

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DEL DETERIORO DE ALIMENTOS DE  
MANTENIMIENTO PARA HURONES MEDIANTE LA  
CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**ARMIN ROLF FREHOFF MIRANDA**

ASESORES:

MVZ MPA DrC CARLOS GUTIERREZ OLVERA

MVZ MARÍA ROCÍO RIVERA NAVA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

Para mi madre (q.e.p.d), quien me mostró el camino correcto, quien me apoyó desde pequeño en mi decisión de volverme MVZ. Quien me enseñó a amar y a cuidar de quienes no pueden cuidarse solos.

A mi padre, quien me inculcó valores y su importancia, me enseñó a no rendirme y apreciar las cosas importantes en la vida.

A Moritz Bühlmann, quien despertó la pasión por la bioquímica y biología y me impulsó siempre en la dirección correcta, enseñándome a pensar para encontrar solución a los problemas que se presenten.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi hermana Dagmar, que siempre estuvo al pendiente y apoyando (a su manera) en todo momento.

A Adriana, mi pilar de apoyo incondicional. Gracias por creer en mí, tenerme paciencia y motivarme a ser mejor cada día.

A mis amigos, que con su ejemplo me enseñan a apuntar hacia arriba y aspirar a grandes logros.

A Maria Elena, quien me ha apoyado e impulsado siempre a volverme mejor ser humano.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera, a quien aparte de mi mentor, considero mi amigo. Gracias por todas las enseñanzas y recordarme constantemente por qué somos MVZ y con qué podemos contribuir para hacer una diferencia. Gracias por la enorme paciencia que requirió durante todos estos años y por todas las experiencias con su hermosa familia.

A Rocío Rivera Nava, gracias por las enseñanzas durante la carrera y sin su ayuda y asesoría no se hubiera logrado este trabajo.

A la Facultad, que nos facilitó adquirir muchos conocimientos y que fácilmente se vuelve nuestro segundo hogar.

A la Dra. Guadalupe Sánchez Gonzalez por el apoyo en la realización y comprensión del análisis estadístico de este trabajo.

A mis compañeras Paulina Gutiérrez y Tania Pardo. Gracias por sus múltiples horas de apoyo y por todas sus porras.

Al DNAyB y a todo su personal académico, quienes realizan su trabajo de manera profesional y con calidad y contagian a quienes les rodean.

Gracias al apoyo del programa UNAM-DGAPA-PAPIME PE204811, por ayudar al desarrollo del conocimiento en nutrición en animales de compañía y así mejorar su calidad de vida.

# CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
I.1. Degradación oxidativa y antioxidantes.....	3
I.2. Determinación de la estabilidad de la grasa.....	8
I.3. Deficiencia de lípidos.....	9
II. JUSTIFICACIÓN.....	11
III. HIPÓTESIS.....	11
IV. OBJETIVOS.....	11
IV.1. Objetivo general.....	11
IV.2. Objetivos específicos.....	12
V. METARIAL Y MÉTODOS.....	12
V.1. Análisis químico proximal.....	13
V.2. Índice de peróxidos.....	17
V.3. Análisis estadístico.....	19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
VI.1. Análisis garantizado.....	21
VI.2. Índice de peróxidos.....	22
VII. CONCLUSIONES.....	28
VIII. RECOMENDACIONES.....	29
IX. LITERATURA CITADA.....	31
ANEXO I.....	33

## Índice de figuras

Figura 1. Reacción de oxidación .....	4
Figura 2. . Primer muestreo (día 0).....	23
Figura 3. Alimento 5, muestreos del día 2.....	23
Figura 4. Índice de peróxidos en el alimento cinco a través del tiempo.....	25
Figura 5. Alimento 3, muestreo día 28.....	26
Figura 6. Alimento 3, muestreo día 15.....	26
Figura 7. Alimento 4 (A IV') y alimento 2 (G IV').....	27
Figura 8. Alimento 1, efecto del colorante del alimento.....	27
Figura 9. . Alimento 1, sin efecto del colorante.....	28
Figura 10. Alimento 5.....	28

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Antioxidantes más utilizados en los alimentos para animales.....	8
Cuadro 2. Análisis garantizado exhibido en las etiquetas de los alimentos utilizados para hurón ( <i>Mustela putorius furo</i> ) en Materia Seca (MS).....	20
Cuadro 3. : Resultados obtenidos del Análisis Químico Proximal de los dos alimentos utilizados para hurón ( <i>Mustela putorius furo</i> ) en Materia Seca (MS).....	21
Cuadro 4. Media y desviación estándar en índice de peróxidos para muestra alimento cinco.....	24

## RESUMEN

FREHOFF MIRANDA ARMIN ROLF. Evaluación del deterioro de alimentos de mantenimiento para hurones mediante la concentración de peróxidos (bajo la dirección de MVZ MC DrC Carlos Gutiérrez Olvera y MVZ Rivera Nava María Rocío).

El hurón ha ganado popularidad en los últimos años y esto ha llevado a que diversas compañías elaboren alimento comercial para esta especie. Estos alimentos, idealmente, contienen un alto porcentaje de grasa, por lo que de no ser almacenados adecuadamente se oxidarán, perdiendo cualidades tanto nutritivas como de palatabilidad. Este trabajo buscó evaluar dicho deterioro mediante la técnica de índice de peróxidos. Se realizó en los laboratorios del departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, se utilizaron 5 diferentes lotes de 6 presentaciones de diferentes marcas de alimento para hurón. Se tomó una muestra de 250g de cada empaque y se colocaron en charolas de aluminio expuestos al medio ambiente. El resto del alimento se mantuvo dentro del empaque original cerrado en un lugar fresco y seco como lo indica el fabricante. Se determinó el índice de peróxidos tanto en los expuestos al medio ambiente como en los conservados en su empaque original de los días 0 al 10,15 y 28. Al día 2 se encontraron peróxidos en todos los lotes del alimento cinco, mismos que continuaron hasta el día 6. Debido a los colorantes presentes en el alimento uno, se obtuvieron resultados poco confiables, por lo que se realizó un segundo muestreo donde se descartó la presencia de peróxidos. Se determinó una diferencia estadísticamente significativa en relación al tiempo, mas no con el tratamiento, mostrándose con esto que el alimento se peroxida a través del tiempo sin importar la marca. No se demostró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la interacción de tiempo y tratamiento, aunque se puede atribuir al tipo de empaque. En este trabajo se pudo concluir que es importante que los alimentos no tarden demasiado tiempo en consumirse una vez abiertos, con el fin de evitar la degradación de los lípidos, lo cual traería como consecuencia deficiencia de algunos nutrientes en el animal y problemas de salud, además de promover el rechazo del alimento y pérdidas económicas importantes para el propietario. A su vez, se determinó que la técnica de peróxidos por sí sola no es suficiente para poder demostrar el grado de rancidez de las grasas, por lo que se debe de complementar con otras técnicas.

# **EVALUACIÓN DEL DETERIORO DE ALIMENTOS PREMIUM DE MANTENIMIENTO PARA HURONES MEDIANTE LA CONCENTRACIÓN DE PERÓXIDOS**

## **I. INTRODUCCIÓN**

A lo largo de miles de años el hombre ha domesticado diversas especies de animales para su beneficio, algunas de éstas han ganado popularidad, tal es el caso del hurón (*Mustela putorius furo*). Al ser considerado un buen compañero y amigo para el humano, esta especie como animal de compañía, ha tomado valor significativo en nuestros días, y las personas se preocupan más por el alimento que les puede ofrecer. Tal razón, ha impulsado a compañías a elaborar alimentos comerciales para animales de compañía no convencionales, a fin de nutrirlos adecuadamente y complacer a los propietarios de este tipo de animales.<sup>1,2,3</sup>

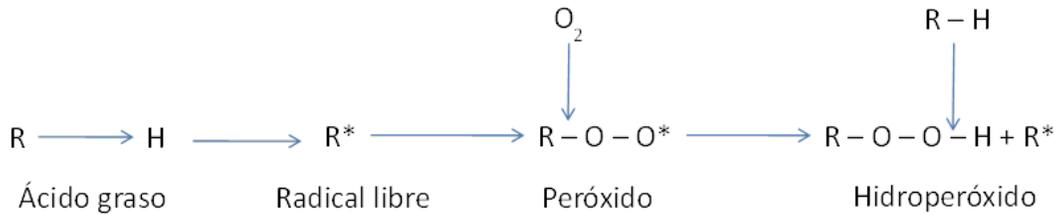
Un reto al que se enfrentan los propietarios de animales no convencionales y las compañías que elaboran su alimento, son los hábitos alimenticios de estos. En este caso, el hurón al ser carnívoro estricto, requiere de 32-38% de proteína y 15-20% de grasa. La proteína debe ser siempre de origen animal. Los alimentos comerciales para hurones deben aportar la cantidad de proteína, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales que aseguren su crecimiento, desarrollo, salud y calidad de vida.<sup>2,3,4</sup>

Hoy día, es posible encontrar hurones que son alimentados con dietas caseras, a base de huevo, pollo, vísceras, complementos de vitaminas y minerales. Sin embargo, son cada vez más las empresas que producen alimento balanceado específico para hurones.

### **I.1. Degradación oxidativa y antioxidantes en los alimentos comerciales para hurones**

Un nutriente básico de los alimentos secos que requiere protección durante el almacenamiento, son los lípidos, que pueden degradarse al exponerse a agentes oxidantes. La oxidación de éstos no tiene lugar durante el proceso de extrusión debido al breve tiempo de exposición al calor, por lo que esta degradación tiene lugar durante el almacenamiento. La abundancia de grasas en los alimentos secos, especialmente en los alimentos para hurón, hace necesario desarrollar métodos antioxidantes para su protección, pues contiene aceites vegetales, grasas animales y vitaminas liposolubles susceptibles a degradación por oxidación.<sup>4,5</sup>

La degradación oxidativa, conocida también como peroxidación lipídica, se produce en tres fases: inicio, propagación y finalización. La fase de inicio comienza cuando un radical libre, a base de oxígeno, actúa sobre un ácido graso poliinsaturado (AGP o PUFA por sus siglas en inglés), dando lugar a un radical de ácido graso. La exposición de grasa al calor, la radiación ultravioleta o iones metálicos como el hierro y cobre, aceleran este proceso. Posteriormente el radical ácido graso sigue reaccionando con el oxígeno, dando lugar a la formación de radicales peroxilo, que reaccionan con otros ácidos grasos formando más radicales de ácidos grasos e hidroperóxidos. Esta segunda fase se denomina propagación, ya que la reacción se autocataliza y progresa potencialmente. La reacción finaliza al ser oxidados todos los ácidos grasos y vitaminas liposolubles disponibles. La degradación subsiguiente de los hidroperóxidos produce ácidos, cetonas y aldehídos que van a conferirle al alimento mal olor, sabor y provocan cambios en la textura del mismo. Esta oxidación también provoca pérdida del contenido calórico y la aparición de formas tóxicas de peróxidos que pueden ser nocivas para la salud animal.<sup>5,6,7,8</sup>



**Figura 1.** Reacción de oxidación. Case y Carey, 2001.

El sabor y olor desagradable que adquiere la mayor parte de las grasas al sufrir peroxidación lipídica se denomina “rancidez”. Este proceso se acelera por la presencia de enzimas lipolíticas (lipasas) presentes en las grasas, que producen hidrólisis de las mismas en presencia de humedad y temperatura.<sup>4,8</sup>

La rancidez de los ácidos grasos poliinsaturados del alimento es un proceso donde hay modificación o destrucción de AGP, entre ellos los ácidos grasos esenciales (AGE), éstos junto a vitaminas D, E y biotina, pierden actividad; lo que provoca que no se absorban a nivel intestinal y no participen en los procesos metabólicos del organismo.<sup>4,7</sup>

Factores que incrementan en menor o mayor medida el proceso de oxidación de lípidos:

- Composición de ácidos grasos en alimento:
  - Número de dobles enlaces: los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados se oxidan a mayor velocidad, los dobles enlaces son altamente susceptibles a la acción del oxígeno.<sup>7</sup>
  - Posición de los dobles enlaces: los ácidos grasos con enlaces conjugados dobles, se oxidan más rápidamente que los dobles enlaces no conjugados.<sup>7</sup>
  - Composición en ácidos grasos de los triacilglicéridos: la velocidad relativa de oxidación de los triacilglicéridos corresponde a la suma de las velocidades de oxidación de sus tres ácidos grasos.<sup>7</sup>

- Temperatura: toda reacción química se ve acelerada por efecto de temperatura. Situación importante en almacenamiento con productos ricos en grasa.<sup>6</sup>
- Concentración y actividad de los pro oxidantes y antioxidantes que contenga el alimento.<sup>7</sup>
- Presión parcial de oxígeno.<sup>7</sup>
- Superficie del alimento que entre en contacto con oxígeno.<sup>7</sup>
- Condiciones de almacenamiento: temperatura, humedad, permeabilidad al oxígeno del empaque, presencia de iones metálicos, etc.<sup>7</sup>

En la formulación de alimentos comerciales para animales, los fabricantes incluyen antioxidantes para retrasar el proceso de peroxidación lipídica. La FDA (Food and Drugs Administration) define a los antioxidantes como sustancias que ayudan a la conservación del alimento retrasando el deterioro, rancidez o decoloración resultante de procesos de oxidación.<sup>23</sup> Estos compuestos no corrigen los efectos de oxidación una vez iniciados, sino que retrasan el proceso oxidativo y evitan el deterioro de las grasas del alimento. Para que este sea eficaz, se deben incluir en la mezcla y proceso inicial del alimento.<sup>7</sup>

Los antioxidantes se clasifican en dos: los naturales y los sintéticos (Cuadro 1). Los naturales se encuentran en cereales, frutas, verduras y aceites vegetales. La vitamina E es el antioxidante natural más abundante, ésta funciona como antioxidante de tejidos corporales y ejerce la misma función protegiendo grasas de los alimentos de la peroxidación. En la naturaleza, la vitamina E o tocoferoles se presentan en varias formas. La mezcla de tocoferoles, que contenga delta y gamma tocoferol proporciona los antioxidantes naturales más eficaces en la protección de grasas animales presentes en alimentos para hurón, en

comparación con el alfa tocoferol, ya que éste tiene un escaso valor como antioxidante alimentario.<sup>7,8</sup>

Otro antioxidante natural que puede incluirse en alimentos para animales es el ácido ascórbico (vitamina C). Éste funciona atrapando oxígeno. Sin embargo, es un compuesto hidrosoluble y no se disuelve fácilmente en la fracción lipídica de los alimentos, lo que limita su función como antioxidante de grasas en alimentos para hurón. Se ha observado que la vitamina C tiene acción sinérgica con otros antioxidantes como vitamina E e hidroxitolueno butilado (BHT), y se incluyen frecuentemente en alimentos para animales con este fin.<sup>7</sup>

El uso de antioxidantes naturales en alimentos comerciales para animales es limitado, debido a que la mayoría de estos compuestos no soporta las condiciones del proceso (temperatura, presión y humedad), deben incluirse en exceso en el alimento para compensar su pérdida durante éste. Esta adición es ineficaz y aumenta el costo de producción.<sup>7,8</sup>

La luteína es una xantina que actúa como antioxidante natural, pertenece al grupo de carotenoides no puede ser convertida en el organismo a vitamina A, recientemente se ha estudiado su mecanismo de acción y efectividad ante los procesos oxidativos. Se cree que actúa en la cascada de regeneración de la molécula de otros antioxidantes naturales como vitamina A y E, es considerada como un potente antioxidante natural, en alimentos para animales de compañía se utiliza flor de cempasúchil y romero como fuentes naturales de luteína.<sup>7</sup>

Los antioxidantes sintéticos de los alimentos para animales incluyen el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), la butilhidroquinina terciaria (TBHQ) y la etoxiquinina. El BHA y el BHT son los antioxidantes sintéticos más comunes que se utilizan hoy día. Tienen un efecto antioxidante sinérgico cuando se utilizan conjuntamente,

soportan el proceso del alimento y tienen una elevada eficacia en protección de grasas animales, aunque su eficacia es algo menor cuando se utilizan con aceites vegetales. La TBHQ (butilhidroxiquinona terciaria) es un antioxidante eficaz para la mayoría de grasas, su uso está aprobado en los alimentos de consumo humano y animal en EU, sin embargo en Canadá, Japón y Unión Europea no ha sido aprobado, lo cual hace que no se utilice en aquellos alimentos que son destinados para el mercado internacional.<sup>7</sup>

El uso de etoxiquina en alimentos para animales se aprobó desde hace 30 años. Al igual que BHT y BHA, la etoxiquina soporta el proceso del alimento y tiene eficacia elevada en protección de grasas. Es especialmente eficaz en protección de aceites que contienen un elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. La concentración máxima permitida de etoxiquina en alimentos para animales es 150 mg/kg. Los alimentos que contienen este aditivo deben incluirlo en la lista de ingredientes como conservador.<sup>7</sup>

El galacto de propilo (n- propilo 3,4,5 trihidro xibenzoato) suele aplicarse con otros antioxidantes sinérgicos como el ácido cítrico que actúa como quelante de hierro y cobre. Se utiliza mezclado con BHA y BHT para protección de grasas y aceites comestibles, esta combinación resiste de manera efectiva el proceso de extrusión en alimentos para animales.<sup>7</sup>

Es necesario el uso de antioxidantes sintéticos o mezcla de éstos con naturales en la elaboración de alimentos comerciales para animales, a fin de proteger las grasas alimentarias de la degradación oxidativa; un correcto uso de estos previene la aparición de rancidez y producción de compuestos tóxicos. Los antioxidantes sintéticos, en la mayoría de ocasiones, son los mejores por su resistencia durante el procesado del alimento y costo.<sup>7,8</sup>

Los antioxidantes funcionan de la siguiente manera: 1) donando electrones, 2) eliminando oxígeno, 3) eliminando radicales libres o 4) donando hidrógenos. También pueden actuar de modo sinérgico con quelantes de minerales y emulsificantes; presentan potencias diferentes dependiendo del antioxidante utilizado.<sup>7</sup>

**CUADRO 1.** Antioxidantes más utilizados en los alimentos para animales.

	<u>COSTO</u>	<u>DISPONIBILIDAD</u>	<u>RESISTENCIA DURANTE EL PROCESADO DEL ALIMENTO</u>	<u>EFICACIA</u>
<b>NATURALES</b>				
Tocoferoles	Elevado	Baja	Escasa	Baja
Ácido ascórbico	Elevado	Baja	Escasa	Baja
Ascorbil palmitato	Elevado	Baja	Escasa	Baja
Luteína	Elevado	Moderada	Buena	Elevada
<b>SINTÉTICOS</b>				
BHA	Bajo	Moderada	Buena	Elevada
BHT	Bajo	Moderada	Buena	Elevada
TBHQ	Bajo	Escasa	Buena	Elevada
Etoxiquina	Bajo	Alta	Excelente	Elevada

Case y Carey, 2001.

## **I.2. Determinación de la estabilidad de la grasa**

Existen diferentes técnicas para determinar la estabilidad de una grasa, y de forma indirecta para comparar la eficacia de los antioxidantes. Cada método tiene ventajas y desventajas,

pero todos los que se emplean pretenden tener valores comparativos y acelerados de la posible estabilidad de la grasa o aceite. Estos métodos son: método de la bomba de oxígeno, índice de peróxidos, método de oxígeno activado (AOM), método Rancimat, ácidos dienoicos conjugados, índice de anisidina, compuestos polares, índice de yodo.<sup>9</sup>

El índice de peróxidos. Técnica utilizada para determinar el estado de oxidación de un aceite o grasa. Determina la cantidad de compuestos intermedios formados en la reacción de oxidación (peróxidos). Una vez que la reacción química empieza, no se detiene y es útil únicamente en las primeras etapas de degradación oxidativa de lípidos, donde se producen altas concentraciones de peróxidos, pero posteriormente se degradan a compuestos más estables y olorosos propios de la rancidez (ácidos, cetonas, aldehídos), por lo que una grasa puede dar un índice de peróxidos igual a cero pero estar muy degradada.<sup>7,10,11</sup>

Utilizando esta técnica, si se obtiene un resultado igual a 0 (cero), no será posible identificar si es porque la muestra no ha empezado a oxidarse, debido a una buena acción de los antioxidantes y un correcto almacenamiento, o si se debe a una completa oxidación previa al inicio del estudio.

### **1.3. Deficiencia de lípidos (vitaminas liposolubles, ácidos grasos poliinsaturados (AGP), ácidos grasos esenciales (AGE) y su efecto en la salud de los animales.**

Los lípidos son indispensables en la dieta de hurones, son nutrientes que aportan gran cantidad de energía y constituyen reservas energéticas, además de que ayudan a la protección de órganos, como riñones, estómago e intestinos. Son importantes ya que las vitaminas liposolubles y ácidos grasos esenciales se encuentran asociados a grasas de los alimentos; además sirven como aislante térmico del tejido subcutáneo, se encuentran en los fosfolípidos del cerebro, abundan en tejido nervioso y sangre como lipoproteínas.<sup>11,12</sup>

Los AGE's son componentes de fosfolípidos de membrana celular y precursores de una variedad de sustancias reguladoras (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, etc.), éstos mantienen la salud e integridad de tejidos epiteliales del cuerpo. La piel es susceptible a deficiencia de AGE's.<sup>13</sup>

Como resultado del inadecuado almacenamiento o proceso de re empaquetado, es decir, exponer el alimento fuera de su empaque original a condiciones ambientales, provoca el deterioro de nutrientes, entre ellos las grasas que sufren oxidación, lo que es perjudicial para la salud de los hurones pues los lleva a padecer enfermedad o problemas ocasionados por deficiencias de nutrientes.<sup>8,10</sup>

La carencia de AGP de lípidos causa signos semejantes a la avitaminosis; los más frecuentes son dermatitis, pelaje seco y opaco, pérdida de pelo, algunos casos de otitis, necrosis de la cola y desarrollo de lesiones cutáneas con predisposición a padecer infecciones bacterianas secundarias.<sup>4,8</sup>

En hurones la deficiencia de AGE causa pelo seco y mate, alopecia, y finalmente el desarrollo de lesiones cutáneas. Con el transcurso del tiempo, la piel se convierte en grasa, pruriginosa y susceptible a infección. El cambio en lípidos superficiales altera la flora bacteriana normal y predispone a infecciones secundarias, además causa una deficiencia en la reproducción, crecimiento y trastornos del sistema urinario.<sup>5,14</sup>

La enfermedad cutánea natural por deficiencia de AGE's es rara hoy en día en animales de compañía. Cuando esta ocurre, suele ser el resultado de una dieta mal formulada o almacenada de forma incorrecta.<sup>8,10</sup>

## **II. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad la nutrición y alimentación de animales de compañía, juega un papel importante como causa y exacerbación de ciertas enfermedades, por lo que el aporte adecuado de nutrientes puede mejorar su condición y calidad de vida. La utilización de alimentos comerciales es cada vez más frecuente, estos aportan ingredientes de calidad y adecuada concentración de nutrientes, sin embargo, su inadecuado manejo puede provocar deterioro y causar baja palatabilidad, rechazo y en consecuencia mal aporte de nutrientes. En base a ello, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el deterioro del alimento para hurón durante su almacenamiento.

## **III.HIPÓTESIS**

Al abrir o re-empacar el alimento y exponerlo al ambiente, se desencadena una serie de procesos químicos que lleva a la producción de peróxidos como resultado de la degradación oxidativa de lípidos.

## **IV.OBJETIVOS**

### **IV.1. Objetivo general**

Determinar el grado de deterioro de alimento comercial de mantenimiento para hurón adulto, evaluando la concentración de peróxidos durante un periodo de 28 días, manteniéndolo en su empaque original cerrado, una vez abierto y en un contenedor expuesto al medio ambiente con una humedad relativa media anual entre 52 y 54% y una temperatura media anual entre 14 y 15 °C.

## **IV.2. Objetivos específicos**

- Determinar la concentración de los analitos: Humedad, Proteína cruda (PC), Extracto etéreo (EE), Cenizas (Cen), Fibra cruda (FC) elementos libres de nitrógeno (ELN), mediante el análisis químico proximal en alimentos especializados para hurón (*Mustela putorius furo*).<sup>9</sup>
- Comparar la concentración de los analitos: Humedad, Proteína cruda (PC), Extracto etéreo (EE), Cenizas (Cen), Fibra cruda (FC) mediante el análisis químico proximal en alimentos especializados para hurón (*Mustela putorius furo*) con el análisis garantizado expuesto en estos productos.
- Determinar la concentración de peróxidos en alimentos comerciales para hurón, en diferentes intervalos de tiempo, después de haber sido abiertos, manteniéndolos en su empaque original.
- Determinar la concentración de peróxidos en alimentos comerciales para hurón, en diferentes intervalos de tiempo, después de haber sido abiertos, manteniéndolos fuera de su empaque original, expuestos al medio ambiente.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UNAM.

Se analizaron alimentos de 6 presentaciones de 5 marcas diferentes que se expiden en el Valle de México (alimento 1, alimento 2, alimento 3, alimento 4 y alimento 5) fueron adquiridos mediante compra directa en diferentes tiendas comerciales para mascotas. De cada marca de alimento se obtuvieron 5 repeticiones de lotes diferentes, obteniendo 30 muestras a analizar. Los parámetros de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

- Que el alimento no caducara durante el periodo de estudio.
- Que el empaque no estuviera dañado, rasgado o presentara orificios.
- Presentación de 1 kg a 11.33 kg (de acuerdo a la presentación que maneja el fabricante).



### **V.1. Análisis químico proximal**

Se realizó un análisis químico proximal del alimento para obtener los analitos: humedad, PC, EE, Cen, FC, y ELN, posteriormente se comparó los resultados con lo expuesto en el análisis garantizado de cada producto.

Los análisis fueron realizados en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

El Análisis Químico Proximal (AOAC 1990) determina el valor nutricional de un alimento, midiendo cuantitativamente las porciones que constituyen un alimento.<sup>9</sup>

- En cuando a Humedad y Materia Seca, (AOAC 1990) las muestras de alimento se pesaron en una balanza analítica en recipientes de aluminio previamente tarados e identificados, se sometieron a secado en una estufa a 50° C durante 12 horas. Posteriormente se pesaron las muestras en la misma balanza analítica para obtener su materia seca, se molieron en un mortero y se vaciaron en bolsas de plástico previamente identificadas para almacenarlas en un lugar seco y fresco.<sup>9</sup>

Se realizó el cálculo mediante la fórmula correspondiente:

$$\% \text{ HUM: } (T+MF)-(T + MD) / (T+ MF) - T \times 100$$

$$\% \text{ MS} = 100 - H$$

**Donde:**

**MF = Muestra fresca**

**MD = Muestra deshidratada**

**T = Tara**

- Para la Proteína Cruda (PC) (AOAC 1990), se pesaron 0.5 g de cada muestra, cada una fue colocada dentro de sobres de papel, el cual posteriormente fue colocado en un matraz de Kjeldahl con un gramo de selenio (catalizador), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Este tubo era colocado en el digestor durante 45 minutos hasta obtener un color verde claro.<sup>9</sup>

Se dejaron enfriar y se colocaron en el equipo de destilación.

Se verificó que hubiera la cantidad suficiente en los depósitos de hidróxido de sodio, agua destilada y ácido bórico, para destilar las muestras. Posteriormente se encendió el destilador y se colocó el tubo de digestión junto con un matraz Erlenmeyer. Ya obtenido el resultado en un matraz Erlenmeyer fue titulado con ácido clorhídrico al 0.1 N.<sup>9</sup>

La proteína bruta fue calculada con la fórmula:

$$\text{PC} = \frac{\text{mL titulados} \times \text{Normalidad del ácido clorhídrico} \times 0.014 \times 6.25}{\text{g muestra}} \times \text{MS}$$

- El extracto etéreo fue obtenido por el método de Soxhlet (AOAC 1990)

Se encendió el Soxhlet y se dejó calentar por diez minutos. Mientras tanto, a los cartuchos se les colocaron 0.7 g de muestra. Una vez prendida la campana, se llenaron los matraces de bola con éter y trozos de crisoles que sirvieron como catalizadores, posteriormente se colocaron las muestras con pinzas y se fijaron al condensador durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se obtuvieron los cartuchos de los tubos Soxhlet para atemperarlos en rejillas, con la finalidad de dispersar el éter para después introducirlos a un horno.<sup>9</sup>

Los cartuchos fueron pesados al día siguiente.

El Extracto etéreo fue calculado con la siguiente formula.

$$\text{EE} = \frac{(\text{PC} + \text{g de muestra}) - (\text{PC} + \text{g de muestra desengrasada})}{\text{g muestra}} \times \text{MS}$$

**Donde:**

**PC = Peso de cartucho**

**MS = Materia Seca**

- Para determinar la fibra cruda (FC) (AOAC 1990), se pesó de 2 a 3 gramos de muestra desengrasada y seca, se colocó en el matraz y se adicionó 200mL de una solución de ácido sulfúrico a 1.25% hasta ebullición.

A continuación se colocó el condensador llevándolo a ebullición en un minuto; en el caso que fue necesario se adicionó antiespumante. Se dejó ebullicir por 30 minutos manteniendo constante el volumen de agua destilada y moviendo periódicamente el matraz para remover las partículas adheridas.

Se instaló el embudo Buchner con el papel filtro precalentado con agua hirviendo para lavar. Simultáneamente, al terminar el tiempo de ebullición, se retiró el matraz dejándolo reposar por un minuto y se filtró cuidadosamente utilizando vacío: la filtración se realizó en menos de 10 minutos. Al final se lavó el papel filtro usando agua hirviendo.

Se transfirió el residuo al matraz y se adicionó 200mL de NaOH 1.25% a ebullición por 30 min.

Posteriormente se precalentó el crisol de filtración con agua hirviendo y se filtró cuidadosamente después de dejar reposar el hidrolizado por 1 minuto.

A continuación se lavó el residuo con agua hirviendo, con la solución de HCl y agua destilada y nuevamente con agua hirviendo. Se colocó la rodaja en el horno a 105°C por 12 horas. Posteriormente se dejó enfriar en el desecador.<sup>9</sup>

## **Cálculos**

**A= Peso del crisol con el residuo seco (g)**

**B = Peso del crisol con la ceniza (g)**

**C = Peso de la muestra (g)**

**Contenido de fibra cruda (%)= 100((A - B)/C)**

- Para las cenizas (Cen) (AOAC 1990), en crisoles a peso constante, se colocaron 0.5 gramos de muestra y posteriormente fueron introducidos a la mufla a 500°C durante 24 horas. Se dejó enfriar la muestra por una hora para después colocarlas en el horno y posteriormente pesarlas en la balanza analítica.<sup>9</sup>

**CENIZAS = (peso crisol + muestra calculada) – (peso crisol solo) x 100**

## **V.2. Índice de Peróxidos**

Para la prueba de índice de peróxidos, se realizó un muestreo inicial obteniendo 5 g de cada alimento que se encontraba en el empaque original al día 0 (cero), para determinar el índice de peróxidos (IP), que serviría de testigo para los muestreos posteriores.<sup>11</sup>

Del empaque de cada alimento se tomaron 250 g que se colocaron en una charola (con previa identificación), éste alimento estuvo expuesto a condiciones ambientales durante 28 días en un laboratorio donde la temperatura promedio registrada en el laboratorio fue de 18°C. El alimento restante, después de la toma de la muestra, se mantuvo dentro del empaque original cerrado, en un lugar fresco y seco como lo indica o recomienda el fabricante.

Todas las muestras fueron molidas y se manejaron en base húmeda (BH).

Posteriormente se realizaron muestreos los días 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15 y 28; tomando una muestra de 5 g tanto del alimento que se encontraba en la charola expuesto al ambiente como del alimento que se encontraba dentro del empaque original para medir el IP, y determinar si existe diferencia entre el alimento de la charola y el alimento que se mantiene en su empaque original.

Se realizó la técnica de índice de peróxidos descrita por Tejada (1992), modificada (que hace referencia a Cocks, L.V. y C. Van Rede), utilizando 4 g de muestra, 2 g para la prueba y 2 g para su repetición.<sup>9,11,12</sup>

La cual se realizó de la siguiente manera:

- Se molió la muestra en base húmeda
- Se pesaron 2 gramos para la prueba y 2 g para su repetición y cada muestra fue colocada en un vaso de precipitado de 250 mL.
- Se adicionaron 30 mL de solución de ácido acético glacial – cloroformo a una concentración 3:2
- Se adicionaron 0.5 mL de solución de cloruro de potasio (KCl) saturada.
- Se agitó ligeramente el vaso, y se esperó durante 1 minuto para que la fracción grasa del alimento fuera liberada.
- Se adicionaron 30 mL de agua desmineralizada y 0.5 mL de solución de almidón al 1% y se observó si hubo cambio de coloración de la muestra.
- Se realizó titulación con tiosulfato de sodio 0.1 N

Los resultados se obtuvieron con la siguiente fórmula, expresados en mili equivalentes de oxígeno activo por kg de grasa (o aceite ya sea el caso):

$$IP = \frac{V * N * 1000}{P}$$

Donde:

- V = Volumen gastado del titulante
- N = Concentración expresado en normalidad del titulante
- P = Peso de muestra expresado en gramos.

### **V.3. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó por medio de un análisis de varianza utilizando un diseño de un solo factor con mediciones repetidas a través del programa computarizado JMP versión 5.1.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis garantizado

El análisis garantizado que presentaron las etiquetas de los alimentos utilizados en el presente estudio se muestra en el cuadro 2.

**CUADRO 2: Análisis garantizado exhibido en las etiquetas de los alimentos utilizados para hurón (*Mustela putorius furo*) en Materia Seca (MS)**

	<b>Humedad (máx.)</b>	<b>PC (min.)</b>	<b>EE (min.)</b>	<b>FC (máx.)</b>	<b>Cenizas (máx.)</b>	<b>ELN (máx.)</b>
Alimento 1	8%	34.7%	10.89%	4.34%	8.7%	30.4%
Alimento 2	8%	47.8%	19.5%	2.17%	11.95%	22.82%
Alimento 3	12%	43.18%	23.29%	4.54%	8.5%	20.45%
Alimento 4	12%	43.18%	13.6%	4.54%	13.6%	25%

### Análisis Químico Proximal

El análisis químico proximal obtenido a partir de este estudio se encuentra en el cuadro 3.

**CUADRO 3: Resultados obtenidos del Análisis Químico Proximal de los dos alimentos utilizados para hurón (*Mustela putorius furo*) en Materia Seca (MS)**

	<b>Humedad</b>	<b>PC</b>	<b>EE</b>	<b>FC</b>	<b>Cenizas</b>	<b>ELN</b>
Alimento 1	6.69%	28.93%	18.86%	4.6%	14.25%	19.71%
Alimento 2	7.57%	41.86%	24%	4.1%	5.6%	37%
Alimento 3	6.29%	37.1%	21.98%	6.29%	8.32%	26%
Alimento 4	8.6%	40.59%	8.64%	4.59%	13.78%	32.27%

De acuerdo al análisis químico proximal realizado a estos alimentos, los resultados obtenidos varían notablemente de los presentados en el análisis garantizado reportado en las etiquetas de los diversos alimentos.

### **VI.1. Análisis Garantizado**

Los datos de la etiqueta de los alimentos utilizados, según Hand (2000) para humedad cumplió con lo estipulado para los alimentos secos para mascotas, (3 y 11%).<sup>4</sup>

Basado en el porcentaje de proteína cruda citado por Bell (1999) y Hand (2000), en tres de los alimentos se cumplió el mínimo de 30% de PC requerido, mientras que en el alimento uno (28.93%), esta cifra quedó por debajo del mínimo recomendado para la especie *Mustela putorius furo*.<sup>4, 14</sup>

En grasa cruda (extracto etéreo), los alimentos uno, dos y tres cumplieron con las necesidades mínimas de mantenimiento de 15%, según lo reportado por Bell (1999), aunque fueron los alimentos 2 y 3 los que a su vez cumplieron con el mínimo de 20% estipulado por Hand (2000). El alimento cuatro no alcanzó el mínimo requerido según lo recomendado por los autores antes mencionados.<sup>4,14</sup>

En cuanto a la fibra cruda (FC), probablemente al igual que para los gatos, no sea esencial en la dieta de los hurones, pero los AGCC producidos por las bacterias intestinales tras la fermentación de esta, ayudan a mantener la salud del colon, por lo que se recomienda una inclusión menor al 5% de MS.<sup>4</sup> De esta manera los alimentos 1, 2 y 4 cumplieron con este criterio, mientras que el alimento 3 sobrepasa el máximo recomendado.

Los carbohidratos o extracto libre de nitrógeno (ELN) no son esenciales para carnívoros estrictos, ya que éstos obtienen glucosa a través de la gluconeogénesis hepática a partir de aminoácidos. Su inclusión no debe sobrepasar el 30% de MS.<sup>4</sup> Parámetro que en este caso no fue cumplido por los alimentos 2 y 4 y sí por los alimentos 1 y 3.

## **VI.2. Índice de Peróxidos**

Después de realizar el análisis de laboratorio, se encontró lo siguiente:

- Al realizar el primer muestreo, ningún alimento mostró presencia de peróxidos. Esto puede deberse a que el alimento no sufrió una degradación oxidativa previa al estudio o por otra parte, a que el alimento ya se encontraba oxidado en su totalidad al momento de empezar a muestrear. Esto se muestra en la Figura. 2.



Figura 2. Primer muestreo (día 0).

- Al segundo muestreo (día 1), se aprecia que uno de los alimentos tiene un aumento en la concentración de peróxidos. Eso demuestra que el desempeño de los antioxidantes a partir de esta fecha se ve disminuido, lo que da paso al proceso de la peroxidación. Tal como lo demostró Rivera en 2010.<sup>1</sup>

- Se evaluaron los parámetros variables obtenidos para el alimento cinco del muestreo del día 2 al día 6. Como se muestra en la Figura 3.

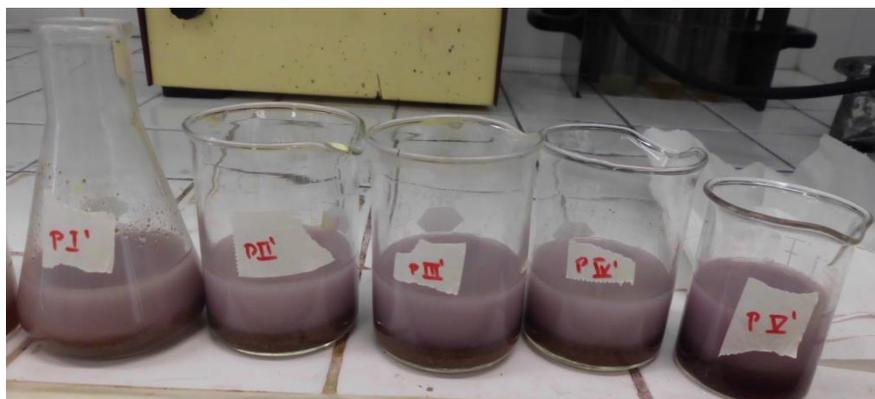


Figura 3. Alimento 5, muestreos del día 2.

- No se encontró diferencia estadísticamente significativa en la interacción tiempo y muestra ( $P=0.3727$ ).

- Tampoco hubo diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (almacenado en empaque original y expuesto al medio ambiente) ( $P=0.7549$ ).

- Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en relación al tiempo, (P =0.0421). Esto es indicativo que el alimento se peroxida a través del tiempo sin importar el tratamiento y marcas. Tal como lo demostró Rivera en 2010. (Cuadro 4, gráfica 1). Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre día 2 y día 3 (P =0.0288) mientras que entre los días 3 y 4, 4 y 5 así como 5 y 6 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**CUADRO 4. Media y desviación estándar en índice de peróxidos para muestra alimento cinco.**

<b>Tiempo</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>
d2	5.394	1.069
d3	6.195	1.494
d4	13.840	7.983
d5	9.785	6.667
d6	7.135	8.246

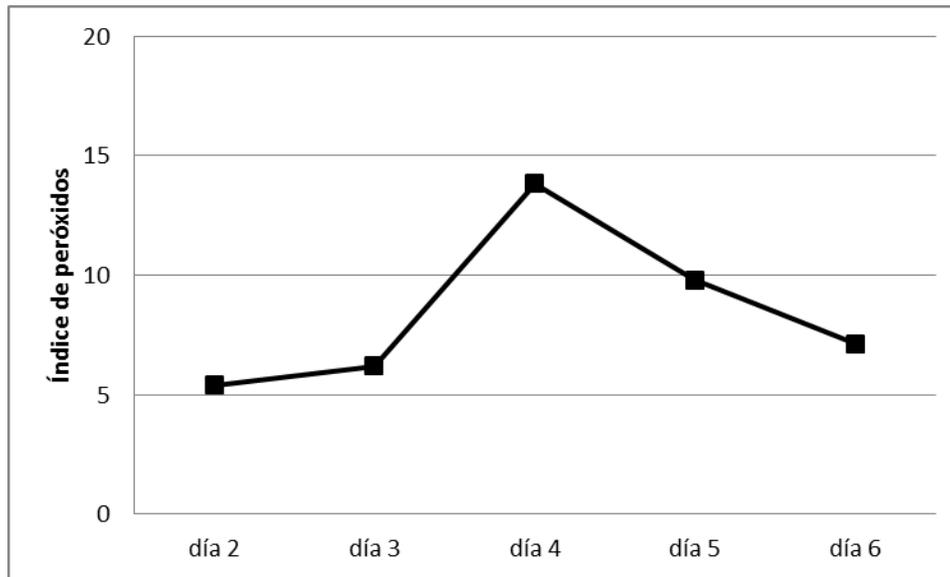


FIGURA 4. Índice de peróxidos en el alimento cinco a través del tiempo

- Hubo una distribución simétrica al graficar las concentraciones de peróxidos. Esto se explica por qué si a través del tiempo los antioxidantes que protegen a esos lípidos se degradan, se facilita su peroxidación y así continúa la degradación de peróxidos en aldehídos, cetonas y ácidos que no son detectados por la técnica de índice de peróxidos. Por otra parte el proceso de peroxidación finaliza hasta que se han degradado todos los lípidos de la muestra.
- No se encontró ninguna diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el índice de peróxidos del alimento mantenido en empaque original y los expuestos al medio ambiente.
- A partir del día 7, ya no se detectaron peróxidos en ninguno de los alimentos. Esto indica que en las muestras que presentaron peróxidos en muestreos anteriores, los lípidos ya fueron degradados en su totalidad y en el resto de las muestras que nunca presentaron peróxidos, esto puede deberse a la buena acción de los antioxidantes durante el periodo de estudio o bien a que ya se encontraban oxidadas en su totalidad antes de comenzar este trabajo. Cada marca adiciona antioxidantes de diferente tipo (natural, sintético o

combinaciones de éstos), los cuales tienen diferente tipo de acción, se agregan en diferentes concentraciones, y pierden o disminuyen su actividad protectora con el paso del tiempo dando lugar a dicho proceso. Tal como lo mencionan Ramanathan R. et al (1994)<sup>15</sup>, y Moure A. et al<sup>16</sup>, la capacidad de eliminar radicales libres depende del tipo y la dosis de antioxidante que se adiciona al alimento o se suministra directamente en el animal (para evitar estrés oxidativo en las células, por exceso de peróxidos precursores de radicales libres). Los antioxidantes en el alimento solo retrasan el proceso de oxidación de los lípidos pero no pueden detener la reacción una vez que ésta ha iniciado.<sup>17</sup>

En el caso del alimento tres, no se encontró índice de peróxidos durante el tiempo de estudio ni en la presentación de 1 kg, ni en la de 11.3 kg. Como se observa en la figura 5 y 6.



Figura 5. Alimento 3, muestreo día 28.



Figura 6. Alimento 3, muestreo día 15.

En los casos del alimento dos y el cuatro, en sus respectivas presentaciones, no se encontró índice de peróxidos durante el tiempo del estudio. Como se observa en la figura 7.

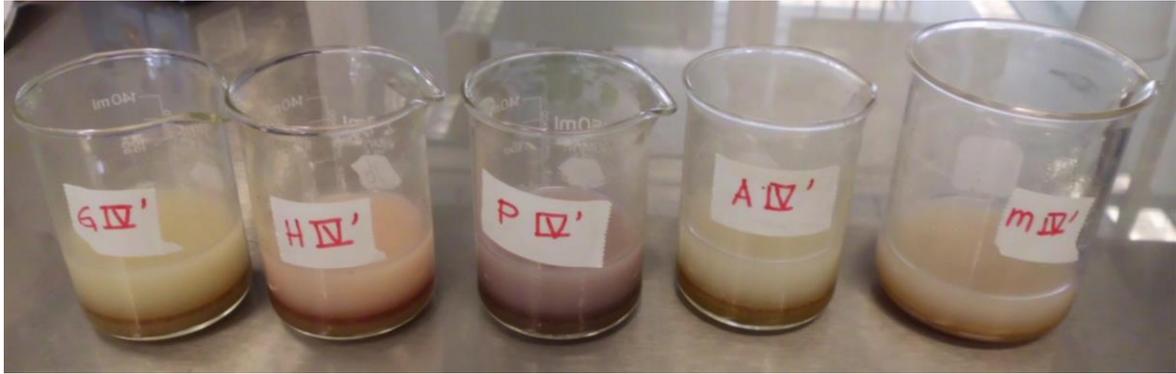


Figura 7. Alimento 4 (A IV') y alimento 2 (G IV').

En el caso del alimento uno, la prueba tuvo que repetirse debido a que algunas de las croquetas tenían un colorante que afectaba la evaluación del resultado, dando falsos positivos. Por tal razón esta técnica no es confiable si la muestra tiene colorantes, ya que aparte de dificultar la lectura de resultados, pueden afectar el proceso de peroxidación.<sup>18</sup> Como se muestra en la figura 8.



Figura 8. Alimento 1, efecto del colorante del alimento.

A la repetición, utilizando únicamente croquetas sin colorante, el resultado fue negativo. Como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Alimento 1, sin efecto del colorante.

En el caso del alimento cinco, éste fue el único donde se obtuvieron resultados positivos demostrando una relación clara entre el tiempo y la concentración de peróxidos. Como se muestra en la figura 10.

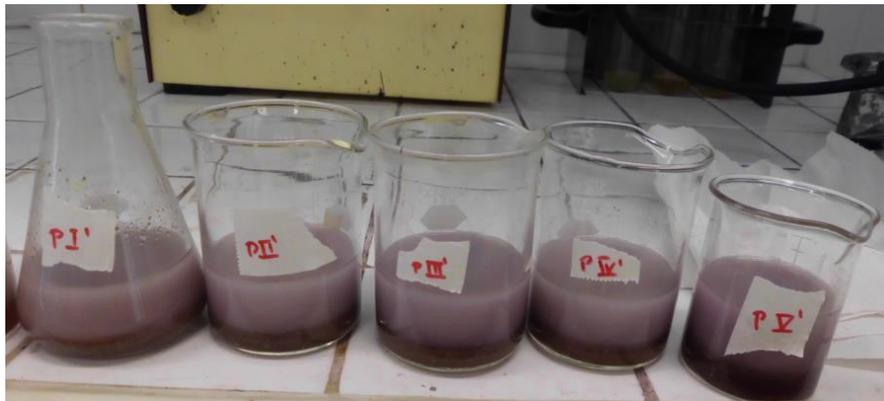


Figura 10. Alimento 5.

## VII. CONCLUSIONES

Con el análisis químico proximal, se pudo comprobar dónde el alimento realmente cumple con lo estipulado en su etiqueta y dónde no y de esta forma saber si es un alimento adecuado para cubrir las necesidades nutricionales del hurón.

- Se pudo demostrar que la técnica de índice de peróxidos no es precisa y que por sí sola, no determina el deterioro de un alimento a través del tiempo, debido a que no detecta si las grasas del alimento vienen peroxidadas en su totalidad al momento de abrir el bulto, o no.

-Además de tener la fecha de caducidad por Norma, se reconoce la importancia de que el fabricante indique el tiempo óptimo de almacenamiento una vez que se abra el empaque, con la leyenda: una vez abierto consumase preferentemente antes de un determinado número de días, aunque se requiere de un estudio más amplio para determinarlo.

### **VIII. Recomendaciones**

-Se recomienda la complementación de este estudio con técnicas que permitan determinar si las grasas del alimento están oxidadas en su totalidad o no antes de implementar la técnica de índice de peróxidos.

-Para completar la evaluación del deterioro de los alimentos para hurones adultos en mantenimiento, se recomienda realizar un estudio de la degradación de la fracción proteica de los alimentos, ya que también es un nutriente básico en la nutrición y salud de los animales.

-Se recomienda complementar este tipo de estudios, con la determinación de la capacidad antioxidante de los alimentos que se evaluaron en el presente estudio, ya que se tendrían datos sobre la efectividad y resistencia de los antioxidantes que se adicionan a estos alimentos y se podría identificar que antioxidantes son los más adecuados en la formulación de los mismos.

-Asimismo, se recomienda complementar este estudio con la determinación de concentraciones de vitaminas liposolubles ya que probablemente éstas también se pierdan con la oxidación de las grasas.

-Se puede recomendar también realizar estudios de evaluación organoléptica de dichos alimentos, ya que el olor, color, textura y sabor de la rancidez son característicos y pueden provocar rechazo por parte de los animales correlacionándose con la calidad nutricional de los alimentos; el estudiar hasta qué punto esas características organolépticas son aceptadas o toleradas por los animales serviría para determinar el tiempo de almacenaje y de suministro al animal.

## VIII. LITERATURA CITADA

- 1.- Rivera NM. Evaluación del deterioro de alimentos súper premium de mantenimiento para perros adultos mediante la concentración de peróxidos (tesis de licenciatura). Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2010.
- 2.- Santana EM., Jantz HE, Best TL. Mammalian Species, School of Forestry and Wildlife Sciences, Auburn University, 42(857):99–110., 2010
3. - Neus MC, Other exotic mammals in the practice, Clínica Veterinària Exòtics Barcelona, España.
4. - Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL. Nutrición clínica en pequeños animales. 4ª ed. Colombia: Inter-Medica. 2000.
- 5.- Guy R. Extrusión de los alimentos. 1ª ed. Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. 2002
- 6.- Staunton WE, Todd WR, Mason HS, Van Bruggen JT. Bioquímica Médica. 4ª edición, Distrito Federal, México. Editorial Interamericana,1969.
- 7- Cubero N, Monferrer A, Villalta J. Aditivos Alimentarios. 1ª ed. Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa. 2002.
- 8.- Case LP, Carey DP, Hirakawa DA, Daristotle L. Nutrición Canina y Felina. Guía para profesionales de los animales de compañía. 2ª edición. Madrid, España. Harcourt, 2001.
9. - Kenneth H. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist Vol. 1, 5a ed., Published Association of Official Analytical Chemists Inc., USA 1990.

- 10.- Kelly N, Wills J. BSAVA Manual of Companion Animal Nutrition and Feeding, London, UK. British Small Animal Veterinary Association. 1996.
- 11.- Tejada I. Control de Calidad y Análisis de Alimentos para Animales. 1ª ed. Distrito Federal, México. Sistema de Educación Continua en producción Animal. 1992.
- 12.- Cocks, LV, Van Rede C. Laboratory Handbook for oil and fat analysis. 3ª ed. London, UK. Academic Press. 1976.
- 13.- Osborne DR, Voogt P. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Zaragoza, España, Editorial Acribia, S.A. 1985.
14. - Bell JA. Ferret Nutrition. Vet Clin North Am Exot Anim Pract. 1999;2(1):169-92, viii.
15. - Ramanathan R, Das NP, Tan CH. Effects of  $\gamma$ -linolenic acid, flavonoids, and vitamins on cytotoxicity and lipid peroxidation. Free Rad. Biol. Med. 1996;16: 43-48
- 16.- Moure A, Cruz MJ, Franco D. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem. 2001;72(2):145 – 171.
- 17.- Kanner J, Rosenthal I. An assessment of lipid oxidation in foods. Pure Appl. Chem. 1992;62:1959-1964
18. -U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Foods Safety and Applied Nutrition. Guidance for Industry Food Labeling; Nutrient Content Claims; Definition for “High Potency” and Definition for “Antioxidants” for Use in Nutrient Content Claims for Dietary Supplements and Conventional Foods. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Foods Safety and Applied Nutrition. 2008; 5-6.

## Anexo 1



Se muestreó alimento de las charolas expuestas al medio ambiente y de su empaque original.



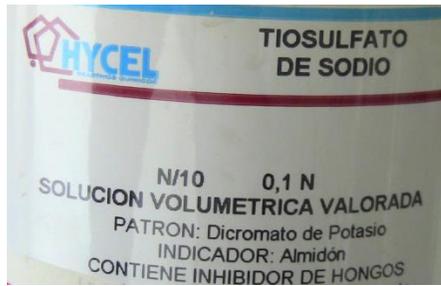
Se molió la muestra en base húmeda y se pesaron 2 g. para la muestra y 2g para su repetición.



Se adicionaron 30 ml. de solución ácido acético – cloroformo 3:2



Solución de almidón 1%



Tiosulfato de sodio 0.1N para la titulación

