

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA
DE ENSILAJE QUÍMICO DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*)**

SANDRA MARCELA MUÑOZ BURBANO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA
DE ENSILAJE QUÍMICO DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS
(*Oncorhynchus mykiss*)**

SANDRA MARCELA MUÑOZ BURBANO

Trabajo de grado presentado como
requisito parcial para optar al título de Químico

Director:

JAIME MARTIN FRANCO, Ph.D.

Grupo de Investigación Química de Productos Naturales (QPN)

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Asesores:

JOSE LUIS HOYOS CONCHA, Ph.D.

EDIER GAVIRIA ACOSTA, Mg.

Grupo de Investigación ASUBAGROIN

Departamento de Ingeniería Agroindustrial

Universidad del Cauca

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

Nota de aceptación

Director _____
Jaime Martin Franco, Ph.D.

Jurado _____

Jurado _____

Popayán, 15 de septiembre del 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, protegerme y ayudarme en cada instante.

A mis padres: Samuel Muñoz Muñoz y Esther Julia Burbano Muñoz, por ser mi ejemplo a seguir y por su apoyo incondicional y desinteresado. Sin ellos no hubiera sido posible alcanzar esta meta.

A la memoria de mis abuelos, quienes hicieron de mi niñez la mejor de todas con su amor e historias increíbles.

A mis hermanos: Ader, Diego, Carlos, Paola y Laura, por todas las historias y experiencias que hemos vivido, y por su apoyo incondicional

A mis cuñadas Mirtha y Leidy, por todo el apoyo, el amor que me han dado, las considero como mis hermanas

A mis sobrinos: Daniela, Diego, Samuel, Sara y Danna, los cuales me han dado lecciones grandes de vida y me han ayudado a crecer como persona.

Al profesor José Luis Hoyos Concha, por su apoyo incondicional en este proyecto, y por educarme no solo como profesional sino como persona.

A Edier Gaviria, por su asesoramiento constante en el desarrollo de mi trabajo de grado

A los profesores Jaime Martin y Ricardo Benítez, por sus conocimientos y el apoyo que me han dado.

Al grupo ASUBAGROIN, por su gran acogida y ayuda durante la realización del proyecto, en especial Sandra Sánchez e Iván Otero, por todo su apoyo.

A mis amigas Diana, Carolay, Lina, Daniela y Kelly, que han estado siempre en las buenas y en las malas. Gracias por todos los momentos vividos, se han quedado grabados en mi mente.

A David Concha por todo el apoyo, comprensión y tiempo compartido

A todos mis compañeros de Química con los que compartí grandes momentos

A todos los profesores que me educaron como profesional y como persona

A todos mis familiares y demás personas que aportaron a mi desarrollo personal

A la Universidad del Cauca, al proyecto ALPEZT, APROPESCA, SGR y QPN por permitir el desarrollo de éste proyecto.

Contenido

INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES Y MARCO CONCEPTUAL.....	3
1.1. Acuicultura.....	3
1.2. Trucha arcoíris.....	3
1.2.1. Identidad.....	3
1.2.2. Taxonomía	4
1.2.3. Producción de trucha arcoíris	4
1.2.4. Subproductos de la industria piscícola	5
1.2.5. Aprovechamiento de subproductos	6
1.3. Hidrolizados proteicos	7
1.3.1. Métodos de obtención hidrolizados proteicos.....	7
1.3.2. Métodos enzimáticos.....	7
1.3.3 Sustrato	8
1.3.4. Enzimas.....	9
1.4. Aplicaciones de los hidrolizados	10
1.5. Caracterización del hidrolizado.....	10
1.5.1. Actividad enzimática.....	10
1.5.2. Determinación del grado de hidrólisis (GH).....	11
1.5.3. Determinación de actividad biológica	13
1.6. Antecedentes de aprovechamiento de subproductos	18
1.6.1. Alimentación de especies menores	18
1.6.2. Extracción de aceite	18
1.6.3. Actividad antioxidante.....	19
1.6.4. Actividad antimicrobiana.....	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. METODOLOGÍA	23
4.1. Recolección y transporte de vísceras	23

4.2. Análisis proximal.....	24
4.3. Obtención de ensilaje químico.....	24
4.3.1. Inactivación de enzimas endógenas.....	24
4.3.2. Análisis proximal de ensilaje químico.....	25
4.4. Caracterización del hidrolizado.....	25
4.4.1. Determinación de solubilidad.....	25
4.4.2. Seguimiento de grado de hidrólisis.....	25
4.5. Determinación de actividad antioxidante.....	26
4.5.1. Método ABTS.....	26
4.5.2. Método DPPH.....	27
4.5.3. Preparación de la muestra.....	27
4.5.4. Medida de actividad antioxidante.....	28
4.6. Determinación de actividad antimicrobiana.....	28
4.6.1. Preparación de agares y caldos de cultivo.....	28
4.6.2. Activación de las bacterias.....	29
4.6.3. Prueba de antagonismo por difusión en pozos.....	29
4.6.4. Prueba de antagonismo turbidimétrica.....	29
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	31
5.1. Recolección de vísceras de pescado.....	31
5.2. Obtención de ensilaje químico.....	32
5.3. Análisis proximal.....	32
5.4. Tratamientos y caracterización del hidrolizado.....	34
5.4.1. Determinación de solubilidad.....	34
5.4.2. Seguimiento de grado de hidrólisis.....	36
5.5. Determinación de actividad antioxidante.....	40
5.5.1. Método ABTS.....	40
5.5.2. Método DPPH.....	41
5.6. Determinación de actividad antimicrobiana.....	45
6. CONCLUSIONES.....	51
7. RECOMENDACIONES.....	53
8. BIBLIOGRAFÍA.....	54
9. ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Producción mundial de trucha arcoíris.....	5
Figura 2 Hidrólisis de enlace peptídico	8
Figura 3 Trucha arcoíris de Silvia-Cauca.....	23
Figura 4 Recolección, transporte y cuarteo de vísceras	31
Figura 5 Obtención de ensilaje químico	32
Figura 6 Solubilidad de extractos proteicos	35
Figura 7 Extractos proteicos de ensilaje.	35
Figura 8 Seguimiento de GH a ensilaje químico.	38
Figura 9 Actividad enzimática a condiciones de ensilaje	40
Figura 10 Influencia del GH en la actividad antioxidante	42
Figura 11 Incremento de eliminación de radicales ABTS y DPPH.....	44
Figura 12 Halos de inhibición.....	47
Figura 13 Curvas de crecimiento de <i>Aeromona hydrophila</i>	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de trucha arcoíris	4
Tabla 2 Aminoácidos en vísceras de Trucha Arcoíris	6
Tabla 3 Actividad antioxidante en hidrolizados de subproductos de peces	19
Tabla 4 Actividad antimicrobiana de hidrolizados de diferentes fuentes	20
Tabla 5. Métodos análisis proximal	24
Tabla 6 Condiciones de cultivo para las bacterias	28
Tabla 7 Animales muestreados por estanque	31
Tabla 8 Comparación de la composición proximal de subproductos de trucha arcoíris	33
Tabla 9 Proteína soluble a diferente pH de extracción y tiempo de ensilaje	34
Tabla 10 Seguimiento de Grado de hidrólisis de ensilaje	37
Tabla 11 Seguimiento de actividad antioxidante	42
Tabla 12 Halos de inhibición	46
Tabla 13 Seguimiento de crecimiento bacteriano	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Reactivos, solventes, equipos y materiales	63
Anexo 2 Método Bradford	64
Anexo 3 Parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método TNBS.....	65
Anexo 4 Parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método ABTS	66
Anexo 5 Parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método DPPH	68
Anexo 6 Influencia del tiempo con respecto al GH	69
Anexo 7 Prueba Tukey realizada a los métodos ABTS y DPPH.....	69
Anexo 8 Diferencia estadística entre los métodos ABTS y DPPH	70

Lista de acrónimos y abreviaturas

\bar{x}	Promedio
σ	Desviación estándar
Cv	Coficiente de variación
°C	Grados Celsius
min	Minutos
h	Hora
s	Segundos
L	Litros
μL	Microlitros
μM	Micromolar
g	Gramos
mg	Miligramos
μg	Microgramo
r.p.m	Revoluciones por minuto
UV	Ultra violeta
A	Absorbancia
nm	Nanómetros
λ	Longitud de onda
%T	% de Transmitancia
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
pKa	Constante de disociación ácida
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico)
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
TROLOX	6- hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
OPA	Ortoftaldehído
Leu	Leucina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APROPESCA	Asociación Productora y Comercializadora de Productos Acuícolas y Agrícolas
AUNAP	Autoridad Nacional de Acuicultura y pesca
FAO	Food and Agriculture Organization
GH	Grado de hidrólisis
CA	Capacidad antioxidante
AMPs	Péptidos antimicrobianos
SET	Transferencia de electrones
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
Sig	Significancia

RESUMEN

En el municipio de Silvia, Departamento del Cauca, se generaron 125,40 Toneladas de subproductos de trucha arcoíris, en el año 2014. Estos desechos han generado contaminación ambiental, riesgo sanitario, pérdida de importantes biomoléculas y disminución de las utilidades (APROPESCA 2014). Una de las alternativas para su aprovechamiento es la obtención de ensilaje químico de vísceras, mediante la adición de un ácido que activa las pepsinas, las cuales generan un hidrolizado proteico estable a temperatura ambiente, con un alto valor nutritivo y ausencia de microorganismos patógenos (Santos, Silva et al. 2015). La hidrólisis enzimática, genera moléculas más pequeñas, que pueden tener un amplio espectro de actividades biológicas, como actividad antioxidante y antimicrobiana (Gehring, Gigliotti et al. 2011). En ésta investigación se realizó un seguimiento de la actividad antioxidante y antimicrobiana por métodos *in vitro* de extractos proteicos de ensilaje a pH 7,00 y se comparó con el grado de hidrólisis (GH), el cual influye en las propiedades físicas y químicas del producto. El GH aumentó durante las primeras 24 h y luego se empezó a estabilizar a las 96,00 h y se mantuvo constante a tiempos de ensilaje superiores, alcanzando un GH entre 38 y 39%; similar al comportamiento obtenido por Wald, Schwarz et al. (2016), en hidrolizados de trucha arcoíris con pepsina del mismo pez. La inhibición de radicales ABTS y DPPH se estabilizó en 11 y 46 % para DPPH y ABTS respectivamente a 10 mg/mL, a GH entre 12,88 y 20,85%; a GH superiores no hay un aumento de actividad. La inhibición de radicales DPPH fue inferior a lo informado por Slizyte, Rommi et al. (2016) en hidrolizados de proteínas de peces de espinas dorsales de salmón desengrasado y por Bougatef, Nedjar-Arroume et al. (2010) en hidrolizados de vísceras de Sardinela con extracto crudo de enzimas endógenas del mismo pez; posiblemente por limitación de transferencia de protones debido al uso de metanol y por la diferencia entre las muestras. Por el contrario, la captación de radicales ABTS fue similar a lo encontrado por Gaviria (2017) en hidrolizados de vísceras de trucha con la enzima Protamex®. Por otro lado, se encontró actividad antimicrobiana contra *Aeromona hydrophila* en el extracto proteico de GH 38,39%, con inhibición de 25,40% de crecimiento bacteriano, a una concentración de 41 mg/mL. Los resultados son inferiores a lo informado por Wald, Schwarz et al. (2016) quien halló actividad antimicrobiana frente a varias bacterias Gram positivas y Gram negativas, con porcentajes de inhibición mayores al 50% a una concentración de 20 mg/mL. La actividad biológica encontrada en extractos proteicos de ensilaje químico, es inferior a lo que reportan algunos investigadores, sin embargo, es necesario evaluar la bioactividad por métodos *in vivo*, para determinar la actividad real.

Palabras clave: Ensilaje, grado de hidrólisis, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

El constante crecimiento del sector acuícola y el aumento record del consumo per cápita de pescado (20 kilogramos anuales), ha generado mayores cantidades de subproductos (FAO 2016), los cuales incluyen recortes de músculo, piel, aletas, espinas, cabezas, vísceras y escamas, que equivalen aproximadamente al 50-70% del peso del animal (Martínez 2011). La gran mayoría de los subproductos son descartados, y sólo el 30% se han utilizado para dar un valor añadido bajo, como en alimentación animal; obtención de fertilizantes y ensilaje. La inadecuada manipulación genera contaminación ambiental y una pérdida de importantes biomoléculas como lo son los lípidos, las proteínas, vitaminas y los compuestos bioactivos, los cuales pueden usarse para diversas aplicaciones biotecnológicas, que permitan desarrollar productos con un alto valor agregado (Villamil, Váquiro et al. 2017)

En los últimos años, los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de subproductos pesqueros, ha ganado interés en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, debido a que la hidrólisis proteica mejora propiedades tecnofuncionales y nutricionales (Atef and Mahdi Ojagh 2017). Los métodos de obtención de los hidrolizados pueden ser químicos, mediante hidrólisis ácida o básica; o enzimáticos, obtenidos por hidrólisis acelerada o por autólisis, como por ejemplo el ensilaje, el cual se obtiene mediante la disminución del pH del pescado o partes de este, a través de la adición de ácidos orgánicos o minerales, enzimas o bacterias productoras de ácido láctico, con la finalidad de activar las proteasas ácidas de los peces, las cuales son responsables de licuar los subproductos (FAO 1997; Santos, Silva et al. 2015). En la hidrólisis de proteínas de peces mediante adición de enzima externa, se han encontrado péptidos con un gran espectro de actividades biológicas, como actividad antimicrobiana, antioxidante, antihipertensiva, anticancerígena, etc. (Villamil, Váquiro et al. 2017). Sin embargo, el ensilaje químico producto de autólisis, ha sido considerado de poco valor, ignorando la posible bioactividad que puede tener gracias a la hidrólisis enzimática.

En el departamento del Cauca la acuicultura es un sector importante en la economía, siendo la tilapia roja (*Oreochromis spp*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) las especies más cultivadas en los municipios de Suarez y Silvia respectivamente. El aumento en la oferta y la demanda, generan un problema de postproducción debido a la generación de subproductos en el procesamiento, por lo que es importante encontrar alternativas tecnológicas para su aprovechamiento, incluyendo desarrollos innovadores que permitan dar un alto valor agregado (Crepic 2015), por ejemplo al ensilaje químico. Por tal motivo, en esta investigación se evaluó la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS y antimicrobiana frente *Aeromona hydrophila* por el método turbidimétrico, de extractos proteicos de ensilaje químico de vísceras de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

1. ANTECEDENTES Y MARCO CONCEPTUAL

1.1. Acuicultura

La FAO (2017) define la acuicultura como: el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. En la actualidad hay aproximadamente 567 especies acuáticas, que se cultivan en todo el mundo por lo que la acuicultura es considerada como uno de los sectores de crecimiento más acelerados. En el 2014 la producción mundial total ascendió a 73,8 millones de toneladas, las cuales son destinadas en su mayoría al consumo humano, aportando 6,7% de la proteína total consumida por éste, además algunos subproductos han sido utilizados para alimentación animal (FAO 2016). Colombia cuenta con todos los pisos térmicos y se destaca en el mundo por su riqueza fluvial, que incluye aguas dulces, salobres y marinas, lo que le permite tener una de las mayores biodiversidades de peces en el planeta, además cuenta con terrenos aptos, que le otorgan un gran potencial para el desarrollo de la acuicultura (FAO 2017). En el 2014, la producción nacional ascendió ligeramente a 92.002 toneladas y en el 2015 a 95.857, siendo la tilapia y la trucha los peces más cultivados (FAOSTAT 2017).

1.2. Trucha arcoíris

1.2.1. Identidad

La FAO (2017) define la trucha arcoíris como un pez perteneciente a los teleósteos fusiformes de la familia de los salmónidos con un cuerpo alargado con 60-66 vértebras, 3-4 espinas dorsales, 10-12 radios dorsales blandos, 3-4 espinas anales, 8-12 rayos anales blandos, 19 rayos caudales. La aleta adiposa, usualmente presenta borde negro, sin tubérculos nupciales, con cambios menores en la cabeza, boca y color de los machos desovantes. Presentan una coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella. El lomo, costados, cabeza y aletas están cubiertas con pequeños puntos negros. La coloración varía con el hábitat, tamaño, y condición sexual. Los residentes en corrientes y los desovantes tienen tendencia a ser más oscuros, con color más intenso; mientras que los residentes de lagos son más brillantes y más plateados.

1.2.2. Taxonomía

Tabla 1 Taxonomía de trucha arcoíris

Reino	Animalia
Subreino	Bilateria
Infrarreino	Deuterostomados
Filo	Cordados
Subfilo	Vertebrata. Vertebrado
Infracilo	Gnatostomados
Superclase	Actinoptergios. Peces con aletas radiadas
Clase	Teleóteos
Superorden	Protacantoptergios
Orden	Salmoniformes. Salmones
Familia	Salmónidos
Subfamilia	<i>Salmoninae</i>
Género	<i>Oncorhynchus</i>
Especies	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Fuente: ITIS-Report (2017)

1.2.3. Producción de trucha arcoíris

La trucha arcoíris es originaria de la región Pacífico de Norte América (Desde Alaska hasta México). Fue introducida en aguas de otros continentes desde 1874, excepto en la Antártica, para la acuicultura y pesca deportiva, expandiéndose rápidamente durante los años 50's, gracias al desarrollo de los alimentos peletizados (FAO 2005). En Figura 1, se muestra que en las últimas décadas la producción mundial total de trucha arcoíris, ha ascendido hasta mantenerse con poca variación en los últimos años. Así, en el año 2014 la producción fue de 812,94 kilotoneladas, ligeramente inferior a la producción de 2013, de 818,29 kilotoneladas (FAOSTAT 2017). A nivel nacional la trucha arcoíris aporta el 11,36% de la producción total acuícola y representa junto con el cultivo de tilapia y camarón, las especies más importantes en la acuicultura del país (Ruales, Torres et al. 2014).

La distribución y características de los sistemas de cultivo dependen de las condiciones climáticas, la trucha Arcoíris por ejemplo, se cultiva en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Cauca, Huila, Nariño, Santander, entre otros (FAO 2017). Es así como entre los años 2014 y 2015 los departamentos con mayor producción acuícola de trucha arcoíris fueron Boyacá, Cundinamarca, Antioquia y Cauca (Pulido 2015); siendo el municipio de Silvia es en el Departamento del Cauca uno de los principales productores con 737,4 toneladas en el 2014 (APROPESCA 2014).



Fuente: FAOSTAT (2017)

Figura 1 Producción mundial de trucha arcoíris

1.2.4. Subproductos de la industria piscícola

Durante el procesamiento del pescado, se generan subproductos que oscilan aproximadamente entre el 50% y el 70% del peso del pescado, e incluyen los recortes de músculo (15-20%), piel y aletas (1-3%), espinas (9-15%), cabezas (9-12%), vísceras (12-18%) y escamas (5%) (Martínez 2011). Las vísceras incluyen branquias, esófago, corazón, hígado, páncreas, estómago, bazo, ciegos pilóricos e intestino.

La inadecuada manipulación de los subproductos, genera un grave problema de contaminación ambiental y pérdida de importantes biomoléculas (Gehring, Gigliotti et al. 2011); Por ejemplo, en el 2014, la producción en Silvia-Cauca, fue de 737,4 toneladas, con un porcentaje de rendimiento de 83%, quedando 125,4 Toneladas de subproductos (vísceras y sangre), los cuales tienen un alto valor nutritivo gracias a su contenido de proteínas de buena calidad que incluyen las enzimas digestivas, lípidos, vitaminas y oligoelementos (Shahidi and Janak Kamil 2001; Wu, Chen et al. 2003). Como se observa en la Tabla 2, las vísceras de trucha arcoíris presentan alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos potencializando las aplicaciones biotecnológicas (Restrepo 2016).

Tabla 2 Aminoácidos en vísceras de Trucha Arcoíris

Aminoácidos apolares	Porcentaje (%)
Alanina	5,4
Fenilalanina	4,5
Isoleucina	4,9
Leucina	7,8
Metionina	3,0
Prolina	4,5
Triptófano	0,6
Valina	5,9
Aminoácidos polares	
No ionizables	
Glicina	7,8
Serina	11,3
Tirosina	3,5
Treonina	3,3
Ionizables ácidos	
Ácido aspártico	3,8
Ácido glutámico	12,9
Ionizables básicos	
Arginina	10,2
Histidina	2,3
Lisina	8,4
Total	

Fuente: Gaviria (2017)

1.2.5. Aprovechamiento de subproductos

En los últimos años, se han realizado estudios para darle un valor agregado a los subproductos de la industria piscícola, como la obtención de alimentos para especies menores (industria piscícola y avícola), mediante la inclusión en piensos, ensilajes, harina y/o aceite de pescado, mejorando factores de producción como la disminución de mortalidad y mejoramiento de otros parámetros productivos (Goosen, de Wet et al. 2014). También, se han utilizado como fertilizantes (Gehring, Gigliotti et al. 2011) (Illera-Vives, Seoane Labandeira et al. 2015); al igual que, para la extracción de colágeno y gelatina; y para la obtención de hidrolizados proteicos(CECOPESCA 2012).

1.3. Hidrolizados proteicos

1.3.1. Métodos de obtención hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos son el producto de la hidrólisis química o enzimática de las proteínas, en él se pueden obtener polipéptidos, péptidos, oligopéptidos e incluso aminoácidos libres.

En la hidrólisis química, no se controla el tipo de productos que se generan, por lo que es posible que el hidrolizado pierda la calidad nutricional, limitando sus aplicaciones (Clemente, Millán et al. 2001). Por el contrario, en la hidrólisis enzimática, los procesos son controlados y se obtienen productos con menos efectos secundarios, debido a la disminución de subproductos indeseados, que son la principal limitante de los hidrolizados proteicos a partir de hidrólisis química.

El producto final depende del tipo y concentración de enzimas cuya actividad está influenciada por el pH, la temperatura y el tiempo; así como también de la fuente y tipo de proteína nativa, que en caso de los peces depende de la especie, factores ambientales y alimentación (Harnedy and FitzGerald 2012).

1.3.2. Métodos enzimáticos

Los métodos para obtener hidrolizados proteicos enzimáticos de peces, incluyen la hidrólisis autolítica y la acelerada (adición de enzima externa). En el proceso autolítico, el producto se obtiene por acción de las enzimas digestivas del pez, y dependiendo las condiciones, la hidrólisis puede durar días o incluso meses. Dentro de éstos hidrolizados, se encuentra el ensilaje, que se define como un producto semi-líquido obtenido del pescado o partes de este, mediante la adición de ácidos orgánicos o minerales, enzimas o bacterias productoras de ácido láctico, que generan una disminución de pH y una activación de las proteasas ácidas de los peces, las cuales son responsables de licuar el sustrato. El producto que se obtiene es estable a temperatura ambiente, con un valor nutritivo alto y ausencia de microorganismos patógenos (FAO 1997) (Santos, Silva et al. 2015).

Por otro lado, la hidrólisis acelerada consiste en la adición de una o varias enzimas, que pueden ser de origen animal, vegetal, bacteriano o fúngico. El producto obtenido depende del tipo de enzima y las condiciones del proceso (Shahidi and Janak Kamil 2001; Benítez, Ibarz et al. 2008). Enzimas como alcalasa®, neutrasa®, protamex®, papaina®, bromelaina®, actinidina®, mezclas de proteasas y enzimas extraídas del mismo pez, se han usado para hidrolizar partes de pescado (Chalamaiah, Dinesh kumar et al. 2012). Estos procesos alternativos permiten un mejor aprovechamiento de subproductos piscícolas, sin embargo, un inconveniente de la hidrólisis acelerada son los mayores costos de

producción, en comparación con la autolítica y la química, por lo que se requieren estudios de viabilidad económica a escala industrial (Shahidi and Janak Kamil 2001).

1.3.3 Sustrato

Las proteínas son macromoléculas biológicas importantes, compuestas de α -aminoácidos unidos mediante enlaces amida sustituido, denominados enlaces peptídicos, de naturaleza covalente (Wade 2004). En la hidrólisis de proteínas, el agua realiza un ataque nucleofílico, que genera la ruptura del enlace peptídico. Ésta reacción no es viable cinéticamente, por lo que se requiere un catalizador como los enzimas, que disminuyen la energía de activación y aumentan la velocidad de reacción (Lehninger 2006).

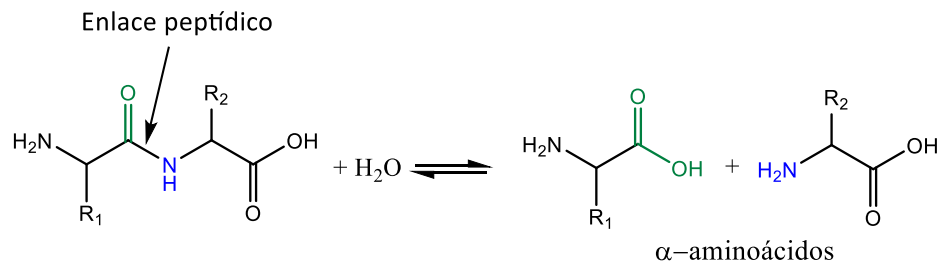


Figura 2 Hidrólisis de enlace peptídico

Para obtener los hidrolizados proteicos, se parte de un sustrato que puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. De los sustratos de origen animal, se encuentra el pescado y sus subproductos, la carne y residuos como tendones o huesos y los microorganismos como las algas. De origen vegetal se han usado principalmente proteínas de soja, trigo y arroz. La elección de la fuente proteica depende del uso del producto final y de los costos, por ejemplo, cuando se desea obtener un hidrolizado como fuente de nitrógeno para alimentación animal, se usan proteínas provenientes del pescado y microbianas (Benítez, Ibarz et al. 2008).

En los músculos de los peces, existen tres tipos de proteínas: Las proteínas estructurales como la actina, miosina, tropomiosina y actomiosina que constituyen del 70-80 % del total de proteínas; las proteínas sarcoplasmáticas como la mioalbúmina, globulina y enzimas, que corresponden al 25-30 % de proteína total y proteínas del tejido conectivo (colágeno) que constituye un 3 % (FAO 2017). Por otro lado, las vísceras contienen proteínas de buena calidad, que incluyen proteínas estructurales correspondientes al músculo liso que forma las paredes musculares de los órganos huecos (vísceras), además de proteínas sarcoplasmáticas, de las cuales se destacan las enzimas digestivas (Shahidi and Janak Kamil 2001; Avendaño 2008); otros componentes de las vísceras son los ácidos grasos insaturados, fosfolípidos, vitaminas solubles y compuestos

bioactivos (Shirahigue, Silva et al. 2016), lo que las hace prometedoras para aplicaciones biotecnológicas, como la obtención de hidrolizados proteicos.

1.3.4. Enzimas

Los enzimas son macromoléculas biológicas que catalizan la conversión de sustratos en productos como se presenta a continuación de forma general:



E, S y P corresponden a enzima, sustrato y producto respectivamente, ES y EP son complejos transitorios de enzima con sustrato y de enzima con producto (Lehninger 2006). Los factores que afectan los enzimas son el pH, la temperatura y la relación de enzima/sustrato.

1.3.4.1. Uso de los enzimas en la industria piscícola

Dentro del aprovechamiento de subproductos de la industria piscícola, se han obtenido hidrolizados proteicos con actividad biológica, mediante el uso de enzimas comerciales y propias del pez. Las enzimas más utilizadas son: la alcalasa®, papaína®, pepsina®, tripsina®, quimotripsina®, pancreatina®, flavourzyme®, pronasa®, neutrasa®, protamex®, bromelaína®, crotina F®, proteasa N®, proteasa A®, orientasa®, termolisina® y validasa® (Halim, Yusof et al. 2016). Sin embargo, son pocos los estudios que se han hecho para escalar industrialmente éstos procesos, debido a que la hidrólisis química y la hidrólisis autolítica, son más económicos (He, Franco et al. 2015).

1.3.4.2. Enzimas en las vísceras

Las vísceras de pescado son ricas en enzimas digestivas por lo que su recuperación a gran escala a partir de ensilaje de pescado es de interés en varias investigaciones. Entre los enzimas más disponibles de forma natural de los peces, se encuentran las proteasas, las cuales pueden ser endopeptidasas, si catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos, entre aminoácidos específicos en la molécula, como por ejemplo la pepsina, tripsina, quimotripsina y elastasa; o pueden ser exopeptidasas si lo hacen en enlaces peptídicos desde los extremos de péptidos, como las carboxipeptidasas y aminopeptidasas (Shahidi and Janak Kamil 2001; Murray 2013)

La licuefacción de las vísceras en el ensilaje químico, se produce gracias a la actividad enzimática de las proteasas ácidas (pepsinas), las cuales se encuentran como zimógenos que se activan a pH ácido mediante una reacción de autocatálisis (Goddard and Perret 2005; Murray 2013). Las pepsinas son enzimas endógenas que se encuentra en el estómago de los peces; pertenecen a la familia aspartato proteasas y se encargan de hidrolizar enlaces peptídicos que están en el

lado amino-terminal de los residuos de aminoácidos aromáticos de fenilalanina (Phe), Triptófano (Trp) y Tirosina (Tyr) (Lehninger 2006; Murray 2013), generando moléculas formadas por determinado número de aminoácidos denominados péptidos (Shahidi and Janak Kamil 2001). Específicamente, en la trucha arcoíris, se han aislado tres pepsinógenos del estómago que contienen siete isoformas con la misma actividad (Wald, Rehbein et al. 2016)

1.4. Aplicaciones de los hidrolizados

Las aplicaciones que pueden tener los hidrolizados dependen del contenido de aminoácidos libres (grado de hidrólisis), el tamaño molecular, la cantidad y el tipo de péptidos generados. Dependiendo del grado de hidrólisis, se pueden mejorar las propiedades tecno-funcionales, como capacidad espumante y emulsificante, así como también, bajar la viscosidad, aumentar la capacidad de agitación, la dispersión y la solubilidad, además de mejorar las propiedades nutricionales e inmunológicas, como el aumento de la digestibilidad y disminución de la alergenicidad (Benítez, Ibarz et al. 2008). Algunos péptidos generados en la hidrólisis enzimática de proteínas de peces, han presentado bioactividad, como propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antihipertensivas y antibacterianas, siendo prometedores para la industria alimentaria, farmacéutica y nutracéutica (Harnedy and FitzGerald 2012; Opheim, Šližytė et al. 2015), para la obtención de productos con valor agregado.

1.5. Caracterización del hidrolizado

Para caracterizar el hidrolizado proteico, en primer lugar se determina el grado de hidrólisis, que influye significativamente en las propiedades tecno-funcionales y biológicas, debido a que afecta la cantidad y el tamaño de péptidos o moléculas obtenidas, lo que es determinante para las aplicaciones. Las propiedades tecnofuncionales incluyen la solubilidad, viscosidad, propiedades sensoriales, emulsificantes y espumantes. Los péptidos que se generan en la hidrólisis de proteínas pueden presentar un gran abanico de actividades biológicas, las cuales pueden ser determinadas por métodos *in vivo* e *in vitro*.

Para la caracterización de los péptidos, se determina la distribución aparente de peso molecular del hidrolizado; y se realiza la separación e identificación por métodos electroforéticos y/o cromatográficos (Benítez, Ibarz et al. 2008). Así también, en el ensilaje químico de vísceras, es necesario determinar la actividad enzimática de las proteasas ácidas presentes en las vísceras, las cuales son responsables de la licuefacción de las mismas.

1.5.1. Actividad enzimática

El estudio de las reacciones enzimáticas, consiste en determinar la velocidad de la reacción la cual se afecta por factores como el pH, la temperatura, la

concentración de sustrato, los inhibidores, es decir, lo que corresponde a la cinética enzimática (Lehninger 2006). Experimentalmente existen dos métodos generales para determinar la actividad enzimática: Métodos continuos y métodos discontinuos. Los métodos continuos se basan en el monitoreo continuo de la desaparición o aparición del sustrato o el producto, mediante técnicas espectroscópicas, como la espectrofotometría de adsorción UV, la fluorescencia y fosforescencia. Por otro lado, en los métodos discontinuos la reacción enzimática debe detenerse en diferentes momentos, y se determina la cantidad de sustrato o de producto, usando métodos cromatográficos, que incluyen diferentes sistemas HPLC y métodos radiométricos (Harris and Keshwani 2009).

1.5.2. Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El grado de hidrólisis (GH) es el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados obtenidos por la hidrólisis de proteínas. Se calcula mediante la Ecuación 1, donde h es la hidrólisis parcial de los enlaces hidrolizados y h_{total} es la hidrólisis total de enlaces peptídicos de la proteína nativa.

$$\text{Ecuación 1: } GH = \frac{h}{h_{total}} * 100$$

El grado de hidrólisis influye significativamente en las propiedades químicas, físicas y biológicas, debido a que afecta la cantidad y el tamaño de péptidos o moléculas obtenidas, por lo que es determinante para las aplicaciones (Benítez, Ibarz et al. 2008).

Los métodos para calcular el GH se basan en la determinación de α -aminoácidos libres, nitrógeno soluble y la valoración potenciométrica de la concentración de hidrogeniones (Benítez, Ibarz et al. 2008).

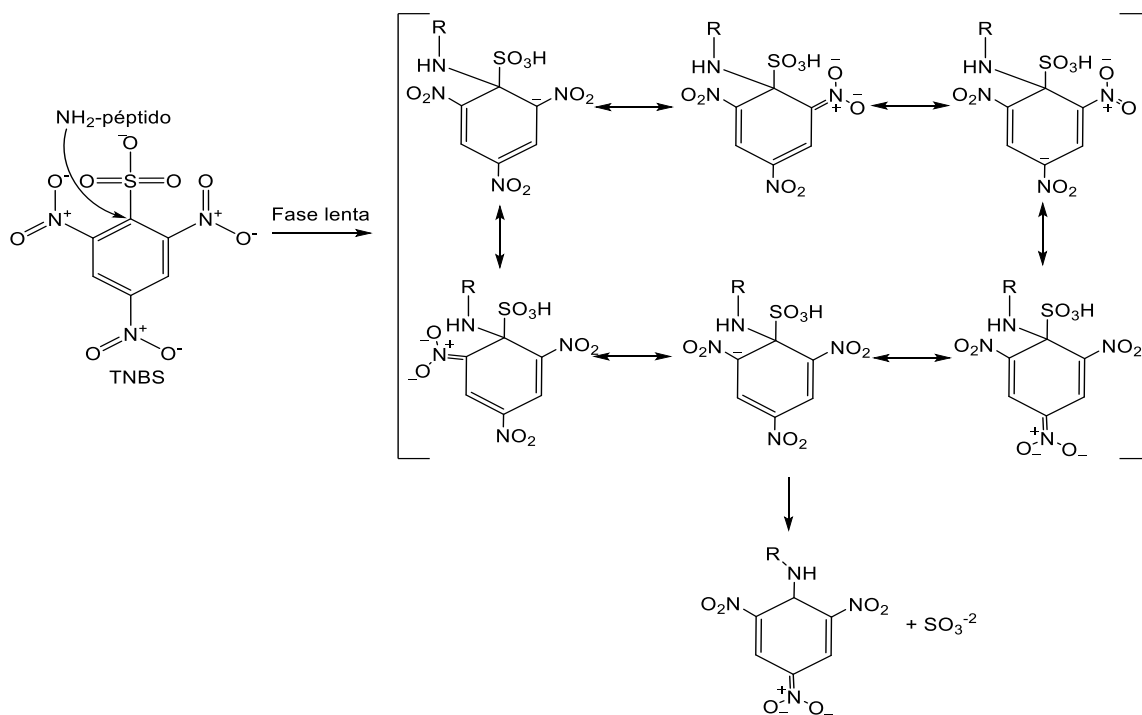
1.5.2.1. Determinación de los grupos α -amino libres

La determinación de los grupos α -amino libres, se basa en la reacción del grupo amino libre producto de la hidrólisis del enlace peptídico, con compuestos que reaccionan con ellos generando derivados cromóforos, que permiten su cuantificación espectrofotométricamente. Los métodos para determinar el GH incluyen la reacción con ninhidrina, ortoftaldehído (OPA) y 2,4,6 ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS), siendo éstos dos últimos los más utilizados para determinarlo en hidrolizados proteicos (Benítez, Ibarz et al. 2008), por lo que en éste proyecto se realizó el seguimiento de GH usando el método TNBS, el cual se describe a continuación:

Método basado en reacción de aminoácidos con TNBS

El método TNBS se basa en la reacción de grupo amino primario de los aminoácidos con el ácido trinitrobencenosulfónico, en medio básico en tiempos

entre 15-60 minutos a temperaturas entre 30-50°C, dando lugar a cromóforos con un máximo de absorbancia de 410 nm (Benítez, Ibarz et al. 2008).



Esquema 1 Mecanismo de reacción entre TNBS y aminoácidos

El mecanismo de reacción se representa en el Esquema 1. Consiste en una sustitución nucleofílica aromática (S_NAr), gracias a la presencia de grupos nitro, los cuales son electroatrayentes fuertes, que activan el anillo, favoreciendo la reacción de (S_NAr). Inicialmente ocurre el ataque nucleofílico del nitrógeno del aminoácido al carbono unido al grupo sulfónico, generando un carbanión que es estabilizado por resonancia, luego sobreviene la eliminación del ion sulfito generando el compuesto cromóforo mencionado (Wade 2004). La reacción termina mediante la adición de un exceso de sulfito de sodio. Éste método correlaciona bien con el método OPA y se obtienen datos reproducibles, sin embargo tiene la desventaja de que el reactivo es inestable, hay riesgo de explosión, los valores de los blancos son altos, hay riesgo de contaminación con ácido pícrico; además, los azúcares reductores y el amonio generan interferencia. El método no es efectivo con prolina e hidroxiprolina y la reacción con lisina altera los resultados (Benítez, Ibarz et al. 2008)

1.5.2.2. Determinación de Nitrógeno soluble

Otra forma de determinar el grado de hidrólisis, es mediante la determinación de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) y su proporción con respecto a la cantidad de nitrógeno total como se muestra en la Ecuación 2 (Ortiz 2017).

$$\text{Ecuación 2 } GH = \frac{\text{Nitrógeno soluble en TC al 10\%}}{\text{Nitrógeno total}} * 100$$

Las técnicas más usuales para determinar la proteína soluble son: el método Kjeldhal, la reacción de Biuret o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos. También se ha empleado el método de Dumas, que consiste en la oxidación del compuesto con CuO, con lo que el nitrógeno de la muestra pasa a nitrógeno gas (N₂), midiéndose el volumen desprendido, con buena correlación contra otros métodos espectrofotométricos (Guadix 2000; Benítez, Ibarz et al. 2008).

1.5.2.3. Determinación potenciométrica de protones liberados (pH estático)

En el método pH estático, la acidez de la reacción de hidrólisis se mantiene constante mediante la adición de base o de ácido, dependiendo de las condiciones iniciales de hidrólisis, es proporcional al GH. Este método sólo se aplica para hidrólisis enzimática de proteínas a pH fuertemente ácido, neutro o alcalino (Benítez, Ibarz et al. 2008).

1.5.3. Determinación de actividad biológica

En los hidrolizados proteicos de peces o partes de éste, la proteína es fraccionada por las enzimas generando moléculas más pequeñas como polipéptidos (<50 aminoácidos) y péptidos (2-20 aminoácidos), de los cuales algunos tienen actividad biológica, que incluyen propiedades anticancerígenas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antioxidantes y antimicrobianas (Halim, Yusof et al. 2016).

1.5.3.1. Actividad antioxidante

En los últimos años han aumentado las investigaciones con el fin de encontrar antioxidantes de origen natural, debido a que muchos antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado, el hidroxianisol butilado, terc-butilhidroquinona y galato de propilo son tóxicos y pueden dañar el ADN. La importancia de encontrar nuevos antioxidantes se debe a la necesidad de prevenir enfermedades producidas por los radicales libres y evitar el deterioro de los alimentos.

Muchos investigadores han aislado péptidos antioxidantes de hidrolizados proteicos, de una gran variedad de peces, los cuales se han caracterizado por tener secuencias cortas de aminoácidos (5-16 aminoácidos), con aminoácidos hidrófobos como fenilalanina, alanina, valina, leucina, prolina, histidina y Tirosina, y los aminoácidos cisteína y metionina que contienen azufre (Halim, Yusof et al. 2016).

Métodos para determinar actividad antioxidante

Los métodos para determinar la actividad antioxidante son *in vivo* e *in vitro*. Los últimos son utilizados con mayor frecuencia en hidrolizados proteicos de peces, destacándose la inhibición de radicales libres 2,2-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) y Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); la inhibición de radicales hidroxilo; determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); barrido de especies reactivas de oxígeno (ROS); poder antioxidante reductor del hierro (FRAP); barrido de radicales superóxido; barrido del radical peroxilo (ORAC); actividad de inhibición de la peroxidación de lípidos; actividad quelante de metales; reducción de la actividad energética; inhibición de la autooxidación del ácido linoleico y la inhibición de la peroxidación del ácido linoleico (Halim, Yusof et al. 2016).

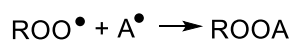
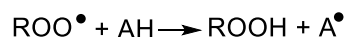
Métodos DPPH y ABTS

Los métodos DPPH y ABTS han sido ampliamente utilizados, para evaluar la actividad de eliminación de radicales de péptidos e hidrolizados proteicos, debido a la estabilidad, simplicidad y rapidez (Li, Jiang et al. 2008). Experimentalmente, se determina la inhibición de los radicales, mediante la disminución de absorbancia a 515,00 y 729,70 nm para DPPH[•] y ABTS^{•+} respectivamente. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición reemplazando en la Ecuación 3, o como equivalentes de un antioxidante de referencia como el TROLOX.

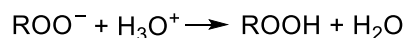
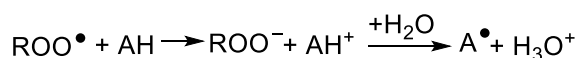
$$\text{Ecuación 3: \%Inhibición} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} * 100$$

Los mecanismos generales para eliminación de radicales, pueden ser de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) o un electrón (SET). Ambos conllevan a la estabilización del radical como se muestra el Esquema 2 (Schaich, Tian et al. 2015). Los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} reaccionan por ambos mecanismos.

HAT-transferencia de átomos de hidrógeno



SET-transferencia de un solo electrón

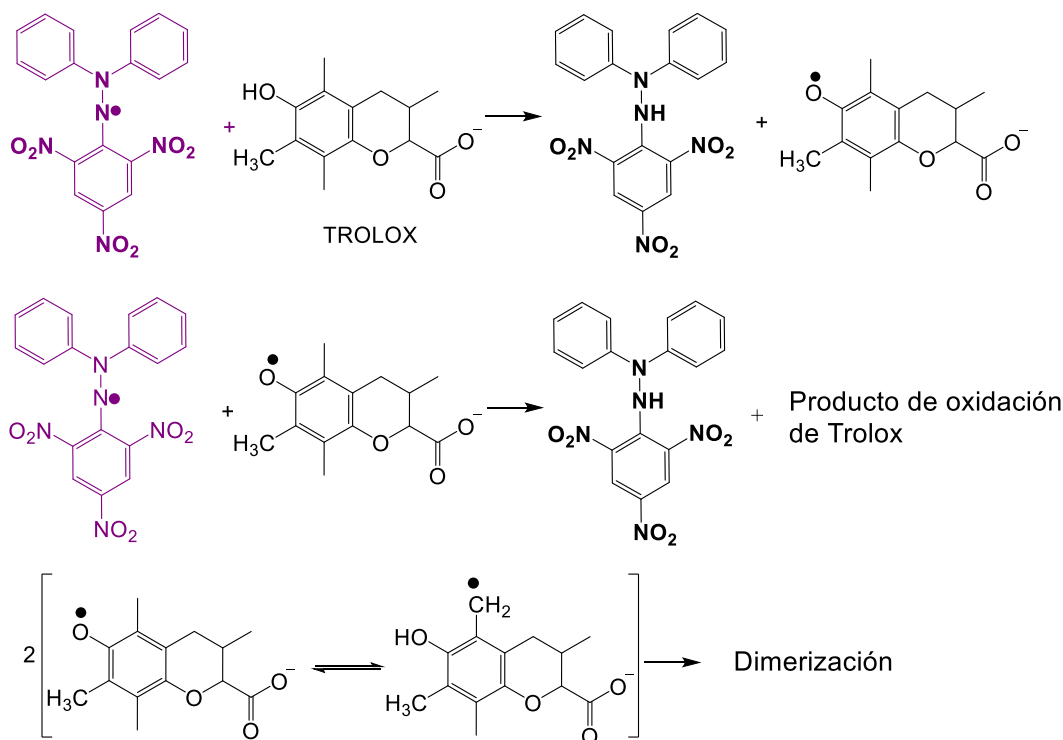


AH= Cualquier antioxidante con H donable. Fuente Schaich, Tian et al. (2015)

Esquema 2 Mecanismos de eliminación de radicales.

El mecanismo HAT se retarda por difusión, es independiente del pH y fuertemente inhibido por solventes de unión de hidrógeno, como el metanol. Por otro lado, el mecanismo SET se da en femtosegundos, aumenta con el pH, por la mayor disponibilidad de electrones y no se afecta por difusión (Schaich, Tian et al. 2015). El mecanismo predominante de reacción de proteínas con radicales es el de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), por lo que los métodos expuestos, pueden afectar la medida real debido al uso de solventes como el metanol en DPPH[•] y el impedimento estérico de los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•], los cuales no son un buen modelo para los pequeños radicales altamente reactivos en los sistemas biológicos y alimentos (Ejemplos: OH[•], NO[•], O₂^{•-}). (Schaich, Tian et al. 2015). Por las razones expuestas anteriormente, además de que muchos antioxidantes pueden perderse durante la digestión alcanzando concentraciones críticas que afectan su bioactividad y a que algunos metabolitos producidos por la degradación de antioxidantes, pueden presentar mayor bioactividad; la actividad antioxidante se debe evaluar *in vivo*. (Schaich, Tian et al. 2015).

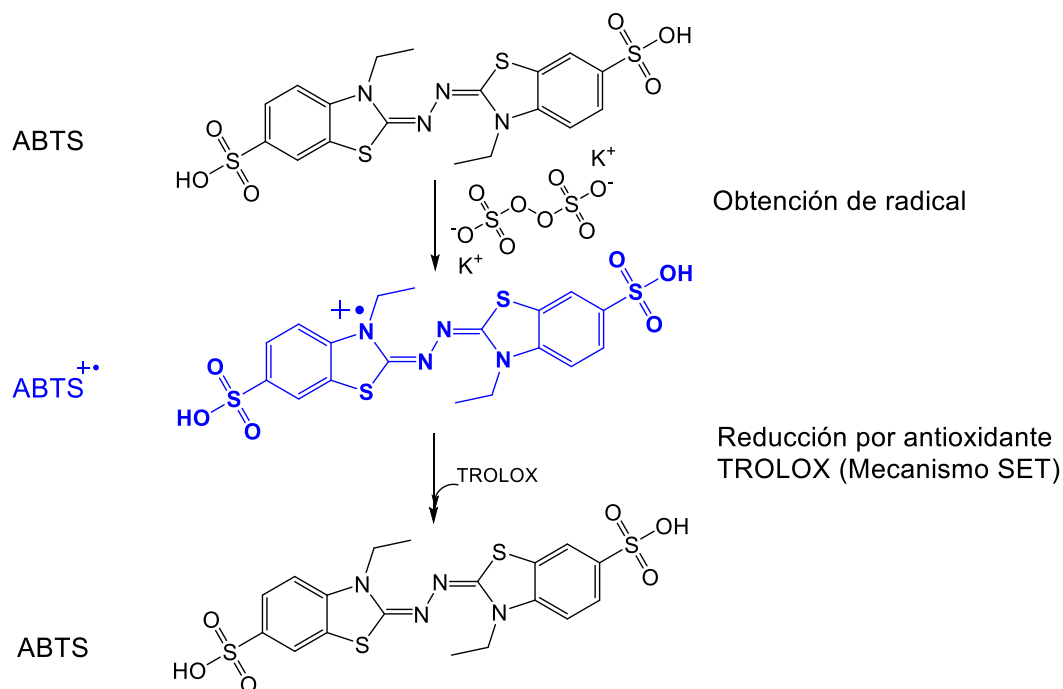
La reacción de los radicales DPPH[•] con TROLOX por el método HAT se muestra en el Esquema 3. Aún no está claro el mecanismo predominante para la eliminación de radicales DPPH[•], sin embargo, en las reacciones donde se usan solventes sustractores de protones, predomina el mecanismo SET (Jiménez 2007).



Fuente: Friaa and Brault (2006)

Esquema 3 Mecanismo HAT del TROLOX con radical DPPH[•]

Por otro lado, el radical $ABTS^{\bullet+}$ se obtiene directamente mediante la reacción con un agente oxidante fuerte, como el persulfato de potasio. El radical reacciona con el antioxidante TROLOX, mediante el mecanismo SET (Jiménez 2007), generando la disminución de la absorbancia a 729,7 nm (Ver Esquema 4).



Esquema 4 Reacciones mediadas con ABTS

1.5.3.2. Actividad antimicrobiana

En los últimos años, se han obtenido péptidos antimicrobianos (AMPs) mediante hidrólisis enzimática de proteínas de peces, cuya calidad y clase de producto lo determina el GH, tipo y concentración de enzima; al igual que la fuente y clase de proteína (Cheng, Tang et al. 2013; Wald, Schwarz et al. 2016).

Wald, Schwarz et al. (2016) determinaron actividad antibacteriana de hidrolizados de subproductos de trucha arcoíris con pepsina aislada del mismo pez, encontrando inhibición tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. La actividad antibacteriana más alta reportada la reportan en cultivos de bacterias *Flavobacterium psychrophilum* (Gram negativa) y *Salmoninarum renibacterium* (Gram-Positiva), las cuales afectan algunos cultivos de peces de la familia de los Salmónidos.

Muchos investigadores asocian la actividad antimicrobiana, con residuos hidrofóbicos y básicos, los cuales facilitan la interacción de los péptidos con los

fosfolípidos aniónicos de la membrana bacteriana o de otros patógenos. Por otro lado, el tamaño y secuencia de aminoácidos, determinan la estructura del péptido y su mecanismo de acción (Castañeda, Ortega et al. 2009; Cheng, Tang et al. 2013; Wald, Schwarz et al. 2016) .

Estructuras de los AMPs

Las estructuras que se han encontrados en AMPs son: anfipáticas con α -hélices, caracterizadas por tener de 12-37 residuos de aminoácidos; anfipáticas con hoja β formados a partir de enlaces disulfuro; y estructuras aleatorias, con cantidades altas de triptófano; o de prolina y arginina; o de histidina (Teixeira, Feio et al. 2012).

Mecanismos de acción

Los tres mecanismos de acción de los péptidos propuestos por los investigadores son: a) Mecanismo de tapón de barril, b) Mecanismo de poro toroidal o agujero de gusano y c) Mecanismo de alfombra. El mecanismo de barril-barrera consiste en la unión de los péptidos a través de la membrana mediante la formación de un tapón compuesto por péptidos helicoidales, la parte hidrofóbica de los péptidos se alinean en la capa lipídica central de la membrana y la hidrofílica forma el interior del poro (Castañeda, Ortega et al. 2009; Trabulo, Cardoso et al. 2010).

El mecanismo de poro toroidal o agujero de gusano, consiste en la formación de un poro mediante la asociación de los segmentos polares de los péptidos con la las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana (Trabulo, Cardoso et al. 2010).

El mecanismo de alfombra se basa en la acumulación de péptidos sobre la superficie de la bicapa lipídica principalmente mediante atracciones electrostáticas generando desestabilización y destrucción de la membrana (Neville, Cahuzac et al. 2006).

Métodos para determinar actividad antimicrobiana

Los métodos generales para medir la actividad antimicrobiana son: la valoración cilindro-placa o método de difusión por pozo y la valoración turbidimétrica. En el método de difusión por pozo, el microorganismo se inocula en cajas de Petri que contiene el agar adecuado para su crecimiento y se realizan pozuelos donde se adiciona la muestra, blancos y antibióticos de referencia. Los halos de inhibición ubicados alrededor del cilindro, se miden y comparan con los antibióticos de referencia y se calcula la potencia relativa de la muestra. Por el contrario, en el método turbidimétrico el microorganismo se inocula en caldo de cultivo adecuado y se mide la turbidez por métodos espectrofotométricos con y sin muestras. El aumento de absorbancia a 600 nm se relaciona con el crecimiento bacteriano (Pedraza and Castellanos 2009).

Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano tiene cuatro fases principales: a) Fase de latencia en donde los microorganismos se adaptan al ambiente y no hay un aumento significativo en el crecimiento, b) Fase exponencial caracterizada por un aumento rápido del microorganismo hasta agotar nutrientes o acumular sustancias tóxicas, c) Fase estacionaria en donde no hay crecimiento poblacional y d) Fase de muerte (Rodríguez, Frómeta et al. 2011).

1.6. Antecedentes de aprovechamiento de subproductos

1.6.1. Alimentación de especies menores

La inclusión baja o moderada de ensilaje de pescado en piensos para especies menores y crustáceos, ha mejorado parámetros de productividad. Toro and Concha (2016), quienes evaluaron las propiedades fisicoquímicas de los residuos piscícolas de tilapia roja a ensilaje biológico, concluyen, que los inóculos *L. plantarum* B2 y BAL de yogur, permite la obtención de ensilado biológico estable y apto para la elaboración de concentrados para especies piscícolas y animales de granja; por ejemplo, Perea, Garcés et al. (2011), evaluaron la inclusión de ensilaje biológico de vísceras de pescado en alimento para tilapia roja, reportando ganancia de peso, incremento en talla y mayor conversión alimenticia de los peces alimentados, con inclusión de ensilaje de 30%. Por otro lado, el ensilaje químico también ha sido incluido en piensos para especies menores; por ejemplo, Gomez, Ortiz et al. (2014), quienes realizaron una inclusión de 30% de ensilaje químico de vísceras de tilapia roja, en alimentación de pollos de engorde, reportan una disminución de los costos de producción hasta un 22,2%. En otra investigación similar, Garcés (2015) encontró que la inclusión de 10 y 20% de ensilaje químico de vísceras de trucha arcoíris en dietas para pollos de engorde, disminuyó los costos de alimentación y mejoró la rentabilidad económica del alimento. Análogamente, (Perea 2016), quien realizó una evaluación nutricional de ensilajes de residuos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en la alimentación de tilapia roja (*Oreochromis spp*), informó que la inclusión de 20% de ensilaje químico, obtenido mediante adición de ácido fórmico, presentó los mejores resultados para el pH, consistencia, perfil microbiológico, composición química y digestibilidad *in vitro* de la materia seca, concluyendo que el ensilaje químico de vísceras de trucha arcoíris, puede ser considerado como una alternativa de alta calidad nutricional para la alimentación de tilapia roja, debido al buen contenido de nutrientes (principalmente grasa y proteína) y a la alta digestibilidad de los nutrientes y la energía.

1.6.2. Extracción de aceite

Las vísceras de trucha arcoíris tienen un alto contenido de lípidos de buena calidad, por lo que varios investigadores han extraído y refinado el aceite para

darle valor agregado a éstos subproductos. Por ejemplo, Díaz, Bonilla et al. (2016) quienes establecieron condiciones de refinación aceite crudo, obtenido a partir de ensilaje de vísceras de trucha arcoíris, obtuvieron un aceite con características apropiadas. Por otro lado Ruales, Torres et al. (2014) extrajeron y caracterizaron el aceite de pescado derivado de subproductos de trucha arcoíris, y reportan una composición adecuada de ácidos grasos omega 3 mediante recuperación por fluidos supercríticos.

1.6.3. Actividad antioxidante

Muchos investigadores han encontrado actividad antioxidante en hidrolizados proteicos de subproductos de una gran variedad de peces por los métodos ABTS y DPPH, en la Tabla 3, se presentan algunas de las investigaciones que se reportan para éste tipo de sustrato.

Tabla 3 Actividad antioxidante en hidrolizados de subproductos de peces

Fuente	Enzimas	GH	DPPH	ABTS	Concentración (mg/mL)	Referencia
Piel <i>Aluterus monoceros</i>	Proteasa de <i>B. amyloliquefaciens</i> H11	2542 ^a	12,7 TE ^b	102,0 TE ^b	NR	Sai-Ut, Benjakul et al. (2014)
Piel de Hoki (<i>Johnius belangerii</i>)	Tripsina®	NR	30,2 ^c	ND	0,2	Mendis, Rajapakse et al. (2005)
	α-quimotripsina®	NR	10,0-20,0 ^c	ND	0,2	
	Pepsina®	NR	20,0-30,0 ^c	ND	0,2	
Espina dorsal de atún	Alcalasa®	<60,0	4,8 ^c	ND	NR	Je, Qian et al. (2007)
	α-quimotripsina®	74,3	17,4 ^c	ND	NR	
	Papaína®	<60,0	36,7 ^c	ND	NR	
	Pepsina®	74,5	35,8 ^c	ND	NR	
	Neutrasa®	74,8	5,1 ^c	ND	NR	
	Tripsina®	<60,0	6,9 ^c	ND	NR	
Vísceras de trucha arcoíris	Protamex®	56,0	40,0 ^c	43,0 ^c	10,0	Gaviria (2017)
Espinas dorsales de salmón desengrasado	Colorasa®	22,1	32,0 ^d	ND	2,5	Slizyte, Rommi et al. (2016)
	Protamex®	22,6	38,0 ^d	ND		
Vísceras de sardinella	Extracto de enzimas endógenas	6,0	53,8	ND	2,0	Bougatef, Nedjar-Arroume et al. (2010)

ND: No Determinado; NR: No reportado; ^ammol Leu/mg; ^bTE: μmol TROLOX/g; ^cPorcentaje de inhibición; ^dPorcentaje de incremento. Modificado de Villamil, Váquiro et al. (2017)

Las investigaciones que se encuentran en la literatura sobre actividad antioxidante en ensilaje de subproductos marinos, se enfocan en los desechos de crustáceos, como el camarón; por ejemplo, Sachindra and Bhaskar (2008) informa actividad antioxidante de licor de biorresiduos de camarón fermentado (ensilado biológico), con porcentaje eliminación del radical DPPH de 40% a una concentración de 1,0 mg/ml, e inhibición del radical ABTS de 95% a 0,5 mg/ml. La actividad antioxidante

se atribuye a la formación de péptidos y aminoácidos durante la hidrólisis de proteína residual del camarón y al contenido de carotenoides. Cabe destacar que los salmónidos como la trucha arcoíris, y otros animales, no pueden sintetizar carotenoides, por lo que su carne es blanca y por tanto es necesario suplementarlos en su dieta (Mora 1996).

1.6.4. Actividad antimicrobiana

Muchos estudios han demostrado que la hidrólisis enzimática de proteínas de huevo o leche, genera péptidos antimicrobianos, sin embargo, son pocas las investigaciones en hidrolizados de carne y subproductos (Wald, Schwarz et al. 2016). En la Tabla 4 se muestran algunos resultados de actividad antimicrobiana de hidrolizados proteicos de diferentes fuentes.

Tabla 4 Actividad antimicrobiana de hidrolizados de diferentes fuentes

Fuente	Enzima	GH (%)	Inhibición (%)	Concentración (mg/mL)	Referencia
Vísceras de trucha arcoíris	Protamex®	17	66,9	10	Gaviria (2017)
Vísceras de trucha arcoíris	Pepsina aislada	21-30	>50	20	Wald, Schwarz et al. (2016)
Leche de Yak	Tripsina®	11-25	>40	0,5	Cheng, Tang et al. (2013)
Músculo de <i>Barbus callensis</i>	Alcalasa®	6,6		1	Sila, Nedjar-Arroume et al. (2014)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción mundial del sector acuícola ha aumentado durante las últimas cinco décadas, por lo que es probablemente el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento. En el año 2014, la producción mundial total ascendió a 73,8 millones de toneladas (FAO 2016); Análogamente, en Colombia, aumentó ligeramente a 92.002 toneladas, siendo la tilapia, trucha y camarón, las especies más cultivadas (AUNAP 2013). En el municipio de Silvia, departamento del Cauca la acuicultura se basa en el cultivo de Trucha Arcoíris, con una producción en el 2014 de 737,4, toneladas siendo uno de los subsectores económicos más importantes del municipio y del Departamento del Cauca. El rendimiento de producción en Silvia fue de 83% quedando un porcentaje significativo de subproductos como escamas, baba, sangre y vísceras (tripas, estómagos, hígados), considerados de desecho, ignorando el contenido de proteínas, lípidos, vitaminas y oligoelementos. Estos generan contaminación ambiental, riesgo sanitario y pérdida por reducción de las utilidades (APROPESCA 2014). Además, el mal manejo de residuos genera la proliferación de bacterias, hongos e insectos, los cuales promueven enfermedades en humanos, animales y plantas, y contaminan las fuentes hídricas que abastecen la región. El fortalecimiento progresivo de la acuicultura en el Cauca, requiere medidas para mitigar la contaminación ambiental y disminuir el riesgo sanitario en la región, además de fortalecer la producción, gracias a un mejor manejo de los subproductos a partir de procesos, que promuevan la generación de valor agregado. Este trabajo se desarrolló en el marco de proyecto “Alternativas para el aprovechamiento de subproductos de la agroindustria piscícola-ALTPEZ-ID3883”, en el cual se han obteniendo productos a partir de los subproductos generados de la industria piscícola, generando un gran impacto a nivel departamental y nacional. Una de las líneas importantes dentro del proyecto es la evaluación de actividades fisiológicas que pueden tener los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (incluyendo el ensilaje) cultivada en Silvia-Cauca, debido a que los péptidos generados en la hidrólisis, además de ser una fuente de energía y nitrógeno, pueden tener propiedades fisiológicas importantes, como antioxidante y antimicrobiana (Harnedy and FitzGerald 2012). El ensilaje ha sido utilizado principalmente para alimentación animal, sin embargo, las propiedades fisiológicas puede darle un valor agregado, y abrir una brecha para nuevas investigaciones que permitan obtener alimentos funcionales para peces. Por éstas razones, en el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante de ensilaje químico de vísceras de trucha arcoíris, por los métodos DPPH y ABTS; y la actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Aeromona hydrophila* y *Streptococcus agalactie*, las cuales afectan los cultivos de tilapia roja. Se realizaron dos pruebas de antagonismo frente a *A.hidrophila* por los métodos de difusión en pozos y turbidimétrico; mientras que la actividad frente a *S. Agalactiae*, se evaluó sólo por el método difusión en pozos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de vísceras de Trucha arcoíris, obtenido mediante ensilaje químico.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Determinar la actividad proteolítica de enzimas ácidas presentes en subproductos de Trucha Arcoíris.

3.2.3. Estudiar en el ensilaje químico la actividad antioxidante mediante los métodos DPPH (2,2-difenil-1 picrilhidracilo) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) y la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión por pozos

3.2.4. Encontrar la relación entre del grado de hidrólisis (GH) del ensilaje químico y la actividad antioxidante y antimicrobiana.

4. METODOLOGÍA

4.1. Recolección y transporte de vísceras

Los subproductos de trucha arcoíris se obtuvieron en el municipio de Silvia-Cauca, de piscifactorías de la Asociación Productora y Comercializadora de Productos Acuícolas y Agrícolas (APROPESCA). El municipio se encuentra ubicado entre los 2°47'37" y 2°31'24" de latitud norte y entre los 76°10'40" y 76°31'05" de longitud al occidente del meridiano de Greenwich, sobre el flanco occidental de la cordillera central, a 2.600 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura media de 15°C (Silvia-Cauca 2014). Se realizó el muestreo al azar en estanques que contenían en promedio 1500 peces; los animales se encontraban en etapa de engorde con un peso promedio de 400 g y en el momento del sacrificio tenían condiciones de ayuno por dos días.



Figura 3 Trucha arcoíris de Silvia-Cauca

Después del proceso de eviscerado, los subproductos se empacaron en bolsas plásticas inertes. Para evitar reacciones post-mortem se colocaron en neveras de icopor con hielo e inmediatamente se transportaron al laboratorio de biotecnología ubicado en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca.

Para determinar la cantidad de muestra representativa n muestral, se aplicó la Ecuación 4.

Ecuación 4.
$$n = \frac{N * Z^2}{(N-1) * e^2 + Z^2}$$

Donde:

n : tamaño de la muestra

N : tamaño del universo

Z : desviación del valor medio, $Z=1,96$ para un nivel de confianza 95%

e : margen de error máximo (p.e. 5%)

4.2. Análisis proximal

Una muestra compuesta y representativa de vísceras se homogeneizó para luego realizar el análisis proximal, de acuerdo a los protocolos expresados en la Tabla 5.

Tabla 5. Métodos análisis proximal

Determinación	Descripción	Método AOAC
Humedad	Deshidratación a 105 °C en estufa hasta peso constante	950.01
Extracto etéreo	Extracción Soxhlet por 4 horas	991.36
Proteína bruta	Método Kjeldahl: Digestión ácida, recolección y destilación de amoníaco en ácido bórico y titulación	968.06
Ceniza	Calcinación a 550 °C por 4 h	942.05
Fibra bruta	Weende: Digestión ácido-base y calcinación	962.09

4.3. Obtención de ensilaje químico

El ensilaje químico se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Goosen, de Wet et al. (2014) con ligeras modificaciones. Se pesaron 200,00±0,01 g de vísceras en un tarro plástico con tapa previamente desinfectada con hipoclorito de sodio (5%) y etanol (98%), posteriormente se adicionó ácido fórmico en relación 2,5% (peso/volumen) y con una varilla de vidrio se agitó durante 15 s para lograr una homogeneización. Las mezclas se colocaron en un cuarto que mantiene la temperatura a 15°C. El ensilaje químico se estudió a diferentes tiempos de hidrólisis de la siguiente manera: Las primeras 44h, se tomaron muestras cada 6h, posteriormente, se tomaron muestras cada 12h hasta un tiempo de 144h, luego, se tomó una muestra a 162 h (18 h después), y por último, se tomaron muestras cada 24h, hasta 234h de ensilaje.

4.3.1. Inactivación de enzimas endógenas

Una vez se terminaron los tiempos de ensilaje, las muestras destructivas, se sometieron a calentamiento a 80°C durante 15 min, con la finalidad de inactivar las enzimas endógenas de las vísceras y así detener la reacción de hidrólisis. Un proceso similar usó Wald, Schwarz et al. (2016) para inactivar enzimas endógenas de vísceras de trucha arcoíris (80°C durante 10 min). Por otro lado, Restrepo (2016) inactivó enzimas de vísceras de trucha a 65°C durante 15 min. Al finalizar la inactivación, se recuperó la cantidad de agua perdida durante el proceso, luego se homogeneizó durante 20 s y se almacenó en tarro plástico a -4°C.

4.3.2. Análisis proximal de ensilaje químico

El análisis proximal de ensilaje químico se realizó de acuerdo a los métodos de la descritos en el numeral 4.2, Tabla 5.

4.4. Caracterización del hidrolizado

4.4.1. Determinación de solubilidad

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Bradford (1976) y editado por Walker (2002).

Preparación del reactivo: Se disolvió $0,0250 \pm 0,0001$ g de azul de Comassie en 12,5 mL de etanol al 95%, luego se adicionó 25 mL de ácido fosfórico al 85% y se aforó la solución a 250 mL con agua destilada. Posteriormente se filtró la mezcla al vacío.

Curva de calibración: Se utilizó la albúmina sérica bovina como referencia, debido a que es usada comúnmente permitiendo comparar resultados con otros autores, además es de bajo costo y está disponible en forma pura. Para realizar la curva de calibración, se preparó una solución stock de 1 mg/mL de albúmina sérica bovina. A partir de ésta se prepararon soluciones estándares de 0,20, 0,40, 0,60 y 1,00 mg/mL. Posteriormente, se adicionó 5 mL de reactivo Azul de Comassie a 100 μ L de cada solución. Después de 15 min se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Finalmente, se obtuvo la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

Preparación de muestra: Para la obtención de los extractos proteicos, se siguió la metodología propuesta por Ozgen, Reese et al. (2006) con ligeras modificaciones: Se pesó $4,0000 \pm 0,0001$ g de ensilaje químico, con tiempos de hidrólisis de 24,07 h; 48,00 h y 144,00 h y se ajustó el pH a 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 y 7,00 con NaOH 0,50 M, utilizando un pH-metro de sólidos. Cada mezcla se homogenizó con vórtex por 15 s y se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C por 15 min. Luego se filtró al vacío y se volvió a centrifugar el sobrenadante a 12.000 rpm a 4°C por 10 min. Por último el sobrenadante se decantó y se almacenó a -4°C hasta el uso respectivo.

Determinación proteína soluble de la muestra: Se realizó por el método descrito anteriormente. La proteína soluble, se cuantificó interpolando en la curva de calibración, teniendo en cuenta las diluciones de las muestras.

4.4.2. Seguimiento de grado de hidrólisis

El seguimiento del GH de ensilaje químico se realizó por el método TNBS descrito por Sai-Ut, Benjakul et al. (2014). A continuación se detalla la metodología:

4.4.2.1. Implementación del método TNBS

Preparación del reactivo TNBS: Se preparó una solución de TNBS a 0,01% (v/v) a partir de una solución Stock de 5%, bajo condiciones de oscuridad.

Preparación de solución Stock y estándares: El aminoácido de referencia utilizado fue Leucina, debido a que se encuentra en gran proporción en las vísceras (7,8%), además de que no tiene impedimento estérico para reaccionar con TNBS. Para preparar la solución stock del aminoácido en mención, se secó $2,0000 \pm 0,0001$ g de Leucina a 100°C durante dos horas para eliminar la humedad. Posteriormente se preparó 50 mL de solución Stock de Leucina de concentración 10 mmol/L y mediante diluciones, se obtuvo estándares de 0,60; 1,20; 1,80; 3,00; 4,20 y 6,00 mmol/L.

Curva de calibración: Se mezcló 128 μL de solución estándar de Leucina y 2 mL de buffer fosfato (pH 8,2), luego se adicionó 1 mL de TNBS 0,01% y se colocó en un baño termostatado a 50°C durante 30 min. Se adicionó solución de sulfito de sodio 0,1 M y se dejó reposar por 15 min para medir la absorción a 410 nm. La regresión lineal se determinó por el método de mínimos cuadrados. Se evaluaron parámetros de reproducibilidad y repetibilidad durante 5 días.

4.4.2.2. Determinación de hidrólisis total

Se pesó $0,5000 \pm 0,0001$ g de ensilaje húmedo de tiempo cero, posteriormente se adicionó 4,5 mL de HCl 6 N. Los triplicados se colocaron en horno a 110°C durante 24 h en un baño de arena, luego se dejaron enfriar y se neutralizaron con 4,5 mL de NaOH 6 N adicionado lentamente. Por último se filtró al vacío y se hicieron las diluciones respectivas para determinar aminoácidos libres totales por el método TNBS.

4.4.2.3. Determinación de aminoácidos libres

La determinación de aminoácidos libres de los extractos proteicos a pH 7,00 (Extractos con mayor solubilidad), se realizó por el método TNBS descrito anteriormente. El GH se expresó como porcentaje y se calculó usando Ecuación 1 de la página 18.

4.5. Determinación de actividad antioxidante

4.5.1. Método ABTS

La actividad de captación de radicales ABTS se realizó por la metodología descrita por Borawska, Darewicz et al. (2016) con algunas modificaciones, que incluyen el pH de reacción adecuado, propuesto por Ozgen, Reese et al. (2006), como se describe a continuación:

4.5.1.1. Preparación del reactivo ABTS

Se preparó 1 mL de ABTS 7,00 mM y 1 mL de solución de $K_2S_2O_8$ 2,45 mM en buffer acetato 20 mM (pH 4,50), previamente centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, la mezcla de ambos en proporción 1:1 se dejó en reposo por 16 horas, sin incidencia directa de la luz y se ajustó la absorbancia a 0,700, a una longitud de onda de 729,70 nm, con buffer acetato pH 4,50.

4.5.1.2. Curva de calibración

Se preparó una solución stock de TROLOX 2000 μ M y a partir de ésta, se generaron soluciones estándares de 0, 50, 100, 200, 300 y 600 μ M. Para iniciar la reacción se mezcló 135 μ L de estándar con 4 mL de reactivo ABTS, con agitación durante 2 s en vórtex. Las absorbancias se midieron después de 30 min de reacción, a una longitud de onda de 729,70 nm. La linealidad de la curva de calibración se determinó usando el método de mínimos cuadrados. Se realizaron parámetros de reproducibilidad y repetibilidad durante 5 días.

4.5.2. Método DPPH

El método DPPH se realizó de acuerdo a la metodología seguida por Zhang, Duan et al. (2012) con modificaciones que incluyen lo propuesto por Jiménez, Sánchez et al. (2012); como se describe a continuación:

4.5.2.1. Preparación del reactivo DPPH

Se preparó una solución de DPPH 30 mg/L en metanol sin incidencia de la luz directa. La absorbancia se ajustó a 0,700 a una longitud de onda de 515 nm.

4.5.2.2. Curva de calibración

Se preparó una solución stock de TROLOX 2000 μ M y a partir de ésta, se prepararon soluciones estándares de 0, 50, 100, 150, 200 y 300 μ M. Para iniciar la reacción se mezcló 200 μ L de estándar con 4 mL de reactivo DPPH y se agitó durante 2 segundos en vórtex. Después de 30 min la mezcla de reacción se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min, a temperatura ambiente y enseguida se midió la absorbancia a 515 nm. La linealidad de la curva de calibración se determinó usando el método de mínimos cuadrados. Se realizaron parámetros de reproducibilidad y repetibilidad durante 5 días.

4.5.3. Preparación de la muestra

Los extractos proteicos de diferentes grados de hidrólisis obtenidos a pH 7,00, se diluyeron en metanol y se centrifugaron a 12.000 rpm, a 4 °C, durante 10 min, para eliminar las proteínas precipitadas. Para ver la influencia del ácido fórmico en la actividad antioxidante, se prepararon soluciones de ácido fórmico 0,24 M a pH

3,00; 4,00; 5,00; 6,00 y 7,00 y se realizó el mismo procedimiento usado con las muestras.

4.5.4. Medida de actividad antioxidante

La actividad antioxidante se midió por los métodos ABTS y DPPH descritos anteriormente. Los resultados se expresaron como TEAC ($\mu\text{mol TROLOX/g}$ proteína), y porcentaje de inhibición a una concentración de 10 mg/mL.

4.6. Determinación de actividad antimicrobiana

La determinación de actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en pozo mediante la metodología descrita por Beaulieu, Thibodeau et al. (2013) con ligeras modificaciones. La prueba de antagonismo se realizó entre los extractos proteicos de GH: 0; 4,84; 15,26; 23,41; 26,33 y 30,32%, y dos bacterias patógenas: *Streptococcus agalactiae* (ATCC 51487) y *Aeromona hydrophila* (ATCC 700183), las cuales afectan los cultivos de tilapia roja. Las bacterias fueron adquiridas en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Cauca. El efecto antimicrobiano de las muestras frente a la bacteria *Aeromona hydrophila* se evaluó por el método turbidimétrico de acuerdo con la metodología usada por Wald, Schwarz et al. (2016), con modificaciones.

4.6.1. Preparación de agares y caldos de cultivo

Las bacterias objeto de estudio se cultivaron en caldo y en agar de acuerdo a las condiciones descritas en la Tabla 6.

Tabla 6 Condiciones de cultivo para las bacterias

Bacteria	Caldo de cultivo	Medio de cultivo en agar
<i>Streptococcus agalactiae</i>	BHI*	BHI
<i>Aeromona hydrophila</i>	TSB**	TSA***

* BHI: infusión cerebro-corazón **TSB: Caldo triptona de soja, ***TSA: Tripticasa de soja

4.6.1.1. Preparación de agares

Se depositó $20,8000 \pm 0,0001$ g de BHI y $40,0000 \pm 0,0001$ g de TSA en dos erlenmeyers diferentes de 600 mL y se adicionó 400 mL de agua destilada a cada uno. Las soluciones se mantuvieron bajo agitación y calentamiento suave hasta completa homogenización, posteriormente se esterilizó en autoclave. Los agares tratados se sirvieron en cajas de Petri dentro de una cabina de flujo laminar.

4.6.1.2. Preparación de caldos

Se mezcló $3,5150 \pm 0,0001$ g de caldo BHI y $24,0000 \pm 0,0001$ g de TSB con 95 mL y 800 mL de agua destilada respectivamente. Las soluciones se mantuvieron en agitación hasta su homogenización. Los caldos se sirvieron en tubos y se esterilizaron en autoclave.

4.6.2. Activación de las bacterias

Las bacterias criocongeladas se pasaron a un tubo con caldo de cultivo óptimo. Posteriormente se colocaron en incubadora a 35 °C por 12 h. Luego se realizó la siembra por agotamiento en caja de Petri con cultivo agar. La caja inoculada se incubó a 35°C durante 24 h. Por último, se realizaron pases de la bacteria al 10% cada 12 h por 24 h.

4.6.3. Prueba de antagonismo por difusión en pozo

Dentro de una cabina de flujo laminar, se realizó una siembra masiva de las bacterias en agar óptimo, utilizando un hisopo estéril. Posteriormente, con una punta se realizaron cuatro pozos por caja y el agar sobrante se retiró con una aza estéril. Luego se tomó 50 µL de los extractos proteicos y se adicionó en los pozos de los agares de ambas bacterias. Se llevó un blanco con ácido fórmico 0,24 M (pH 7,00). Los antibióticos de referencia para *Aeromonas hydrophila*, fueron oxitetraciclina (OT) y cloranfenicol (C); y para la bacteria *Streptococcus agalactiae*, los antibióticos ampicilina (A) y cloranfenicol (C). Todas las cajas se incubaron durante 24 horas a 35°C y luego se midieron los halos de inhibición de las muestras, del blanco y de los controles positivos usando un pie de rey.

4.6.4. Prueba de antagonismo turbidimétrica

Se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos frente a la *Aeromonas hydrophila* por el método turbidimétrico.

4.6.4.1. Muestras

Las muestras corresponden a los extractos obtenidos con GH de 0,0; 4,84; 12,88; 15,26; 20,85; 23,41; 30,32 y 38,39%. Se utilizó un blanco de ácido fórmico pH 7,00 y un control de bacteria en condiciones óptimas.

4.6.4.2. Porcentaje de inhibición de muestras

Se adicionó 0,5% de cada extracto proteico al caldo con bacteria al 10%, e inmediatamente se midió la absorbancia a 600 nm. Los tratamientos se incubaron

a 35°C, manteniendo la agitación a 100 rpm. La absorbancia se midió cada 3 h, durante 12 h. Se usó un blanco con ácido fórmico 0,24 M (pH 7,00) y control de bacteria sin muestra. El porcentaje de inhibición se determinó con las absorbancias medidas a 12 h y concentración de 41 mg/mL.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1. Recolección de vísceras de pescado



Figura 4 Recolección, transporte y cuarteo de vísceras. a) Captura, b) Eviscerado, c) Recepción y d) Cuarteo

Para muestrear primero se recolectaron las vísceras de 759 peces los cuales se encontraban en condiciones de dos días de ayuno. El rendimiento del proceso de fileteado es del 83% por lo tanto se obtuvo aproximadamente 51,61 Kg de vísceras. En el laboratorio se realizó un cuarteo para obtener una muestra homogénea y los subproductos sobrantes se utilizaron en otras investigaciones del proyecto ALTPEZ.

Tabla 7 Animales muestreados por estanque

Factor	Valor	Parámetro
Z	1,96	95% de confianza
N	1.500	animales estanque
e	0,05	%
n	759	número de animales muestreados

5.2. Obtención de ensilaje químico



Figura 5 Obtención de ensilaje químico. a) Pesaje y b) Adición de ácido fórmico

El ensilaje químico de vísceras de trucha arcoíris se obtuvo mediante la adición de ácido fórmico, el cual es un ácido orgánico que permite un pH bajo facilitando la acción de las pepsinas y la eliminación de carga bacteriana gracias al pH y al efecto bactericida en su forma no disociada. La inclusión baja o moderada de ensilaje químico de pescado, en piensos para animales de granja y peces, ha mejorado parámetros de productividad (Pardo and Parra 2000). Agregado a esto, el uso de ácidos orgánicos de cadena corta como el ácido fórmico, puede mejorar el rendimiento y crecimiento de los animales de granja, peces y crustáceos como lo han reportado algunos autores (Olsen and Toppe 2017), por lo que el producto obtenido en ésta investigación, puede usarse para éste fin.

5.3. Análisis proximal

El análisis proximal de las vísceras de trucha arcoíris muestra una composición de macromoléculas importante, representada en lípidos con el 69,20% y proteínas el 27,30%. El ensilaje químico presentó un porcentaje de proteínas y lípidos de 22,6 y 65,9% respectivamente.

La composición de proteínas y lípidos varía entre especies diferentes e incluso en las misma especies, por ejemplo, el contenido de proteína de las vísceras de trucha arcoíris de Silvia-Cauca de 27,3% en base seca, es superior al encontrado en vísceras del mismo pez reportado por Dumas, de Lange et al. (2007), quienes reportan un contenido de 22,2% y por Bermudez, Rodriguez et al. (1999) en vísceras de cachama blanca quienes informan un 20,2%. El porcentaje de proteína es inferior al reportado por Taheri, Anvar et al. (2013) en trucha arcoíris, quienes encontraron un 52,9% de proteína. Por otro lado el porcentaje de lípidos (69,2) fue similar a reportado por Dumas, de Lange et al. (2007) (69.3%) y superior al hallado por Bermudez, Rodriguez et al. (1999) y Taheri, Anvar et al. (2013), en

vísceras de cachama blanca y de trucha arcoíris, con porcentajes de 49,2 y 45,8% respectivamente. Las diferencias en la composición se debe a factores como la edad, sexo, tamaño y rasgos genéticos del pez, así como también del medio ambiente y alimentación (FAO).

El contenido de proteína en vísceras de 27,3% encontrado en ésta investigación, es inferior a lo encontrado por Dumas, de Lange et al. (2007) y Gokoglu, Yerlikaya et al. (2004) en filete de trucha con porcentajes de 68,9 y 74,4%, respectivamente. Sin embargo, la fracción lipídica de vísceras es superior con un 69,2% en comparación al 27,1% y 12,9% informado por los autores mencionados anteriormente. Evidenciando que se pierden importantes nutrientes cuando no hay un aprovechamiento adecuado de las vísceras.

El análisis proximal del ensilaje químico muestra que los porcentajes de proteína y lípidos son de 22,6 y 65,9%, respectivamente, los cuales son inferiores a lo encontrado en la materia prima. Los porcentajes de pérdida son; 4,7% de proteína y 3,3% de lípidos, que pueden deberse posiblemente a la formación de compuestos lipoproteicos, los cuales no son digeribles, aumentando el contenido de fibra de 0,01 a 5,3% (Ver Tabla 8).

Tabla 8 Comparación de la composición proximal de subproductos de trucha arcoíris

	%Cenizas	%Proteína	%Lípidos	%Fibra	Referencia
Vísceras de trucha	3,2±0,1	27,3±0,0	69,2±0,3	0,01±0,00	Presente investigación
Ensilaje de vísceras de trucha	5,5±0,1	22,6±0,2	65,9±0,1	5,3±0,2	Presente investigación
Vísceras de trucha	2,2	22,2	69,3	N/D	Dumas, de Lange et al. (2007)
Vísceras de trucha	9,6	52,9	45,8	N/D	Taheri, Anvar et al. (2013)
Filete de trucha	4,6	68,9	27,1	N/D	Dumas, de Lange et al. (2007)
Filete de trucha	5,1	74,4	12,9	N/D	Gokoglu, Yerlikaya et al. (2004)
Vísceras de cachama blanca	2,73	20,2	49,2	0,23	Bermudez, Rodriguez et al. (1999)
Ensilaje de vísceras de cachama blanca	N/D	25,7	32,5	N/D	Pardo and Parra (2000)

5.4. Tratamientos y caracterización del hidrolizado

5.4.1. Determinación de solubilidad

5.4.1.1. Método Bradford

Usando el método de mínimos cuadrados se determinó la linealidad de la curva de calibración. La ecuación lineal fue $y = 0,6141x - 0,0393$ con el coeficiente de determinación r^2 de 0,9946, lo que indica que el 99,46% de la incertidumbre original se explica mediante el modelo lineal (Ver Anexo 2).

5.4.1.2. Determinación proteína soluble

En estudios preliminares, el GH máximo alcanzado en el ensilaje químico es estable a 144 h, por lo tanto, la bioactividad debe encontrarse a tiempos de hidrólisis menores. Por ésta razón, se determinó la solubilidad a diferentes pHs de ensilajes con tiempos de 24, 48 y 144 h. Los porcentajes de proteína soluble se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9 Proteína soluble a diferente pH de extracción y tiempo de ensilaje

pH	Ensilaje de 24 h		Ensilaje de 48 h		Ensilaje de 144 h	
	%Proteína soluble	C _v	%Proteína soluble	C _v	%Proteína soluble	C _v
3	18,06±0,59	3,27	24,22±0,92	3,79	15,28±0,07	0,43
4	26,12±1,03	3,94	32,31±0,72	2,23	21,96±0,93	4,22
5	37,70±0,34	0,91	45,83±0,86	1,87	31,75±1,54	4,87
6	57,76±2,22	3,84	49,76±2,44	4,90	42,82±1,73	4,03
7	87,56±2,14	2,44	83,63±1,28	1,13	67,00±2,99	4,47

La solubilidad de las proteínas de ensilaje de 48 h presentó porcentajes de 24,22% a pH 3,00 y de 45,83% a pH 5,00, mayor en comparación con ensilaje de 24 h, en el cual, la solubilidad fue de 16,06% a pH 3,00 y de 37,70% a pH 5,00 (Ver Tabla 9). Sin embargo, la solubilidad de ensilaje de 48 h, a pH 6,00 y pH 7,00 (49,76 y 83,63% respectivamente) y de ensilaje de 144 h (42,82 y 67,00% respectivamente) fue inferior a lo encontrado en ensilaje de 24 h (Ver Tabla 9). Esto se debe en primer lugar, a la mayor interacción lipo-proteína con el aumento del GH asociado al tiempo de ensilaje (estudios preliminares), y al pH de extracción el cual afecta la solubilidad, de las proteínas y de los ácidos grasos presentes en los hidrolizados.

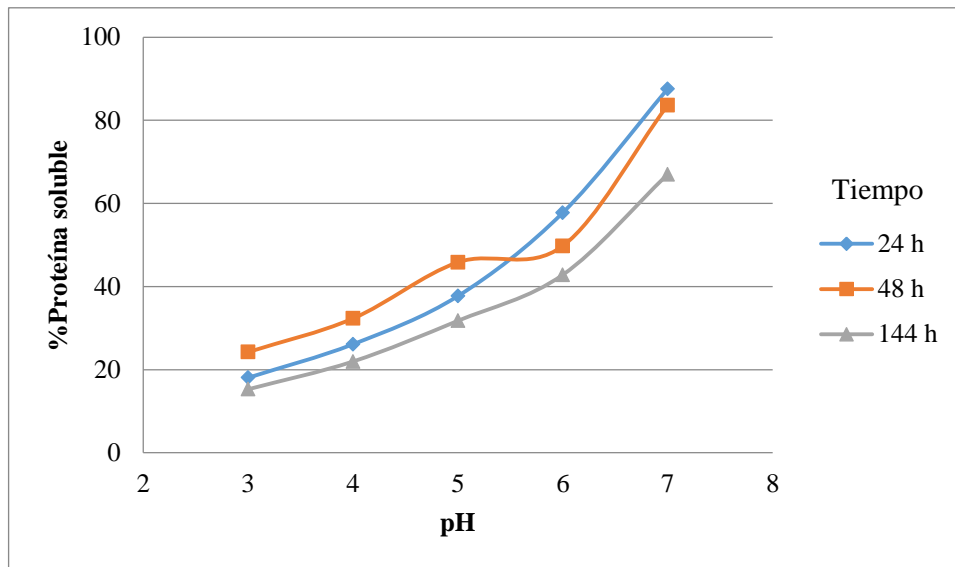


Figura 6 Solubilidad de extractos proteicos

A un mismo tiempo de ensilaje, el pH afecta la solubilidad de las proteínas y de los ácidos grasos. En la Figura 6, se observa que a medida que aumenta el pH entre 3,00 y 7,00, las proteínas se hacen más solubles debido probablemente a que se alejan de su punto isoeléctrico (PI). Análogamente, los ácidos grasos son más solubles a pHs superiores a su pKa, que oscila generalmente entre 4,5 y 5,5; condiciones que favorecen la formación de emulsiones (Ferreyra, Kuskoski et al. 2007), y por tanto una posible disminución de la solubilidad de proteínas (Ver Figura 7).

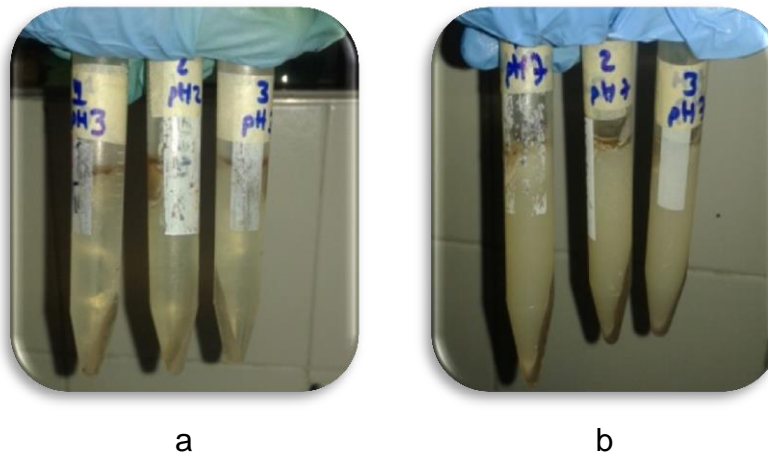


Figura 7 Extractos proteicos de ensilaje. a) pH 3,00, con ensilaje de 144 h y b) pH 7,00, con ensilaje de 144 h

Como se observa en la Figura 6, a medida que aumentó el tiempo de ensilaje asociado al aumento del grado de hidrólisis (estudios preliminares), la solubilidad disminuyó más a pH 6,00 y 7,00. Este comportamiento puede deberse a que un aumento del GH facilita la interacción de los lípidos con las proteínas, debido a que con el aumento de GH, hay una mayor liberación de los ácidos grasos de los tejidos adiposos de las vísceras, además de aumentar la solubilidad de las proteínas, por una mayor exposición de aminoácidos hidrofílicos durante la hidrólisis, condiciones que permiten la formación de emulsiones. Después de una semana de almacenamiento, el ensilaje de pescado con ácido fórmico, se separa en cuatro fases: Una fase lipídica, seguido de una emulsión lipo-proteína, una fase acuosa soluble y un pequeño sedimento de fragmentos de tejido insoluble que precipita en el fondo (Kristinsson and Rasco 2000; Shahidi and Janak Kamil 2001).

En general, la solubilidad de los extractos proteicos de ensilaje a los tiempos estudiados, aumentó en el rango de pH de 3,00 a 7,00 (Ver Figura 6), debido probablemente a que éstas son más solubles cuando el pH se aleja de su punto isoeléctrico. Éste comportamiento es similar a lo encontrado por varios investigadores en hidrolizados de peces y subproductos; como por ejemplo, por Foh, Kamara et al. (2011) en hidrolizados de tilapia (*Oreochromis niloticus*); por Nalinanon, Benjakul et al. (2011) en hidrolizados de músculo de *Nemipterus hexodon* con pepsina aislada de atún (*Katsuwonus pelamis*); y por Wald, Schwarz et al. (2016) en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con pepsina aislada del mismo pez.

5.4.2. Seguimiento de grado de hidrólisis

5.4.2.1. Método TNBS

Se realizaron curvas de calibración por triplicado durante cinco días para evaluar parámetros de reproducibilidad y repetitividad. Usando el método de mínimos cuadrados se determinó la linealidad de la curva de calibración y se obtuvo que la ecuación lineal es $y = 0,0505x + 0,0246$ con el coeficiente de determinación r^2 es de 0,9931, lo que indica que el 99,31% de la incertidumbre original se explica mediante el modelo lineal (Ver Anexo 3). A partir de la ecuación lineal se calcularon las concentraciones en milimol de Leucina/g muestra encontrados en las hidrólisis parciales de los ensilajes a diferentes tiempos, y la hidrólisis total, para luego calcular el porcentaje de hidrólisis, los resultados se presentan en la siguiente sección.

5.4.2.2. Determinación de α -aminoácidos libres en extractos proteicos

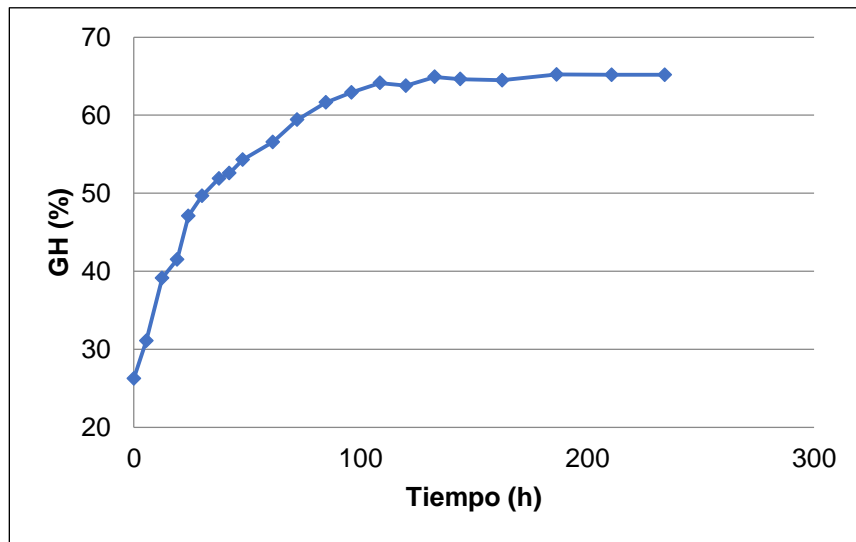
La hidrólisis total (h_{total}) de ensilaje químico fue de $1109,84 \pm 6,98$ mg Leucina/g muestra. Con respecto a la h_{total} se calcularon los porcentajes de hidrólisis de los distintos hidrolizados y los resultados se resumen en la Tabla 10

Tabla 10 Seguimiento de Grado de hidrólisis de ensilaje

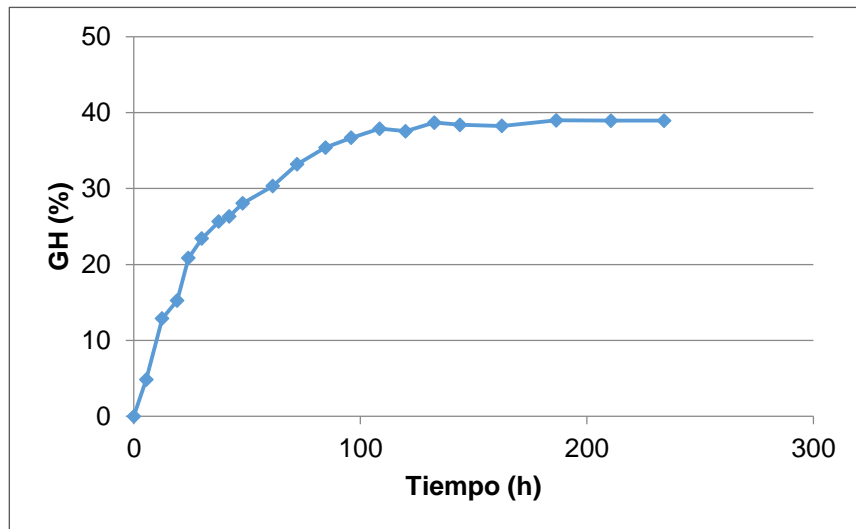
Tiempo de ensilaje (h)	Grado de hidrólisis real (%)	C_v (%)	Grado de hidrólisis (%)^a	C_v (%)
0,00	26,24±0,20	0,76	0,00	
5,50	31,08±0,06	0,20	4,84±0,06	1,30
12,50	39,12±0,16	0,42	12,88±0,16	1,27
19,12	41,50±0,40	0,96	15,26±0,40	2,61
24,07	47,09±0,73	1,55	20,85±0,73	3,49
30,03	49,65±0,62	1,24	23,41±0,62	2,63
37,52	51,89±0,27	0,53	25,65±0,27	1,07
42,12	52,57±0,74	1,42	26,33±0,74	2,83
48,00	54,29±0,18	0,33	28,05±0,18	0,63
61,32	56,56±0,13	0,23	30,32±0,13	0,42
72,00	59,42±0,01	0,02	33,18±0,01	0,04
84,63	61,63±0,24	0,40	35,39±0,24	0,69
96,00	62,93±0,43	0,68	36,69±0,43	1,17
108,53	64,13±0,82	1,27	37,89±0,82	2,15
120,00	63,78±1,81	2,84	37,54±1,81	4,82
132,73	64,92±1,58	2,43	38,67±1,58	4,08
144,00	64,63±0,21	0,33	38,39±0,21	0,55
162,43	64,48±0,26	0,41	38,24±0,26	0,69
186,50	65,21±1,13	1,73	38,97±1,13	2,90
210,67	65,18±0,01	0,02	38,94±0,01	0,04
234,08	65,18±0,29	0,44	38,94±0,29	0,74

^aSe calculan restando el GH inicial (26,24%)

El Grado de hidrólisis del ensilaje de tiempo cero, fue 26,24% (Ver Tabla 10), que puede deberse a residuos de alimentos en los estómagos e intestinos, los cuales no fueron removidos con el fin de evitar la pérdida de enzimas. Para comparar los resultados con otros autores, se restó el GH inicial a los demás ensilajes. El seguimiento de GH real y el GH por acción de las proteasas ácidas, se muestran en las Figura 8.



a



b

Figura 8 Seguimiento de GH en ensilaje químico. a) GH real y b) GH producto de acción de enzimas

Se determinó el efecto del tiempo respecto al GH mediante un diseño de medidas repetidas en donde el factor intrasujeto es el tiempo. Usando el modelo de Greenhouse-Geisser, se obtuvo que el efecto del tiempo en el GH es estadísticamente significativo (Ver Anexo 6). También se realizó una comparación por pares mediante el modelo de Bonferroni, donde se concluye que después de 96,00 h de ensilaje no hay diferencias significativas en los grados de hidrólisis, debido a que la significancia fue $>0,05$ en todas las comparaciones entre muestras. De acuerdo con los resultados estadísticos, se tiene que el GH máximo alcanzado se encuentra entre 37-39% (Ver Tabla 10).

Como se muestra en la Figura 8b, el grado de hidrólisis aumenta linealmente con el tiempo durante las primeras 24 horas de ensilaje desde 0,00% a 47,09%, debido a la facilidad de rompimiento de enlaces peptídicos por una mayor disponibilidad de sustrato; luego hay una etapa donde no hay una disminución de la hidrólisis hasta estabilizarse a un valor entre 37-39%, a tiempos superiores de 96,00 horas (Ver Tabla 10). La reducción de velocidad puede deberse a la disminución del número de enlaces peptídicos disponibles, mermando la probabilidad de choque molecular en los lugares requeridos. También pudo ocurrir la inhibición de la enzima por exceso de productos de hidrólisis, desnaturalización de la enzima o autohidrólisis (Tonon, dos Santos et al. 2016). Éste comportamiento concuerda con lo reportado por varios investigadores para hidrolizados proteicos de peces (Kristinsson and Rasco 2000; Klompong, Benjakul et al. 2007; Restrepo 2016).

El rango de GH máximo del ensilaje obtenido, es superior 1,2 a 1,3 veces a lo reportado por Wald, Schwarz et al. (2016), quienes alcanzaron fase estacionaria a GH 30% a tan solo 3,5 h, en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris mediante adición de pepsina extraída del mismo pez. Por otro lado, el GH es inferior 1,2 a 1,1 veces, al máximo encontrado por Gaviria (2017) en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris mediante adición de la enzima Protamex®, quien reportó un GH máximo de 43% a 3,8 h. Éstos resultados evidencian que la hidrólisis de proteínas es más rápida cuando se adiciona una enzima, en comparación de la autólisis, debido, a que las condiciones de reacción como el pH, temperatura y relación enzima/sustrato, se controlan más fácilmente en la hidrólisis mediante adición de enzima, como consecuencia, es más rápida (Klompong, Benjakul et al. 2007). Sin embargo, en la mayoría de investigaciones, los procesos para la producción de hidrolizados mediante la adición de enzima, no han sido escalados industrialmente, debido a que los costos de producción son mayores en comparación a la hidrólisis química y autolítica (He, Franco et al. 2015).

5.4.2.3. Actividad de enzimática

En las primeras 24 h (1,44 millares de minuto) de ensilaje, hay un aumento lineal en la cantidad de producto formado en la hidrólisis, con una liberación de aminoácido (representado como Leucina) entre 0 mgLeu/gmuestra a tiempo cero, hasta 238,55 mgLeu/gmuestra a las 24 h. Posteriormente la liberación de aminoácidos disminuye hasta estabilizarse a tiempos superiores de 96,00 h (5,76 millares de minuto). Usando el método diferencial se calculó la pendiente de la recta tangente a la curva en la fase lineal, la cual corresponde a la velocidad inicial de reacción, que en éste caso es de 0,1607 mg/min, indicando que se liberan 0,16 mg de Leucina cada minuto. La Figura 9 representa el seguimiento de hidrólisis enzimática de proteínas en el ensilaje químico en función del tiempo.

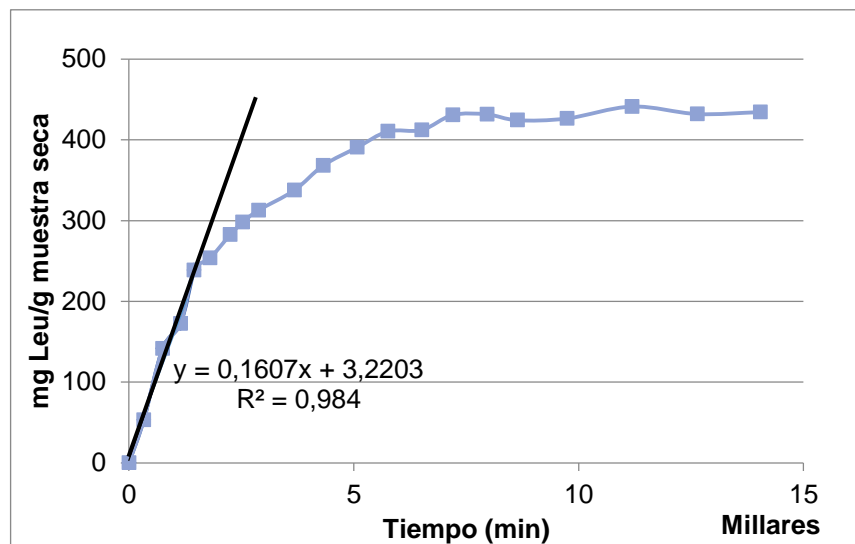


Figura 9 Actividad enzimática a condiciones de ensilaje

La velocidad de reacción de las enzimas que generan autólisis es inferior a la reportada por Restrepo (2016), quien evaluó la actividad enzimática de Protamex® para hidrolizar aislado proteico de vísceras de Trucha Arcoíris, encontrando una velocidad de 0,95 mg Leucina/min, aproximadamente seis veces mayor. Éstos resultados son similares a los reportados por Wu, Chen et al. (2003), quienes encontraron un mayor cantidad de aminoácidos libres y péptidos, en hidrolizados de Caballa (*Scomber austriasicus*) obtenidos mediante adición de Proteasa N, en comparación con el hidrolizado producto de autólisis. De acuerdo con lo anterior, la hidrólisis por adición de enzima disminuye el tiempo de reacción debido a una mayor actividad enzimática, sin embargo, se debe evaluar la factibilidad de los procesos para determinar la viabilidad económica, ya que los enzimas generan un costo adicional en comparación con la autólisis.

5.5. Determinación de actividad antioxidante

5.5.1. Método ABTS

5.5.1.1. Curva de calibración

Se realizaron curvas de calibración por triplicado durante cinco días para evaluar parámetros de reproducibilidad y repetibilidad. Por método de mínimos cuadrados se determinó la linealidad de la curva de calibración (Ver Anexo 4). La ecuación lineal fue de $y = -0,0008x + 0,6631$ con el coeficiente de determinación r^2 es de 0,9955, lo que indica que el 99,55% de la incertidumbre original se explicó mediante el modelo lineal. A partir de la ecuación lineal se calcularon las concentraciones en $\mu\text{mol TROLOX/g proteína}$, los resultados se muestran en la sección 5.5.3.

5.5.2. Método DPPH

5.5.2.1. Curva de calibración

Se realizaron curvas de calibración por triplicado durante cinco días para evaluar parámetros de reproducibilidad y repetibilidad. Por método de mínimos cuadrados se determinó la linealidad de la curva de calibración (Ver Anexo 5). La ecuación lineal es $y = -0,0012x + 0,664$ con el coeficiente de determinación r^2 es de 0,9986, lo que indica que el 99,86% de la incertidumbre original se explica mediante el modelo lineal. A partir de la ecuación lineal se calcularon las concentraciones en $\mu\text{mol TROLOX/g}$ proteína, los resultados se muestran en la sección 5.5.3.

5.5.3. Actividad antioxidante de los extractos proteicos de ensilaje químico

De acuerdo Halim, Yusof et al. (2016), los péptidos antioxidantes en su gran mayoría son de cadena corta y su capacidad biológica está relacionada con secuencias que contienen aminoácidos con residuos aromáticos e hidrófobos como la fenilalanina, alanina, valina, leucina, prolina, histidina y tirosina, así como también aminoácidos que contienen azufre, es decir, cisteína y metionina. La trucha arcoíris presenta una buena distribución de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (Tabla 2) lo que le permite ser un buen sustrato para la obtención de péptidos antioxidantes (Restrepo 2016). En el ensilaje químico de vísceras de trucha, la proteína se fracciona generando péptidos, que dependiendo su tamaño, secuencia y tipo de aminoácidos, pueden presentar actividad antioxidante; por ésta razón se evaluó actividad antioxidante de extractos proteicos de ensilaje químico a pH 7,00 (mayor solubilidad de proteínas), por los métodos ABTS y DPPH. Los resultados se reportaron tanto en $\mu\text{mol TROLOX/g}$ proteína, como en porcentaje de Inhibición a una concentración de 10 mg proteína/mL (Ver Tabla 11).

Tabla 11 Seguimiento de actividad antioxidante

GH (%)	%Inhibición		μmol TROLOX/g proteína	
	ABTS	DPPH	ABTS	DPPH
0,00	33,54±0,20	7,62±0,20	28,48±0,07	6,21±0,12
4,84±0,06	38,92±0,28	8,22±0,25	33,64±0,26	6,57±0,15
12,88±0,16	43,61±0,92	9,28±0,41	38,13±0,80	7,21±0,25
15,26±0,40	45,07±0,13	9,91±0,01	39,37±0,12	7,59±0,01
20,85±0,73	45,58±0,84	10,59±0,17	39,85±0,78	8,00±0,11
23,41±0,62	45,65±0,66	11,14±0,30	39,91±0,62	8,32±0,18
25,65±0,27	45,86±2,16	11,42±0,14	40,13±1,98	8,49±0,08
26,33±0,74	45,92±1,57	11,32±0,16	40,16±1,47	8,44±0,10
28,05±0,18	45,88±0,64	11,35±0,17	40,12±0,60	8,45±0,10
30,32±0,13	45,98±0,94	11,23±0,34	40,22±0,87	8,38±0,20
33,18±0,01	45,78±0,44	11,08±0,19	40,03±0,41	8,29±0,11
35,39±0,24	45,90±1,21	10,93±0,37	40,04±0,97	8,20±0,22
36,69±0,43	46,06±1,76	11,08±0,20	40,29±1,64	8,29±0,12
37,89±0,82	46,04±1,70	11,17±0,04	40,22±1,48	8,36±0,00
37,54±1,81	45,72±1,79	11,04±0,25	39,94±1,61	8,20±0,24
38,67±1,58	45,94±0,77	11,14±0,16	40,18±0,72	8,33±0,09
38,39±0,21	46,28±2,09	11,04±0,30	40,50±1,95	8,27±0,18
38,24±0,26	46,32±0,13	10,96±0,37	40,53±0,13	8,22±0,23
38,97±1,13	46,12±1,17	10,86±0,26	40,34±1,09	8,17±0,16
38,94±0,01	46,16±1,35	10,82±0,18	40,38±1,26	8,14±0,11
38,94±0,29	46,02±0,97	10,77±0,26	40,28±0,86	8,14±0,11

La actividad antioxidante se midió en todos los tiempos de ensilaje químico. El porcentaje de inhibición del radical ABTS varió en un rango de 34-46% (28-40 μmol TROLOX/g proteína) y del radical DPPH entre 8-11% (6-8 μmol TROLOX/g proteína) a grados de hidrólisis desde 0 a 39% (Ver Tabla 11).

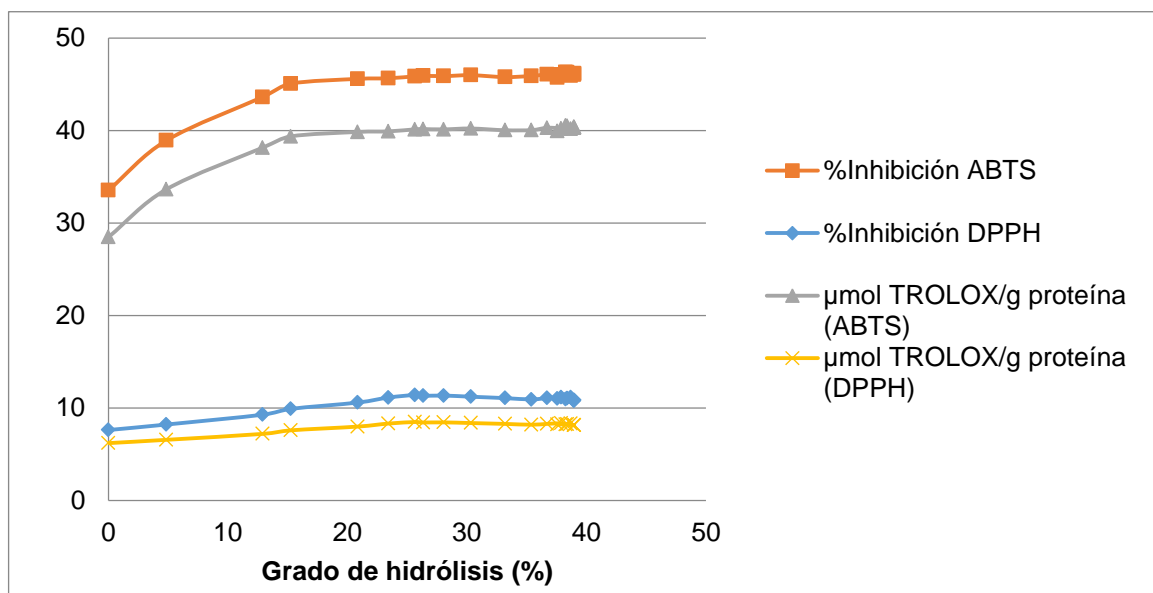


Figura 10 Influencia del GH en la actividad antioxidante

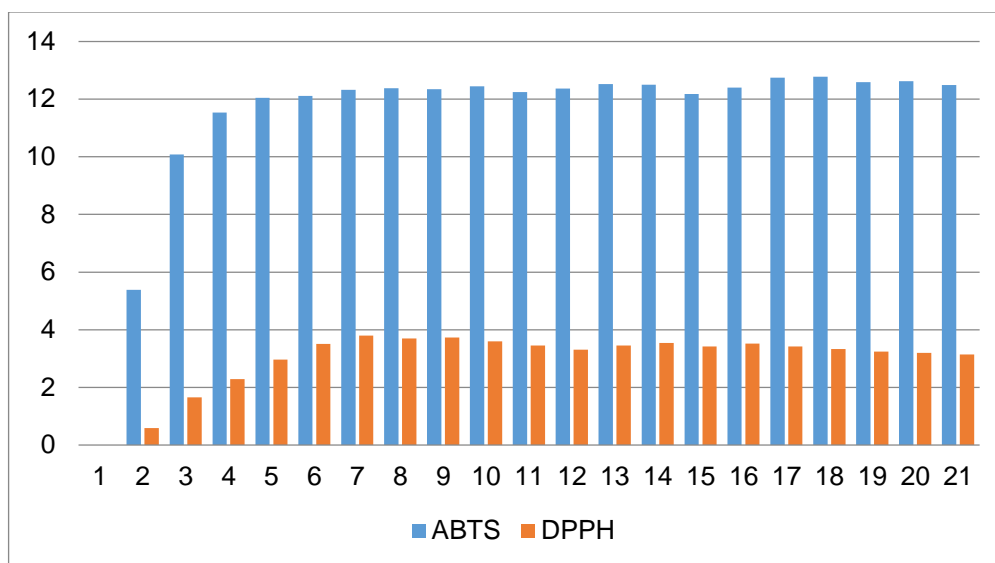
Se realizó la prueba Tukey para determinar las diferencias entre las medias de las muestras a distintos grados de hidrólisis (Ver Anexo 7). Por el método DPPH, las muestras de GH de 0,00, 4,84, 12,88, 15,26 y 20,85% se agruparon en subconjuntos diferentes, el resto de muestras de GH entre 23,41 y 38,97% se agruparon en otro subconjunto con significancia de 0,071, indicando que los resultados no tienen diferencias significativas. Cabe resaltar, que la muestra con GH de 20,85% no presenta diferencias significativas con la mayoría de muestras del último subconjunto (Ver Anexo 7). Por otro lado, por el método ABTS, se encontró que los hidrolizados con GH de 0,00 y 4,84% son diferentes debido a que se agruparon en subconjuntos separados, por el contrario, los hidrolizados con GH entre 12,88 y 38,97% se agruparon en un subconjunto y la significancia fue de 0,303, evidenciando que no hay diferencias significativas entre este grupo de muestras. Estos resultados muestran, que en las primeras horas de ensilaje, hay un aumento de actividad antioxidante, relacionado con el incremento del GH, posteriormente, la actividad alcanza un máximo entre GH de 12,88 y 20,85% y se estabiliza, por lo que a GH superiores, no se observó un incremento.

La mayor actividad obtenida por el método DPPH, fue cuatro veces inferior a la actividad por ABTS, para comprobar las diferencias estadísticamente, se realizó una comparación entre los métodos DPPH y ABTS. Para ello, se hizo un diseño de medidas repetidas con factor tiempo intrasujeto y el método de determinación de actividad antioxidante, como factor intersujeto. De acuerdo con las pruebas de los efectos intersujetos y la comparación por pares, se concluye que los métodos de determinación de actividad antioxidante, en las condiciones ensayadas, tienen diferencias significativas (Ver Anexo 8), debido probablemente a las diferencias de cinética de las reacciones mediadas por cada radical, además de la solubilidad y la naturaleza de la muestra.

En la Figura 10 se observan dos etapas, en la primera hay un aumento de actividad antioxidante hasta que se comienza a estabilizar a GH entre 12,88 y 20,85%, y se mantiene constante a GH superiores. El máximo porcentaje de inhibición encontrado, fue de 46 y 11% de radical ABTS y DPPH respectivamente. El aumento inicial de la actividad antioxidante con el GH, está asociado a la generación de péptidos con cadenas más pequeñas, los cuales se asocian con una mayor actividad. Por otro lado, a GH mayores no se logró un incremento en la inhibición de radicales, debido probablemente, a la interacción de los péptidos generados, con los lípidos que se liberan de los tejidos adiposos de las vísceras, a medida que aumenta el GH. La actividad antioxidante del blanco de muestra por el método DPPH no presentó inhibición, sin embargo por el método ABTS la inhibición fue de $1,62 \pm 0,00\%$ debido a que el ácido fórmico puede influir en la estabilidad del radical, el cual se afecta por el pH.

La actividad antioxidante obtenida por el método DPPH presentó un máximo de incremento de 4% (Ver Figura 11), siendo inferior de 8 a 9,5 veces a la actividad obtenida por Slizyte, Rommi et al. (2016) en hidrolizados de proteínas de peces de

espinas dorsales de salmón desgrasado con los enzimas Colorasa® y Protamex®, reportando porcentajes de incremento de 32% y 38% de eliminación del radical DPPH respectivamente, a una concentración de 2,5 mg/mL a grados de hidrólisis entre 22,1 y 22,6%.



La figura representa el incremento en los 21 tratamientos con distintos tiempos de ensilaje

Figura 11 Incremento de eliminación de radicales ABTS y DPPH

El porcentaje de inhibición máximo de radical DPPH fue de 2,2% a 2 mg/mL (11% a 10 mg/mL), ésta actividad es 24 veces inferior a lo encontrado por Bougatef, Nedjar-Arroume et al. (2010) en hidrolizados de vísceras de Sardinela con extracto crudo de enzimas endógenas del mismo pez, quien logró obtener un porcentaje de inhibición de 53,76% a una concentración de 2 mg/mL a GH de 6%; y 3,6 veces menor a la inhibición encontrada por Gaviria (2017) en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con la enzima Protamex® a la misma concentración, a GH 56%.

Por otro lado, la inhibición máxima de radicales ABTS encontrada en ensilaje químico fue de 46%, ligeramente superior a lo encontrado por Gaviria (2017) quien informa un 43% de inhibición, de hidrolizados proteicos de trucha arcoíris obtenidos por hidrólisis enzimática con Protamex®, a la misma concentración. Éste resultado es importante, debido a que se obtuvo a menores costos de producción, un producto que tiene buena capacidad de estabilizar radicales ABTS, sin embargo, se debe determinar por métodos *in vitro*, los cuales tengan mayor relevancia a nivel biológica como el ORAC, y también por métodos *in vivo*, para evitar la subestimación o sobreestimación de los resultados.

Las diferencias significativas entre los métodos usados puede deberse a tanto a la naturaleza de la muestra, como a las condiciones del método. Se sabe que la transferencia de un solo electrón (SET) y la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), son los dos mecanismos de reacción entre los antioxidantes y los radicales

DPPH y ABTS, la SET se da a mayor velocidad y aumenta con pH, por el contrario la HAT es independiente del pH y se afecta por los solventes de unión de hidrógeno como el metanol. En la reacción con DPPH a las condiciones ensayadas, es probable que el método HAT importante en la reacción con proteínas, se haya visto afectado, predominado así, la transferencia de electrones (Schaich, Tian et al. 2015). El radical DPPH es de carácter hidrofóbico, por lo que sus reacciones se deben realizar en solventes orgánicos como el metanol, sin embargo, en éste tipo de muestras el metanol desnaturaliza las proteínas y las precipita, generando turbidez en la mezcla de reacción, lo que conlleva a subestimar los resultados. Por ésta razón, fue necesario centrifugar antes de realizar la medida espectrofotométrica, logrando una disminución de la desviación estándar de las medidas, análogo a lo reportado por Jiménez, Sánchez et al. (2012), que optimizó el método DPPH para una bebida de café. Por el contrario, el radical ABTS es hidrosoluble y reacciona con una amplia gama de antioxidantes, debido a que es más inestable que el DPPH, además, las reacciones mediadas por ABTS se dan en soluciones acuosas que permiten la transferencia de átomos de hidrógeno, no obstante, el impedimento estérico del radical afecta el método HAT (Schaich, Tian et al. 2015).

La evaluación por métodos *in vivo* es la mejor forma de determinar la capacidad antioxidante sin subestimar o sobreestimar los resultados (Lafarga and Hayes 2014).

5.6. Determinación de actividad antimicrobiana

Convencionalmente se asocia la actividad antimicrobiana con residuos hidrofóbicos y básicos, por lo que las vísceras de trucha arcoíris producida en Silvia-Cauca al presentar una buena distribución de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos (Ver Tabla 2), se convierten en un sustrato prometedor para la obtención de hidrolizados proteicos con actividad antimicrobiana.

Varios investigadores han encontrado actividad antimicrobiana en hidrolizados proteicos de peces a bajos grados de hidrólisis, por lo que se evaluó la actividad antimicrobiana de ensilajes con GH $\leq 30,32$ frente a bacterias Gram negativas *Aeromonas hydrophila* y Gram positivas *Streptococcus agalactiae* las cuales afectan cultivos de tilapia. Se usó el método de difusión en agar, ensayo ampliamente utilizado para determinar actividad antimicrobiana en hidrolizados proteicos. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12 Halos de inhibición

Muestra	GH	Diámetro de inhibición (mm)					
		<i>Streptococcus agalactiae</i>			<i>Aeromonas hydrophila</i>		
		\bar{x}	σ	C _v	\bar{x}	σ	C _v
M1	0,00	0,00	0,00	---	1,99	0,09	4,33
M2	4,84	0,00	0,00	---	1,83	0,10	5,71
M3	15,26	0,00	0,00	---	2,12	0,17	7,89
M4	23,41	0,00	0,00	---	1,29	0,05	4,04
M5	26,33	0,00	0,00	---	1,16	0,04	3,11
M6	30,32	0,00	0,00	---	1,17	0,05	4,27
Blanco		0,00	0,00	---	0,00	0,00	---
OT					27,95	0,97	3,45
C		20,90	0,89	4,26	22,56	2,07	9,19
A		0,00	0,00	---			

Como se muestra en la Tabla 12, los extractos de ensilaje a los diferentes GH estudiados, no presentaron inhibición frente a *Streptococcus agalactiae*, sólo se observó un halo de 20,90 mm, con el antibiótico cloranfenicol. Por otro lado, los halos de inhibición frente a la bacteria *Aeromona hydrophila*, generados por los extractos de ensilaje a diferentes GH, variaron entre 1,16 y 2,12 mm. En comparación con el antibiótico oxitetraciclina, los resultados fueron inferiores de 24 a 13 veces, y en comparación con cloranfenicol menores de 19 a 11 veces. Sumado a esto, se obtuvieron coeficientes de variación altos tanto en las muestras como en los antibióticos, a pesar de que las muestras se realizaron por sextuplicado, razón por la cual, no se pudo concluir sobre su actividad por lo que se evaluó la actividad frente a *Aeromona hydrophila* por el método turbidimétrico.

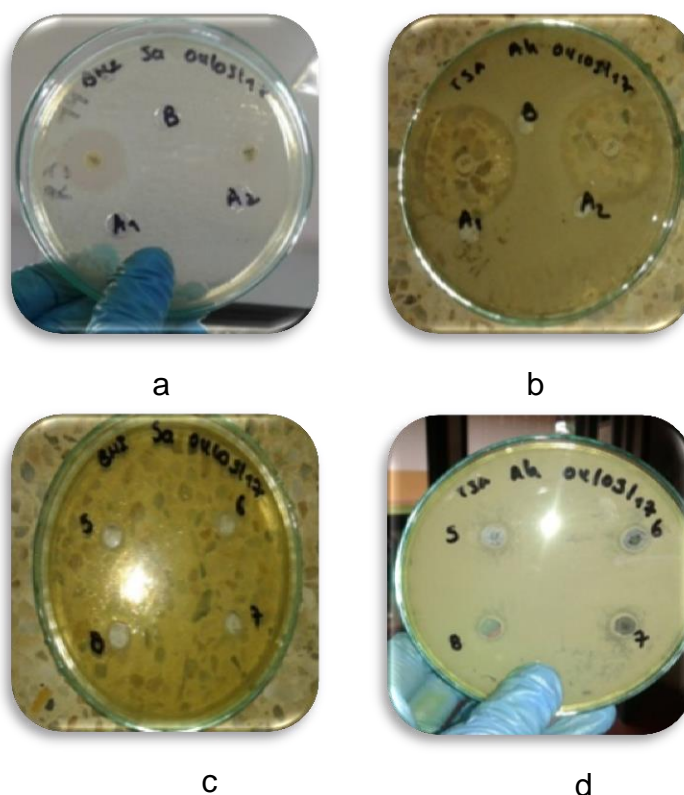


Figura 12 Halos de inhibición. a) y b), controles positivos y blancos para *Streptococcus agalactiae* y *Aeromonas hydrophila*, respectivamente; c) Ausencia de halos de inhibición para muestras frente a *Streptococcus agalactiae* y d) Halos de inhibición para muestras con GH 0 (5 y 6) y 4,84 % (7 y 8) frente a *Aeromonas hydrophila*

Los resultados del seguimiento del crecimiento bacteriano por el método turbidimétrico se resume en la Tabla 13.

Tabla 13 Seguimiento de crecimiento bacteriano

GH (%)	Tiempo de tratamiento (h)				
	0	3	6	9	12
0,00	0,002±0,000	0,015±0,001	0,145±0,004	0,567±0,010	0,744±0,031
4,84	0,002±0,000	0,016±0,001	0,139±0,002	0,573±0,014	0,796±0,036
12,88	0,002±0,000	0,016±0,001	0,137±0,001	0,580±0,019	0,788±0,060
15,26	0,002±0,000	0,020±0,000	0,138±0,004	0,610±0,020	0,761±0,005
20,85	0,002±0,000	0,019±0,001	0,130±0,006	0,399±0,040	0,704±0,057
23,41	0,002±0,000	0,020±0,000	0,129±0,004	0,612±0,015	0,838±0,019
30,32	0,002±0,000	0,018±0,000	0,132±0,004	0,542±0,025	0,658±0,023
38,39	0,002±0,000	0,015±0,000	0,123±0,001	0,510±0,024	0,490±0,019
Bacteria	0,002±0,000	0,014±0,001	0,118±0,003	0,353±0,016	0,657±0,032
Blanco	0,003±0,000	0,014±0,000	0,099±0,001	0,364±0,011	0,633±0,000

Los resultados de actividad antimicrobiana, se reportan a un tiempo de tratamiento de 12 horas una vez inoculada la bacteria, debido a que, se observó que los tratamientos con hidrolizado comenzaron en su mayoría la fase final en donde las bacterias no crecen más y empiezan a morir. En la Tabla 13, se muestran las absorbancias obtenidas a diferentes tiempos de tratamiento, de los distintos hidrolizados, de la bacteria y del blanco, que corresponde al ácido fórmico 0,24 M pH 7,00. La absorbancia inicial de todos los tratamientos fue de 0,002; luego, aumentó con el tiempo, debido al crecimiento bacteriano. Después de 12 horas, la bacteria sin muestra, presentó una absorbancia de 0,657 y el blanco de 0,633, es decir, que el blanco inhibió el crecimiento un 3,65%. Por otro lado, el crecimiento de la bacteria, se favoreció con la adición de extractos proteicos entre GH de 0,00 y 23,41%. El hidrolizado de GH 30,32%, presentó una absorbancia de 0,658, similar a la bacteria sola (0,657), y el extracto de ensilaje a GH 38,39%, presentó una inhibición del crecimiento 25,40%.

En la Figura 13 se representan las curvas de crecimiento bacteriano con hidrolizados proteicos de grados de hidrólisis $\leq 38,39\%$, con el blanco de ácido fórmico y el control de bacteria, por un periodo de 12 horas. No se evaluó la actividad a tiempos de ensilaje mayores de 144 horas debido a que el GH se estabiliza. En los tratamientos con hidrolizados se observan tres regiones típicas: la fase de latencia en la cual se adaptan al nuevo medio, la fase de crecimiento exponencial donde la bacteria crece hasta agotar nutrientes y la fase donde disminuyen su crecimiento y empiezan a morir (Rodríguez, Frómata et al. 2011). Las curvas de crecimiento del ácido fórmico, el control de bacteria, fueron similares.

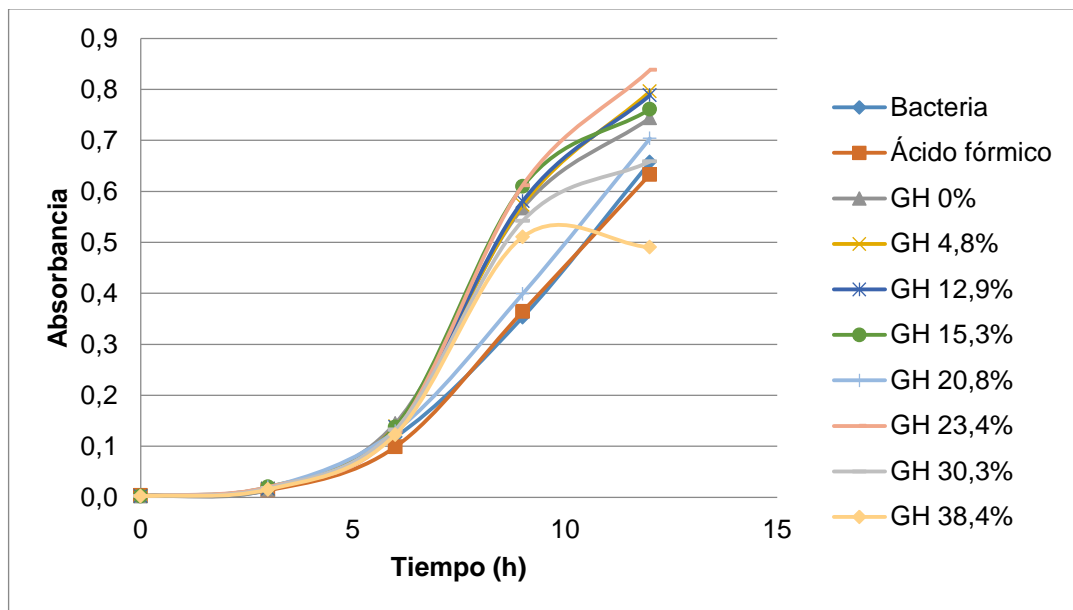


Figura 13 Curvas de crecimiento de *Aeromonas hydrophila*

La curva de crecimiento de la bacteria en presencia de ácido fórmico fue similar en comparación con la bacteria sola, sin embargo, el porcentaje de inhibición de crecimiento, se debe a que el ácido fórmico, presenta actividad antimicrobiana en su forma no disociada, mediante difusión a través de las membranas celulares y la consecuente afectación de las reacciones enzimáticas y los sistemas de transporte (Olsen and Toppe 2017).

El ensilaje de tiempo cero, presentó un grado de hidrólisis inicial de 26,24% (GH 0,00% para comparar) y no inhibió el crecimiento bacteriano, por el contrario, lo favoreció. Por otro lado, el ensilaje con GH de 38,39% inhibió el crecimiento de la bacteria en un 25,40% a las 12 horas de iniciado el tratamiento, que puede deberse a la liberación de péptidos antimicrobianos. Es probable que hidrolizados entre GH 0,00 y 23,41% hayan sido fuente de proteína para las bacterias favoreciendo su crecimiento, resultados que concuerdan con lo reportado por Vázquez, González et al. (2004), quienes extrajeron peptonas de vísceras de atún aleta amarilla, calamar, pez espada y trucha arcoíris, y las utilizaron como fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos de interés para la acuicultura, encontrando crecimientos superiores en comparación con un medio comercial común. Cabe resaltar, que el hidrolizado con GH de 30,32%, presentó una absorbancia inferior a los extractos de GH inferiores, y similar/igual al control de la bacteria, evidenciando, que el GH afecta la actividad antimicrobiana.

Los resultados anteriores indican que la actividad antimicrobiana se afecta por el grado de hidrólisis; así, a GH entre 0,00 y 20,41%, a las condiciones estudiadas, los hidrolizados no presentan actividad y por el contrario, es probable que hayan sido fuente de nutrientes, sin embargo, cuando el GH es 30,32%, la cantidad de bacterias disminuyen en comparación con las muestras de GH menores, y si bien no hay inhibición positiva, tampoco hay un incremento del crecimiento.

El efecto antimicrobiano obtenido es inferior a lo hallado por Wald, Schwarz et al. (2016), quienes obtuvieron porcentajes de inhibición superiores al 50% en hidrolizados de subproductos de trucha arcoíris, frente a 14 bacterias diferentes, siendo los hidrolizados con GH menores al 30% los que presentaron mayor actividad a una concentración de 20 mg/mL. Por otro lado el resultado es inferior a lo reportado por Cheng, Tang et al. (2013) quienes obtuvieron hidrolizados proteicos de caseína de leche de Yak con tripsina encontrando actividad antimicrobiana a GH menores de 25% con porcentajes de inhibición mayores al 40% a una concentración de 0,5 mg/mL. Los resultados difieren de lo encontrado por Sila, Nedjar-Arroume et al. (2014) quienes reportan actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias en hidrolizados de músculo de *Barbus callensis* obtenido por tratamiento con Alcalasa a grados de hidrólisis bajos a concentración de 1 mg/mL. La mejor actividad informada fue a grado de hidrólisis de 6,6%, debido a que a GH más bajos (2,8%) o más altos (15,54 y 16,20%) no encontraron inhibición del crecimiento bacteriano. Estas diferencias se deben no sólo al tipo de enzima y sustrato con que se generan los péptidos, sino también al

gran abanico de posibilidades de mecanismos de acción de los AMPs, además de la composición de la muestra, ya que en muchos casos, las pruebas se realizan con hidrolizados con una cantidad baja de lípidos, lo cual permite, una menor interacción entre los péptidos anfipáticos y algunos hidrofóbicos, con los lípidos. Generalmente la actividad antimicrobiana de los péptidos se asocia a la carga neta positiva, así como también al carácter anfipático que les permite interactuar con los fosfolípidos aniónicos de la membrana, siendo los mecanismos de tapón barril, de poro toroidal y de alfombra los convencionales, sin embargo, se han encontrado AMPs que no tienen características similares a los clásicos, caracterizándose por ser pequeños, con o sin una pequeña porción de residuos hidrófobos (Bougherra, Dilmi-Bouras et al. 2017).

Por último, el ensilaje químico de vísceras de trucha arcoíris con ácido fórmico ha sido utilizado para la elaboración de alimento concentrado para tilapia roja en etapa de engorde presentando alta digestibilidad de los nutrientes y energía, además de mejorar índices de crecimiento y aprovechamiento nutritivo con inclusión de 20% de ensilaje; sin embargo, no se había evaluado la actividad biológica del ensilaje químico que puede estar relacionada con la mejora de los parámetros productivos. En ésta investigación se encontró que la mejor actividad biológica asociada a péptidos bioactivos por métodos *in vitro* se obtiene con ensilajes de GH 38,4% a un tiempo de 144 horas, no obstante se recomienda evaluar por métodos *in vivo* para comprobar la bioactividad real, además de la seguridad y biodisponibilidad de los péptidos. Por otro lado se debe tener en cuenta que el ácido fórmico del ensilaje también puede aumentar el crecimiento de los peces así como disminuir la mortalidad y actuar como bactericida contra bacterias como *Aeromona hydrophila* (Abu Elala and Ragaa 2015), factor que puede favorecer la actividad biológica del ensilado.

6. CONCLUSIONES

Los subproductos obtenidos mediante ensilaje de las vísceras de la trucha arcoíris, tienen una composición elevada de lípidos y proteínas, que potencializa el uso de estos componentes tratados comúnmente como desechos, elevándolos a la categoría de materias primas en procesos biotecnológicos que podrían generar valor agregado a la industria de la trucha en el Departamento del Cauca, además de disminuir el impacto ambiental del sector piscícola.

Si bien los hidrolizados proteicos de ensilaje químico presentaron un amplio rango de solubilidad a diferentes pHs, el mayor porcentaje de proteína soluble se obtuvo a pH 7,00, resultado favorable para el desarrollo de alimentos, en donde se requiere solubilidad a pH cercano al fisiológico para evitar daños en el sistema digestivo de los peces.

El aumento de GH favorece la liberación de lípidos de los tejidos adiposos de las vísceras, además del aumento de aminoácidos expuestos, lo que generó probablemente un incremento de interacciones lipo-proteína y como consecuencia, una disminución de la solubilidad.

Bajo las condiciones dadas en el ensilaje químico, las proteasas ácidas presentes en las vísceras de trucha arcoíris, presentaron una actividad proteolítica aproximadamente seis veces menor en comparación de la enzima Protamex® utilizada para hidrolizar vísceras del mismo pez.

El GH influyó en la actividad antioxidante de ensilaje químico. La actividad antioxidante se comenzó a estabilizar entre GH 12,88 y 20,85%; y se mantuvo constante a GH mayores, alcanzando porcentajes de inhibición de 11 y 46% para DPPH y ABTS, respectivamente, a una concentración de 10 mg proteína/ mL.

La actividad antioxidante encontrada en ensilaje químico para estabilizar radicales DPPH, es inferior a muchos reportes de investigadores, posiblemente por inhibición de los mecanismos HAT importantes en la actividad antioxidante de los péptidos y por el contenido de lípidos de la muestra que pudo encapsular péptidos de carácter hidrofóbicos solubles en metanol, evitando su reacción. Por el contrario, la capacidad de eliminación de radicales ABTS, fue similar a lo encontrado en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris usando la enzima Protamex®. En consecuencia, se obtiene un producto económico con capacidad de estabilización de radicales ABTS sin adición de enzima externa. Estos resultados son prometedores para nuevas investigaciones, las cuales permitan encontrar un valor agregado al ensilaje químico, como por ejemplo, en el desarrollo de alimentos funcionales para peces, además de disminuir el impacto ambiental del sector piscícola del departamento del Cauca.

Se encontró actividad antimicrobiana frente a *Aeromona hydrophila*, en el extracto proteico de ensilaje con GH de 38,39%, el cual inhibió el crecimiento de la bacteria

en un 25,40% a las 12 horas de iniciado el tratamiento. Se concluye que el GH afecta la obtención de AMPs, puesto que los otros ensilajes evaluados con menores GH no presentaron inhibición y posiblemente fueron fuente de proteína para la bacteria.

La actividad antimicrobiana se obtuvo a GH alto, diferente a lo que reportan varios investigadores, sin embargo, los AMPs actúan por diferentes mecanismos, por lo que se explicarían las diferencias encontradas.

Los resultados obtenidos son prometedores para la producción de alimentos funcionales para peces. Sin embargo, no se puede concluir sobre su bioactividad, debido a que los sistemas biológicos son muy complejos y se requieren ensayos *in vivo* para confirmar la actividad biológica.

7. RECOMENDACIONES

Evaluar la capacidad antioxidante del ensilaje químico de vísceras de trucha por otros métodos *in vitro* que se asemejen más a las condiciones biológicas, como por ejemplo el ensayo ORAC. Además, se recomienda evaluar la actividad antioxidante por métodos *in vivo*, que permitan comprobar las propiedades biológicas del ensilaje.

Estudiar la actividad antimicrobiana de ensilaje químico por el método turbidimétrico, frente a otras bacterias que afecten a especies menores, incluyendo la *Streptococcus agalactiae*.

Realizar una inclusión de ensilaje químico con GH entre 12 y 40 %, en piensos de especies menores y determinar los parámetros de producción, además de evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana por métodos *in vitro* e *in vivo* antes y después de la inclusión de ensilaje químico.

Determinar otras actividades biológicas de los péptidos obtenidos mediante ensilaje químico, como actividad antihipertensiva, anticancerígena, antidiabética, entre otras., con la finalidad de obtener alimentos funcionales para peces.

Identificar y cuantificar los péptidos bioactivos, usando métodos electroforéticos y cromatográficos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Elala, N. M. and N. M. Ragaa (2015). "Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*." Journal of Advanced Research 6(4): 621-629.
- APROPESCA (2014). Reporte anual de la Asociación Productora y Comercializadora de productos Acuícolas y Agrícolas de Silvia. Silvia-Cauca, APROPESCA.
- Atef, M. and S. Mahdi Ojagh (2017). "Health benefits and food applications of bioactive compounds from fish byproducts: A review." Journal of Functional Foods 35: 673-681.
- AUNAP (2013). Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia. Bogotá, Rm Gráficos
- Avendaño, L. H. (2008). Nefrología clínica, Editorial Médica Panamericana S.A.
- Beaulieu, L., J. Thibodeau, et al. (2013). "Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products." PharmaNutrition 1(4): 149-157.
- Benítez, R., A. Ibarz, et al. (2008). "Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones." Acta bioquímica clínica latinoamericana 42(2): 9.
- Bermudez, J., J. Rodriguez, et al. (1999). "Ensilaje de vísceras de pescado Cachama blanca (*Piaractus brachyponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos de engorde en una dieta con aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* - *Elaeis oleifera*)." Livestock Research for Rural Development 11.
- Borawska, J., M. Darewicz, et al. (2016). "Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein *in vivo* and *in vitro* hydrolysates." Food Chemistry 194: 770-779.
- Bougatef, A., N. Nedjar-Arroume, et al. (2010). "Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins." Food Chemistry 118(3): 559-565.
- Bougherra, F., A. Dilmi-Bouras, et al. (2017). "Antibacterial activity of new peptide from bovine casein hydrolyzed by a serine metalloprotease of *Lactococcus lactis subsp lactis* BR16." Journal of Functional Foods 32: 112-122.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry 72(1): 248-254.
- Castañeda, J., J. A. Ortega, et al. (2009). "Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones." Medigraphic Artemisa en línea 18(1): 13.
- CECOPESCA (2012). El aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos. 280-12-181-8 Madrid.
- Clemente, A., F. Millán, et al. (2001). "Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos." Grasas y Aceites 52: 132-136.
- Chalamaiah, M., B. Dinesh kumar, et al. (2012). "Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review." Food Chemistry 135(4): 3020-3038.
- Cheng, X., X. Tang, et al. (2013). "Antibacterial effect and hydrophobicity of yak κ -casein hydrolysate and its fractions." International Dairy Journal 31(2): 111-116.
- Díaz, M., R. Bonilla, et al. (2016). "Evaluación de refinación de aceite extraído de ensilaje de subproductos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)."
- Dumas, A., C. F. M. de Lange, et al. (2007). "Quantitative description of body composition and rates of nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquaculture 273(1): 165-181.
- FAO El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Composición química. <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s05.htm>, FAO.
- FAO (1997). Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal. FAO. La Habana-Cuba: 1-248.
- FAO. (2005). "*Oncorhynchus mykiss*." Programa de información de especies acuáticas, from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es.
- FAO (2016). El consumo mundial de pescado per cápita supera por primera vez los 20 kilogramos anuales. FAO. Roma, FAO.
- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Acuicultura.

- FAO. (2017). "Acuicultura." Retrieved Mayo 2017, 2017, from <http://www.fao.org/aquaculture/es/>.
- FAO (2017). Composición química. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO. <http://www.fao.org/docrep/v7180s/v7180s05.htm>, FAO.
- FAO. (2017). "Programa de información de especies acuáticas-*Oncorhynchus mykiss*." 2017, from http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es.
- FAO. (2017). "Visión general del sector acuícola nacional-Colombia." Retrieved Febrero 2017, 2017, from http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es.
- FAOSTAT. (2017). "Producción acuícola mundial." from <http://www.fao.org/figis/website/html/undefined>.
- FAOSTAT. (2017). "Producción de acuicultura total en la República de Colombia." from http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_colombia/es.
- Ferreira, J., E. Kuskoski, et al. (2007). "Propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas de harina de cacahuete (*Arachis hypogaea* Lineau)." DOAJ 58(3): 5.
- Foh, M. B. K., M. T. Kamara, et al. (2011). Chemical and Physicochemical Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fish Protein Hydrolysate and Concentrate.
- Friaa, O. and D. Brault (2006). "Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH in semi-aqueous solution." The Royal Society of Chemistry(4): 6.
- Garcés, Y. (2015). "Efecto nutricional del ensilado químico de subproductos piscícolas en la alimentación de pollos de engorde (*Gallus domesticus*)." Cuban Journal of Agricultural Science 49.
- Gaviria, E. (2017). Obtención de péptidos activos a partir de la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Maestría en ciencias químicas, Universidad del Cauca.
- Gehring, C. K., J. C. Gigliotti, et al. (2011). "Functional and nutritional characteristics of proteins and lipids recovered by isoelectric processing of fish by-products and low-value fish: A review." Food Chemistry 124(2): 422-431.

- Goddard, J. S. and J. S. M. Perret (2005). "Co-drying fish silage for use in aquafeeds." Animal Feed Science and Technology 118(3): 337-342.
- Gokoglu, N., P. Yerlikaya, et al. (2004). "Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Food Chemistry 84(1): 19-22.
- Gomez, G., M. Ortiz, et al. (2014). "Evaluación del ensilaje de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp*) en alimentación de pollos de engorde." Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 2: 106-114.
- Goosen, N. J., L. F. de Wet, et al. (2014). "The effects of protein hydrolysates on the immunity and growth of the abalone *Haliotis midae*." Aquaculture 428: 243-248.
- Goosen, N. J., L. F. de Wet, et al. (2014). "Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*." Animal Feed Science and Technology 188: 74-84.
- Guadix, A. (2000). "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas." Pharmaceutica 41(1): 10.
- Halim, N. R. A., H. M. Yusof, et al. (2016). "Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review." Trends in Food Science & Technology 51: 24-33.
- Harnedy, P. A. and R. J. FitzGerald (2012). "Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review." Journal of Functional Foods 4(1): 6-24.
- Harris, T. K. and M. M. Keshwani (2009). "Chapter 7 Measurement of Enzyme Activity." Methods in Enzymology 463: 57-71.
- He, S., C. M. Franco, et al. (2015). "Economic Feasibility Analysis of the Industrial Production of Fish Protein Hydrolysates using Conceptual Process Simulation Software." Bioprocessing & Biotechniques 5(1): 8.
- Illera-Vives, M., S. Seoane Labandeira, et al. (2015). "Evaluation of compost from seaweed and fish waste as a fertilizer for horticultural use." Scientia Horticulturae 186: 101-107.

- ITIS-Report (2017). *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) Interagency Taxonomic Information System. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=161989#.
- Je, J.-Y., Z.-J. Qian, et al. (2007). "Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis." Process Biochemistry 42(5): 840-846.
- Jiménez, A., M. Sánchez, et al. (2012). "Optimización del método captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café." Anales de veterinaria 28: 12.
- Jiménez, J. P. (2007). Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos. Doctor, Universidad Autónoma de Madrid.
- Klompong, V., S. Benjakul, et al. (2007). "Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type." Food Chemistry 102(4): 1317-1327.
- Kristinsson, H. G. and B. A. Rasco (2000). "Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases." Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(3): 657-666.
- Kristinsson, H. G. and B. A. Rasco (2000). "Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40(1): 43-81.
- Lehninger, N., Cox, (2006). Principios de Bioquímica, Omega, España: 116-232
- Li, Y., B. Jiang, et al. (2008). "Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH)." Food Chemistry 106(2): 444-450.
- Martínez, Ó. (2011). "Estado actual del aprovechamiento de subproductos de la industria pesquera mediante la obtención de productos de alto valor añadido."
- Mendis, E., N. Rajapakse, et al. (2005). "Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate." Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(3): 581-587.

- Mora, G. I. d. I. (1996). Efectos de pigmentación en el musculo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mediante el uso de extractos pigmentantes de flor de cempasuchil (*Tagetes erecta*) y paprika (*Capsicum annuum*) incorporados en el alimento balanceado. Maestro en ciencias con especialidad en ecología acuática y pesca, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Murray, R. K. (2013). Enzimas: Cinética. Harper Bioquímica ilustrada. McGraw-Hill. España: 62-74.
- Murray, R. K. (2013). Nutrición, digestión y absorción Harper Bioquímica ilustrada. McGraw-Hill. España: 462.
- Nalinanon, S., S. Benjakul, et al. (2011). "Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna." Food Chemistry 124(4): 1354-1362.
- Neville, F., M. Cahuzac, et al. (2006). "Lipid Headgroup Discrimination by Antimicrobial Peptide LL-37: Insight into Mechanism of Action." Biophysical Journal 90(4): 1275-1287.
- Olsen, R. L. and J. Toppe (2017). "Fish silage hydrolysates: Not only a feed nutrient, but also a useful feed additive." Trends in Food Science & Technology 66: 93-97.
- Opheim, M., R. Šližytė, et al. (2015). "Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates." Process Biochemistry 50(8): 1247-1257.
- Ortiz, M. E. R. (2017). Propiedades funcionales de hoy. OmniaScience. México: 224-225
- Ozgen, M., R. N. Reese, et al. (2006). "Modified 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid (ABTS) Method to Measure Antioxidant Capacity of Selected Small Fruits and Comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Methods." Journal of Agricultural and Food Chemistry 54(4): 1151-1157.
- Pardo, C. and H. Parra (2000). Ensilaje de vísceras de pescado para la alimentación de cerdos en levante y finalización. Pregrado en Zootecnia, Universidad La Salle.

- Pedraza, P. and H. Castellanos (2009). Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos *in vitro*. Parte X. Cefoperazona-Sulbactam. Microbiología Industrial y Bacteriología, Pontificia Universidad Javeriana.
- Perea, C. (2016). Evaluación nutricional de ensilajes de residuos de Trucha Arcoíris *Oncorhynchus mykiss* en la alimentación de Tilapia Roja *Oreochromis spp.* Doctor, Universidad Nacional.
- Perea, C., Y. Garcés, et al. (2011). "Evaluación de ensilaje biológico de residuos de pescado en alimentación de tilapia roja (*Oreochromis spp.*)."
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 9(1): 60-68.
- Pulido, C. (2015). Protocolo cadena acuícola. Bogotá, Ministerio de agricultura y desarrollo rural y AGRONET: 28.
- Restrepo, L. (2016). Hidrólisis enzimática de proteínas presentes en subproductos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), cultivada en Silvia-Cauca. Pregrado, Universidad del Cauca.
- Rodríguez, E. R., N. R. Frómata, et al. (2011). "Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez."
CENIC Ciencias Biológicas 43(2): 5.
- Ruales, D., C. Torres, et al. (2014). "Aprovechamiento de residuos de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*: uso de tecnologías limpias para la extracción de aceite."
Orinoquia 18: 294-299.
- Sachindra, N. M. and N. Bhaskar (2008). "In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste."
Bioresource Technology 99(18): 9013-9016.
- Sai-Ut, S., S. Benjakul, et al. (2014). "Effect of Drying Methods on Odorous Compounds and Antioxidative Activity of Gelatin Hydrolysate Produced by Protease from *B. amyloliquefaciens* H11."
Drying Technology 32(13): 1552-1559.
- Santos, C. E. d., J. d. Silva, et al. (2015). "Oil from the acid silage of Nile tilapia waste: Physicochemical characteristics for its application as biofuel."
Renewable Energy 80: 331-337.

- Schaich, K. M., X. Tian, et al. (2015). "Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays".
Journal of Functional Foods 18: 782-796.
- Shahidi, F. and Y. V. A. Janak Kamil (2001). "Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry." Trends in Food Science & Technology 12(12): 435-464.
- Shirahigue, L. D., M. O. Silva, et al. (2016). "The Feasibility of Increasing Lipid Extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Waste by Proteolysis." Journal of Aquatic Food Product Technology 25(2): 265-271.
- Sila, A., N. Nedjar-Arroume, et al. (2014). "Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria." LWT - Food Science and Technology 55(1): 183-188.
- Silvia-Cauca, A. d. (2014). "Nuestro Municipio." from http://www.silvia-cauca.gov.co/informacion_general.shtml. Consultado: 17 Julio 2017
- Slizyte, R., K. Rommi, et al. (2016). "Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones." Biotechnology Reports 11: 99-109.
- Taheri, A., S. A. A. Anvar, et al. (2013). "Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout." Iranian Journal of Fisheries Sciences 12(1): 154-169.
- Teixeira, V., M. J. Feio, et al. (2012). "Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes." Progress in Lipid Research 51(2): 149-177.
- Tonon, R. V., B. A. dos Santos, et al. (2016). "Coupling of ultrafiltration and enzymatic hydrolysis aiming at valorizing shrimp wastewater." Food Chemistry 198: 20-27.
- Toro, R. O. and J. H. Concha (2016). "Residuos piscícolas a ensilaje biológico: Evaluación Fisicoquímica." 2016 10: 8.
- Trabulo, S., A. L. Cardoso, et al. (2010). "Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems." Pharmaceuticals 3(4): 961-993.
- Vázquez, J. A., M. P. González, et al. (2004). "A new marine medium: Use of different fish peptones and comparative study of the growth of selected species of marine bacteria." Enzyme and Microbial Technology 35(5): 385-392.

- Villamil, O., H. Váquiro, et al. (2017). "Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties." Food Chemistry 224: 160-171.
- Wade, L. G. (2004). Química Orgánica. Pearson. España: 1114-1136
- Wald, M., H. Rehbein, et al. (2016). "Purification and characterization of pepsinogen and pepsin from the stomach of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." European Food Research and Technology 242(11): 1925-1935.
- Wald, M., K. Schwarz, et al. (2016). "Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin." Food Chemistry 205: 221-228.
- Walker, J. M. (2002). The Protein Protocols Handbook. Quantitation of proteins. H. PRESS. Estados Unidos: 15-21.
- Wu, H.-C., H.-M. Chen, et al. (2003). "Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)." Food Research International 36(9): 949-957.
- Zhang, Y., X. Duan, et al. (2012). "Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin." Peptides 38(1): 13-21.

9. ANEXOS

Anexo 1. Reactivos, solventes, equipos y materiales

Tabla 14 Reactivos y solventes

Nombre reactivo o solvente	Pureza	Marca
Acetato de sodio	99,7%	Sigma Aldrich
Ácido acético glacial	99,7%	Fischer Scientific
ABTS	98%	Sigma Aldrich
Ácido bórico	98%	Merck Millipore
Ácido clorhídrico	37%	Fischer Scientific
Alcohol etílico	99,8%	Fischer Scientific
Ácido fórmico	85%	Industrial
Ácido fórmico	98%	Merck
Ácido fosfórico	85%	Sigma Aldrich
Ácido sulfúrico	95-97%	Merck Millipore
Ácido trinitrobenceno sulfónico (TNBS)	5%	Sigma Aldrich
Albúmina bovina	97%	Panreac
Azul de Comassie	99%	Panreac
DPPH	98%	Sigma Aldrich
Etanol	95%	Sigma Aldrich
Éter de petróleo		Scharlau
Fosfato dibásico de potasio hidratado	99%	Merck
Fosfato monobásico de potasio monohidratado	98,25%	Merck
TROLOX	97%	Sigma Aldrich
Hidróxido de sodio	99%	Millipore
Isooctano	99,9%	Honeywell
Leucina	98%	Sigma Aldrich
Metanol grado HPLC	99%	Fischer Scientific
Pastillas catalizador Kjeldahl		Merck
Persulfato de potasio	99%	Sigma Aldrich
Sulfito de sodio	98,75%	Merck
Antibióticos: penicilina, oxitetraciclina y ampicilina		
<i>Aeromona hydrophila</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>	---	
Caldo TSB		Sharlau
Caldo BHI		Merck
Agar TSA		Sharlau
Agar BHI		Sharlau

Tabla 15 Equipos

Equipo	Cantidad	Marca/modelo	Laboratorio
Autoclave	2	Tuttnaver Allamerican	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Balanza analítica	1	Kern/AES 220-4	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Balanza de humedad	1	Kern/DBS 60-3	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Baño termostataado	1	Polystat/2W7	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Bomba de vacío	1	Vacuubrand	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Cámara de flujo laminar	1	Miniflow/120	Laboratorio de Biotecnología, Universidad del Cauca

Centrifuga Refrigerada	1	Hermle Labortechnik/Z 326K	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Equipo Kjeldahl	1	Raypa	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Equipo Soxthet	1	Raypa	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Horno	1	Binder 115	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Espectrofotómetro UV-Vis	1	SHIMADZU/UV-1800	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Plancha de calentamiento	1	CORNING	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Mufla	1	Thermolyne/1400	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Olla del rotaevaporador	1	Heidolph/Laborota 4000	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
pH metro	1	Metrooh/827	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
pHmetro de sólidos	1	HORIBA/D51	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
FIBERTEST	1	Raypa	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Licuadaora	1	Oster	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Vórtex	1	Thermolyne	Laboratorio de biotecnología, Universidad del Cauca
Shaker	1	Thermo scientific/ MAXQ4450	

Anexo 2 Método Bradford

Tabla 16 Curva de calibración del método Bradford

mg Albúmina/mL	Absorbancia 595 nm			\bar{x}	σ	C_v
	1	2	3			
0,10	0,038	0,037	0,037	0,037	0,001	1,546
0,20	0,092	0,091	0,084	0,089	0,004	4,898
0,40	0,192	0,186	0,180	0,186	0,006	3,226
0,60	0,319	0,310	0,300	0,310	0,010	3,069
0,80	0,457	0,461	0,465	0,461	0,004	0,868
1,00	0,569	0,585	0,600	0,585	0,016	2,652

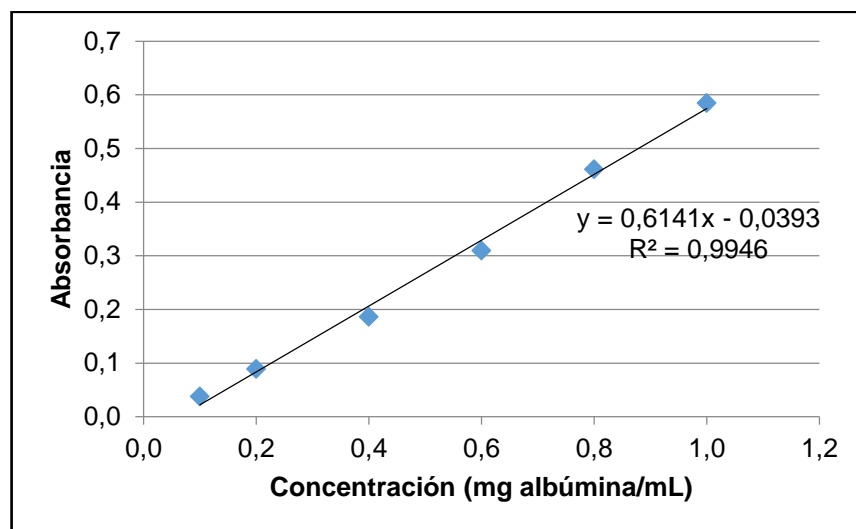


Figura 14 Curva de calibración de Albúmina

Anexo 3 Parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método TNBS

Tabla 17 Resumen de resultados para curva de calibración de Leucina

Concentración Leu (mM)	Absorbancia					\bar{x}	C_v
	1	2	3	4	5		
0,6	0,041±	0,038±	0,038±	0,038±	0,038±	0,039±	3,218
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	
1,8	0,124±	0,123±	0,122±	0,122±	0,123±	0,123±	0,650
	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,001	
3,0	0,178±	0,177±	0,178±	0,179±	0,179±	0,178±	0,379
	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	
4,2	0,242±	0,244±	0,248±	0,249±	0,248±	0,246±	1,129
	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,003	
6,0	0,337±	0,339±	0,341±	0,341±	0,340±	0,340±	0,429
	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	
8,5	0,439±	0,439±	0,441±	0,442±	0,440±	0,440±	0,296
	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	

Los límites de detección y cuantificación se determinaron experimentalmente disminuyendo el valor de concentración en los patrones de Leucina. En la Tabla 18 se evidencia que a una concentración de 0,014 mM de Leucina se obtiene la mínima absorbancia (0,001) que se puede detectar por el método. La precisión del método corresponde al coeficiente de variación en cada patrón.

Tabla 18 Límite de detección y cuantificación del método TNBS

Concentración Leucina (mM)	Absorbancia					\bar{x}	σ	C_v
0,066	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004	0,000	0,000	
0,033	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001	17,321	
0,014	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	
0,010	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000	0,000	

La sensibilidad del método se midió como el promedio de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas. Los parámetros sensibilidad, R^2 y ecuación de la recta se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros determinados

Parámetro	Valor
Sensibilidad	0,0505±0,0003
R^2	0,9931
Ecuación de la recta	$y=0,0505x + 0,0246$

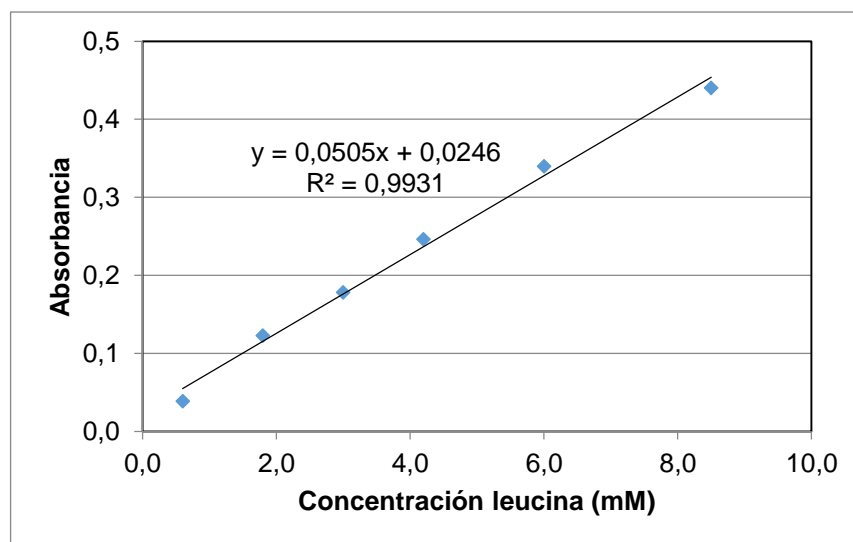


Figura 15 Curva de calibración de Leucina

Anexo 4 Parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método ABTS

Tabla 20 Resultados curva de calibración de TROLOX por el método ABTS

TROLOX (μM)	Absorbancia					\bar{x}	C_v
	1	2	3	4	5		
0	0,676±	0,672±	0,672±	0,675±	0,679±	0,675±	0,762
	0,010	0,002	0,003	0,004	0,004	0,005	
50	0,620±	0,621±	0,621±	0,618±	0,615±	0,619±	0,541
	0,003	0,002	0,002	0,002	0,004	0,003	
100	0,583±	0,579±	0,591±	0,586±	0,588±	0,586±	0,808
	0,003	0,002	0,002	0,002	0,004	0,005	
200	0,495±	0,486±	0,503±	0,501±	0,498±	0,497±	1,785
	0,003	0,002	0,002	0,002	0,004	0,009	
300	0,398±	0,393±	0,401±	0,398±	0,396±	0,397±	1,078
	0,010	0,003	0,004	0,012	0,006	0,004	
600	0,185±	0,178±	0,191±	0,182±	0,183±	0,184±	2,545
	0,004	0,004	0,004	0,005	0,003	0,005	

Los límites de detección y cuantificación se determinaron experimentalmente disminuyendo el valor de concentración en los patrones de TROLOX, en la Tabla

21 se muestra que a una concentración de 1300 $\mu\text{mol TROLOX/L}$ se obtiene la mínima absorbancia (0,001) que se puede detectar por el método.

Tabla 21 Límite de detección y cuantificación del método ABTS

TROLOX (μM)	A ₁	A ₂	A ₃	\bar{x}	σ	C _V
1100	0,002	0,002	0,002	0,0020	0,000	0,000
1300	0,001	0,001	0,001	0,0010	0,000	0,000
1600	0,001	0,001	0,001	0,0010	0,000	0,000
2000	0,001	0,001	0,001	0,0010	0,000	0,000

La sensibilidad del método se midió como el promedio de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas. Los parámetros sensibilidad, R² y ecuación de la recta se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22 Parámetros determinados

Parámetro	Valor
Sensibilidad	-0,0008±0,0000
R ²	0,9955
Ecuación de la recta	y= -0,0008x + 0,6631

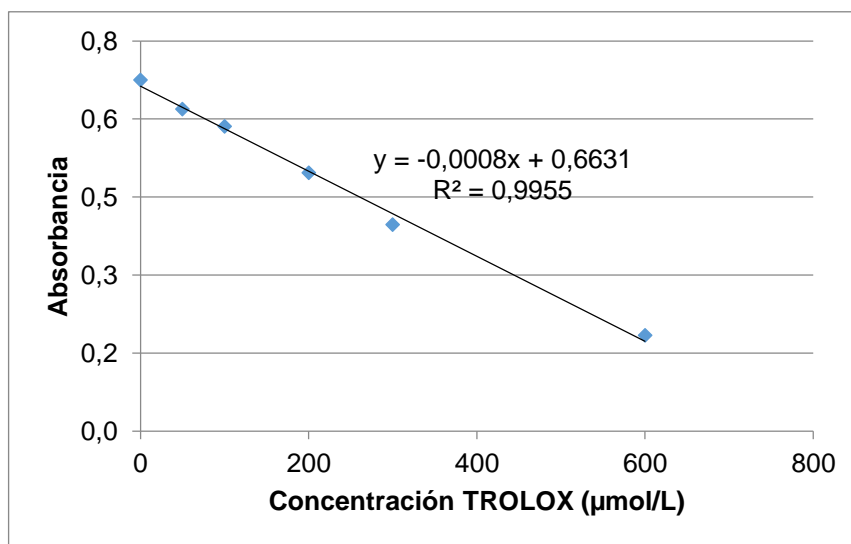


Figura 16 Curva de calibración de TROLOX por ABTS

Anexo 5 Parámetros de reproducibilidad y repetibilidad del método DPPH

Tabla 23 Resultados curva de calibración de TROLOX por el método DPPH

TROLOX (μM)	Absorbancia					\bar{x}	C_v
	1	2	3	4	5		
0,0	0,656±	0,656±	0,657±	0,666±	0,654±	0,658±	0,697
	0,002	0,002	0,004	0,002	0,001	0,005	
50,0	0,599±	0,602±	0,606±	0,630±	0,602±	0,608±	1,924
	0,002	0,001	0,004	0,002	0,001	0,012	
100,0	0,533±	0,529±	0,548±	0,544±	0,536±	0,538±	1,467
	0,001	0,007	0,002	0,004	0,001	0,008	
150,0	0,474±	0,491±	0,503±	0,494±	0,466±	0,484±	3,735
	0,001	0,007	0,002	0,004	0,001	0,018	
200,0	0,419±	0,417±	0,417±	0,424±	0,418±	0,419±	0,755
	0,001	0,019	0,005	0,004	0,003	0,003	
300,0	0,294±	0,293±	0,341±	0,289±	0,298±	0,289±	3,191
	0,004	0,001	0,001	0,003	0,001	0,009	

Los límites de detección y cuantificación se determinaron experimentalmente disminuyendo el valor de concentración en los patrones de TROLOX. En la Tabla 24 se evidencia que a una concentración de 700 μmol TROLOX/L se obtiene la mínima absorbancia (0,031) que se puede detectar por el método. La precisión del método corresponde al coeficiente de variación en cada patrón.

Tabla 24 Límite de detección y cuantificación del método DPPH

TROLOX (μM)	A_1	A_2	A_3	\bar{x}	σ	C_v
700	0,031	0,031	0,032	0,031	0,001	1,843
900	0,031	0,031	0,031	0,031	0,000	0,000
1300	0,031	0,031	0,032	0,031	0,001	1,843
1800	0,031	0,031	0,031	0,031	0,000	0,000
2000	0,031	0,032	0,031	0,031	0,001	1,843

La sensibilidad del método se midió como el promedio de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas. Los parámetros sensibilidad, R^2 y ecuación de la recta se resumen en la Tabla 25.

Tabla 25 Parámetros determinados

Parámetro	Valor
Sensibilidad	0,0012±0,0001
R^2	0,9986
Ecuación de la recta	$y = -0,0012x + 0,6640$

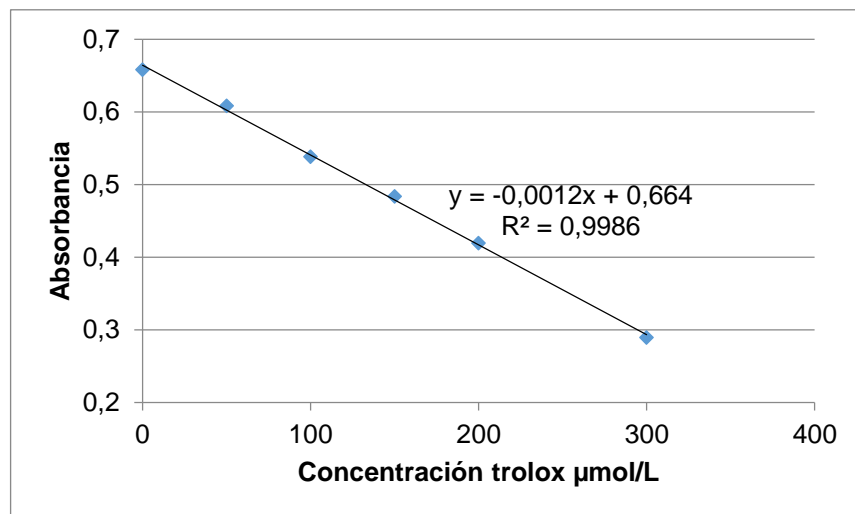


Figura 17 Curva de calibración de TROLOX por DPPH

Anexo 6 Influencia del tiempo (factor intrasujeto) con respecto al GH

Tabla 26 Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida: GH			
Origen		Significancia	Potencia observada ^a
Tiempo	Greenhouse-Geisser	0,000	1,000

^aCalculado con alfa = 0,05

Anexo 7 Prueba Tukey realizada a los métodos ABTS y DPPH, teniendo como factor fijo el GH

Tabla 27 Subconjuntos homogéneos de actividad antioxidante por el método DPPH

GH	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
0,00	3	7,62					
4,84	3		8,29				
12,88	3			9,28			
15,26	3				9,91		
20,85	3					10,59	
38,94	6					10,80	10,80
38,97	3					10,86	10,86
35,39	3					10,93	10,93
38,24	3					10,96	10,96
37,54	3					11,04	11,04
38,39	3					11,04	11,04
33,18	3					11,08	11,08
36,69	3					11,08	11,08
23,41	3					11,14	11,14
38,67	3					11,14	11,14
37,89	3					11,17	11,17

30,32	3						11,23
26,33	3						11,32
28,05	3						11,35
25,65	3						11,40
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	0,101	0,071

Tabla 28 Subconjuntos homogéneos de actividad antioxidante por el método ABTS

GH	N	Subconjunto		
		1	2	3
0,00	3	33,54		
4,84	3		38,92	
12,88	3			43,61
15,26	3			45,07
26,33	3			45,28
20,85	3			45,58
23,41	3			45,64
37,54	3			45,72
33,18	3			45,78
25,65	3			45,86
28,05	3			45,88
35,39	3			45,90
38,67	3			45,94
38,97	3			45,95
30,32	3			45,98
37,89	3			46,04
38,94	6			46,04
38,39	3			46,28
38,24	3			46,32
36,69	3			46,38
Sig.		1,000	1,000	,303

Anexo 8 Diferencia estadística entre los métodos ABTS y DPPH

Tabla 29 Pruebas de los efectos inter-sujetos

Origen	Factor F	Sig.	Potencia observada ^a
Método	131102,063	0,000	1,000
Error			

^aCalculado con alfa = 0,05