a una longitud de onda de 440 nm. Una vez obtenidas las lecturas de las absorbancias estas fueron capturadas en una hoja de cálculo del paquete computacional Excel © para Windows ver. 5.0 donde se realizó, con los datos de la absorbancia y de la concentración calculada, un análisis de regresión para obtener

el valor de la pendiente y el intercepto de esta curva, con estos valores se calculó la concentración de óxido crómico en cada muestra utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/ml Cr}_2\text{O}_3 = \frac{AM - APB - IC}{PC}$$

donde: AM = Absorbancia Media de la Muestra  
APB = Absorbancia Promedio del Blanco  
IC = Intercepto de la Curva  
PC = Pendiente de la Curva

$$\text{mg Cr}_2\text{O}_3 \text{ en la muestra} = \frac{\mu\text{g / ml Cr}_2\text{O}_3 \times 100 \text{ ml}}{1000}$$

Para la determinación de óxido crómico en la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{Cr}_2\text{O}_3 = \frac{\text{mg Cr}_2\text{O}_3}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

La digestibilidad proteica de las harinas de pescado se calculó usando los valores ya obtenidos para la dieta de base y las otras dietas experimentales, las cuales fueron formuladas de tal forma que la dieta de base (equivalente a una dieta de referencia) tuviera exactamente la misma fórmula que las dietas experimentales sin considerar la HP.

La digestibilidad de la proteína dietaria -DAP- (nutriente estudiado en este caso) se expresó en % de acuerdo a la ecuación siguiente (Maynard *et al.*, 1983):

$$\% \text{Digestibilidad Proteica} = \left( 1 - \frac{\% \text{Oxido crómico en alimento}}{\% \text{Oxido crómico en heces}} \times \frac{\% \text{nutriente en heces}}{\% \text{nutriente en alimento}} \right) \times 100$$

En el caso de la digestibilidad de la materia seca -DAMS-, la fórmula se simplifica de la siguiente manera:

$$\% \text{Digestibilidad de la Materia Seca} = \left( 1 - \frac{\% \text{Oxido crómico en alimento}}{\% \text{Oxido crómico en heces}} \right) \times 100$$

La digestibilidad proteica aparente del ingrediente -DAPI- (harina de pescado) se calculó mediante la siguiente fórmula:

**% Digestibilidad Proteica del Ingrediente =**

$$\left[ \frac{[(\%DAP \text{ Dieta Exp} \times \%Prot \text{ Dieta Exp})(100)] - [(\%DAP \text{ Dieta Base} \times \%Prot \text{ Dieta Base})(100 - P)]}{P \times \%Prot \text{ Ingrediente}} \right]$$

Donde: P = % de inclusión de la harina de pescado en la dieta experimental

En el caso de la digestibilidad de la materia seca de las harinas -DAMSI-, también se simplifica el termino de % proteína, ya que hablamos de un % de materia seca igual a 100 en el numerador y denominador.

**% Digestibilidad Materia Seca del Ingrediente =**

$$\frac{[(DAMS \text{ Dieta Exp}) \times 100] - [(DAMS \text{ Dieta Base})(100 - P)]}{P}$$

Donde: P = % de inclusión de la harina de pescado en la dieta experimental

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis químico proximal de la materia prima, torta de prensa y harinas de subproductos de atún (HSA) con y sin antioxidante

Los resultados sobre el análisis químico proximal de las muestras se presentan en la tabla 3, mientras que los resultados de este mismo análisis en las HSA realizado por los laboratorios de INVE Aquaculture se muestran en el Anexo 8. De manera global los resultados de ambos laboratorios concuerdan en la composición proximal de las HSA aunque se observan ligeras diferencias en los valores de proteína y grasa las cuales se deben a que los resultados que presenta INVE están expresados en base húmeda.

Tabla 3. Análisis químico proximal de las muestras.

Muestra	Mat. Prima	Torta Prensa	HSA S/A	HSA C/A
Materia Seca (%)	27.40 ± 0.25**	47.32 ± 0.72	97.06 ± 0.02	96.25 ± 0.15
Proteína (%)	62.37 ± 0.06	54.43 ± 0.09	67.22 ± 0.74	62.99 ± 0.34
Grasa (%)	13.42 ± 0.25	2.48 ± 0.09	9.62 ± 0.10	8.40 ± 0.33
Ceniza (%)	10.75 ± 1.50	31.51 ± 1.18	21.86 ± 0.84	28.47 ± 0.21
ELN (%)	13.45 ± 0.33	11.56 ± 1.41	4.42 ± 0.02	0.12 ± 0.66
Energía (Kcal/g)*	5.31 ± 0.04	3.75 ± 0.03	4.56 ± 0.06	4.33 ± 0.05

\* Los factores de conversión usados en el cálculo de energía fueron: Proteína = 6.25; Grasa = 9.5; ELN = 4.1

Los valores del análisis químico están reportados en base seca

Valores representan la media de cada parámetro; n = 12 para cada muestra

El factor de conversión de proteína empleado fue de 6.25

\*\* Error estándar

Como se puede observar, la humedad en la materia prima es alta (72.6%) lo cual es normal ya que se trata de materia prima fresca. Pero el contenido de humedad en la materia prima se reduce durante el proceso de prensado a 52.7% y decrece aún más después del secado por la pérdida de humedad a valores cercanos al 4% los cuales se consideran bajos.

También se puede observar que el contenido de proteína y ceniza en la materia prima después de pasar por la cocción y el secado varía considerablemente, aun cuando los resultados están expresados en base seca; encontrándose un menor contenido de proteína para el lote de HSA con antioxidante (62.99%) en relación a la HSA sin antioxidante (67.22%).

Respecto al contenido de grasa se puede observar una reducción después del prensado (2.4%) debido a la pérdida de grasa y de otros componentes de origen lipídico con el agua de cola. Después del secado se encontraron valores de 8-9% los cuales se consideran normales en una harina de atún.

## 6.2 TVN de la materia prima, torta de prensa y harinas de subproductos de atún (HSA)

Los valores obtenidos en esta prueba para cada una de las muestras se presentan en la Fig. 3. Se puede observar que los valores de TVN se encuentran dentro de los límites establecidos para considerar que la materia prima es fresca, presentando una ligera diferencia (3%) entre la materia prima y la torta de prensa, así como un descenso importante (10%) en las muestras de harinas con y sin antioxidante tomadas después de ser secadas. Cabe hacer mención que parte de los compuestos volátiles se pierde por efecto del calor durante el secado de la materia prima.

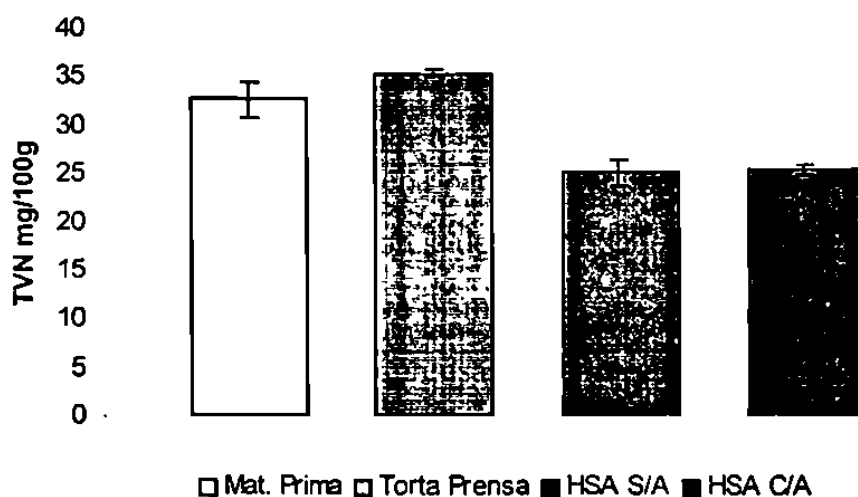


Fig. 3.- Nitrógeno volátil total en las muestras de subproductos de atún (n=6).



### 6.3 TVN y aminos biogénicas en las harinas experimentales.

Los resultados del contenido de aminos biogénicas en cada una de las harinas experimentales se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Índices de frescura en las harinas experimentales

Harina	HPCH**	HSAF***	HSAMO***	HSAAO***
TVN mg/100g	77	56	46	44
Histamina mg/kg	78	250	546	540
Cadaverina mg/kg	----	33.9	69.8	73.5
Putrescina mg/kg	----	76.2	94.9	94.9
Tiramina mg/kg	----	25.7	35.1	34.6

\*\* Los valores mostrados fueron proporcionados por la empresa TEPUAL-Chile

\*\*\* Los valores mostrados fueron proporcionados por la empresa INVE-Aquaculture

Con respecto al TVN se puede observar que la harina de pescado chilena es la que presenta el valor más alto, mientras que las HSA presentaron valores muy homogéneos entre ellas, existiendo una gran diferencia entre la harina Chilena y las HSA (21-28 %).

La harina chilena presentó la concentración de histamina más baja. Mientras que de las HSA, la de menor concentración fue la HSAF, por su parte las concentraciones entre las HSA oxidadas fueron muy similares pero dos veces más altas que la HSAF. Entre estas harinas las concentraciones de cadaverina presentaron el mismo comportamiento que para la histamina, y en el caso de la putrescina y tiramina las diferencias son mucho menores entre la HSAF y las HSA oxidadas.

#### 6.3.1 *Conteo microbiológico*

Los resultados de esta cuenta microbiológica se presentan en la tabla 5. Se puede observar que existe una cuenta ligeramente más alta en la HSAF con respecto a las HSA oxidadas aun cuando se sabe que todas las harinas fueron fabricadas con materia prima del mismo proceso. De manera general la cuenta microbiológica fue baja para todas las harinas.

**Tabla 5. Análisis microbiológico en las harinas de subproductos de atún (HSA)**

Harina	HSAF	HSAMO	HSAAO
Mesofilicos aerobios CFU/g	2000	500	900
Psicrofilicos CFU /g	1700	<10	<10
Enterococos CFU /g	400	<10	<10
Hongos CFU /g	2200	500	700
Levaduras CFU /g	<10	<10	<10
Coliformes totales MPN/g	7.3	<3	3.6

• Los valores de la cuenta microbiológica fueron proporcionados por el laboratorio de microbiología de la F.C.B. de la U.A.N.L.

#### 6.4 Evaluación química del grado de oxidación en las harinas de subproductos de atún

Los resultados del contenido de grasa extraída por el método de Bligh and Dyer, así como los resultados de las determinaciones de rancidez en las harinas experimentales se presentan en la tabla 6.

**Tabla 6. Lípidos totales e índices de rancidez en harinas de subproductos de atún (HSA)**

Harina	HPCH	HSAF	HSAMO	HSAAO
Lípidos Totales%	----	8.69 ± 0.09	10.44 ± 0.23	7.49 ± 0.30
VP*(meq/kg)	8.3	9.85 ± 0.49	47.55 ± 0.98	97.52 ± 1.85
VP-INVE	----	22.66	63.37	18.44
V.A.**( $\delta$ óptica)	----	10.65 ± 1.61	36.29 ± 0.01	59.03 ± 5.48
T.B.A.***mg/kg	----	6.39 ± 1.83	8.00 ± 1.49	10.32 ± 2.08
T.B.A.-INVE	----	6	9	15.98

\* Los valores del I.P. están expresados como miliequivalentes/kg de materia grasa y representan el valor promedio (n = 6).

\*\* Los valores del V A. están expresados como 100 veces la densidad óptica y representan el valor promedio (n = 18).

\*\*\*Los valores del TBA están expresados como mg de MDA/kg de materia grasa y representan el valor promedio (n = 36).

Se observa que existe un porcentaje más alto de grasa en la HSAMO (10.44%) contra 8.69% de la HSAF y 7.49% para la HSAAO, siendo este el valor más bajo. La HSAMO se obtuvo a los 180 días de almacenaje en refrigeración a -4°C y la HSAAO se obtuvo 21 días después de almacenar la harina a temperatura ambiente (32-36°C). Por ello, los índices de rancidez en las harinas, aumentaron gradualmente para cada uno de los parámetros de oxidación, en proporción al grado de rancidez que se buscaba. Así se tiene que los valores más altos los presentó la HSAAO y los más bajos la HSAF.

## 6.5 Análisis químico proximal de las harinas de pescado experimentales

Los resultados del análisis químico proximal se presentan en la tabla 7, donde se puede observar que la HPCH presentó los mejores valores para proteína, grasa y ceniza; considerando su contenido de humedad (7%) se puede decir que se trata de una harina que no fue sobrecalentada. Por otra parte resalta el alto contenido de ceniza en la HSAF y la menor cantidad de grasa en la HSAAO, además de la gran diferencia en contenido de proteína entre la HSAF y las HSA oxidadas (61.2% vs. 67.23). Al inicio de este trabajo se consideró que existía un problema de tipo analítico por lo que fué necesario repetir varias veces los análisis y con resultados similares, fue así como se verificó que la diferencia entre los lotes de las mismas harinas se debía a una falta de homogeneidad en la HSAF con respecto a los otros dos y no a una variabilidad analítica.

**Tabla 7. Análisis químico proximal de las Harinas Experimentales**

Harina	HPCH*	HSAF	HSAMO	HSAAO
Materia Seca(%)	93.40	97.06 ± 0.13***	96.25 ± 0.12	96.64 ± 0.12
Proteína(%)	73.12	61.20 ± 1.10	67.23 ± 1.60	66.84 ± 1.64
Grasa(%)	8.00	8.89 ± 0.06	9.62 ± 0.11	7.85 ± 0.06
Ceniza(%)	14.70	28.47 ± 0.34	21.86 ± 0.00	22.10 ± 0.30
E.L.N.(%)	4.18	1.43 ± 0.32	1.29 ± 0.17	3.20 ± 0.36
Energía Kcal/g**	5.03	4.33 ± 0.04	4.73 ± 0.01	4.62 ± 0.01

\* El análisis químico fue realizado por Tepual

\*\* Los factores de conversión usados en el cálculo de energía fueron: Proteína = 6.25, Grasa = 9.5; ELN = 4.1

Los valores del análisis químico están reportados en base seca

Valores representan la media de cada parámetro, n = 12 para cada harina

El factor de conversión de proteína empleado fue de 6.25

\*\* Error estándar

## 6.6 Análisis químico proximal de las dietas elaboradas con las harinas de pescado experimentales

Para corroborar que las dietas fueron bien formuladas y fabricadas se realizó un análisis químico proximal (Tabla 8), resaltando el alto contenido de ceniza y el alto porcentaje de lixiviación (36.5%) en la dieta elaborada con la HSAF con respecto a las otras. También se hace evidente el menor porcentaje de proteína en la dieta base, que no contenía harina de pescado (31 vs. 38%), el contenido de grasa para todas las dietas fue homogéneo (alrededor de 9.6-10.2%). Siendo la humedad el punto en el que se observa una alta variabilidad (5-9%).

**Tabla 8. Análisis químico proximal de las dietas experimentales**

Determinación (%)	Dieta Base	Dieta HPCH	Dieta HSA Fresca	Dieta HSA Mediana	Dieta HSA Alta
Materia Seca	91.87 ± 0.09*	94.11 ± 0.05	94.54 ± 0.19	93.85 ± 0.01	92.73 ± 0.07
Proteína	31.29 ± 0.37	38.40 ± 0.86	38.24 ± 0.01	37.81 ± 0.51	36.75 ± 0.11
Grasa	9.92 ± 0.08	9.80 ± 0.03	9.61 ± 0.03	10.21 ± 0.08	9.70 ± 0.39
Ceniza	4.27 ± 0.01	6.22 ± 0.02	10.41 ± 0.18	7.54 ± 0.16	7.56 ± 0.09
ELN + Fibra	46.39	36.69	36.28	38.29	38.27
Lixiviación **	7.60 ± 0.05	9.01 ± 0.03	36.55 ± 0.30	6.76 ± 0.06	5.94 ± 0.00

Los valores del análisis químico están reportados en base seca

Los valores representan la media de cada parámetro; n = 3 para cada dieta

El factor de conversión de proteína empleado fue de 6.25

\* Error estándar

\*\* Lixiviación esta reportada como % de materia seca, pérdida después de mantener el alimento en agua de mar artificial a 35 ppt y 26-28°C durante una hora.

## 6.7 Resultados del bioensayo de crecimiento a los 14 días

Los resultados del bioensayo se presentan en la tabla 9, observando que en términos generales, los mejores valores para cada uno de los parámetros biológicos evaluados se dieron con la dieta HPCH.

**Tabla 9. Resultados del bioensayo a los 14 días**

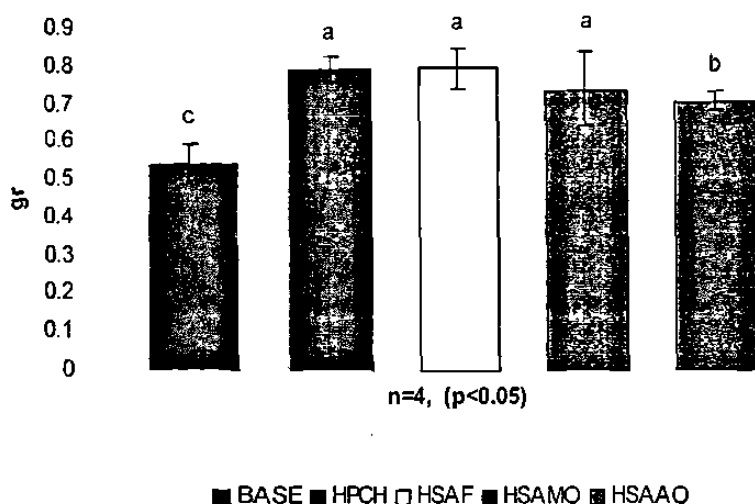
Dieta	Base	HPCH	HSAF	HSAMO	HSAAO	P
Peso Inicial (g)	0.507 ± 0.01	0.524 ± 0.01	0.524 ± 0.01	0.514 ± 0.01	0.517 ± 0.01	0.8684
Consumo 14 (g)	0.53 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.79 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.0001
TC 14 (g)	34.9 ± 4.76 <sup>c</sup>	71.93 ± .28 <sup>a</sup>	59.62 ± .99 <sup>b</sup>	64.14 ± 11.6 <sup>ab</sup>	58.03 ± 3.3 <sup>b</sup>	0.0001
TCA14	3.08 ± 0.44 <sup>c</sup>	2.12 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.56 ± 0.22 <sup>b</sup>	2.26 ± 0.2 <sup>ab</sup>	2.34 ± .09 <sup>ab</sup>	0.0016
Sobrev14 (%)	97.5 ± 5.00	92.5 ± 5.00	97.5 ± 5.00	92.5 ± 5.0	97.5 ± 5.00	0.3513

Los valores representan la media de cada parámetro, (n = 4) para cada dieta

\* Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

\*\* Error estándar

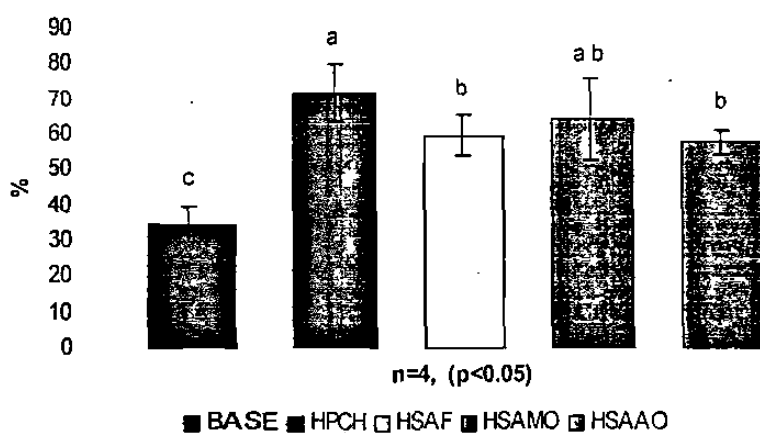
A los 14 días se encontró una reducción significativa en el consumo promedio por organismo para la dieta con HSAAO y la dieta sin harina de pescado, siendo esta última la de menor consumo (Fig. 4). Por otra parte no se encontraron diferencias entre las dietas con HPCH, HSAF y HSAMO aunque el valor promedio para esta última es menor a las otras dos.



**Fig. 4. Consumo promedio por organismo a los 14 días del bioensayo**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

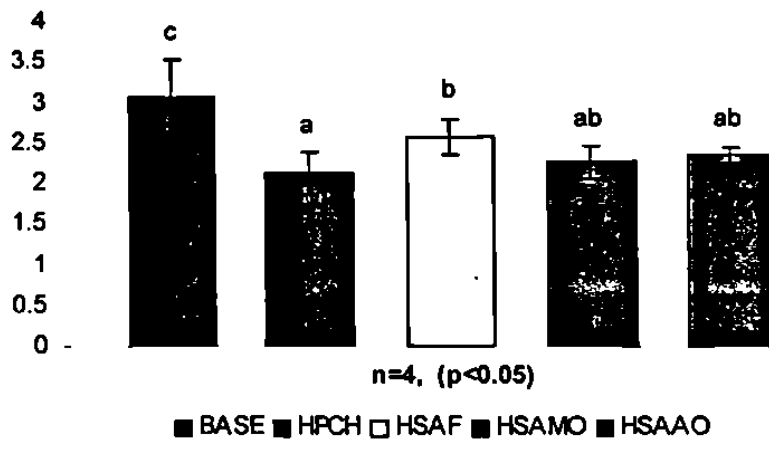
La tasa de crecimiento, cuya representación gráfica se puede observar en la Fig. 5, fue igual para las dietas HPCH y HSAMO, mientras que entre las dietas con HSA no se encontraron diferencias significativas aunque numéricamente se observa un valor ligeramente mayor en la dieta HSAF contra la HSAAO, las diferencias más significativas (p<0.05) se dieron nuevamente entre las dietas con HPCH y la dieta Base.



**Fig. 5. Tasa de crecimiento promedio a los 14 días de bioensayo**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

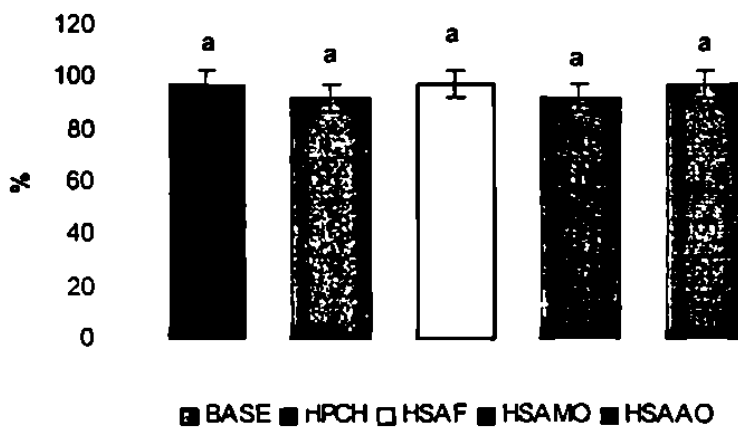
Para la tasa de conversión alimenticia, los valores obtenidos fueron de forma global relativamente elevados, mayores de 2. La dieta con HPCH fue significativamente mejor ( $p < 0.05$ ) que la dieta Base y HSAF, pero no hubo diferencias entre las dietas HPCH, HSAMO y HSAAO, ni entre las dietas con HSA.



**Fig. 6. Tasa de conversión alimenticia promedio a los 14 días de bioensayo**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

En lo que respecta a la sobrevivencia, se observa un descenso del 7.5% en las dietas con HPCH y HSAMO, pero esta diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ) en comparación a las demás dietas, es importante resaltar que en todos los tratamientos se presentó una baja mortalidad (Fig. 7).



**Fig. 7. Tasa de sobrevivencia promedio a los 14 días de bioensayo**

### 6.7.1 Resultados del bioensayo de crecimiento a los 28 días

Los resultados a los 28 días del experimento se presentan en la tabla 10.

**Tabla 10. Resultados del bioensayo a los 28 días**

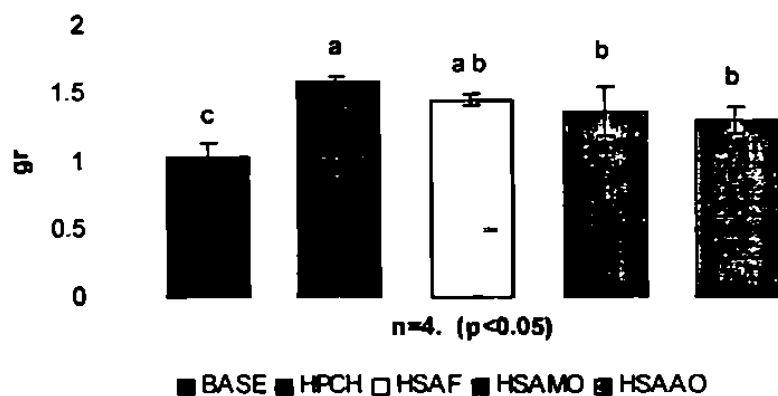
Dieta	Base	HPCH	HSAF	HSAMO	HSAAO	P
Peso Inicial (g)	0.507 ± 0.01	0.524 ± 0.01	0.524 ± 0.01	0.514 ± 0.01	0.517 ± 0.01	0.8684
Peso Final (g)	0.87 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.30 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.08 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.0001
Consumo28 (g)	1.04 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.61 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.04 <sup>ab</sup>	1.37 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.02 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.0001
TC 28 (g)	70.90 ± 9.9 <sup>c</sup>	147.71 ± 18 <sup>a</sup>	108.58 ± 12 <sup>b</sup>	109.54 ± 30.9 <sup>b</sup>	98.07 ± 11.6 <sup>bc</sup>	0.0001
TCA 28	2.93 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.59 ± 0.30 <sup>ab</sup>	2.63 ± 0.95 <sup>ab</sup>	2.60 ± 0.36 <sup>ab</sup>	0.0179
Sobrev 28 (%)	90.0 ± 8.2	90.0 ± 8.16	95.00 ± 5.77	90.00 ± 0.01	92.50 ± 5.0	0.7213

Los valores representan la media de cada parámetro; n = 4 para cada dieta

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

\* Error estándar

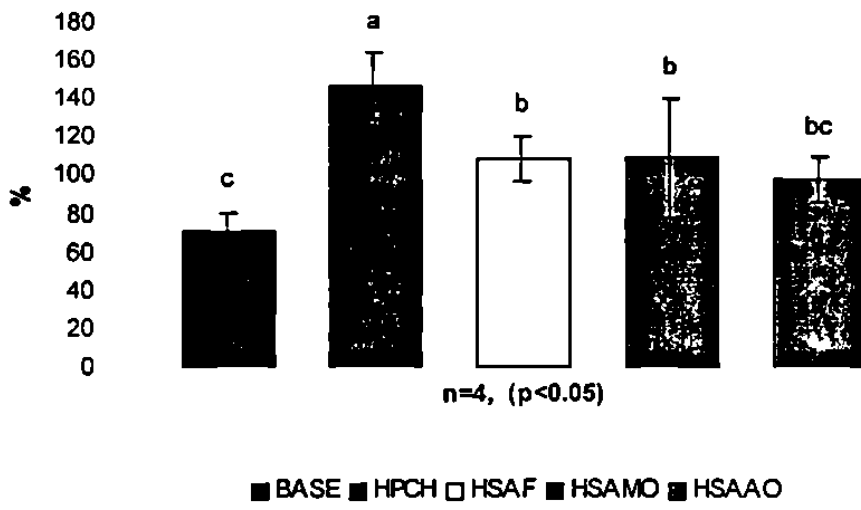
El consumo promedio por organismo con la dieta HPCH fue significativamente mayor (p<0.05) a los demás tratamientos, con excepción de la dieta HSAF. Entre las dietas con HSA no se encontraron diferencias significativas aunque si se puede observar una ligera disminución en el consumo con el incremento de rancidez. La representación gráfica de los resultados se puede apreciar en la Fig. 8. La HPCH se consumió un 19% más que la HSAAO y un 35% más que la dieta base, la diferencia en consumo entre las HSAF y HPCH fue de un 9%.



**Fig. 8. Consumo promedio por organismo a los 28 días del bioensayo**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

En los resultados del análisis estadístico realizado para la tasa de crecimiento se observa que la dieta Base fue nuevamente la peor de todas (Fig. 9). esta dieta dio crecimientos significativamente menores ( $p < 0.05$ ) a las otras, excepto a la HSAAO. Una mínima diferencia se observa entre las dietas con HSA, aunque esta no llega a ser significativa; mientras que la HPCH produjo la mejor tasa de crecimiento, siendo esta 40% mejor que la obtenida con las HSA y un 77% mejor que la obtenida con la dieta Base sin HP.

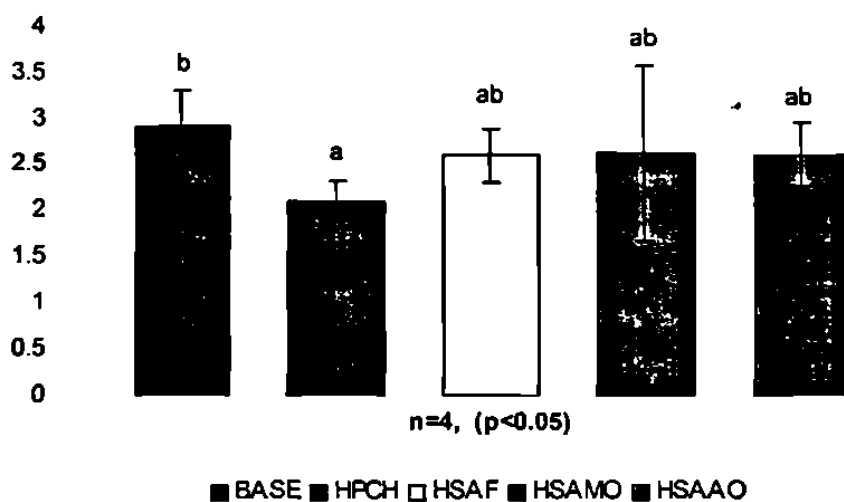


**Fig. 9. Tasa de crecimiento promedio a los 28 días de bioensayo**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

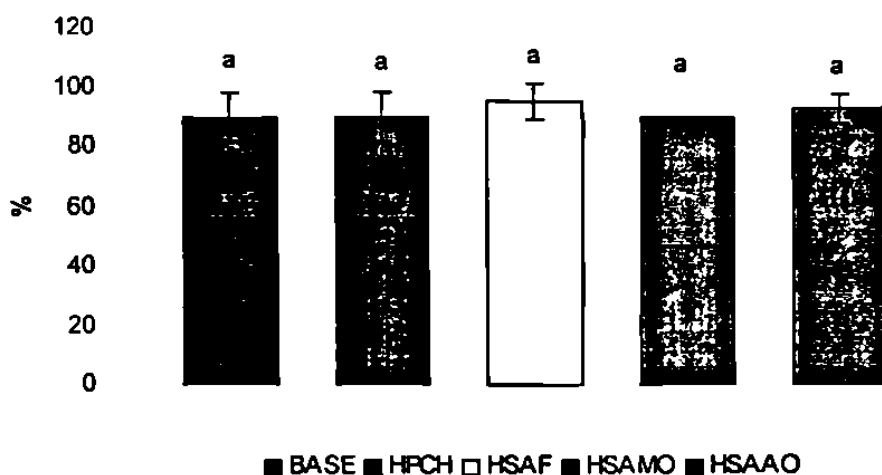
Como se puede observar en la Fig. 10, la mejor TCA se obtuvo con la dieta HPCH, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con las TCA obtenidas con las HSA aunque las diferencias numéricas parecen importantes. Entre las dietas con HSA no se encontraron diferencias significativas. Por su parte, la dieta Base dio como resultado una TCA significativamente mayor que la dieta con HPCH.





**Fig. 10. Tasa de conversión alimenticia promedio a los 28 días de bioensayo**  
 Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

La sobrevivencia a los 28 días del bioensayo fue buena superior al 90% para todos los tratamientos no encontrándose diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellos. La HSAF fue la del mayor sobrevivencia con 95%, seguida de la dieta HSAAO (92.5%).



**Fig. 11. Tasa de sobrevivencia promedio a los 28 días de bioensayo**

## 6.8 Pruebas de evaluación de la calidad de la proteína

Se presentan en la tabla 11 los resultados sobre las pruebas de digestibilidad *in vitro*, lisina disponible y proteína soluble determinados por INVE (los resultados de digestibilidad *in vitro* obtenidos en el laboratorio de maricultura no fueron muy reproducibles, por lo que no se tomaron en cuenta).

**Tabla 11. Índices de calidad de la proteína en las harinas experimentales**

Harina	HPCH *	HSAF **	HSAMO **	HSAAO **
Dig. Proteína Torry (%)	----	53.15	55.45	56.48
Proteína Soluble (%)	----	9.44	9.6	10.06
Lisina Disponible (%)	8.4	3.37	4.09	4.05

\* Los valores mostrados fueron proporcionados por la empresa TEPUAL-Chile

\*\* Los valores mostrados fueron proporcionados por la empresa INVE-Aquaculture

Con respecto a la HPCH solamente se contó con su valor de lisina disponible, por lo que no se presentaron valores para las otras dos pruebas. Se puede observar que el contenido de lisina disponible es 4% más alto en la HPCH que en las HSA de diferente grado de oxidación. Para las HSA oxidadas, las diferencias en los valores que presentan en las tres pruebas son pequeñas destacando sólo la diferencia de % en digestibilidad entre la HSAF y la HSAAO.

### 6.8.1 Bioensayo de digestibilidad *in vivo* con las dietas experimentales

Los resultados se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12. Digestibilidad aparente de las dietas experimentales**

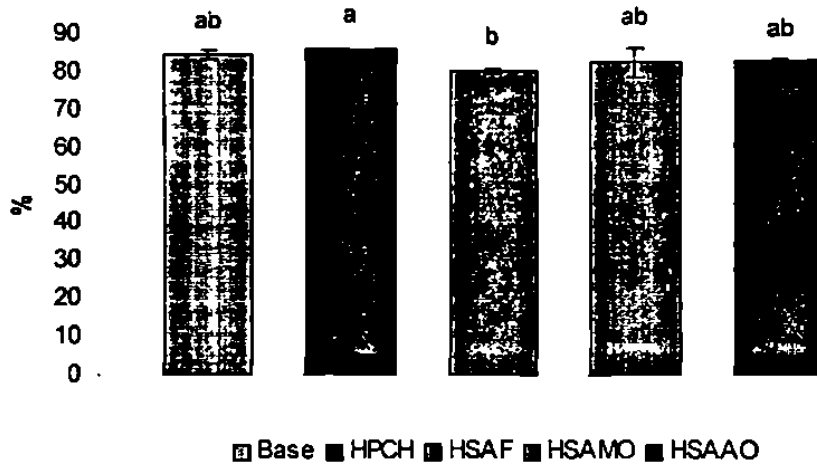
DIETA (%)	Base	HPCH	HSAF	HSAMO	HSAAO
DAMS	84.53 ± 1.06 <sup>ab</sup>	86.35 ± 0.06 <sup>a</sup>	80.47 ± 0.57 <sup>b</sup>	82.84 ± 3.80 <sup>ab</sup>	83.67 ± 0.06 <sup>ab</sup>
DAP	88.96 ± 0.39 <sup>bc</sup>	91.38 ± 0.28 <sup>a</sup>	87.23 ± 0.75 <sup>c</sup>	90.74 ± 1.76 <sup>ab</sup>	91.39 ± 0.15 <sup>a</sup>
DAMSI	-	94.50 ± 0.37 <sup>a</sup>	65.56 ± 2.67 <sup>b</sup>	75.97 ± 19.2 <sup>ab</sup>	80.26 ± 6.65 <sup>ab</sup>
DAP	-	90.89 ± 0.82 <sup>a</sup>	75.11 ± 2.14 <sup>b</sup>	84.79 ± 5.04 <sup>a</sup>	83.84 ± 0.42 <sup>a</sup>

Los valores representan la media de cada parámetro, n = 3 para cada dieta

El factor de conversión de proteína empleado fue de 6.25

Las letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p < 0.05)

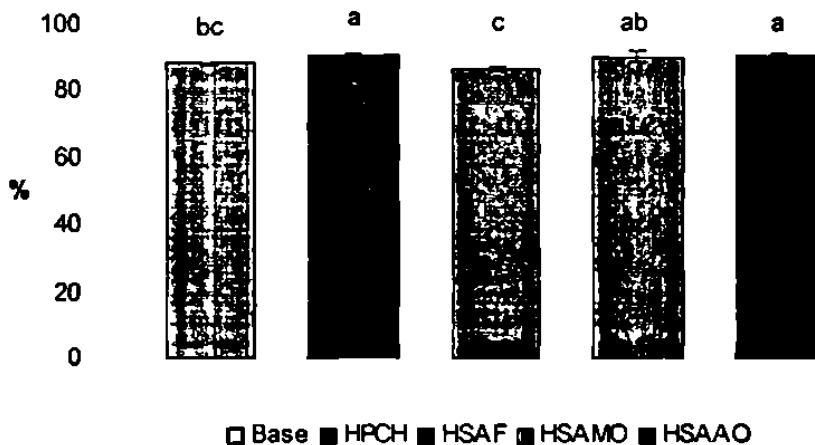
Para la DAMS no se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos excepto entre la HPCH y la HSAF dando esta ultima un DAMS 6% menor, los resultados están representados en la Fig. 12.



**Fig. 12. Digestibilidad aparente de la materia seca de la dieta**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

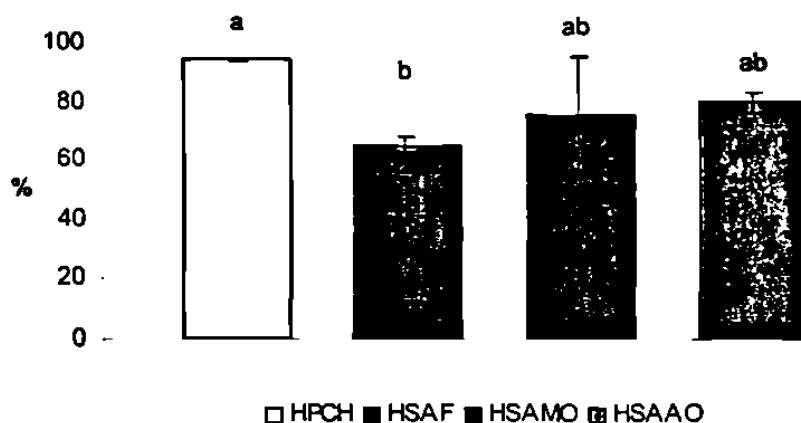
Con respecto a la DAP se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dietas HSAF y Base contra la dieta HPCH siendo esta  $\cong 4\%$  más digerida. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las dietas con HSA oxidadas y la dieta con HPCH (Fig 13).



**Fig. 13. Digestibilidad aparente de la proteína de la dieta**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

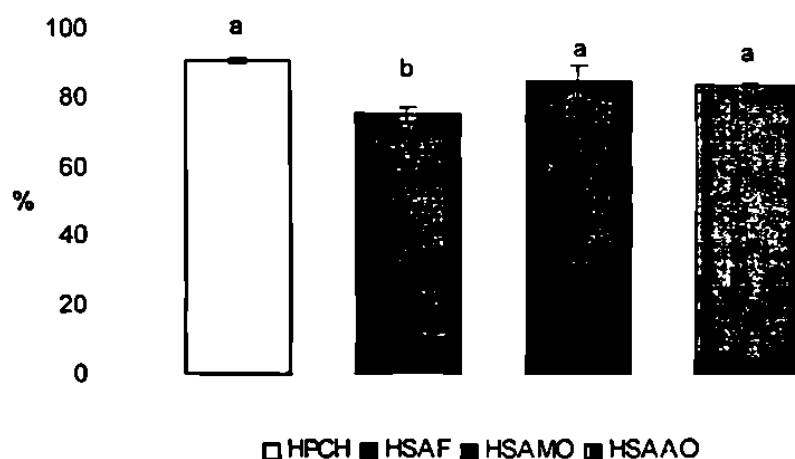
Para la DAMSI si se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dietas HSAF (30% menor) y HPCH, pero no entre esta última y las dietas con HSA oxidadas aunque numéricamente la digestibilidad es 20% y 14% menor que la HPCH (Fig 14).



**Fig. 14. Digestibilidad Aparente de la Materia Seca del Ingrediente**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

Para la DAPI se encontro una diferencia de 17% menor para la dieta HSAF la cual fue significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con las dietas HPCH, HSAMO y HSAAO, mientras que entre las dos últimas se presentó una diferencia de 7.5% con respecto a la HPCH pero no fue significativa (Fig 15).



**Fig. 15. Digestibilidad aparente de la proteína del ingrediente**

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en ( $p < 0.05$ )

## 7. DISCUSIONES

### 7.1 Composición química proximal de las muestras

El análisis químico proximal de la materia prima, la torta de prensa y de las muestras de HSA con y sin antioxidante, demostró una alta variabilidad en humedad, proteína, grasa y ceniza. Estas diferencias se deben a la heterogeneidad de las muestras en los diferentes puntos de muestreo (diferente proporción de carne y hueso). Esta variabilidad en la composición proximal, es común en harinas de subproductos de origen animal (Dong *et al.*, 1993). En el caso de harinas de pescado Opstvedt (1973a), Higgs *et al.* (1995), Anderson *et al.* (1993) y Anderson *et al.* (1997) explican que la variabilidad se debe a: diferencias en la composición de la materia prima antes de la conversión en harina de pescado; proporciones variables de pescado entero, desechos, y residuos del enlatado en la materia prima; diferencias en las condiciones de procesamiento (cocimiento y temperatura de secado empleada durante la fabricación); variaciones en la calidad y cantidad de solubles de pescado, adicionados a la torta de prensa que propician alteraciones en la calidad global de la harina dando lugar a variaciones en los niveles de colágeno, así como de ceniza y otros constituyentes proximales.

En el caso específico de la harina de subproductos de atún Kifer *et al.* (1969) después de analizar más de 50 muestras, concluyen que la gran variabilidad nutricional se debe a las variaciones en la proporción de carne roja incluidas con la cabeza, el esqueleto y las otras partes del cuerpo, utilizadas como materia prima en la fabricación de la harina.

En nuestro caso varios de estos puntos justifican o explican la variabilidad en la calidad y composición de los dos lotes de HSA muestreadas, así tenemos que, la variación en el contenido de proteína entre los dos lotes de HSA puede deberse a la falta de homogeneidad de la materia prima y por lo tanto a una diferente proporción de carne y hueso en los subproductos que constituyeron cada lote muestreado, aunado al hecho de que se tomaron las muestras en diferentes tiempos (aunque uno después del otro) y no se partió de una sola muestra para dividirla, y agregar a una fracción antioxidante y a otra no. Quedando el lote de HSA con antioxidante con un porcentaje menor de proteína (carne) y uno mayor de ceniza (huesos). Esto demuestra que en el proceso se necesita una mejor homogeneización de la

materia prima ya sea al inicio o al final del mismo, y que se debió partir de una muestra única y homogénea. Con respecto a la comparación de las HSA y la HPCH, la diferencia en proteína y ceniza, se explica principalmente por el hecho de usar subproductos en un caso y pescado entero en el otro.

Los niveles en el contenido de ceniza en las HSA se consideran altos comparados con el valor recomendado para las harinas de pescado entero de buena calidad <15% (Abdo *op cit.*), pero concuerdan con los encontrados por Kifer *op cit.*, en el cual establecen un contenido de cenizas para las harinas de subproductos de atún entre 20 y 27%; también el NRC, (1983) y Feedstuffs, (1989) establecen para este tipo de harinas un 23.6% y 23% en contenido de cenizas.

El contenido de grasa, en los lotes de HSA con y sin antioxidante, así como en el caso de la HPCH fue de (8-9%) lo cual se consideró aceptable, ya que el valor recomendado para las harinas de pescado utilizadas en acuicultura esta entre 8-11% como máximo de grasa (Abdo *et al.*, 1993). Los resultados concuerdan con los presentados por Kifer *et al.* (1969) quienes reportan un contenido total de grasa de 7 a 14%.

La humedad en las harinas en general fue baja en las HSA (3-4%) lo que indica que el proceso de secado fue muy severo por lo que es probable que la harina haya sido sobrecalentada y en consecuencia el producto haya sido quemado reduciendo con ello su valor nutritivo, esta situación es común en secadores de flama directa donde la temperatura en el centro de la partícula es alrededor de 80-95°C (Barlow y Windsor, 1984), siendo bajo este proceso como se fabricaron las HSA. Actualmente las harinas de pescado de alta calidad resultan del procesamiento de pescado entero extremadamente fresco, el cual es cocido y secado bajo condiciones de baja temperatura, a este tipo de harinas corresponde la HPCH usada en este estudio. La denominación de este tipo de harinas es [“Low-Temperature” (LT)] baja temperatura.

## **7.2 Nitrógeno volátil total (TVN) en la materia prima, torta de prensa y HSA**

Los valores de TVN encontrados para la materia prima y la torta de prensa de los subproductos de atún (30-34 mgN/100g), se encuentran dentro de los valores recomendados por los productores internacionales de harinas de pescado. lo que demuestra que las HSA fueron elaboradas con materia prima fresca. De acuerdo con Castro, 1989 el TVN no debe superar valores de 50 y 90 mgN/100g de muestra de la materia prima.

El descenso en el TVN de las muestras iniciales de HSA sin antioxidante y con antioxidante es sorprendente, ya que después de reincorporar los solubles concentrados a la torta de prensa, el TVN debería ser mayor en las harinas que en la materia prima. La única manera de interpretar este descenso es la volatilización de los compuestos del TVN durante el secado, lo que confirma la presunción de un sobrecalentamiento durante el secado.

## **7.3 Evaluación de la calidad de las harinas experimentales**

Los valores reportados para el TVN en las HSA y la HPCH por el laboratorio de INVE-Aquaculture, caen dentro del recomendado por Castro 1989; Abdo *et al.*, 1993; Pike, 1994 y Subramanyam, 1994; quienes establecen un valor de TVN <50mg/100g en harinas secadas a baja temperatura y de menos de 90 mg/100g en harinas elaboradas de pescado fresco y secadas a una temperatura regular. Sin embargo, cabe señalar que el valor de TVN en harinas, no tiene mucho valor porque algunas sustancias volátiles se pierden durante el secado, dando lugar a valores subestimados.

El bajo valor de histamina en la HPCH indica la gran frescura de la materia prima utilizada. Por otra parte, el incremento encontrado en el contenido de aminas biogénicas en las harinas oxidadas, con respecto a la no oxidada (con valores del simple al doble), podría deberse a que estas muestras hayan recibido más solubles de pescado que la muestra de HSAF (las aminas biogénicas son altamente solubles en agua por lo que durante el proceso se concentran en el agua de cola y en los solubles de pescado Subramanyam, 1994), pero también podría deberse a que la materia prima de esas muestras haya estado más descompuesta. Las pruebas microbiológicas de las HSA presentaron conteos bajos. lo que

demuestra la eficiencia del secado en la destrucción de las bacterias, sin haber una relación con el contenido de aminas biogénicas.

En escandinavia las harinas de pescado especiales no deben exceder de 2000 ppm en el contenido total de aminas biogénicas -histamina + cadaverina + putrescina + tiramina- (Ricque *et al.*, 1998), en este experimento el contenido total de aminas más alto fue para la HSAAO (1579 ppm) que está por abajo de la anterior norma.

#### **7.4 Evaluación química del grado de oxidación en las harinas de subproductos de atún**

Las pruebas químicas utilizadas para evaluar el grado de oxidación en aceites puros presentan algunos inconvenientes cuando se aplican a aceites muy pigmentados, como es el caso de los lípidos residuales de las HP. Como estas pruebas son colorimétricas, específicamente en la técnica del TBA, estos pigmentos generan interferencias que llevan a obtener resultados erróneos. En el caso del presente trabajo, este problema fue solucionado utilizando la técnica para la determinación del TBA modificada por Bostoglou *et al.* (1996) en la cual no es necesario extraer los lípidos de la harina, ya que los productos de oxidación se extraen con TCA directamente a partir de la harina y haciendo uso de la espectrofotometría derivativa las posibles interferencias se eliminan. En el caso del valor peróxido, la técnica requiere de una titulación y el momento del cambio de color para definir el final de está, no es fácil de establecer si hay pigmentos en el aceite, por lo que la técnica se vuelve muy subjetiva.

Tanto la HSAF como las HSAMO y HSAAO fueron almacenadas para llegar a valores de rancidez, que se encontraran dentro de los rangos presentados por San Martín (1995). El tiempo de almacenamiento fue relativamente corto (6 meses), comparado con el usado por Pettersen *et al.* (1996) para oxidar harinas de pescado entero (10 meses de almacenamiento). Los análisis fueron realizados en el laboratorio de análisis químicos del programa maricultura y en los laboratorios de INVE-Aquaculture. De manera global los resultados sobre estos indicadores en el laboratorio de INVE, concuerdan con los obtenidos en el laboratorio de maricultura, sin embargo, ligeras diferencias se observaron en la determinación del valor peróxido. Estas diferencias pueden ser explicadas por lo mencionado anteriormente y por las distintas fechas de análisis entre ambos laboratorios.



Una disminución del 3% en el contenido de los lípidos totales se observó para la HSAAO con respecto a la HSAMO. Se ha encontrado en otros trabajos con harinas y aceites de pescado oxidados que existe un decremento en la concentración de ácidos grasos  $\omega_3$ , lo cual lleva a encontrar un menor contenido de grasa cruda (Koshio *et al.*, 1994a; Borsting *et al.*, 1994; de Koning y Mol, 1989).

## **7.5 Análisis químico proximal de las dietas elaboradas con las harinas de pescado experimentales**

Los resultados del análisis químico para la proteína y grasa de cada una de las dietas coinciden con la formulación teórica con una diferencia mínima. La diferencia en la proteína total para la dieta base con respecto a las otras, se explica ya que esta no contenía harina de pescado. Con respecto al contenido de ceniza, las diferencias entre las dietas base, HPCH y las HSA con diferente grado de oxidación son lógicas ya que la primera dieta al no contener harina de pescado (que es un ingrediente con un alto contenido de ceniza) presenta un bajo porcentaje; mientras que en las dietas con harina de pescado, el contenido de éstas en ceniza, así como su nivel de inclusión en la fórmula, establecieron las diferencias.

Las diferencias en el contenido de cenizas entre las dietas con HSAF y con HSA oxidadas, se explican por una parte, por el mayor porcentaje de inclusión de la HSAF, en comparación a las HSA oxidadas y por otra a su mayor contenido de ceniza.

Con respecto al porcentaje de lixiviación en las dietas, estos se consideran óptimos pues fueron menores al 10% a excepción de la dieta HSAF, que presentó un valor demasiado alto (36.55%) debido a su alto contenido de ceniza.

## **7.6 Bioensayo de crecimiento**

El consumo de las dietas fue afectado significativamente por el tipo y la oxidación de harina de pescado. Así tenemos que el alimento con HPCH fue mas consumido, que los alimentos con HSA oxidadas. Este efecto de la rancidez sobre el consumo ha sido reportado por San Martín (1995) y Anderson (1997), en trabajos con camarón y salmón del Atlántico respectivamente. Sin embargo, otros autores como Pettersen *et al.* (1996) y Cruz *et al.* (1992)

en experimentos similares, no encontraron un efecto de los lípidos oxidados en harina y aceite de pescado, sobre el consumo del alimento en salmón y camarón *Penaeus vannamei* respectivamente.

Los mejores resultados en incremento en peso, tasa de crecimiento y tasa de conversión alimenticia fueron para los camarones alimentados con la dieta HPCH, debido a las características de esta harina que fue procesada en condiciones de baja temperatura, materia prima fresca y con pescado entero. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Cruz *et al.* (1992) al sustituir la harina de pescado entero por HSA.

Bajo las condiciones de este trabajo, la oxidación en las HSA hasta valores de 97.52 meq/kg de VP; 59.03 de VA y 10.32 mg de MDA/kg, no afectó de manera significativa el crecimiento y la sobrevivencia de los camarones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Hung *et al.*, 1980 y 1981; Koshio *et al.*, 1994<sup>a</sup>; Pettersen *et al.*, 1996 y Bautista y Subosa, 1997, quienes al evaluar el efecto de aceites dietarios oxidados en diferentes especies acuáticas, concluyen que no hay efectos en la sobrevivencia y el crecimiento o se ven atenuados cuando las dietas están suplementadas con vitamina E, vitamina C, lecitina de soya y antioxidantes sintéticos. Los efectos más graves como mortalidades y reducción de la respuesta inmune, sólo se presentan por carencia o ausencia de uno de ellos, más que por una toxicidad causada por los productos de oxidación (Murai *et al.*, 1974; Hung *et al.*, 1980a; Hung *et al.*, 1980b; Hung *et al.*, 1981; Ketola *et al.*, 1989; Obach y Laurencin, 1992; Koshio *et al.*, 1994b; Enberg *et al.*, 1994; Kosutarak *et al.*, 1995; Ricque *et al.*, 1995 y Stéphan *et al.*, 1995). Este mismo efecto puede explicar los resultados del presente estudio ya que todas las dietas en experimentación contenían suficientes cantidades de vitamina E, vitamina C y etoxiquín, además la lecitina de soya sustituyó completamente la inclusión de aceite de pescado, todos ellos pudieron actuar como antioxidantes y reducir los efectos de la rancidez en la sobrevivencia y el crecimiento de los camarones.

En contraparte, Murai *et al.* (1988), citados por Koshio *et al.* (1994b) reportan que el "yellow tail" (*Seriola quinqueradiata*) mostró 23% de mortalidad y un pobre crecimiento con dietas oxidadas (PV = 26 meq/kg), lo cual habla de cierta susceptibilidad de la especie a los lípidos oxidados. Paradójicamente Sakai *et al.* (1992), trabajando con esta misma especie, en

otro estudio, utilizando aceite de sardina oxidado (PV = 100 meq/kg) reporta que fue bien tolerado por esta especie.

## 7.7 Calidad de la proteína en las harinas experimentales

Numerosos métodos químicos y biológicos han sido usados para la evaluación de la calidad de la proteína, pero debido a la complejidad de la nutrición proteica es poco probable que un sólo método pueda ofrecer una visión completa del valor nutritivo de la proteína en una muestra del alimento. Es evidente que el valor de una proteína está determinado por su patrón de aminoácidos y por la digestibilidad de la proteína (Opstvedt, 1975).

Por ello fue necesario evaluar la calidad de la proteína de las HSA fresca y oxidadas bajo diferentes pruebas de laboratorio, se seleccionó la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la proteína ya que a nivel internacional distintos productores y comercializadores de harinas de pescado han establecido sus propias especificaciones de calidad para las harinas de pescado y dentro de estas especificaciones la técnica *in vitro* utilizando pepsina constituye un análisis fundamental (Castro *et al.*, 1994).

Los resultados de la prueba de digestibilidad *in vitro* aplicada a las HSA fresca y oxidadas, fueron bajos en general (53-56%), si se comparan con las de una harina de pescado entero secada a baja temperatura (92-94% en Castro *et al.*, 1994) pero coinciden con los reportados por Cruz *et al.* (1992) para el mismo tipo de harinas (65.9%). El sobrecalentamiento durante su fabricación y el alto contenido de ceniza en estas harinas pueden ser la causa, como ha sido demostrado por Cho y Slinger (1979); Hajen *et al.*, (1993); Romero *et al.* (1997); Gomes *et al.* (1995); Anderson *et al.* (1993) y Anderson *et al.* (1997).

El sobrecalentamiento y los hidroperóxidos durante el secado pueden causar reacciones con las proteínas reduciendo la disponibilidad de los aminoácidos y la digestibilidad de la proteína. La lisina puede estar involucrada en las reacciones de Maillard y la tasa de cisteína:cistina puede ser afectada por el calentamiento (Opstvedt *et al.*, 1984 citado por Anderson *et al.*, 1993). La reacción de Maillard, comprende a un grupo de reacciones no enzimáticas en las cuales aldehídos, cetonas o azúcares reductores reaccionan con aminoácidos, péptidos o proteínas. En los alimentos sobrecalentados se observa un cambio de

color (amarillo a café oscuro) y una disminución del valor nutricional (la lisina, histidina y fenilalanina se pierden durante esta reacción). Por la severidad del calentamiento, los cambios pueden o no pueden ser reversibles, ya que la estructura terciaria de la proteína es atacada.

Sin embargo, las HSA oxidadas y sin oxidar presentaron valores similares de lisina disponible, que además fueron ligeramente inferiores (4%) al valor mínimo reportado por la FAO, 1970 (4.8 a 7.4%) y 50% por abajo del valor encontrado para la HPCH. Esto demuestra, que la calidad de la proteína de las HSA fue afectada por las condiciones de secado pero no por la oxidación de los lípidos. Esto difiere de los resultados encontrados por *Lea et al.* (1958, citado por *Opstvedt, 1975*) y *Carpenter et al.* (1963, citado por *Opstvedt, 1975*) quienes demostraron una reducción en la disponibilidad de lisina (de un 4 a 9%) en harinas de arenque después de haber sido oxidadas, así como una disminución en la digestibilidad *in vitro* con pepsina del 2%, posiblemente debido a que en nuestro caso el daño causado por el secado en las HSA fue predominante.

Es importante remarcar que tanto la lisina disponible como la digestibilidad *in vitro* de las harinas, se relacionan bien con los resultados de crecimiento y TCA obtenidos, por lo que parecen ser buenos indicadores de la calidad en las harinas utilizadas en dietas para camarón, (aunque los resultados del análisis de correlación, no fueron presentados por carecer de un número limitado de datos y los resultados del mismo podrían estar sobreestimados).

### **7.7.1 Pruebas de digestibilidad in vivo con las dietas experimentales**

La DAMS, la DAMSI, la DAP y la DAPI de todas las dietas fue similar excepto para la dieta con HSAF. Aunque estadísticamente no existieron diferencias entre las dietas HPCH, HSAMO y HSAAO, numéricamente la dieta HPCH fue superior en digestibilidad a las otras dos dietas.

Los bajos porcentajes de DAPI encontrados para las HSA y especialmente para la HSAF (75.11%), concuerdan con los resultados reportados por *Ezquerro et al.* (1997a) para una HSA mexicana de composición similar (63.6%), y a los encontrados por *Akiyama et al.* (1989), para una harina de pescado entero (65% proteína y 21% de ceniza) cuya DAP fue baja (80%); estos autores asumen que las bajas digestibilidades se deben principalmente a su alto

contenido en cenizas. Esto ya ha sido observado en otros trabajos donde un alto contenido de ceniza en los ingredientes reduce su digestibilidad proteica, al interferir en la homeostasis y la regulación de la absorción a nivel intestinal, por interacciones antagónicas entre los nutrientes por los sitios de absorción (Hardy, 1997). En el alimento con HSAF, la baja digestibilidad también podría explicarse por el alto porcentaje de lixiviación de esta dieta, lo que genera una menor disponibilidad de los nutrientes al disolverse en el agua.

La digestibilidad *in vivo* es una medida de la cantidad total de un ingrediente o una dieta que es digerida y absorbida, los resultados indican que la oxidación de los lípidos no afectó significativamente estos factores de las HSA y que son muy semejantes a los de la HPCH. De tal manera que, el bajo rendimiento obtenido con las harinas de atún, se debe más a un problema de disponibilidad de nutrientes esenciales que a un problema de digestión y absorción (i.e. el bajo valor de lisina disponible) ya que el camarón digiere pero no crece. Esto concuerda con el hecho de que existe una mejor relación entre crecimiento y lisina disponible que entre crecimiento y digestibilidad *in vivo*, además de que existe un exceso de aminoácidos esenciales en la fórmula de HPCH con respecto a las fórmulas con HSA.

La limitante de usar la digestibilidad *in vivo* como una prueba de calidad única, ha sido subrayada por varios autores (Opstvedt, 1975; Haard, 1995; Hardy, 1997; Ezquerro *et al.*, 1997a; Ezquerro *et al.*, 1997b) quienes coinciden que es necesario complementarla, con una prueba del valor biológico de la proteína, como por ejemplo su patrón de aminoácidos.

## 8. CONCLUSIONES

- ◆ La HSA por su alto contenido en hierro, se puede oxidar fácilmente durante el almacenamiento, aún en condiciones de refrigeración, por lo que es estrictamente necesario adicionar un antioxidante sintético durante su proceso.
- ◆ La oxidación de los lípidos de las HSA hasta niveles denominados altamente oxidados (IP= 97.52 meq/kg; VA= 59.03 y TBA= 10.32 mg MDA/kg) no afecta significativamente el crecimiento, el consumo, la TCA, y la sobrevivencia del camarón blanco *P. vannamei*; pero existe una tendencia a disminuir el consumo y el crecimiento. Sin embargo, en el caso de fórmulas que estén limitadas en sus nutrientes esenciales, sin márgenes nutricionales de seguridad, es probable que los efectos sean significativos.
- ◆ La inclusión de HSA produce crecimientos significativamente menores a los producidos por una harina de pescado entero de calidad certificada (secada a baja temperatura), debido a: un problema de disponibilidad de nutrientes (por ejemplo lisina), causado por las extremas condiciones de secado y el alto contenido de ceniza.
- ◆ Aunque existen trabajos que demuestran que hay un daño en la proteína generado por la rancidez oxidativa, en el presente estudio, la digestibilidad aparente de la proteína (DAP) en las HSA fue más afectada por el alto contenido de ceniza, que por el grado de oxidación.
- ◆ El camarón blanco tolera altos niveles de rancidez, siempre y cuando los niveles dietarios de ácidos grasos esenciales, vitamina E y vitamina C no sean limitantes y exista la suplementación con un antioxidante sintético.

## 9. RECOMENDACIONES

- ◆ Para poder establecer que existe un daño en el valor nutricional de las harinas de pescado por la rancidez, cuando las harinas son incorporadas a las dietas para camarón, es necesario incrementar el tiempo de experimentación, así como variar los niveles de inclusión de vit. E, vit. C y antioxidantes sintéticos.
- ◆ En los experimentos con harinas de subproductos animales se debe tomar mucha atención en la toma de las muestras, ya que si no se parte desde un inicio con una muestra homogénea, los resultados que se obtengan tendrán una alta variabilidad.
- ◆ Para mejorar la calidad de la HSA, es necesario mejorar la tecnología y/o condiciones de secado, para obtener harinas con una humedad residual mayor y así evitar que la harina se queme, reduciendo con ello la disponibilidad de sus nutrientes. Así mismo se recomienda, incluir en un proceso de tamizado después de la molienda, para reducir con ello el contenido de ceniza en el producto final.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abdo de la Parra, M.I., Cruz Suárez, L.E. y D. Ricque. 1993. Especificaciones de Harinas y Aceites de Pescado para Nutrición Animal Acuícola. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque M. y R. Mendoza A. Eds. Memorias del 1er. Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos Acuícolas. Asociación Americana de la Soya y U.A.N.L.. Nuevo León, México. pp. 243-255.
- Akiyama, D.M., S.R. Coelho, A.L., Lawrence and E.H. Robinson. 1989. Apparent Digestibility of Feedstuffs by the Marine Shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **55** (1): 91-98.
- Akiyama, D.M., W.G., Dominy. and A.L., Lawrence. 1991. Penaeid Shrimp Nutrition for the Commercial Feed Industry: Revised. In: Dean M. Akiyama and Ronnie K.H. Tan Eds. Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. American Soybean Association. Singapore. pp 80-98.
- Anderson, S.J., S.P. Lall, D.M. Anderson, and M.A. McNiven. 1993. Evaluation of Protein Quality in Fish Meals by Chemical and Biological Assays. *Aquaculture*, **115**: 305-325.
- Anderson, S.J., D.A. Higgs, R.M. Beames, M. Rowshandeli. 1997. Fish Meal Quality Assessment for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Reared in Sea Water. *Aquaculture Nutrition*, **3**: 25-38.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. Edited by Kenneth Helrich. 15<sup>th</sup> Edition. Arlington, Virginia, U.S.A. Vol. 1 : 684 pp.
- Badui, D.S.. 1993. Química de los alimentos. 3<sup>a</sup> edición, Edit. Alhambra, Mexicana. 639 pp.
- Barlow, S. M. y M. L. Windsor. 1984. SubProductos de Pesquería. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Vol. 1 Harina y Aceite de Pescado en Nutrición Animal. Nuevo León, México 1992.
- Bautista, N.M. and P.F. Subosa. 1997. Changes in shrimp feed quality and effects on growth and survival of *Penaeus monodon* juveniles. *Aquaculture*. **151**: 121-129.
- Bimbo, P.A. 1990. The Seafood Industry. An Osprey Book, Published by Van Nostrand Reinhold. New York, U.S.A.. pp. 325-341.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, Vol. **37**: 911-917.
- Borsting, C.F., R.M. Engberg, K. Jakobsen, S.K. Jensen and J.O. Andersen. 1994. Inclusion of Oxidized Fish Oil in Mink Diets: 1. The Influence on Nutrient Digestibility and Fatty Acid Accumulation in Tissues. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, **72**: 132-145.
- Botsoglou, A.N., D. Fletouris J., G. Papageorgiou E., V. Vassilopoulos, A. Mantis J., and A. Trakatellis G. 1994. Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1931-1937.



- CANACINTRA. 1996. Panorama de la Industria Alimentaria Animal en México durante 1995. Sección de Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales. Cámara Nacional de la Industria de la Transformación. Pp. 12-29.
- CANAINPES. 1997. Reporte de producción de atún y sardina enlatados 1996. Cámara Nacional de la Industria Pesquera. 8 p.
- Castro C. E. 1989. Chilean Fish Meal Quality. Fundación Chile. Santiago, Chile. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Vol. 1 Harina y Aceite de Pescado en Nutrición Animal. Nuevo León, México 1992.
- Castro, E., y L. Avila M. 1994. Aminoácidos Esenciales: Rol y Determinaciones de Lisina, Metionina y Cistina. En: Emilio Castro Campos Editor. Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-F.A.O. Proyecto Aquila II, Documento de Campo No. 16, pp. 53-59.
- Cho, Y.C. and S.J. Slinger. 1979. Apparent Digestibility Measurement in Feedstuffs for Rainbow Trout. From: Proceedings World Symposium on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology. Vol. II. Berlin. pp. 239-247.
- Cruz Suárez, L. E., R. Robledo-De León, D. Ricque. 1992. Evaluation of Tuna Byproducts Meal as a Protein Source for *Penaeus vannamei* Shrimp Feed in a Controlled Environment. Abstract of Aquaculture American '92. National Shellfisheries Association, Fish Culture Section on the American Fisheries Society and World Aquaculture Society. Orlando, Florida, U.S.A.: pp. 73.
- Cruz Suárez, L. E., D. Ricque, y V.P. Domínguez J. 1994. Utilización de la Lecitina en la Nutrición Acuícola : Crustáceos. En: Mendoza, A. R., L. E. Cruz S. y D. Ricque M. Eds. Memorias del 2o. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Nuevo León, Mexico.
- D'Abramo, R.L. 1997. Part I : Triacylglycerols and Fatty Acids. In : D'Abramo, R.L., D.E. Conklin and D.M. Akiyama Editors, Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture. Louisiana State University, Vol. 6, pp 71-84.
- de Koning, A.J. and T. Mol H.. 1989. Lipid Determination in Fish Meal: An Investigation of Three Standard Methods Applied to Stabilised and Nonstabilised Anchovy Meals at Increasing Stages of Maturity. *J. Sci. Food Agric.*, 46: 259-266.
- Dong, M.F., R.W. Hardy, N.F. Haard, F.T. Barrows, B.A. Rasco, W.T. Fairgrieve, and I.P. Forster. 1993. Chemical Composition and Protein Digestibility of Poultry Byproduct Meals for Salmonid Diets. *Aquaculture*, 116: 149-158.
- Engberg, R.M. and C.F. Borsting. 1994. Inclusion of Oxidized Fish Oil in Mink Diets: 2. The Influence on Performance and Health Considering Histopathological, Clinical, and Haematological Indices. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, 72: 146-157.
- Ezquerro, J.M., F.L.G. Carreño, R. Civera and N.F. Haard. 1997a. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157: 249-260.
- Ezquerro, J.M., F.L.G. Carreño and O. Carrillo. 1997b. In vitro Digestibility of white shrimp (*Penaeus vannamei*) protein sources. In press.

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1970. Contenido de amino ácidos disponibles en la harina de pescado. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Nuevo León, México 1992.
- Feedstuffs. 1989. The Weekly Newspaper for Agribusiness. Vol. 61, No. 31
- Fish Farming International. 1996. Peter Hjul Editor. An EMAP Business Publication. Champlain, New York, U.S. December 1996, Vol. 23, No. 12 : 30-31.
- Gomes, F.E., P. Rema, S. J. Kaushik. 1995. Replacement of Fish Meal by Plant Proteins in the Diet of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestibility and Growth Performance. *Aquaculture*, 10: 177-186.
- Gunnlaugsdottir, H. and R.G. Ackman. Three Extraction Methods for Determination of Lipids in Fish Meal: Evaluation of a Hexane/Isopropanol Method as an Alternative to Chloroform Based Methods. *J. Sci. Food Agric.*, 61: 235-240.
- Haard, N.F. 1995. Digestibility and *in vitro* Evaluation of Plant Protein for Salmonid Feed. In: Chhorn Lim and David J. Sessa Editors. Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture. Chapter 15: 199-219.
- Hajen, E.W., D.A. Higgs, R.M. Beames and B.S. Dosanjh. 1993. Digestibility of Various Feedstuffs by Postjuveniles Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in Sea Water. 2. Measurement of Digestibility. *Aquaculture*, 115: 333-347.
- Hardy, W. R. 1997. Understanding and Using Apparent Digestibility Coefficients in Fish Nutrition. *Aquaculture Magazine*. May/June: 84-89.
- He, H. and A. L. Lawrence. 1993. Vitamin E Requirement of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 118: 245-255.
- Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Prendergast, A.F., Beames, R.M., Hardy, R.W., Riley, W&Deacon, G. 1995. Use of Rapeseed/Canola Protein Products in Finfish Diets. In: Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture (Lim, C.E. & Sessa, D.J. eds). AOCS Press, Champaign, IL. pp. 130-156
- Hung, S.S.O., C.Y. Cho, and S.J. Slinger. 1980a. Measurement of Oxidation in Fish Oil and its Effect on Vitamin E Nutrition of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, Vol. 37: 1248-1253.
- Hung, S.S.O. and S.J. Slinger. 1980b. Effect of Oxidized Fish Oil on the Ascorbic Acid Nutrition of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, 50: 393-400.
- Hung, S.S.O., C.Y. Cho, and S.J. Slinger. 1981. Effect of Oxidized Fish Oil, DL  $\alpha$ -Tocopheryl Acetate and Ethoxyquin Supplementation on the Vitamin E Nutrition of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fed Practical Diets. *J. Nutr.*, 111: 648-657.
- IAFMM. 1981. Fish oil Bulletin No.8. Método de análisis recomendado para la determinación del valor anisidina en aceites de pescado. 2 pp.

- Kanazawa, Akio. 1984. Nutrition of Penaeid Prawns and Shrimps. First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Hoilo City, Philippines. pp 123-130.
- Ketola, H.G., C.E. Smith, and G.A. Kindschi. 1989. Influence of Diet and Oxidative Rancidity on Fry of Atlantic and Coho Salmon. *Aquaculture*, **79**: 417-423.
- Kifer, R.R., N.L. Karrick, W. Clegg, M.E. Stansby and M.E. Ambrose. 1969. Nutritive Content of Tuna (Mixed Species) Fish Meal Evaluated by Chemical Methods. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuícola y Pecuaria. Nuevo León, México 1992.
- Koshio, Shunsuke, S. Teshima, and A. Kanazawa. 1994a. Effects of Dietary Oxidized Oil for *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science*, **60** (3): 283-288.
- Koshio, S., R.G. Ackman, and S.P. Lall. 1994b. Effects of Oxidized Herring and Canola Oils in Diets on Growth, Survival, and Flavor of Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1164-1169.
- Kosutarak, P., A. Kanazawa, S. Teshima, and S. Koshio. 1995. Interactions of L-Ascorbyl-2-Phosphate Mg and Oxidized Fish Oil on Red Sea Bream Juveniles. *Fisheries Science*, **61** (4): 696-702.
- Labuza, P.T.. 1970. Kinetics of Lipid Oxidation in Foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*. Vol.2, 3:pp 355-405.
- Masson, S.L. 1994. Criterio de Calidad para Materias Grasas Utilizadas Frecuentemente en la Nutrición Animal y de Peces. En: Emilio Castro Campos Editor. Control de Calidad de Insumos y Dietas Acuícolas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-F.A.O. Proyecto Aquila II, Documento de Campo No. 16, pp. 77-92.
- Maynard, A.L., J.K. Loosli, H.F. Hintz and R.G. Warner. 1983. Los lípidos y su metabolismo en nutrición animal. Edit. McGraw-Hill. 4ª. México, D.F., p. 109-143.
- Murai, T. and J.W. Andrews. 1974. Interactions of Dietary  $\alpha$ -Tocopherol, Oxidized Menhaden Oil and Ethoxyquin on Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.*, **104**: 1416-1431.
- Nettleton, Joyce A. 1985. Seafood nutrition. De. Osprey. 22-205 p.
- Nieto, L. M.G. 1995. Efecto de las Diferencias en el Procesamiento de las Harinas de Pescado y la Toxicidad de las mismas, sobre la Digestibilidad Aparente en el Camarón Blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei* Bonne), en Condiciones de Laboratorio. Tesis de Biólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León/Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey Nuevo León, México. 81 pp.
- NRC. 1983. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academy of Sciences. Washington, D.C., U.S.A. 102 p.
- Obach, A. and B. Laurencin. 1992. Effects of Dietary Oxidized Fish Oil and Deficiency of Antioxidants on the Immune Response of Turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, **107**: 221-228.

- Olsen, S. 1969. Pepsin Digestibility Test. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Seminario Internacional Sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuicola y Pecuaria. Vol. II Técnicas de Análisis. Nuevo León, México 1992.
- Opstvedt, J. 1973a. Effect of Drying and Storage on the Energy Value of the Protein and Lipid Fractions of Herring Meal. Influence of Residual Lipids on the Nutritive Value of Fish Meal IV. *Acta Agriculture Scandinavica*, Vol. 23: 200-208.
- Opstvedt, J. 1975. Effect of Lipid Oxidation on Protein Quality of Fish Meal. Influence of Residual Lipids on the Nutritive Value of Fish Meal VII.. *Acta Agriculture Scandinavica*, Vol. 25: 53-71.
- Opstvedt, J.. 1985. Correlation Between Different Measurements of Lipid Oxidation in Feed Ingredients and Compound Feed. In: 8th. European Symposium on Poultry Nutrition. The Worlds Poultry Science Association. Israel Branch. pp. 193-197.
- Opstvedt, J.. 1985. Lípidos de Pescado en Nutrición Animal. Norwegian Herring Oil & Meal Industry Research Institute. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuicola y Pecuaria. Vol. 1 Harina y Aceite de Pescado en Nutrición Animal. Nuevo León, México 1992.
- Pettersen, J. and Olsen S. 1989. Rancidity and its Measurements in Food. In: Proceedings 15th. Scandinavian Symposium on Lipids. Scandinavian Forum for Lipid Research and Technology Rebild Bakker, Denmark. pp. 529-539.
- Pettersen, J. A. Aksnes, H. Mundheim and J. Opstvedt. 1996. Nutritional Effects of Lipid Oxidation in Fish Feed. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque M. y R. Mendoza A. Eds. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México.
- Pike, I.H; Andorsdóttir, G. and Mundheim, H.. 1990. The Role of Fish Meal in Diets for Salmonids. Corporación de Productores de harina de Pescado. Santiago, Chile. En: Cruz-Suárez, L.E. y D. Ricque M. Eds. Memorias del Seminario Internacional sobre Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuicola y Pecuaria. Vol. 1 Harina y Aceite de Pescado en Nutrición Animal. Nuevo León, México 1992.
- Pike, I.H.. 1994. Marine Products For Aquaculture The Future. Internacional Association Of Fish Meal Manufacturers. En: Mendoza, A.R., L.E. Cruz S. y D. Ricque M. Eds. Memorias del 2o. Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Nuevo León, Mexico.
- Pike, I.H.. 1997. Fishmeal Information Network. Promoting the benefits of fishmeal in animal feed. International Fishmeal & Oil Manufacturers Association. Hertfordshire, U.K.
- Ricque, M. D., M.I. Abdo-de la Parra, L.E. Cruz S., G. Cuzon, M. Cousin, Aquacop and I. H. Pike. 1998. Raw material freshness. a quality criterion for fish meal fed to shrimp. Aquaculture. (In press).
- Ricque, M. D., L.E. Cruz S., San Martín del Ángel y I. H. Pike. 1995. Efecto de la calidad de aceite de pescado en la producción de camarón. *Acuicultura del Ecuador* 1: 31-46.

- Romero, J.J., E. Castro, A.M. Díaz, M. Reveco, J. Zaldívar. 1997. Evaluation of Methods to Certify the "Premium" Quality of Chilean Fish Meals. *Aquaculture*, 124: 351-358.
- Rosenberry, Bob. 1997. World shrimp farming an annual report. Published by Shrimp News International. In: Shrimp News International. San Diego, C.A., U.S.A., pp 39-42.
- San Martín del Angel, P.. 1995. Efecto del grado de oxidación de aceite de pescado y de la suplementación con vitamina E y un antioxidante sintético en la nutrición del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León/Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey Nuevo León, México. 81 pp.
- SEMARNAP. 1996. Anuario Estadístico de Pesca. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, pp. 105-116.
- Siang, Ch. Ng, and L.L. Kim. 1992. Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products. Edited by Katsutoshi Miwa and Low Su Ji. Marine Fisheries Research Department Southeast Asian Fisheries Development Center, 2nd Edition. Singapore, Thailand.
- Stéphan, G., J. Guillaume, F. Lamour. Lipid Peroxidation in Turbot (*Scophthalmus maximus*) Tissue: Effect of Dietary Vitamin E and Dietary n-6 or n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Aquaculture*, 130: 251-268.
- Subramanyam, M.. 1994. Ingredient Quality in the Production and Performance of Aquaculture Feeds. En: Mendoza, A.R., L.E. Cruz S. y D. Ricque M. Eds. Memorias del 2o. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Nuevo León, Mexico.
- Tacon, A. G. J.. 1989. Nutrición y Alimentación de Peces y Camarones Cultivados. Manual de Capacitación. Programa Cooperativo Gubernamental.. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Aliemntación-FAO Proyecto Aquila II, Documento de campo No. 4. pp. 3250.
- Tecator. 1983. Fat extraction on feeds with Soxtec System HT. Application Note AN 67/83. In: Manual Tecator Soxtec System HT2. 3p.
- Tecator. 1987. Determination of kjeldahl nitrogen content with Kjelttec System 1026. Application Note AN 86/87. In: Manual Tecator Kjelttec System 1026 Distilling Unit. 9p.
- Tapia, S. M., L.E. Cruz S., D. Ricque M., I. Abdo de la Parra y M.G. Nieto L.. 1997. Harinas y Aceites de Pescado. En: Curso de Formación de Administradores de Granjas Acuícolas. Modulo de Valoración Productiva en el Centro de Ciencias de Sinaloa. Capítulo: Nutrición y Alimentación de Camarón, 19 p.
- Woyewoda, D.A., S. J. Shaw, P. J. Ke and B. G. Burns. 1986. Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality. Canadian Department of Fisheries and Oceans. Nova Scotia, Canada. *Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* No. 1448: 41-49.

## **11. ANEXOS**

**Anexo 1. Determinación de Nitrógeno Volátil Total (TVN). Técnica ASN 3140 del Manual de Técnicas Tecator, Kjeltec 1026 Dist. Unit, Manual Part No. 1000 2790, T 8806, Prabin &Co AB, Klippan.**

- 1.- Pesar 10 g de muestra fresca con una aproximación de  $\pm 0.1$  mg (anotar el peso)
- 2.- Adicionar 30 ml de Acido Tricloroacético (TCA) al 5%
3. Licuar por 30 segundos a alta velocidad y vaciar a un tubo de digestión de 250 ml
- 4.- Adicionar 50 ml de agua destilada y agitar por unos segundos en un vortex
- 5.- Agregar 1.0 g de Oxido de Magnesio
- 6.- Centrifugar a 3000 r.p.m.por 10 min. a 4°C
- 7.- Colocar dentro del tubo algunas perlas de vidrio o 3 ml de un agente antiespumante
- 8.- Conectar el tubo al destilador
- 9.- En un matraz de destilación, agregar 25 ml de Acido Bórico al 4%
- 10.- Iniciar la destilación en forma manual hasta obtener 200 ml de destilado
- 11.- Titular con HCl al 0.1 N (anotar los ml gastados en la titulación)
- 12.- Correr un blanco con los puntos del 2 al 10

El valor del TVN se obtiene con la Fórmula:

$$\text{mgTVN}/100\text{g} = \frac{(T - B) \times N \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

donde:

T = ml gastados de HCl en la titulación de la muestra  
B = ml gastados en la titulación del blanco  
N = Normalidad del HCl

## **Anexo 2. Extracción y Purificación de Lípidos Método de Bligh and Dyer (1959).**

Este método, fue seleccionado debido a que se ha demostrado, que los solventes polares (metanol y cloroformo), extraen alrededor de 3% más grasa que el método de extracción Soxhlet con etil-acetato (de Koning *et al.*, 1985; de Koning y Mol, 1989; Pettersen y Olsen, 1989; Cabrini *et al.*, 1992; Gunnlaugsdottir y Ackman, 1993 y Honeycutt *et al.*, 1995). El contenido de la grasa en la extracción, se ve incrementado por la polaridad del solvente, esto es explicado por el incremento en la solubilidad de los lípidos polares (i.e. FI) por los solventes polares (Christie, 1982 citado por Pettersen y Olsen, 1989). De ahí que escoger los solventes durante el procedimiento de extracción influye también en el contenido de los productos de oxidación lo cual puede ser explicado por la polaridad de los aldehídos y peróxidos, así como del poder del solvente y la polaridad de los extractos (Pettersen y Olsen, 1989).

### **Determinación:**

- 1.- Agregar a un tubo para centrifuga 10 g de muestra.
- 2.- Agregar cloroformo-metanol-agua en proporción (2:2:1.8), con 1 ppm de BHT como antioxidante, disuelto en el cloroformo.
- 3.- Homogenizar a un cm del fondo con un homogenizador de tejidos, a alta velocidad durante 30 segundos.
- 4.- Enjuagar el homogenizador con 5 ml de la mezcla cloroformo-metanol en el mismo recipiente de la muestra.
- 5.- Centrifugar durante 10 minutos a 4,500 rpm.
- 6.- Recuperar la fase líquida en un embudo de separación. Con la muestra centrifugada, hacer una a dos veces los pasos del 2 al 6.
- 7.- Tapar el embudo de separación con un tapón esmerilado y agitar ligeramente dejando escapar los gases.
- 8.- Dejar reposar la muestra hasta que se formen las dos fases.
- 9.- Tener un matraz bola previamente lavado y secado en estufa a 70°C durante 18 horas. Meterlo en un desecador para evitar la absorción de humedad y tararlo.
- 10.- Recuperar en el matraz bola, la fase de cloroformo acumulada en el fondo del embudo pasándola a través de un filtro hidrofóbico (Whatman 1PS).
- 11.- Lavar el embudo de separación con 10 ml de cloroformo y volver a decantar la fase de cloroformo y recuperarla en el matraz bola.
- 13.- Poner el matraz bola en un roto-vapor a una temperatura de 50-60°C, bajo vacío y el agua de refrigeración lo más fría posible (utilizar hielo), hasta eliminar los solventes.



- 14.- Colocar el matraz en la estufa nuevamente hasta perder la humedad ganada, pesarlo y por diferencia obtener la cantidad de lípidos.
- 15.- Obtener el porcentaje de lípidos con respecto a la muestra original.

### Anexo 3. Índice de Péroxido - Método Oficial de la A.O.A.C. 965.33, (1991).

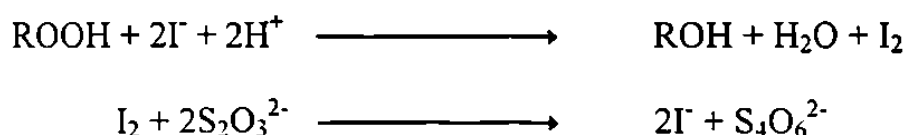
#### 1. Generalidades:

Los peróxidos son los primeros compuestos producidos por la oxidación de los aceites, son determinados usualmente por métodos colorimétricos y es una medida de los peróxidos contenidos en el aceite (Hung *et al.*, 1980). Un contenido elevado de peróxidos indica que el aceite no ha sido elaborado o almacenado adecuadamente, o bien no ha sido estabilizado. Para la acuicultura se recomienda que los aceites no contengan un índice de peróxidos mayor de 25 meq/kg (Masson, 1994).

#### 2. Principio:

El procedimiento iodométrico de la A.O.A.C., esta basado en la reducción de los peróxidos en medio ácido por el yoduro de potasio. El yodo liberado es titulado con tiosulfato de sodio (valorado), con la adición de almidón recién preparado como indicador. Sin embargo, los resultados son afectados por la temperatura y el tiempo de reacción, así como por la estructura química de los peróxidos (Opstvedt, 1985; Pettersen y Olsen, 1989). La reacción procede como sigue:

#### 3. Fundamento Químico:



#### 4. Aparatos:

- Pipeta Mohr; tipo de medición; 1 ml de capacidad.
- Matraz Erlenmeyer; con tapón de vidrio; 250 ml.

#### 5. Reactivos:

- Todos los reactivos deberán ser de calidad analítica.
- Antioxidante BHT.
- Acido acético-solución cloroformo (preparada mezclando tres partes de volumen de ácido acético glacial con dos partes del volumen de cloroformo).
- Solución yoduro de potasio saturada. Almacenada a la obscuridad. Prueba diaria adicionando 2 gotas de solución de almidón a 0.5 ml de la solución yoduro de potasio en 30 ml de solución ácido acético-cloroformo. Si se forma una coloración azul y requiere más de 1 gota de 0.1 N de solución de tiosulfato de sodio, descarte la solución de yoduro de potasio y prepare un nuevo lote. .

- Solución de tiosulfato de sodio, aproximadamente 0.1N, estandarizada.
- Solución de tiosulfato de sodio, aproximadamente 0.01N estandarizada. Esta solución deberá ser preparada diluyendo 10 veces la solución 0.1N con agua destilada recientemente hervida, enfriar y proteger de la luz. .
- Solución indicadora de almidón, 1g de almidón soluble en 100ml de agua destilada.

## 6. Procedimiento:

- 1.- Pesar 0.5 a 5.0g de muestra homogeneizada y aproximadamente 0.03 de BHT, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapa esmerilada.
- 2.- Añadir 30 ml de la solución acética-cloróformica. Agitar hasta que la muestra se disuelva.
- 3.- Añadir 0.5 ml de la solución saturada de KI utilizando la pipeta Mohr.
- 4.- Todas las soluciones deberán ser almacenadas en la oscuridad con agitaciones ocasionales por 1 minuto.
- 5.- Añadir 30 ml de agua destilada.
- 6.- Titular con tiosulfato de sodio 0.1N, agitando vigorosamente y hasta que desaparezca el color amarillo. (Es necesario trabajar con una microbureta)
- 7.- Adicionar 0.5 ml de solución indicadora de almidón, y continúe la titulación. Agite vigorosamente el matraz hasta el punto final y extraiga todo el yoduro de la capa clorofórmica.
- 8.- Adicione el tiosulfato por goteo hasta que el color azul desaparezca (nota: si la titulación es menor de 0.5 ml repita la determinación utilizando 0.01N de la solución de tiosulfato de sodio).
- 9.- Corra una determinación del blanco utilizando solamente los reactivos. La titulación del blanco no deberá exceder 0.1 ml de la solución de tiosulfato de sodio 0.1N.
- 10.- Índice de Peróxido = 
$$\frac{(S - B) \times N \times 1000}{\text{peso muestra (g)}} \text{ (meq/Kg materia grasa)}$$

donde:      B = Titulación del blanco  
               S = Titulación de la muestra  
               N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio

## 7. Valoración del Tiosulfato de Sodio:

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml colocar 0.02 g de Dicromato de Potasio seco. Agregar 80 ml de agua destilada recientemente hervida y fría, adicionar 20 ml de HCl 1N y disolver, dejar reposar por 10 minutos en la oscuridad. Titular la solución con tiosulfato, adicionándolo lentamente hasta obtener una coloración verde, agregar 5 ml de almidón y

continuar agregándole el tiosulfato hasta una coloración esmeralda (se emplean aproximadamente 200 ml). Calcular la normalidad del tiosulfato con la siguiente fórmula:

$$N \text{ Na}_2\text{SO}_4 = \frac{\text{(g de Dicromato)} (1000)}{\text{(ml de tiosulfato empleados)} (49.031)}$$

### 8. Repetibilidad:

Las diferencias entre dos determinaciones corridas simultáneamente o en sucesiones rápidas por el mismo análisis no deberá exceder 2.0 miliequivalentes/Kg.

### 9. Errores:

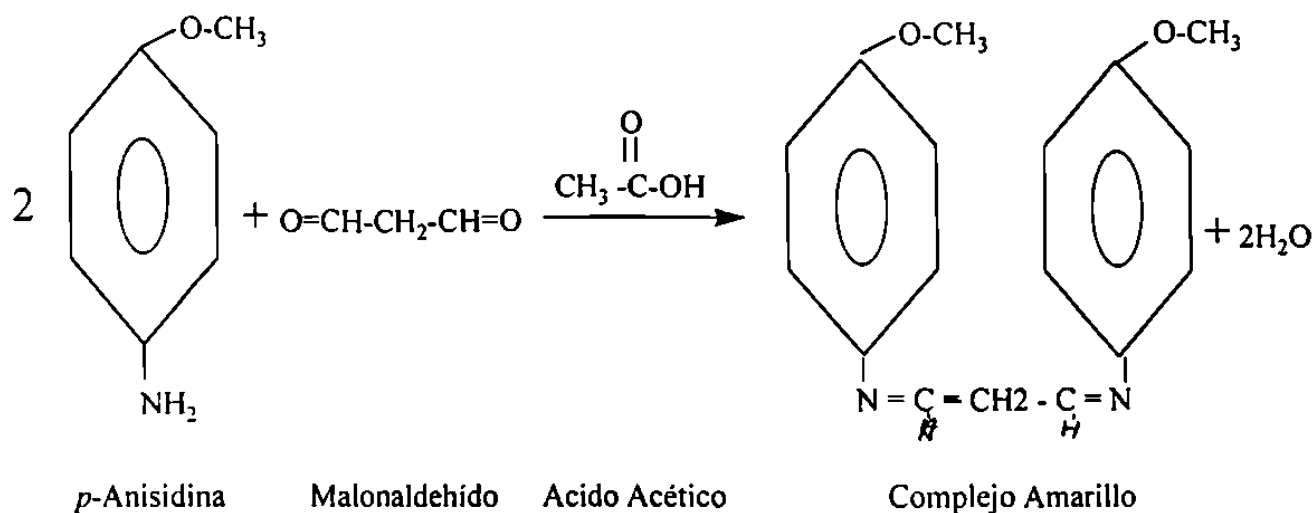
- 1.- El yodo es algo volátil, pudiendo la disolución perder parte de él. Esta fuente de error, se minimiza añadiendo a la disolución un exceso de yoduro potásico, para que se forme el triyoduro complejo  $\text{I}_3^-$ .
- 2.- La luz intensa acelera la oxidación atmosférica del ion yoduro. El agua que se utiliza para la disolución y para disolver el yoduro potásico, debe estar recientemente hervida para eliminar el oxígeno disuelto y el yodo liberado debe valorarse en seguida.
- 3.- La disolución de almidón, dejada bastante tiempo en reposo, sufre descomposición y se hace inestable al yodo, por lo que debe prepararse en el mismo día de su utilización. En los métodos indirectos, no debe añadirse el indicador hasta que se haya valorado la mayor parte del yodo; una concentración elevada de yodo da con el almidón un complejo con propiedades indicadoras disminuidas.
- 4.- En la normalización del tiosulfato de sodio, el punto final de la valoración, si se utiliza almidón, consiste en el paso de color azul intenso del yodo-almidón, al verde claro del  $\text{Cr}^{+++}$ . Este punto final es tan brusco, que fácilmente se sobrepasa cuando el operador tiene poca experiencia, en cuyo caso debe desecharse la muestra.
- 5.- En solución fuertemente ácida, el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  se destruye y en solución fuertemente alcalina puede ser oxidado a sulfato y la reacción no es estequiométrica.

**Anexo 4. Valor Anisidina. (IAFMM, 1981. Fish oil Bulletin No. 8 "Método de análisis recomendado para la determinación del Valor Anisidina en aceites de pescado"). List *et al.*, 1974.**

Mediante este índice se determina la concentración de aldehídos presentes en los aceites, los cuales se forman por oxidación de los peróxidos. El VA es un análisis colorimétrico y mide los productos formados durante la reacción de para-anisidina y los diénos conjugados, un producto de oxidación secundario (Opstvedt, 1985; Pettersen y Olsen, 1989). Es recomendable realizar esta prueba, ya que puede ocurrir que un aceite muy oxidado presente un bajo índice de peróxidos por haber pasado la mayor parte de éstos a aldehídos, al proseguir la oxidación (Abdo *et al.*, 1993).

**1. Principio:**

La reacción de p-anisidina (p-metoxianilina) con los aldehídos (compuestos volátiles derivados de la oxidación de lípidos) en presencia de ácido acético, forman por adición, un complejo amarillo que contiene dobles enlaces carbono-nitrógeno (nota 1). El valor p-anisidina se define por convención como 100 veces la densidad óptica medida en una celda de 1 cm, a una longitud de 350 nm, de una solución conteniendo 1.00g del aceite en 100 ml de una mezcla de solvente y reactivos de acuerdo al método descrito. La reacción básica puede ser representada como sigue:



**2. Aparatos:**

2.1 Tubos de prueba de 10 ml mínimo, con tapones de rosca.

2.2 Frascos graduados de 25 ml.

2.3 Pipeta o bureta automática.

2.4 Espectrofotómetro para observaciones a 350 nm.

2.5 Celdas con 1(± 0.01) cm, las 2 celdas de cada par deben ser idénticas.

### 3. Reactivos:

- 3.1 Iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), ópticamente claro (nota 2).
- 3.2 Acido acético glacial, reactivo analítico (nota 3).
- 3.3  $\rho$ -anisidina, reactivo analítico (nota 4) solución 2.5 g/l en ácido acético glacial. (3.2) (nota 5).

### 4. Procedimiento:

- 4.1 La muestra debe estar perfectamente seca y limpia.
- 4.2 Pesar entre 0.5 y 4.0 g de la muestra, lo más cercano a 0.001 g, en un frasco volumétrico (2.2), disuelva y diluya a el volumen con iso-octano (3.1).
- 4.3 Medir la absorbancia ( $A_b$ ) de la solución a 350 nm en una celda (2.5) con el espectrofotómetro (2.4), utilice las celdas de referencia llenando sólo con solventes como blanco.
- 4.4 Pipetear exactamente 5 ml de la solución de grasa en un tubo de prueba (2.1) y exactamente 5 ml de el solvente en un segundo tubo de prueba por medio de una pipeta automática (2.3) adicione exactamente 1 ml de la solución  $\rho$ -anisidina (3.3) a cada tubo, tapar y agitar.
- 4.4 Mantener el tubo en la oscuridad por 10 min a 24°C.
- 4.5 Medir la absorbancia ( $A_s$ ) de la solución en el primer tubo de prueba en una celda (2.5) a 350 nm, utilizando la solución del segundo tubo de prueba como blanco en las celdas de referencia.

### 5. Expresión de Resultados:

El valor  $\rho$ -anisidina ( $V_{\rho-A}$ ) se determina con la siguiente fórmula:

$$V_{\rho-A} \text{ (densidad óptica x 100)} = \frac{25 [1.2 (A_s - A_b)]}{m}$$

donde:

$A_s$  = Absorbancia de la solución grasa.

$A_b$  = Absorbancia del blanco.

$m$  = Es la masa en g, de la porción de prueba.

## 6. Observaciones

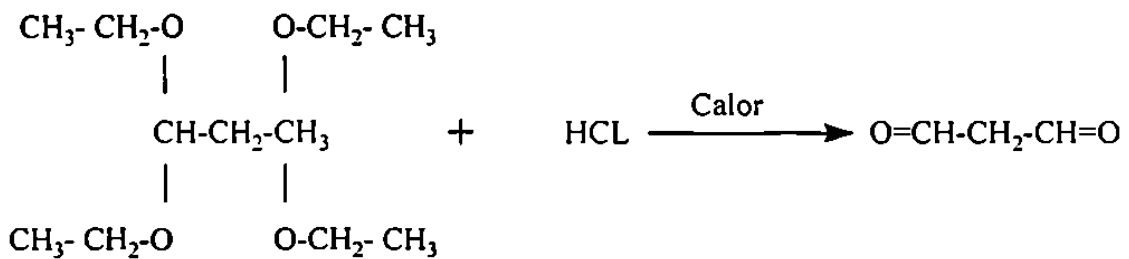
1. La intensidad de color en los productos formados en la reacción amarilla depende no solamente de la cantidad de compuestos aldehídicos presentes sino también de su estructura. Se ha establecido que las dobles ligaduras de la cadena carbonada incrementan la absorbancia molar 4 o 5 veces. Los medios tales como alquenos, especialmente pudieran contribuir sustancialmente a los valores establecidos.
2. En algunos casos  $\eta$ -hexano puede ser substituido por iso-octano como solvente, sin embargo, para aceites teniendo altas cantidades de ácidos grasos oxidados puede no disolverse completamente en  $\eta$ -hexano. Para tales aceites el iso-octano puede ser utilizado como solvente. La absorbancia del solvente utilizado (iso-octano o  $\eta$ -hexano), medido en celdas de 1 cm entre 300 y 380  $\eta\text{m}$ , debe ser de 0 o cercana a cero. Los productos comerciales deben estar libres de cualquier material absorbente filtrados a través de una columna de vidrio (3-5 cm de diámetro interno, y 100 cm de longitud) llena con sílica gel.
3. La reacción entre  $p$ -anisidina y los aldehídos involucra la formación de agua. Por lo tanto, la presencia de humedad, en cualquiera de los reactivos o en la muestra lleva a la incompleta reacción y consecuentemente, genera bajos valores. Debido a que el ácido acético glacial es altamente higroscópico, es esencial checar el contenido de humedad por la técnica de Karl Fisher. Si, el contenido de humedad excede 0.1%, el ácido acético debe ser descartado.
4. Debido al almacenamiento,  $p$ -anisidina tiende a obscurecerse como resultado de la oxidación. Un reactivo descolorante debe ser utilizado para reducir y decolorar de la siguiente manera: disuelva 40g de  $p$ -anisidina en 1lt de agua a 75°C. Adicione 2g de sulfito de sodio y 20g de carbón activo y remueva por 5 min. Filtre a través de un filtro de papel doble. Si el carbón pasa a través del papel, repita la filtración. Enfríe la solución filtrada a 0°C, permitiendo dejarlo a esta temperatura por lo menos 4 hr. o de preferencia, toda la noche. Filtre los cristales de  $p$ -anisidina y lave con una pequeña cantidad de agua destilada a una temperatura aproximada a 0°C. Después de secar, en un desecador al vacío, transfiera los cristales a un frasco ámbar. Si el almacenamiento fuera a baja temperatura y en la obscuridad, los cristales obtenidos pudieran no obscurecerse durante 1 año.
5. Todas las anilinas son consideradas potencialmente tóxicas, por lo que se recomienda utilizar protección al llevar a cabo la técnica (guantes, cubre bocas, etc.).

**Anexo 5. Número del Acido Tiobarbitúrico (TBA). Modificado por Botsoglou, N.A. ; J. Fletouris D. ; E. Papageorgiou G. ; N. Vassilopoulos V. ; J.Mantis A. and G. Trakatellis A. J. Agric. Food Chem. 1994 : 42, 191-197.**

Este método determina los aldehídos producidos de la oxidación de los ácidos grasos, principalmente el ácido linolénico (C18) y el araquidónico (C20). Se ha aplicado para harina de pescado, harina de pollo, harina de carne y alimento semihúmedo para mascotas.

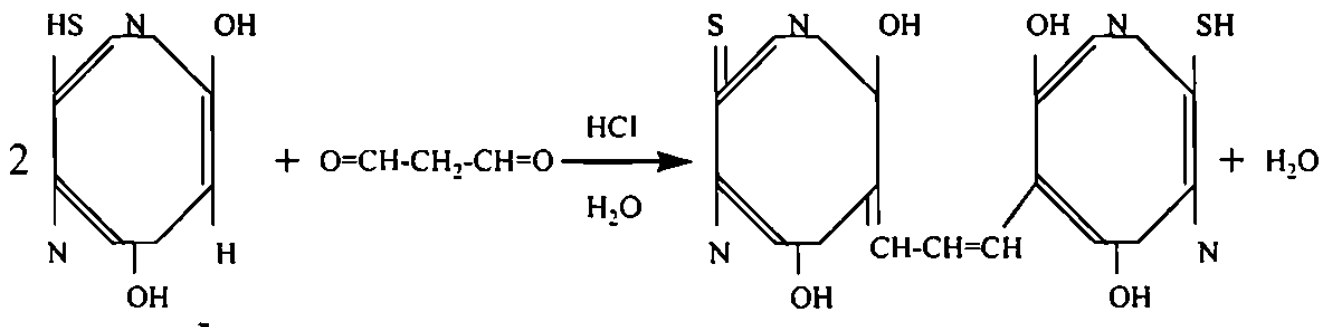
**Principio :**

El complejo rosa, está formado por la reacción del 2-ácido tiobarbitúrico (TBA) con el compuesto carbonil activo (MDA), el cual es derivado de la oxidación de los lípidos y su máxima absorbancia es a 532 nm. La hidrólisis ácida del 1,1,3,3,-Tetraetoxipropano (TEP) con HCl y calor, produce MDA, el cual reacciona cuantitativamente con el TBA (Sinnhuber y Yu, 1958).



1,1,3,3,-Tetraetoxipropano (TEP)      Acido clorhídrico      Malonaldehído

En los lípidos auto-oxidados, el MDA no aparece en estado libre, pero se ha visto que se encuentra principalmente en estado ligeramente ligado y es liberado cuando el sistema es calentado en un medio ácido. La reacción básica puede ser representada como sigue:



Acido Tiobarbitúrico  
(TBA)

Malonaldehído

TBA Cromógeno

La extracción de MDA de la muestra, fue llevada a cabo con TCA en presencia de hexano y BHT. La mezcla es homogenizada y centrifugada para, posteriormente, ser eliminada la capa de hexano. La solución es diluida al volumen con TCA y una alícuota de esta solución



es diluida con TBA. La solución es incubada a 70°C para llevar a cabo la reacción del TBA con el MDA y formar el complejo coloreado, que es medido a través de la 3ª. derivada del espectro a 521.5 nm. La concentración de MDA en la muestra, es calculada en base a la pendiente y el punto de intercepto obtenidos de la curva de calibración y es expresada como ng de MDA/ml.

#### **Control de Calidad :**

1. Un Blanco deberá ser incluido en cualquier análisis llevado a cabo. Este es utilizado como "cero" en el espectrofotómetro.
2. Asegúrese de colocar, la muestra pesada, directamente en el fondo de los tubos y evitando que la muestra quede en las paredes y no pueda ser digerida, ya que puede dar resultados erróneos.
3. Aunque la mezcla de antioxidante quizá no sea necesaria para todas las muestras, está deberá ser utilizada en cada una de ellas como medida de seguridad.
4. No caliente la muestra por más tiempo del indicado, un excesivo calentamiento de la muestra puede causar una oxidación adicional, resultando en datos analíticos altos.

#### **Aparatos :**

1. Espectrofotómetro Beckman modelo DU-650 de doble banda con celdas de absorción de 1 cm,  $\lambda$  532 nm. La tercera derivada del espectro fue producida por diferenciación electrónica ( $d^3A/d\lambda^3$ ), donde A es la absorbancia y  $\lambda$  es la longitud de onda del espectro normal obtenido a una velocidad de barrido de 480 nm/min, usando una diferencia derivada montada de 21 nm.
2. Homogenizador de tejidos Virtis (Janke & Kunkel, Gamb H., Germany).
3. Centrífuga Centra MP4 (IEC)
4. Agitador Vortex (Heidolph, Germany)
5. Baño maría con agitación, tipo 3044 (Kottermann, Germany)
6. Balanza analítica ; con rango de + 0.001 g
7. Tubos de ensaye Pyrex con tapa de rosca de 20 ml
8. Micropipetas de 100 y 1000  $\mu$ l
9. Cronómetro
10. Matraces volumétricos de diferentes tamaños
11. Tubos para centrífuga con capacidad mayor de 10 ml
12. Celdas para espectrofotómetro de 1 cm

#### **Reactivos :**

1. Acido 2-tiobarbitúrico ( $\text{NHCSNHCOCH}_2\text{CO}$ ), grado ACS (TBA) de sigma o equivalente
2. 1.1.3.3.-tetraetoxipropano (TEP) Sigma chemicals
3. Acido tricloroacético ( $\text{CCL}_3\text{COOH}$ ), (TCA) grado ACS certificado
4. Acido clorhídrico (grado reactivo)
5. Butylhidroxitolueno (BHT)

## 6. Hexano (grado reactivo)

### Preparación de la solución madre de MDA (239 µg /ml) :

1. Pesar 73.2 mg de TEP en un tubo de ensaye con tapón de rosca, diluido con 10 ml de HCL 0.1 N, sumergir en baño maría hirviendo por 5 minutos y enfriar rápidamente bajo agua corriente. Aforar a 100 ml la solución hidrolizada de TEP.

### Preparación del estandard MDA (239 µg /ml):

2. Se toma 1 ml de la solución madre y aforar a 100 ml con agua destilada

### Preparación de la muestra :

1. Pesar 2 g de la muestra en un tubo de centrifuga de 25 ml
2. Agregar 8 ml de TCA al 5%
3. Agregar 5 ml de BHT al 0.8% en hexano
4. Homogenizar por 30 segundos a alta velocidad
5. Centrifugar por 3 minutos a 3000 g y eliminar la capa de hexano
6. Llevar la fase acuosa a 10 ml con TCA al 5%
7. Tomar 2.5 ml en un tubo de ensaye con tapa de rosca y agregar 1.5 ml de TBA al 0.8%
8. Incubar por 30 minutos en baño maría a 70°C
9. Enfriar en agua corriente
10. Leer en el espectrofotómetro a  $\lambda$  521.5 nm con la tercera derivada del espectro

### Curva de Calibración :

Alícuotas de la solución estándar son pipeteadas en tubos de ensaye con tapa de rosca y aforadas a 2.5 ml con TCA al 5%, adicionandoles 1.5 ml de TBA al 0.8% en cada tubo. Incubarlos en baño maría por 10 minutos a 70°C y enfriar en agua corriente para leer en el espectro. La curva de calibración fue construida con los valores trazados al pico más alto a  $\lambda$  521.5 nm.

### Determinación :

La concentración de MDA en los extractos de la muestra son calculados en base a la pendiente y el punto de intercepto obtenidos en la curva de calibración (en caso de que el valor de la absorbancia sea mayor a 1, el extracto de la muestra se deberá diluir con agua antes de la medición final). El MDA en las muestras fue determinado usando la siguiente fórmula:

$$\text{MDA (ppb)} = 16CV/W$$

donde :

C = la concentración de MDA ( $\eta\text{g/ml}$ ) en el extracto de la muestra de acuerdo a la curva de calibración

V = el factor de dilución empleado en el extracto de la muestra

W = el peso de la muestra (g)

### Observaciones:

- El MDA es directamente cuantificado basándose en la 3ª. derivada del espectro de absorción, del complejo rosa formado. Además la purificación no es requerida porque la transformación derivada de la banda analítica a  $\lambda$  532  $\eta\text{m}$  virtualmente elimina las interferencias espectrales que surgen de otros compuestos.
- Se usa hexano para purificar el extracto y con ello eliminar la turbidez que se genera de la extracción en las muestras altas en grasa.
- El BHT adicionado antes de la mezcla, es efectivo para inhibir la oxidación de los lípidos.
- El propósito de usar una solución de TCA, en la separación de la fase acuosa de la muestra de la capa de hexano, es principalmente para eliminar trazas del precipitado blanco (proteínas) y las impurezas que pueden ser acarreadas sobre los lípidos, después de la reacción con TBA.
- El TBA, en ausencia del aldehído, también produce compuestos de color amarillo con otros derivados de la oxidación de las grasas.
- La presencia de sacarosa y de ácidos, interfiere en la determinación.
- El malonaldehído reacciona con proteínas, lo que reduce su concentración real para la determinación.

## **Anexo 6. Determinación de la Digestibilidad de la Proteína por Métodos *in vitro* : Torry Modificado (Olsen, 1969).**

El método A.O.A.C., recomienda emplear una concentración alta de pepsina (0.2%) con lo cual casi toda la proteína será digerida independientemente de su calidad y se pierde la sensibilidad para detectar el efecto nutricional negativo de un inadecuado sobrecalentamiento como puede ocurrir en la fabricación de harina de pescado o de carne. El método Torry por su parte, recomienda emplear una concentración débil de pepsina (0.0002%) incrementando la sensibilidad del análisis.

### **Corrección del Acido:**

La corrección del efecto digestivo del ácido se hace incluyendo con cada muestra que está siendo analizada un "control" en donde sólo se añade ácido (sin pepsina) a la muestra. El porcentaje de digestibilidad se determina en la forma habitual para los tratamientos de "pepsina + ácido" y "solamente ácido". El valor final de "nitrógeno digestible en pepsina corregida para el ácido" se calcula de la siguiente forma :

$$100 (P - A) - (100 - A)$$

donde :

P = porcentaje de nitrógeno digestible en pepsina

A = porcentaje de nitrógeno soluble en ácido

### **Preparación de la Muestra :**

1. Molienda, malla ASTM 30 (0.500 mm)
2. Pesaje, precisión 0.1 mg (balanza analítica)
3. Digestión
4. Muestra con HCL
5. Incubar con agitación 16 hr a 45°C (Incubador orbital)
6. Filtración al vacío-lavado (Buechner)
7. Determinación de nitrógeno no digerible ; método Kjeldahl
8. Nitrógeno residual HCL y Nitrógeno residual pepsina
9. Mineralización ; digestión con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y catalizador
10. Destilación ; con arrastre de vapor (Tecator 1026)
11. destilado recibido en ácido bórico la 4% con indicador (rojo de metilo-verde de bromocresol)
12. Titulación; con HCL 0.1 N (titulador automático)
13. Porcentaje de Nitrógeno

—

Calculos :

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{a \times N \times 14 \times 1000}{m \times 100}$$

donde :

a = ml gastados en la titulación

N = normalidad del HCl

m = peso de la muestra en gramos

$$\% \text{ Digestibilidad en pepsina} = \frac{\% \text{ N residual ácido} - \% \text{ N residual pepsina}}{\% \text{ N residual ácido}}$$

**Anexo 7. Base de datos del programa Mixit II, lista de nutrientes y restricciones de ingredientes**

Fórmulas Dietas Experimentales HSA (Bioensayo Dic 96)

FORMULA 9 < 9> Bioensayo Dic 96, Control Tepu  
 FORMULA 11 < 11> Bioensayo Dic 96, HSA M.O.  
 FORMULA 13 < 13> Bioensayo Dic 96, Dieta Base

FORMULA 10 < 10> Bioensayo Dic 96, HSA Fresca  
 FORMULA 12 < 12> Bioensayo Dic 96, HSA A.O.

F O R M U L A S

INGREDIENTES E.B.HUM	9	10	11	12	13
AL. Composito 5	18.220	---	---	---	---
Harina de TRIGO	38.422	35.655	36.448	35.688	47.907
Harina de trigo	8.000	8.000	8.000	8.000	10.037
Harina de camaron	4.000	4.000	4.000	4.000	5.018
Lechuga de Soya	23.270	23.270	23.270	23.270	29.190
Lechuga vitaminica	1.010	1.000	1.010	1.010	1.000
Ascorbina	6.802	6.381	7.151	7.232	6.381
Peróxido	0.026	0.025	0.025	0.025	0.025
WAV	0.250	0.242	0.250	0.250	0.233
HSA fresca	---	21.400	---	---	---
Ascorbina	---	0.026	0.027	0.025	0.208
HSA med. oxidada	---	---	19.820	---	---
HSA alta oxidada	---	---	---	20.300	---
TOTALES	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

INGREDIENTES E.B.HUM	9	10	11	12	13
BASE %	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Humedad %	8.41	6.95	7.04	7.00	8.95
Energia Kcal/gr	4.49	4.40	4.47	4.46	4.36
Proteína cruda %	35.17	35.00	35.02	35.06	29.87
Grasa Etéreo %	9.00	9.00	9.00	9.00	7.35
Fibra crud %	0.74	0.74	0.74	0.74	0.93
Almidón %	5.38	8.75	7.01	7.15	3.39
Calcio %	1.10	2.59	1.96	2.02	0.52
Fosforo %	1.08	1.77	1.46	1.48	0.72
Cloruro %	0.79	0.85	0.79	0.80	0.83
Cero %	0.33	0.42	0.34	0.35	0.19
Carbón %	0.19	0.20	0.18	0.18	0.18
Sodio %	0.23	0.28	0.22	0.22	0.09
Azufre %	0.49	0.52	0.47	0.48	0.44
Cobre Mg/Kg	8.26	9.32	8.56	8.60	8.31
Hierro Mg/Kg	76.89	135.41	107.83	109.46	46.92
Manganeso Mg/Kg	13.38	13.37	12.81	12.80	14.26
Zinc Mg/Kg	7.51	8.45	8.12	8.14	9.12
Cinc Mg/Kg	37.21	76.20	59.88	60.80	22.79
Vit. C %	1.15	1.09	1.21	1.22	1.13
Colina Mg/Kg	674.60	674.60	674.60	674.60	846.23
Esteroles %	0.17	0.17	0.17	0.17	0.22
Cholina Mg/Kg	7.48	7.48	7.48	7.48	9.38
Vit. Pantot Mg/Kg	4.28	4.28	4.28	4.28	5.37
Vit. B6	1.47	1.47	1.47	1.47	1.84
Riboflavin Mg/Kg	0.71	0.71	0.71	0.71	0.90
Thiamina Mg/Kg	1.45	1.45	1.45	1.45	1.82
Vit. B12 Mg/Kg	---	---	---	---	---
Vit. E Mg/Kg	0.86	0.86	0.86	0.86	1.08
Vit. K Mg/Kg	---	---	---	---	---
Arginina %	2.41	1.93	1.93	1.94	1.60
Glutamina %	0.87	1.70	1.70	1.70	1.09
Histidina %	1.18	0.89	0.89	0.90	0.68

leucina †	1.43	1.48	1.48	1.48	1.28
scina †	2.64	2.48	2.48	2.49	2.20
scina †	2.10	1.76	1.76	1.76	1.26
scina †	0.66	0.64	0.64	0.64	0.63
scina †	0.49	0.57	0.57	0.57	0.62
scina †	1.70	1.57	1.58	1.58	1.46
scinalani †	1.27	1.04	1.04	1.05	0.89
scina †	1.56	1.50	1.50	1.50	1.36
scina †	0.79	1.23	1.23	1.23	0.99
scina †	0.29	0.40	0.40	0.40	0.36
scina †	1.59	1.60	1.60	1.60	1.32
scina se †	99.75	99.76	99.75	99.75	99.77
scitol Mg/Kg	---	---	---	---	---
scila vit †	1.01	1.00	1.01	1.01	1.00
scioxidan †	---	---	---	---	---
sc	39.18	38.20	39.82	39.66	48.24
scolesterol †	0.31	0.25	0.26	0.26	0.25
scfolipid †	5.05	4.21	4.58	4.62	4.19
sc 2w6 †	3.00	2.85	3.17	3.20	2.83
sc 3w3 †	0.39	0.37	0.40	0.40	0.36
sc 5w3 †	0.09	0.30	0.16	0.09	0.07
sc 6w3 †	0.26	1.20	0.56	0.21	0.04
scolina †	---	---	---	---	---
scanina †	0.93	---	---	---	---
sc Aspart †	1.49	---	---	---	---



	TEPUAL, Co	HSA fresca	Harina de	Gluten de	Harina de	Pasta de S	Mezcla vit	Lecitina .	HSA med. o
	mposito 5	.....	TRIGO ...	trigo ...	camaron .	oya .....	aminica .	.....	xidada ..
INGREDIENT	-1-	-2-	-3-	-4-	-5-	-6-	-7-	-8-	-9-
REDONDEADO A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PRECIO \$/KG	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
BASE %	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Humedad %	6.660	0.409	11.850	3.992	8.220	8.000	0.000	2.000	0.368
Energia Kcal/gr	4.670	4.224	3.803	5.131	4.216	4.093	0.000	9.500	4.391
Prot. cruda %	63.098	54.263	11.420	81.334	44.400	47.290	0.000	0.000	58.258
Ext. Etereo %	8.000	8.854	0.790	0.178	12.280	0.290	0.000	98.000	5.709
Fibra crud %	0.000	0.000	0.000	0.120	0.000	3.160	0.000	0.000	0.000
Centiza %	14.700	28.355	0.610	0.723	21.360	6.690	0.000	0.000	21.780
Calcio %	3.725	10.177	0.084	0.043	7.755	0.305	0.000	0.000	7.817
Fosforo %	2.473	5.451	0.504	0.260	1.467	0.640	0.000	3.000	4.187
Potasio %	0.715	0.932	0.392	0.202	0.662	2.001	0.000	0.000	0.716
Cloro %	0.993	1.308	0.252	0.130	0.829	0.041	0.000	0.000	1.004
Magnesio %	0.248	0.298	0.140	0.072	0.430	0.274	0.000	0.000	0.229
Sodio %	0.874	0.958	0.028	0.014	1.251	0.041	0.000	0.000	0.736
Azufre %	0.765	0.880	0.588	0.304	0.000	0.437	0.000	0.000	0.676
Cobre Mg/Kg	8.939	12.947	2.800	1.446	0.000	23.365	0.000	0.000	10.044
Hierro Mg/Kg	216.527	459.629	14.000	7.229	83.687	120.889	0.000	0.000	356.565
Manganeso Mg/Kg	10.926	10.358	8.400	4.337	23.910	29.460	0.000	0.000	8.035
Selenio Mg/Kg	1.341	5.567	0.420	0.217	0.000	30.476	0.000	0.000	4.319
Zinc Mg/Kg	104.291	273.180	16.800	8.675	22.316	43.683	0.000	0.000	211.930
P. C. %	0.000	0.000	0.000	0.000	1.670	0.320	0.000	14.880	0.000
Colina Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	829.000	0.000	2614.000	0.000	0.000	0.000
Cateroles %	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.700	0.000	0.052	0.000
Niacina Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	12.000	0.000	28.000	0.000	0.000	0.000
Ac. Pantot Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	6.100	0.000	16.300	0.000	0.000	0.000
Vit. B6	0.000	0.000	0.000	0.900	0.000	6.000	0.000	0.000	0.000
Riboflavin Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	2.900	0.000	0.000	0.000
Thamina Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	1.800	0.000	5.600	0.000	0.000	0.000
Vit. B12 Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Vit. E Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	2.000	0.000	3.000	0.000	0.000	0.000
Vit. K Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Arginina %	6.220	3.120	0.420	2.989	2.804	3.290	0.000	0.000	3.350
Glicina %	0.000	3.940	0.429	3.059	0.000	1.970	0.000	0.000	4.230
Histidina %	3.480	1.660	0.244	1.738	1.068	1.160	0.000	0.000	1.780
Isoleucina %	2.250	2.170	0.459	3.257	1.869	2.200	0.000	0.000	2.330
Leucina %	4.850	3.500	0.849	6.042	2.982	3.550	0.000	0.000	3.760
Lisina %	6.010	3.550	0.244	1.738	2.415	2.910	0.000	0.000	3.810
Metionina %	1.780	1.330	0.176	1.251	0.912	0.560	0.000	0.000	1.430
Cistina %	0.000	0.380	0.293	2.085	0.657	0.810	0.000	0.000	0.410
Penilalanina %	2.940	2.000	0.586	4.171	1.769	2.290	0.000	0.000	2.150
Tirosina %	3.070	1.600	0.332	2.364	1.480	1.440	0.000	0.000	1.710
Serina %	2.640	2.030	0.576	4.101	0.000	2.290	0.000	0.000	2.170
Treonina %	0.000	2.110	0.322	2.294	1.580	1.800	0.000	0.000	2.260
Triptofano %	0.000	0.520	0.117	0.834	0.401	0.690	0.000	0.000	0.560
Valina %	2.940	2.580	0.488	3.476	2.036	2.190	0.000	0.000	2.770
Materia se %	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Inositol Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Mezcla vit %	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	100.000	0.000	0.000
Antioxidan %	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
EM %	3.040	7.712	75.330	13.653	13.740	34.570	0.000	0.000	13.519
colesterol %	0.270	0.000	0.000	0.000	0.398	0.000	0.000	0.000	0.000
fosfolipid %	3.730	0.471	0.260	0.000	4.530	0.029	0.000	60.000	0.023
18:2w6 %	0.000	0.139	0.057	0.000	0.160	0.018	0.000	43.700	0.067

18.3w3	%	0.056	0.069	0.011	0.000	0.073	0.004	0.000	5.430	0.034
20.5w3	%	0.168	1.137	0.000	0.000	1.387	0.000	0.000	0.000	0.552
22.6w3	%	1.220	5.461	0.000	0.000	0.883	0.000	0.000	0.000	2.654
Prolina	%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Alanina	%	5.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ac. Aspart	%	8.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

INSTITUTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA 05-18-1998  
 GOBIERNO AUTONOMO DE NUEVO LEON 16:44:21

	HSA alta o	Antioxidan	Metionina	SOLVAY ...
	oxidada ..	te .....	.....	.....
INGREDIENT	-10-	-11-	-12-	-13-
REDONDEADO A	0.000	0.000	0.000	0.000
PRECIO \$/KG	0.000	0.000	0.000	0.000
MSE	100.000	100.000	100.000	100.000
Humedad %	0.468	0.000	0.000	0.000
Energia Kcal/gr	4.334	0.000	4.500	0.000
Prot cruda %	57.402	0.000	100.000	0.000
Ext Stereo %	5.201	0.000	0.000	0.000
Fibra crud %	0.000	0.000	0.000	0.000
Ceniza %	21.997	0.000	0.000	0.000
Calcio %	7.895	0.000	0.000	0.000
Fosforo %	4.229	0.000	0.000	0.000
Potasio %	0.723	0.000	0.000	0.000
Cloro %	1.014	0.000	0.000	0.000
Magnesio %	0.231	0.000	0.000	0.000
Sodio %	0.743	0.000	0.000	0.000
Azufre %	0.683	0.000	0.000	0.000
Cobre Mg/Kg	10.044	0.000	0.000	0.000
Hierro Mg/Kg	356.565	0.000	0.000	0.000
Manganeso Mg/Kg	8.035	0.000	0.000	0.000
Selenio Mg/Kg	4.319	0.000	0.000	0.000
Zinc Mg/Kg	211.930	0.000	0.000	0.000
P. C. %	0.000	0.000	0.000	0.000
Colina Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Esteroles %	0.000	0.000	0.000	0.000
Niacina Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Ac. Pantot Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Vit. B6	0.000	0.000	0.000	0.000
Riboflavin Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Thiamina Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Vit. B12 Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Vit. B Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Vit. K Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
Arginina %	3.300	0.000	0.000	0.000
Glicina %	4.170	0.000	0.000	0.000
Histidina %	1.760	0.000	0.000	0.000
Isoleucina %	2.300	0.000	0.000	0.000
Leucina %	3.710	0.000	0.000	0.000
Lisina %	3.760	0.000	0.000	0.000
Metionina %	1.410	0.000	100.000	0.000
Cistina %	0.410	0.000	0.000	0.000
Penilalanina %	2.110	0.000	0.000	0.000
Tirosina %	1.690	0.000	0.000	0.000
Serina %	2.140	0.000	0.000	0.000
Treonina %	2.230	0.000	0.000	0.000
Triptofano %	0.550	0.000	0.000	0.000
Valina %	2.730	0.000	0.000	0.000
Materia se %	100.000	100.000	100.000	0.000

Insitol	Mg/Kg	0.000	0.000	0.000	0.000
niacina vit	%	0.000	0.000	0.000	0.000
nicotinamida	%	0.000	0.000	0.000	0.000
niacina	%	14.466	0.000	0.000	0.000
colesterol	%	0.000	0.000	0.000	97.000
fosfolipid	%	0.007	0.000	0.000	0.000
linoleico	%	0.022	0.000	0.000	0.000
oleico	%	0.011	0.000	0.000	0.000
palmitico	%	0.176	0.000	0.000	0.000
stearico	%	0.847	0.000	0.000	0.000
colina	%	0.000	0.000	0.000	0.000
inulina	%	0.000	0.000	0.000	0.000
ácido aspartico	%	0.000	0.000	0.000	0.000

INSTITUTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA 05-18-1998  
 GOBIERNO AUTÓNOMO DE NUEVO LEÓN 16:46:19

HSA alta o  
 oxidada ..

INGREDIENT		-31-
REDONDEADO A		0.000
PRECIO	\$/KG	0.000
BASE	%	100.000
humedad	%	0.468
Energia	Kcal/gr	4.334
Prot cruda	%	57.402
Carb Etereo	%	5.201
Fibra crud	%	0.000
Omiza	%	21.997
Calcio	%	7.895
Fosforo	%	4.229
Potasio	%	0.723
Cloro	%	1.014
Magnesio	%	0.231
Sodio	%	0.743
Azufre	%	0.683
Cobre	Mg/Kg	10.044
Hierro	Mg/Kg	356.565
Manganeso	Mg/Kg	8.035
Selenio	Mg/Kg	4.319
Zinc	Mg/Kg	211.930
P. C.	%	0.000
Colina	Mg/Kg	0.000
Esteroles	%	0.000
Inulina	Mg/Kg	0.000
ácido Pantot	Mg/Kg	0.000
Vit. B6		0.000
Riboflavin	Mg/Kg	0.000
Thiamina	Mg/Kg	0.000
Vit. B12	Mg/Kg	0.000
Vit. E	Mg/Kg	0.000
Vit. K	Mg/Kg	0.000
Arginina	%	3.300
Glicina	%	4.170
Histidina	%	1.760
Isoleucina	%	2.300
Leucina	%	3.710
Lisina	%	3.760
Metionina	%	1.410
Valina	%	0.410

INGREDIENTE LIST 37  
bioens dic 96, tesis, control  
05-08-1998 08:54:47

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

	INGREDIENTES	MINIMO (en base hum.)	MAXIMO (en base hum.)
1	TEPUAL, Composito 5	18.220 %	18.225 %
3	Harina de TRIGO	---	---
4	Gluten de trigo	8.000 %	8.002 %
5	Harina de camaron	4.000 %	4.010 %
6	Pasta de Soya	23.270 %	---
7	Mezcla vitaminica	1.000 %	1.010 %
9	Lecitina	6.381 %	6.382 %
13	Antioxidante	0.025 %	0.026 %
28	SOLVAY	0.250 %	0.256 %

9 INGREDIENTES  
15 RESTRICCIONES

INGREDIENTE LIST 40  
bioens dic 96, tesis, fresca  
05-08-1998 08:54:48

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

	INGREDIENTES	MINIMO (en base hum.)	MAXIMO (en base hum.)
2	HSA fresca	21.400 %	21.404 %
1	Harina de TRIGO	---	---
4	Gluten de trigo	8.000 %	8.002 %
5	Harina de camaron	4.000 %	4.010 %
6	Pasta de Soya	23.270 %	---
7	Mezcla vitaminica	1.000 %	1.010 %
9	Lecitina	6.380 %	6.381 %
15	Metionina	0.026 %	0.026 %
13	Antioxidante	0.025 %	0.025 %
28	SOLVAY	0.250 %	0.250 %

10 INGREDIENTES  
17 RESTRICCIONES

INGREDIENTE LIST 41  
bioens dic 96, tesis, med oxid  
05-08-1998 08:54:48

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

	INGREDIENTES	MINIMO (en base hum.)	MAXIMO (en base hum.)
30	HSA med. oxidada	19.820 %	19.824 %
3	Harina de TRIGO	---	---
4	Gluten de trigo	8.000 %	8.002 %
5	Harina de camaron	4.000 %	4.010 %
6	Pasta de Soya	23.270 %	23.275 %
7	Mezcla vitaminica	1.000 %	1.010 %
9	Lecitina	6.380 %	6.381 %
15	Metionina	0.074 %	0.074 %
13	Antioxidante	0.025 %	0.025 %
28	SOLVAY	0.250 %	0.251 %

10 INGREDIENTES  
18 RESTRICCIONES

INGREDIENTE LIST 42  
bioens dic 96, tesis, alta oxi  
05-08-1998 08:54:48

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

INGREDIENTES		MINIMO	MAXIMO
		(en base hum.)	(en base hum.)
31	HSA alta oxidada	20.300 %	20.304 %
3	Harina de TRIGO	---	---
4	Gluten de trigo	8.000 %	8.002 %
5	Harina de camaron	4.000 %	4.010 %
6	Pasta de Soya	23.270 %	23.275 %
7	Mezcla vitaminica	1.000 %	1.010 %
9	Lecitina	6.380 %	6.381 %
15	Metionina	0.026 %	0.027 %
13	Antioxidante	0.025 %	0.025 %
28	SOLVAY	0.250 %	0.250 %

10 INGREDIENTES  
18 RESTRICCIONES

INGREDIENTES		MINIMO	MAXIMO
		(en base hum.)	(en base hum.)
4	Harina de TRIGO	45.020 %	---
4	Gluten de trigo	10.030 %	---
5	Harina de camaron	5.018 %	---
6	Pasta de Soya	29.196 %	---
7	Mezcla vitaminica	1.267 %	---
9	Lecitina	9.074 %	---
15	Metionina	0.031 %	---
13	Antioxidante	0.031 %	---
28	SOLVAY	0.313 %	---

LIST 43 (bioens dic 96, tesis, alta oxi) 9 INGREDIENTES 9 RESTRICCIONES

INGREDIENTE LIST 43  
bioens dic 96, tesis, alta oxi  
05-08-1998 09:44:04

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA - MARICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

**Anexo 9. Datos en bruto del bioensayo (14 y 28 días) y análisis estadístico: consumo promedio por organismo, tasa de crecimiento, TCA y sobrevivencia**

<b>Dieta</b>	<b>Consumo/Org. 14 (g)</b>	<b>Incremento en Peso14 (%)</b>	<b>Tasa de Crecimiento 14 (%)</b>	<b>TCA 14</b>	<b>Sobrev. 14 (%)</b>
<b>BASE</b>	0.614	0.20	38.60	3.10	100
	0.526	0.14	28.82	3.63	90
	0.519	0.17	33.40	3.03	100
	0.495	0.19	38.80	2.55	100
<b>HPCH</b>	0.817	0.38	72.10	2.13	90
	0.801	0.34	65.40	2.33	90
	0.812	0.35	66.67	2.29	100
	0.741	0.42	83.57	1.75	90
<b>HSAF</b>	0.801	0.28	52.05	2.87	100
	0.762	0.29	57.56	2.60	100
	0.806	0.34	64.55	2.37	90
	0.819	0.34	64.31	2.43	100
<b>HSAMO</b>	0.629	0.24	48.15	2.58	90
	0.752	0.35	69.17	2.13	90
	0.739	0.33	64.01	2.25	100
	0.837	0.39	75.27	2.13	90
<b>HSAAO</b>	0.779	0.32	61.52	2.47	100
	0.659	0.29	58.10	2.24	100
	0.670	0.28	53.50	2.37	100
	0.711	0.31	59.00	2.31	90

**Análisis de datos a los 14 días**

Variable C\_ORG14  
By Variable DIETA

*Analysis of Variance*

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	1783	0446	15.1220	.0000
Within Groups	15	.0442	.0029		
Total	19	.2225			

Group	Count	Standard Mean	Standard Deviation	Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	.5385	.0520	.0260	.4557 TO 6213
Grp 2	4	.7924	.0352	.0176	.7364 TO .8485
Grp 3	4	.7971	.0246	.0123	.7579 TO 8363
Grp 4	4	.7393	.0853	.0426	.6036 TO 8749
Grp 5	4	.7048	.0540	.0270	.6188 TO 7907
Total	20	.7144	.1082	.0242	.6638 TO .7651

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.4954	.6141
Grp 2	.7405	.8166
Grp 3	.7619	.8190
Grp 4	.6292	.8369
Grp 5	.6590	.7785
TOTAL	.4954	.8369

**Levene Test for Homogeneity of Variances**

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
.7657	4	15	.564

----- O N E W A Y -----

Variable C\_ORG14  
By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0384 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	1	5	4	2	3
.5385	Grp 1					
.7048	Grp 5	*				
.7393	Grp 4	*				
.7924	Grp 2	**	*			
.7971	Grp 3	**	*	*		

<b>Dietas:</b> Grupo 1: Base Grupo 2: Harina Chilena. Tepual Grupo 3: HSA fresca Grupo 4: HSA medianamente oxidada Grupo 5: HSA altamente oxidada
--

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1			
Group	Grp 1		
Mean	.5385		
-----			
Subset 2			
Group	Grp 5	Grp 4	
Mean	.7048	.7393	
-----			
Subset 3			
Group	Grp 4	Grp 2	Grp 3
Mean	.7393	.7924	.7971

----- ONEWAY -----  
 Variable FC14  
 By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	3070.7592	767.6898	14.0328	.0001
Within Groups	15	820.6032	54.7069		
Total	19	3891.3624			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	34.9032	4.7651	2.3826	27.3210 TO 42.4855
Grp 2	4	71.9344	8.2862	4.1431	58.7494 TO 85.1195
Grp 3	4	59.6208	5.9964	2.9982	50.0794 TO 69.1623
Grp 4	4	64.1485	11.6179	5.8089	45.6621 TO 82.6349
Grp 5	4	58.0318	3.3518	1.6759	52.6984 TO 63.3652
Total	20	57.7278	14.3111	3.2001	51.0299 TO 64.4256

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	28.8181	38.8000
Grp 2	65.3992	83.5749
Grp 3	52.0522	64.5543
Grp 4	48.1481	75.2709
Grp 5	53.4972	61.5234

TOTAL 28.8181 83.5749

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1.1517	4	15	.371

----- ONEWAY -----  
 Variable TC14  
 By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq 5.2301 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	1	5	3	4	2
34.9032	Grp 1					
58.0318	Grp 5	*				
59.6208	Grp 3	*	*			
64.1485	Grp 4	*	*	*		
71.9344	Grp 2	***	***	***	*	

Dietas:
Grupo 1: Base
Grupo 2: Harina Chilena, Tepual
Grupo 3: HSA fresca
Grupo 4: HSA medianamente oxidada
Grupo 5: HSA altamente oxidada

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1
Mean	34.9032

Subset 2

Group	Grp 5	Grp 3	Grp 4
Mean	58.0318	59.6208	64.1485

Subset 3

Group	Grp 4	Grp 2
Mean	64.1485	71.9344



Variable TCA14  
By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	2.2262	.5566	7.5186	.0016
Within Groups	15	1.1104	.0740		
Total	19	3.3366			

Group	Count	Standard Mean	Standard Deviation	Error	95 Per Cent Confidence Interval for Mean
Grp 1	4	3.0808	.4423	.2211	2.3771 TO 3.7845
Grp 2	4	2.1254	.2642	.1321	1.7049 TO 2.5458
Grp 3	4	2.5691	.2230	.1115	2.2143 TO 2.9239
Grp 4	4	2.2693	.2132	.1066	1.9301 TO 2.6086
Grp 5	4	2.3477	.0976	.0488	2.1924 TO 2.5031
Total	20	2.4785	.4191	.0937	2.2823 TO 2.6746

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	2.5536	3.6341
Grp 2	1.7511	2.3289
Grp 3	2.3749	2.8711
Grp 4	2.1260	2.5775
Grp 5	2.2415	2.4715
TOTAL	1.7511	3.6341

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
.8571	4	15	.512

----- ONEWAY -----

Variable TCA14  
By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq .1924 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	2	4	5	3	1
2.1254	Grp 2					
2.2693	Grp 4					
2.3477	Grp 5					
2.5691	Grp 3	*				
3.0808	Grp 1	****				

Diets:
Grupo 1: Base
Grupo 2: Harina Chilena, Tepual
Grupo 3: HSA fresca
Grupo 4: HSA medianamente oxidada
Grupo 5: HSA altamente oxidada

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Group	Grp 2	Grp 4	Grp 5
Mean		2.1254	2.2693	2.3477
-----				
Subset 2	Group	Grp 4	Grp 5	Grp 3
Mean		2.2693	2.3477	2.5691
-----				
Subset 3	Group	Grp 1		
Mean		3.0808		

-----ONEWAY-----  
 Variable SOBREV14  
 By Variable DIETA

*Analysis of Variance*

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	Prob.
Between Groups	4	120 0000	30 0000	1.2000	.3513
Within Groups	15	375 0000	25.0000		
Total	19	495 0000			

Group	Count	Standard Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	97.5000	5.0000	2.5000	89.5440 TO 105.4560
Grp 2	4	92.5000	5.0000	2.5000	84.5440 TO 100.4560
Grp 3	4	97.5000	5.0000	2.5000	89.5440 TO 105.4560
Grp 4	4	92.5000	5.0000	2.5000	84.5440 TO 100.4560
Grp 5	4	97.5000	5.0000	2.5000	89.5440 TO 105.4560
Total	20	95.5000	5.1042	1.1413	93.1112 TO 97.8888

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	90.0000	100.0000
Grp 2	90.0000	100.0000
Grp 3	90.0000	100.0000
Grp 4	90.0000	100.0000
Grp 5	90.0000	100.0000
TOTAL	90.0000	100.0000

-----ONEWAY-----  
 Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
.0000	4	15	1.000

-----ONEWAY-----  
 Variable SOBREV14  
 By Variable DIETA  
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq 3.5355 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5	
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31	- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Grp 2	Grp 4	Grp 1	Grp 3	Grp 5
Mean	92.5000	92.5000	97.5000	97.5000	97.5000

-----ONEWAY-----  
 Variable IPESO14  
 By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	0880	0220	15.7029	.0000
Within Groups	15	0210	0014		
Total	19	1090			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	.1769	.0246	.0123	.1378 TO .2160
Grp 2	4	.3761	.0354	.0177	.3198 TO .4325
Grp 3	4	.3121	.0307	.0154	.2632 TO .3610
Grp 4	4	.3301	.0632	.0316	.2295 TO .4306
Grp 5	4	.3000	.0143	.0072	.2772 TO .3228
Total	20	.2990	.0757	.0169	.2636 TO .3345

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.1447	.1980
Grp 2	.3440	.4229
Grp 3	.2790	.3396
Grp 4	.2441	.3937
Grp 5	.2830	.3150
TOTAL	.1447	.4229

-----ONEWAY-----  
 Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1.4650	4	15	.262

-----ONEWAY-----  
 Variable IPESO14  
 By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq .0265 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	1	5	3	4	2
.1769	Grp 1					
.3000	Grp 5	*				
.3121	Grp 3	*	*			
.3301	Grp 4	*	*	*		
.3761	Grp 2	***	**	*	*	

**Dietas:**  
 Grupo 1: Base  
 Grupo 2: Harina Chilena, Tepual  
 Grupo 3: HSA fresca  
 Grupo 4: HSA medianamente oxidada  
 Grupo 5: HSA altamente oxidada

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1
Mean	.1769

Subset 2

Group	Grp 5	Grp 3	Grp 4
Mean	.3000	.3121	.3301

Subset 3

Group	Grp 4	Grp 2
Mean	.3301	.3761

Dieta	Consumo/Org. 28 (g)	Incremento en Peso28 (%)	Tasa de Crecimiento 28 (%)	TCA 28	Sobrev. 28 (%)
BASE	1.19	0.38	74.57	3.11	90
	0.99	0.41	82.60	2.40	90
	1.01	0.31	59.77	3.29	100
	0.97	0.33	66.75	2.92	80
HPCH	1.63	0.75	140.81	2.17	90
	1.59	0.69	131.73	2.30	90
	1.63	0.77	145.57	2.11	100
	1.59	0.87	172.73	1.82	80
HSAF	1.45	0.64	119.53	2.27	90
	1.42	0.48	93.71	2.98	100
	1.52	0.62	117.11	2.46	100
	1.45	0.54	103.99	2.66	90
HSAMO	1.14	0.65	126.35	1.76	90
	1.40	0.54	104.06	2.60	90
	1.35	0.34	68.53	3.95	90
	1.60	0.73	139.22	2.19	90
HSAAO	1.36	0.53	103.78	2.56	90
	1.21	0.57	111.68	2.14	90
	1.24	0.46	87.15	2.70	100
	1.40	0.47	89.66	3.00	90

**Análisis de datos a los 28 días**

Variable C\_ORG28  
By Variable DIETA

*Analysis of Variance*

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	7095	1774	15.9306	.0000
Within Groups	15	1670	.111		
Total	19	8765			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean	
Grp 1	4	1.0413	.1011	.0506	.8805	TO 1.2022
Grp 2	4	1.6104	.0228	.0114	1.5741	TO 1.6467
Grp 3	4	1.4599	.0411	.0205	1.3945	TO 1.5253
Grp 4	4	1.3715	.1865	.0932	1.0748	TO 1.6682
Grp 5	4	1.3049	.0920	.0460	1.1585	TO 1.4513
Total	20	1.3576	.2148	.0480	1.2571	TO 1.4581

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.9730	1.1916
Grp 2	1.5885	1.6320
Grp 3	1.4199	1.5175
Grp 4	1.1437	1.5973
Grp 5	1.2102	1.4020
TOTAL	.9730	1.6320

**Levene Test for Homogeneity of Variances**  
Statistic dfl df2 2-tail Sig.  
2.1810 4 15 .121

----- ONE WAY -----

Variable C\_ORG28  
By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$MEAN(J)-MEAN(I) \geq .0746 * RANGE * SQRT(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	1	5	4	3	2
1.0413	Grp 1					
1.3049	Grp 5	*				
1.3715	Grp 4	*	*			
1.4599	Grp 3	*	*	*		
1.6104	Grp 2	***	***	***	*	

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1
Mean	1.0413

Subset 2

Group	Grp 5	Grp 4	Grp 3
Mean	1.3049	1.3715	1.4599

Subset 3

Group	Grp 3	Grp 2
Mean	1.4599	1.6104

Variable TC28  
By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	12190.6704	3047.6676	9.2494	.0006
Within Groups	15	4942.4645	329.4976		
Total	19	17133.1349			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Per Cent Conf Int for Mean
Grp 1	4	70.9227	9.8597	4.9298	55.2340 TO 86.6114
Grp 2	4	147.7100	17.6395	8.8198	119.6420 TO 175.7780
Grp 3	4	108.5843	12.0379	6.0190	89.4296 TO 127.7390
Grp 4	4	109.5396	30.9550	15.4775	60.2840 TO 158.7952
Grp 5	4	98.0647	11.6619	5.8309	79.5083 TO 116.6211
Total	20	106.9643	30.0291	6.7147	92.9102 TO 121.0183

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	59.7656	82.6029
Grp 2	131.7279	172.7273
Grp 3	93.7132	119.5274
Grp 4	68.5343	139.2182
Grp 5	87.1456	111.6820
TOTAL	59.7656	172.7273

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1.9827	4	15	.149

----- ONE WAY -----

Variable TC28  
By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq 12.8355 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	1	5	3	4	2
70.9227	Grp 1					
98.0647	Grp 5					
108.5843	Grp 3	*				
109.5396	Grp 4	*				
147.7100	Grp 2	****				

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1	Grp 5
Mean	70.9227	98.0647

Subset 2

Group	Grp 5	Grp 3	Grp 4
Mean	98.0647	108.5843	109.5396

Subset 3

Group	Grp 2
Mean	147.7100

-----ONEWAY-----  
 Variable TCA28  
 By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	1.4174	.3543	1.3555	.2957
Within Groups	15	3.9213	.2614		
Total	19	5.3387			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	2.9293	.3855	.1928	2.3158 TO 3.5427
Grp 2	4	2.1003	.2041	.1020	1.7756 TO 2.4250
Grp 3	4	2.5921	.3031	.1516	2.1097 TO 3.0744
Grp 4	4	2.6271	.9481	.4740	1.1185 TO 4.1357
Grp 5	4	2.6005	.3550	.1775	2.0356 TO 3.1653
Total	20	2.5698	.5301	.1185	2.3218 TO 2.8179

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	2.3981	3.2887
Grp 2	1.8175	2.2991
Grp 3	2.2661	2.9768
Grp 4	1.7605	3.9527
Grp 5	2.1415	2.9958
TOTAL	1.7605	3.9527

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1.8534	4	15	.171

-----ONEWAY-----  
 Variable TCA28  
 By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq .3615 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1

Group	Grp 1
Mean	2.9293

Subset 2

Group	Grp 2	Grp 3	Grp 5	Grp 4
Mean	2.1003	2.5921	2.6005	2.6271

----- ONE WAY -----  
 Variable SOBREV28  
 By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	80.0000	20.0000	5217	.7213
Within Groups	15	575.0000	38.3333		
Total	19	655.0000			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	90.0000	8.1650	4.0825	77.0079 TO 102.9921
Grp 2	4	90.0000	8.1650	4.0825	77.0079 TO 102.9921
Grp 3	4	95.0000	5.7735	2.8868	85.8132 TO 104.1868
Grp 4	4	90.0000	.0000	.0000	90.0000 TO 90.0000
Grp 5	4	92.5000	5.0000	2.5000	84.5440 TO 100.4560
Total	20	91.5000	5.8714	1.3129	88.7521 TO 94.2479

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	80.0000	100.0000
Grp 2	80.0000	100.0000
Grp 3	90.0000	100.0000
Grp 4	90.0000	90.0000
Grp 5	90.0000	100.0000
TOTAL	80.0000	100.0000

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
1.2857	4	15	.319

----- ONE WAY -----  
 Variable SOBREV28  
 By Variable DIETA

Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq 4.3780 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5	
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31	- No two groups are significantly different at the .050 level

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1	Group	Grp 1	Grp 2	Grp 4	Grp 5	Grp 3
Mean		90.0000	90.0000	90.0000	92.5000	95.0000



----- ONE WAY -----  
 Variable IPESO28  
 By Variable DIETA

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	4	.3527	.0882	9.9291	.0004
Within Groups	15	.1332	.0089		
Total	19	.4859			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	.3592	.0486	.0243	.2818 TO .4367
Grp 2	4	.7723	.0757	.0378	.6518 TO .8927
Grp 3	4	.5696	.0739	.0370	.4520 TO .6872
Grp 4	4	.5640	.1683	.0841	.2963 TO .8318
Grp 5	4	.5064	.0503	.0252	.4262 TO .5865
Total	20	.5543	.1599	.0358	.4795 TO .6291

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM
Grp 1	.3060	.4147
Grp 2	.6929	.8740
Grp 3	.4770	.6407
Grp 4	.3404	.7281
Grp 5	.4610	.5651
TOTAL	.3060	.8740

Levene Test for Homogeneity of Variances

Statistic	df1	df2	2-tail Sig.
2.2434	4	15	.113

----- ONE WAY -----  
 Variable IPESO28  
 By Variable DIETA  
 Multiple Range Tests: Duncan test with significance level .05

The difference between two means is significant if

$$\text{MEAN}(J) - \text{MEAN}(I) \geq .0666 * \text{RANGE} * \text{SQRT}(1/N(I) + 1/N(J))$$

with the following value(s) for RANGE:

Step	2	3	4	5
RANGE	3.01	3.16	3.26	3.31

(\*) Indicates significant differences which are shown in the lower triangle

Mean	DIETA	1	5	4	3	2
.3592	Grp 1					
.5064	Grp 5	*				
.5640	Grp 4	*	*			
.5696	Grp 3	*	*	*		
.7723	Grp 2	*****	*****	*****	*****	

Homogeneous Subsets (highest and lowest means are not significantly different)

Subset 1  
 Group Grp 1  
 Mean .3592

Subset 2  
 Group Grp 5 Grp 4 Grp 3  
 Mean .5064 .5640 .5696

Subset 3  
 Group Grp 2  
 Mean .7723

