

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA BIOQUÍMICA  
MENCIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA Y HEMATOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS  
MICROBIOLÓGICAS Y BROMATOLÓGICAS DE ALIMENTOS  
BALANCEADOS PARA ANIMALES DE LABORATORIO  
(RATAS Y RATONES). SELADIS**

**ELABORADO POR:**

Univ. Carla Luna Montaña

**ASESORES INSTITUCIONALES:**

Dra. Angélica Ma. Espada

Dra. María Torrez

La Paz – Bolivia  
2007

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA BIOQUÍMICA  
MENCIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA Y HEMATOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS  
MICROBIOLÓGICAS Y BROMATOLÓGICAS DE ALIMENTOS  
BALANCEADOS PARA ANIMALES DE LABORATORIO  
(RATAS Y RATONES). SELADIS**

**ELABORADO POR:**

Univ. Carla Luna Montaña

**TESINA PARA LA OBTENCIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA**

La Paz – Bolivia  
2007

## RESUMEN

Los animales de laboratorio deben ser alimentados con dietas no contaminadas y nutricionalmente adecuadas, diariamente o acorde a requerimientos particulares. Los subcomités de nutrición del National Research Council Committee establecen los requerimientos nutricionales de los animales de laboratorio abordando además los temas de control de calidad, ausencia de contaminantes químicos, microbiológicos y la presencia de tóxicos naturales de los ingredientes, además de la biodisponibilidad de los nutrientes en los alimentos. El alimento concentrado en nutrientes está constituido en su mayor parte por subproductos de origen orgánico animal o vegetal. Debido a esto, se requieren condiciones apropiadas de elaboración, transporte y almacenamiento con el fin de contrarrestar la alta susceptibilidad del producto a alteraciones microbianas, lo cual incide directamente en cuadros infecciosos de la mayoría de las enfermedades de los animales como consecuencia de bacterias como *Salmonella sp.*, las toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, o por la presencia de micotoxinas producidas por hongos.

Todo conlleva a determinar la calidad microbiológica, fisicoquímica y nutricional de alimentos balanceados para consumo de animales de laboratorio en estos productos que son elaborados y comercializados en nuestro medio.

Los resultados obtenidos de este estudio permitieron establecer la importancia de mantener la calidad de los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y nutricionales, en este tipo de alimentos, de tal manera que sirvan de base para calificar un alimento balanceado como apto para el consumo de los animales de laboratorio.

La experiencia con las muestras demostraron que las características microbiológicas son aceptables, pero se pudo evidenciar que las características nutricionales y fisicoquímicas en la mayoría de las muestras analizadas no cumplen los requerimientos para este tipo de animales de laboratorio.

Se encontraron 2 muestras (13 por ciento) con recuento de bacterias aeróbias mesófilas por encima de los valores de referencia microbiológicos recomendados  $<1 \times 10^6$  UFC/g para este tipo de alimentos.

En 6 muestras (40 por ciento) se encontró recuento de coniformes totales fuera de los valores de referencia microbiológicos recomendados mayores a  $1 \times 10^2$  UFC/g. Mediante pruebas bioquímicas se identificó *Escherichia coli* en 4 muestras (27 por ciento) y *Enterobacter cloacae* en 2 muestras (14 por ciento).

En el recuento de mohos y levaduras se encontraron 6 muestras (40 por ciento) fuera de los valores de referencia microbiológicos recomendados de  $<1 \times 10^2$  UFC/ml. Se identificó *Penicillium sp.* en 2 muestras (13 por ciento) y *Candida sp.* en 7 muestras (47 por ciento).

Ninguna de las muestras procesadas presentó desarrollo de *Salmonella sp.*

No se presentó desarrollo de *Staphylococcus aureus* en ninguna de las 15 muestras procesadas. Sin embargo 12 muestras (80 por ciento) presentaron desarrollo de *Staphylococcus coagulasa negativa*.

Con respecto a las características nutricionales de las muestras procesadas, 8 muestras (53 por ciento) presentaron un contenido de proteínas menor al requerimiento bromatológico requerido para alimento de roedores de laboratorio (ratas y ratones) (19.0 por ciento), 1 muestra (7 por ciento) cumple con el requerimiento de proteínas y 6 muestras (40 por ciento) presentaron contenido de proteínas mayor al requerimiento nutricional.

El contenido de grasa se encontró por debajo del requerimiento bromatológico en 9 muestras procesadas (60 por ciento), 1 muestra (7 por ciento) cumple con el contenido requerido (3,30 por ciento) y 5 muestras (33 por ciento) presentaron contenido de grasa mayor al requerimiento.

Se encontró 11 muestras (73 por ciento) con contenido de fibra por debajo del requerimiento bromatológico requerido para alimento de roedores de laboratorio (4,90

por ciento), 4 muestras (27 por ciento) presentaron contenidos de fibra mayores al requerimiento y ninguna muestra cumple con el contenido de fibra requerido.

Ninguna muestra cumple con el requerimiento de contenido de cenizas (6.70 por ciento), 13 muestras (87 por ciento) presentaron contenido mayor y 2 muestras (13 por ciento) contenido menor al requerido.

El porcentaje máximo de humedad es de 12 por ciento para este tipo de alimentos, se encontró 2 muestras (13 por ciento) con contenido de humedad mayor a este valor, 12 muestras (80 por ciento) presentaron contenidos menores al valor máximo y solo 1 muestra (7 por ciento) se encontró con contenido de humedad en el límite máximo aceptable.

Los valores de acidez se encontraron por encima del valor máximo permisible que es de 0.1 por ciento de ácido láctico.

El contenido de carbohidratos no se realizó debido a que este componente no tiene un valor establecido ya que depende de la cantidad que el investigador desee aportar a un determinado alimento para un experimento específico.

El valor energético de todas las muestras se encontró por debajo de los valores recomendados para esta especie (3,6 – 3,8 Kcal/Kg).

Debe ponerse énfasis en tres factores importantes, para que el alimento sea utilizado eficientemente por un animal, siendo estos los siguientes: la formulación adecuada del alimento, la manufactura del alimento y el manejo adecuado del alimento.

## TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
III.	ANTECEDENTES.....	2
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	9
V.	OBJETIVOS.....	10
A.	OBJETIVO GENERAL .....	10
B.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
VI.	MARCO REFERENCIAL .....	11
A.	CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR LA FACILIDAD CON QUE SE ALTERAN.....	12
1.	Alimentos estables o no perecederos.....	12
2.	Alimentos semiperecederos .....	12
3.	Alimentos perecederos .....	12
B.	NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO .....	12
1.	NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO RATAS Y RATONES .....	13
C.	FORMULACIÓN DE DIETAS PARA ANIMALES DE LABORATORIO .....	17
D.	COMPOSICIÓN BROMATOLOGICA REQUERIDA PARA UN ALIMENTO DE ROEDORES DE LABORATORIO .....	23
E.	PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LAS DIETAS .....	24
F.	CONSERVACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS DIETAS .....	25
G.	PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS .....	32
H.	PARÁMETROS BROMATOLÓGICOS .....	35
1.1	Determinación de la humedad por método de secado .....	36
1.2	Análisis de proteínas por el método de Kjeldahl .....	37
1.3	Determinación de grasa por el método de extracción de solubilidad .....	37
1.4	Análisis de fibra .....	38
1.5	Determinación de carbohidratos .....	38
1.6	Análisis de cenizas .....	38
1.7	Determinación de acidez .....	38
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO .....	39
A.	Tipo de Investigación .....	39
B.	Muestreo .....	39
C.	Estrategia de ejecución .....	40
D.	Materiales y métodos .....	41
1.1	PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS .....	41
1.1.1	RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS .....	41
1.1.2	RECuento DE BACTERIAS AEROBIAS MESOFILAS .....	42
1.1.3	RECuento DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
1.1.4	DETECCIÓN DE <i>Samonella</i> .....	45
1.1.5	RECuento DE COLIFORMES TOTALES EN PLACA .....	46

1.2	ANÁLISIS BROMATOLÓGICO .....	47
1.2.1	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS MÉTODO DE KJELDAHL..	47
1.2.2	DETERMINACIÓN DE GRASA EXTRACCIÓN POR SOLUBILIZACIÓN .....	47
1.2.3	DETERMINACIÓN DE FIBRA HIDROLÍISIS ÁCIDA Y ALCALINA .....	48
1.2.4	DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS MÉTODO DE FEHLING .....	48
1.2.5	DETERMINACIÓN DE CENIZAS CALCINACIÓN ORGANIZA....	49
1.2.6	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD MÉTODO POR SECADO.....	49
1.2.7	DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ MÉTODO DE TITULACIÓN.....	50
1.2.8	DETERMINACIÓN DEL VALOR ENERGÉTICO .....	50
VIII.	RESULTADOS .....	51
IX.	DISCUSIÓN .....	58
X.	CONCLUSIONES .....	61
XI.	RECOMENDACIONES .....	63
XII.	BIBLIOGRAFÍA .....	64

## I. INTRODUCCIÓN

La nutrición constituye el factor que mayor influencia ejerce sobre el desarrollo de un organismo vivo, si esta no es adecuada, se ven trastocados el potencial genético, la reproducción, y la longevidad de los mismos.

La dieta para una adecuada alimentación de las especies de animales en el laboratorio incluye aproximadamente 50 nutrientes esenciales, que deben contar con un manejo apropiado para procurar mantener su calidad y cualidad.

Respecto a la alimentación de los animales de laboratorio, estos deben ser alimentados con dietas no contaminadas y nutricionalmente adecuadas, diariamente o acorde a requerimientos particulares. Los subcomités de nutrición del *National Research Council Committee* establecen los requerimientos nutricionales de los animales de laboratorio abordando además los temas de control de calidad, ausencia de contaminantes químicos, microbiológicos y la presencia de tóxicos naturales de los ingredientes, además de la biodisponibilidad de los nutrientes en los alimentos.

El alimento concentrado en nutrientes está constituido en su mayor parte por subproductos de origen orgánico animal o vegetal. Debido a esto, se requieren condiciones apropiadas de elaboración, transporte y almacenamiento con el fin de contrarrestar la alta susceptibilidad del producto a alteraciones microbianas, lo cual incide directamente en cuadros infecciosos de la mayoría de las enfermedades en los animales como consecuencia de bacterias, como *Salmonella sp*, las toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, o por la presencia de micotoxinas producidas por hongos.

Las buenas prácticas de fabricación de alimentos (BPFA) constituyen un factor importante para asegurar que los alimentos se fabriquen en forma uniforme y controlada, de acuerdo con normas de calidad adecuadas al uso que se pretende dar y conforme a las condiciones establecidas para su comercialización

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La ausencia de datos referente a la calidad microbiológica, fisicoquímica y nutricional de alimentos balanceados para consumo de animales de laboratorio, determina la necesidad de realizar un estudio que permita conocer dichas características en estos productos que son elaborados y comercializados en nuestro medio.

Teniéndose en cuenta que tanto la conservación como el control de dichas características constituyen aspectos fundamentales para el aseguramiento de la calidad y de la estandarización de dietas para animales de laboratorio, determinará que no se transformen en factores de distorsión de los resultados obtenidos en estudios experimentales con animales de laboratorio.

Los resultados obtenidos de este estudio permitirán establecer la importancia de mantener la calidad de los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y nutricionales, en este tipo de alimentos, de tal manera que sirvan de base para calificar un alimento balanceado como apto para el consumo de los animales de laboratorio.

## **III. ANTECEDENTES**

El estado nutricional de un animal de laboratorio está directamente relacionado con la alimentación que recibe (cualitativa y cuantitativamente).

La nutrición es una variable que puede afectar, en distintos sentidos a los resultados experimentales obtenidos. Así, los resultados de un determinado estudio pueden estar sesgados, o falseados de forma involuntaria, por factores que afectan a la composición de la dieta que ingieren los animales, como pueden ser los cambios desconocidos en los constituyentes de la misma.<sup>1</sup>

Desde 1988 se han venido formulando, evaluando y aplicando diferentes tipos de dietas con objeto de conocer la influencia de la proporción de proteínas, grasa y fibra



en la incidencia de enfermedades crónicas y de tumores. La composición nutricional de la dieta puede influir en el crecimiento, la aparición de enfermedades, las expectativas de vida, la aparición de tumores y la respuesta a tratamientos químicos.

Tras numerosos estudios de balance de nitrógeno, crecimiento, desarrollo y capacidad de reproducción, utilizando diferentes proteínas a distintos niveles en la dieta, se ha propuesto, que las dietas de ingredientes naturales y para animales en crecimiento, sea de una concentración del 15 % de una proteína o mezcla proteica de alta calidad. Actualmente, se estudia la posible relación entre los aportes proteicos y la presencia de algunas enfermedades infecciosas y parasitarias. Se ha comprobado que aportes proteicos superiores a los recomendados como más convenientes, aumentan la frecuencia y la gravedad de la salmonelosis por *S. typhimurium* en los ratones, siendo mucho más elevada la tasa de mortalidad que cuando el aporte proteico en la dieta es el adecuado.

Otros estudios indican que en las dietas de animales de experimentación hay fuentes de Hidratos de Carbono que deben utilizarse **con precaución e incluso no emplearse**. Este es el caso de la fructosa y la sacarosa (disacárido que contiene fructosa), con capacidad para alterar el flujo glucolítico del hepatocito. Se ha descrito que, tras la alimentación con estos azúcares, un incremento en el peso del hígado junto con un mayor contenido en glucógeno y triglicéridos (hipertrigliceridemia) y alteraciones renales con nefrocalcinosis.

“Estudios realizados en ratas ponen en evidencia que, la fibra insoluble hasta niveles dietéticos del 20 % no afecta al crecimiento del animal”.<sup>1</sup>

En estudios a largo plazo realizados en ratas, se ha visto que entre las causas de mortalidad, posiblemente relacionadas con la dieta, se pueden incluir las nefropatías en machos, los tumores de mama en hembras y los tumores de adenohipófisis en ambos sexos.

Entre 1980 y 1994, la dieta no purificada de fórmula abierta NIH – 07, rica en proteínas (24 % en peso), pobre en grasa y fibra (5 % y 3.5%, respectivamente) y con una relación Ca/P (Calcio/Fosforo) de 0.75, fue seleccionada como la dieta que

se debe utilizar (Dieta Recomendada) para los estudios de toxicología y carcinogénesis en roedores dentro del National Toxicology Program (Estados Unidos). Esta dieta, quizás debido a su alta proporción de proteína y a su baja relación Ca/P, puede haber contribuido a las nefrocalcinosis, y a la gravedad de las nefropatías y otras lesiones encontradas en los estudios antes comentados.

Con los resultados obtenidos con esta dieta experimental, se formuló una nueva dieta (NTP-2000), de ingredientes naturales no purificados, aportando el maíz y el trigo el 60 % de éstos (Cuadro 4-12). Los estudios realizados con esta dieta, formulada con un 14.5 % de proteína, un 8.2 % de grasa, un 9.3 % de fibra y una relación Ca/P de 1/3, han puesto de manifiesto que es más adecuado que la NIH-07 para el crecimiento y el mantenimiento de ratas, ya que previene la nefrocalcinosis y parece disminuir la incidencia y gravedad de las lesiones asociadas a la dieta o a la edad.

**CUADRO 4 – 12**

<b>Ingredientes</b>	<b>NTP-2000</b>	<b>NIH-07</b>
Maíz molido	22.18	24.5
Trigo molido	22.26	23.0
Trigo (calidad media)	15.0	10.0
Harina de soja (49 % de proteína)	5.0	12.0
Harina de pescado (6 % de proteína)	4.0	10.0
Leche en polvo	0.0	5.0
Gluten de maíz (60 % de proteína)	0.0	3.0
Harina de alfalfa	7.5	4.0
Salvado de avena	8.5	0.0
Celulosa	5.5	0.0
Aceite de maíz	3.0	0.0
Aceite de soja	3.0	2.5
Levadura de cerveza	1.0	2.0
Melazas desecadas	0.0	1.5
Cloruro sódico	0.3	0.5

Fosfato cálcico bibásico	0.4	1.25
Carbonato cálcico	0.9	0.5
Cloruro de colina (70% de colina)	0.26	0.09
Metionina	0.2	0.0
Premezcla de vitaminas	0.5	+
Premezcla de minerales	0.5	0.25

La dieta purificada que se ha empleado con más frecuencia para estudios nutricionales y toxicológicos ha sido la AIN-76 (Cuadro 4-13), modificada por el American Institute of Nutrition, mediante el incremento de la concentración de vitamina K (diez veces), pasando a denominarse AIN-76A. Durante 16 años, estas dietas han sido ampliamente utilizadas por la comunidad científica, pero debido a problemas nutricionales y técnicos, la FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) ha revisado su formulación, proponiendo nuevas dietas para el crecimiento, gestación, lactancia y el mantenimiento de roedores. La composición de la dieta semipurificada AIN-76 recomendada para el crecimiento y el mantenimiento de roedores durante el primer año de vida consiste en un 18.4% de proteína, un 5.0% de grasa, un 5.0 % de fibra, un 65 % de hidratos de carbono y 3.79 kcal/g de energía.<sup>1</sup>

**CUADRO 4 – 13**

<b>AIN-76: Mezcla mineral (g/kg)</b>		<b>AIN-76: Mezcla vitamínica (g/kg)</b>	
Fosfato cálcico bibásico	500.00	Tiamina (mg/kg)	600.0
Cloruro sódico	74.00	Rivoflavina (mg/kg)	600.0
Citrato potásico monohidratado	220.00	Piridoxina (mg/kg)	700.0
Sulfato potásico	52.00	Ácido nicotínico (g/kg)	3.0
Óxido de magnesio	24.00	Pantotenato cálcico (g/kg)	1.6
Carbonato de manganeso	3.50	Ácido fólico (mg/kg)	200.0
Citrato férrico	6.00	Biotina (mg/kg)	20.0
Carbonato de cinc	1.60	Cianocobalamina	1.0



INICIALES	SIGNIFICADO
° C	Grados Centígrados
T	Tiempo
AMES	Aerobios mesofilos
COLI	Coliformes totales
SALM	Salmonella
CLOS	Clostridium
Estafi	Staphylococcus
MOH/LEV0	Mohos y levaduras

Cuadro 4 – 14. Carga microbiológica de dieta control (MCI-3) y tratada térmicamente (MT) con diferentes valores de temperatura (° C) y tiempo (T°). Igualmente se indica la microbiología de una dieta altamente contaminada (MP1-3). En todos los casos se indica el valor medio ( $\pm$  2 DS). (Extraído de Zúñiga et al., 1999)

INICIALES	SIGNIFICADO
TMA	Tasa máxima aceptada
MC	Muestra control, n = 6
MP	Muestra problema
MT	Muestra tratada térmicamente

La Dirección General de Servicios Agrícolas (ONPF - Uruguay) y la división de protección de alimentos, establece los siguientes plazos de validez recomendados (máximos) para alimentos balanceados.<sup>3</sup>

- Alimentos balanceados y raciones suplementarias molidas para animales en crecimiento, otras raciones con nivel de grasa superior a 3%: 2 meses (tiempo máximo de almacenamiento)
- Alimentos balanceados y raciones suplementarias molidas para animales en terminación y con un nivel de grasa menor o igual a 3%: 3 meses

- Granos quebrados, achatados o molidos: 3 meses
- Alimentos balanceados y raciones suplementarias pellets: 6 meses
- Premezclas que adicionen vitaminas y/o minerales, y que se incorporen a un nivel menor a 10%: 6 meses
- Harinas de carne y de pescado (con antioxidante): 6 meses

Según un estudio realizado en alimentos balanceados para rumiantes elaborado con pollinaza (excretas de aves de corral) <sup>4</sup> se determinó el comportamiento de la contaminación microbiológica, encontrando que, en el alimento balanceado el contenido de microorganismos se incrementó conforme aumentó el tiempo de almacenamiento. Este fue casi en un 900% para el caso de los coliformes fecales encontrados en el día 28 de muestreo en comparación con la cantidad encontrada en el día cero. En ninguna muestra analizada se encontró *Salmonella* ni *Shigella*, pero se aisló *Aspergillus spp.*

En un estudio realizado en Lima Perú cuyo objetivo fue evaluar a través de pruebas biológicas en ratas de laboratorio el valor nutricional de los insumos proteicos utilizados en los alimentos comerciales para perros, tales como, torta de soya (TS), harina de carne (HC) y harina de pollo (HP). Se utilizaron las pruebas biológicas de Relación de Eficiencia Proteica (PER), Digestibilidad Verdadera (DV), Utilización Neta de las Proteínas (NPU) y Valor Biológico (VB). Se empleó 40 ratas albinas de 23 días de edad distribuidas en grupos de acuerdo al insumo proteico utilizado en la dieta: grupos TS, HC, HP, control (caseinato de sodio) y apteico.

Los insumos proteicos evaluados tuvieron una alta digestibilidad verdadera. La harina de carne es el insumo proteico de menor calidad (menor PER, NPU y VB). Concluyeron que para evaluar la calidad de los insumos proteicos no es suficiente determinar su contenido proteico y digestibilidad, sino que además se requiere realizar las evaluaciones biológicas. <sup>5</sup>

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Con base en que la nutrición de los animales al igual que en los humanos, es un factor importante que influye en el potencial genético, reproductivo, y longevidad, es que el alimento balanceado que consumen debe cumplir con los requerimientos nutricionales de cada especie e incluso de cada raza de animal, el mismo debe cubrir los requerimientos adecuados respecto a contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, fibra, cenizas y las características fisicoquímicas tales como el pH, y la humedad deben ser adecuados para evitar la alteración durante el almacenamiento de estos productos terminados.

Así mismo es importante el control de calidad microbiológica de los alimentos balanceados para evitar la proliferación de cualquier tipo de microorganismos ya sean bacterias u hongos debida a una mala selección de las materias primas, mal sistema de elaboración con malas practicas de higiene del personal encargado de su elaboración o condiciones inadecuadas de almacenamiento, todo ello puede afectar la salud de los animales de experimentación.

Los riesgos que representa para la salud de los animales de laboratorio cuando consumen alimentos con cargas microbiológicas por encima de los estándares microbiológicos recomendados y/o la presencia de microorganismos patógenos, obligan cada vez mas a establecer controles y normas estrictas para regular la elaboración y comercialización de los alimentos balanceados.

Este estudio permitirá conocer la calidad de los alimentos balanceados para animales de laboratorio, debido a que no se cuenta con datos respecto a los parámetros microbiológicos y bromatológicos de estos productos que son elaborados y comercializados en nuestro país.

## V. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

- Determinar los parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y nutricionales de alimentos balanceados para animales de laboratorio (ratas, ratones).

### B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los parámetros microbiológicos de muestras de alimentos balanceados para animales de laboratorio (ratas, ratones). A través de:
  - Recuento de bacterias aerobias mesófilas
  - Recuento de *Staphylococcus aureus*.
  - Recuento de mohos y levaduras.
  - Recuento de coliformes totales.
  - Identificación de *Salmonella*.
- Determinar los parámetros nutricionales de alimentos balanceados para animales de laboratorio (ratas, ratones). A través de:
  - Determinación del contenido de Proteínas
  - Determinación de fibra
  - Determinación de hidratos de carbono.
  - Determinación de grasa.
  - Determinación del valor energético.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos de alimentos balanceados para animales de laboratorio (ratas, ratones). A través de:
  - Determinación de ceniza.
  - Determinación de acidez.
  - Humedad.



## VI. MARCO REFERENCIAL

Una gran variedad de microorganismos contaminan los alimentos en los lugares de producción y durante el procesamiento. El que estos microorganismos crezcan, sobrevivan o mueran dependerá de la clase de alimento, del medio ambiente y del procedimiento de elaboración.

Los alimentos deshidratados no suelen ser estériles, sin embargo, debido a su baja actividad de agua ( $A_w$ ) pueden permanecer estables microbiológicamente durante mucho tiempo, solo cuando se humedecen podrá comenzar la alteración, principalmente por mohos que al mismo tiempo que alteran los alimentos pueden producir micotoxinas,

Así en los alimentos conservados entre  $-5$  y  $-10^\circ\text{C}$ , en los que la cantidad de agua en forma líquida es muy limitada, los microorganismos que predominan son los mohos. Igualmente en alimentos cuyo pH es inferior a 5 o cuya actividad agua ( $A_w$ ) menor de 0,9, pueden crecer levaduras o mohos. Consiguientemente, el crecimiento microbiano en estos alimentos puede originar micotoxinas pero no toxinas bacterianas. La evolución de los microorganismos patógenos y toxigénicos en un alimento perecedero depende tanto del ambiente físico y bioquímico como de la flora competidora acompañante al ambiente biológico.

Los gérmenes patógenos sólo producen enfermedades si llegan a alcanzar niveles muy altos en los alimentos, así sucede con *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringes*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Bacillus cereus*. Estos microorganismos en pequeñas cantidades son inocuos y se encuentran en pequeñas cantidades en muchos alimentos crudos.

La mayoría de las bacterias alterantes se multiplican con facilidad a temperaturas inferiores a la mínima de crecimiento de las bacterias productoras de intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias, mide por lo tanto el período de conservabilidad de un

alimento. Algunos gérmenes que constituyen esta flora son patógenos, por lo que un recuento en placa a 35°C alto pone en duda la garantía sanitaria de un alimento. Por consiguiente, es prudente reducir la población microbiana de los alimentos tanto desde el punto de vista sanitario como tecnológico.<sup>6</sup>

#### **A. CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR LA FACILIDAD CON QUE SE ALTERAN**

Según la facilidad con que se alteran, los alimentos se pueden incluir en tres grupos:

##### **1. Alimentos estables o no perecederos.**

Son aquellos que no se alteran, a no ser que se manipulen sin cuidado.

##### **2. Alimentos semiperecederos.**

Si este tipo de alimentos se manipulan y conservan de forma apropiada, permanecen sin alterarse durante bastante tiempo.

##### **3. Alimentos perecederos.**

Son aquellos que se alteran con facilidad a no ser que se utilicen procedimientos de conservación.<sup>7</sup>

#### **B. NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO**

La alimentación es la forma de proporcionar al animal de laboratorio, los alimentos necesarios para que alcance un crecimiento y desarrollo óptimo. La nutrición estudia, sin embargo, el conjunto de procesos mediante los cuales el organismo animal recibe, transforma, incorpora y utiliza los nutrientes contenidos en los alimentos, y que constituyen los materiales esenciales para el mantenimiento de la vida.

Para realizar una correcta planificación de la alimentación y conseguir un estado nutricional óptimo, se deben conocer las necesidades nutricionales de tipo tanto cuantitativo como cualitativo de las diferentes especies, esto es fundamental en el proceso de formulación de dietas. Sin embargo, se puede

planificar una dieta muy equilibrada que los animales no ingieran, o bien, aunque la ingieran, puede suceder que la disponibilidad digestiva y metabólica de los distintos nutrientes no sea la adecuada.

Por tanto, a la hora de determinar estos requerimientos se deben tener en cuenta una serie de factores, como la palatabilidad, que va a condicionar la ingestión de alimento, su utilización digestiva y metabólica y su excreción. Todos estos procesos pueden, a su vez, estar influenciados por factores externos, como la forma física del alimento, o las características orosensoriales, junto con la presencia de sustancias no nutritivas y contaminantes. Además, hay que tener en cuenta las posibles pérdidas de nutrientes derivadas de los procesos de fabricación y almacenamiento de los alimentos.<sup>8</sup>

## **1. NECESIDADES NUTRICIONALES DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO RATAS Y RATONES**

Con independencia de la especie y tipo de modelo experimental, estos animales necesitan ingerir una serie de nutrientes que son comunes a todos ellos. Los macronutrientes son las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas. Los micronutrientes están constituidos por los minerales y vitaminas.

En la formulación de una dieta lo más importante es asegurar el aporte adecuado de los distintos nutrientes. Para ello, debemos conocer los requisitos de todos y cada uno de estos nutrientes para la especie considerada. Sin embargo, puesto que la cantidad de alimento ingerido va a venir determinada por las necesidades energéticas de la especie en cuestión, resulta esencial establecer la densidad calórica de la dieta, es decir, la cantidad de cada nutriente por un número determinado de kilocalorías (kcal).

## **1.1 Energía**

Son los componentes de la dieta que aportan al animal el combustible necesario para el mantenimiento de los procesos vitales basales, como el latido cardíaco o la respiración, para la producción de calor a fin de mantener la temperatura corporal, y para la actividad física necesaria para comer, roer, cavar, etc. La energía de la dieta la proporcionan principalmente los hidratos de carbono (HC) y las grasas, y en menor grado los esqueletos hidrocarbonados de las proteínas.

Los estándares para ratas y ratones se sitúan en valores de densidad calórica entre 3.6 y 3.8 kcal/g de alimento, en el caso de una alimentación ad libitum y con un contenido adecuado en otros nutrientes.

## **1.2 Proteínas**

Los animales no necesitan las proteínas como tales aportadas por los alimentos, sino los aminoácidos (AA) esenciales, que las componen para poder sintetizar, tras su incorporación, sus propias proteínas.

Se debe establecer, en qué medida los AA que forman parte de la dieta se adecuan a la composición de las proteínas propias del animal. La calidad de una proteína puede verse alterada por distintas causas, como un almacenamiento, un sobrecalentamiento en el proceso de peletización, o un tratamiento térmico inadecuado. Este daño no es fácilmente detectable, de modo que es necesario realizar algunas pruebas para conocer la calidad proteica de una dieta.

**Cuadro 4-2. Composición en aminoácidos (mg/g de nitrógeno) de proteínas purificadas utilizadas en dietas de animales de laboratorio (se asume que la proteína tiene 16 g de nitrógeno)**

Aminoácido	Caseína ácida	Caseína ANRC	Lactoalbúmina	Concentrado de proteína de trigo	Proteína de soja aislada
Alanina	188	188	369	331	269
Arginina	231	231	188	175	475
Asparagina	431	469	769	681	725
Cistina	25	25	200	169	81
Ácido glutámico	1306	1563	925	1094	1194
Glicina	113	125	14	125	263
Histidina	181	200	131	131	163
Isoleucina	288	313	319	338	306
Leucina	569	594	875	744	513
Lisina	481	488	669	588	394
Metionina	181	200	131	156	81
Fenilalanina	319	331	244	219	325
Prolina	650	706	319	331	319
Serina	363	381	313	338	325
Treonina	269	300	369	413	238

### 1.3 Hidratos de carbono

En la dieta de ingredientes naturales para animales de experimentación los almidones de los cereales son la principal fuente de hidratos de carbono (HC). En dietas purificadas el aporte de HC se realiza utilizando almidón y sacarosa, que además contribuye a dar sabor al alimento, mejorar su aceptación y, por tanto, su ingestión. La principal función de los HC es aportar energía a corto plazo, por lo que no existen requisitos específicos sino en función del aporte de energía.

#### **1.4 Fibra**

No aporta energía, en cantidades apreciables, ni otros nutrientes. Sin embargo, debido a su papel regulador de todo el proceso digestivo, disminuyendo el tiempo de tránsito y aumentando el volumen de las heces, entre otras funciones, se le considera un componente dietético más. La fibra da mayor volumen a la dieta, evitando la formación de masas sólidas de alimento que impidan la penetración de los jugos digestivos. Un exceso conduce a un menor consumo de alimentación, provocando a lo largo la desnutrición del individuo.

Al ser prácticamente acalórica actúa como diluyente energético en las dietas, y su adición provoca un incremento en la ingestión de alimento por parte del animal. Esta característica se aprovecha para la elaboración de dietas experimentales en las que es necesario modificar la densidad calórica para cambiar la ingestión de alimentos del animal, o bien en estudios sobre regulación de la ingestión. Normalmente, en dietas purificadas se añade en proporciones cercanas al 5 % en forma de fibra no soluble (celulosa). En dietas de ingredientes naturales, la fibra procede de distintas fuentes vegetales (soja, alfalfa, maíz).

#### **1.5 Grasas**

La grasa de la dieta, formada por lípidos, en su mayor parte triacilglicéridos, tiene distintas funciones dentro del organismo. Por una parte, constituye una fuente excelente de energía por su alta densidad calórica (9 kcal/g), aproximadamente el doble de la contenida en HC y proteínas. Por otro lado, es un elemento estructural de las membranas celulares, aportando ácidos grasos (AG) esenciales, es necesaria para la absorción de vitaminas liposolubles (A, D, E y K). También tiene un papel importante en la palatabilidad de los alimentos, y por tanto, en la aceptación de la dieta por el animal incrementando su ingestión.<sup>1</sup>

### C. FORMULACIÓN DE DIETAS PARA ANIMALES DE LABORATORIO

Tiene como objetivo fundamental conseguir las concentraciones ideales de nutrientes que permitan hacer frente a las necesidades específicas de los distintos animales de laboratorio teniendo en cuenta las pérdidas debidas a los procesos tecnológicos y de almacenamiento, estas pérdidas se deben evaluar mediante el análisis del alimento balanceado elaborado.

En la elaboración de dietas de ingredientes naturales hay que tener en cuenta los nutrientes que aporta cada uno de los ingredientes.

Si fuera necesario se añaden al alimento balanceado premezclas de vitaminas y minerales, el denominado corrector mineralovitamínico.

En el caso de las dietas purificadas, la formulación no es tan compleja, al ser cada constituyente fuente de un único nutriente. Las fuentes comúnmente usadas son:

- Caseína o proteína de soja como fuente proteica.
- Aceites como fuente de grasa.
- Azúcar y almidón como fuentes de hidratos de carbono.
- Celulosa como fuente de fibra bruta.
- A todo ello se le añade la premezcla de vitaminas y minerales.

Con arreglo al tipo de formulación, se dividen en tres grupos: ***dietas de ingredientes naturales, purificadas y químicamente definidas.***

Los ingredientes se expresan como porcentaje en peso, debiendo tener la fórmula un valor del 100 %. Como se cita en el siguiente cuadro.

Raciones de nutrientes recomendadas para animales alimentados *ad libitum*, expresados por kg de alimento compuesto por un 90% de materia seca<sup>1</sup>. Las necesidades corresponden a animales en crecimiento. Para ratas en mantenimiento y hembras en gestación, véase en NRC (1995)

	Ratón	Rata	Hámster	Cobayo	Conejo
Energía digerible <sup>2</sup> (kJ/g)	16.8	16.0	17.6	12.6	10.5
Grasa (g/kg)	s.d.	50	50	s.d.	20
Fibra (g/kg)	r.d.	r.d.	s.d.	100	110
Proteína (g/kg)	180	1203	150	180	160
Arginina (g/kg)	3	6	7.6	s.d.	6
Asparagina (g/kg)	s.d.	4	s.d.	s.d.	s.d.
Hierro (mg/kg)	25	35	140	50	r.d.
Calcio (g/kg)	4	5	5.9	9	4
Cloro (g/kg)	r.d.	0.5	r.d.	r.d.	3
Magnesio (g/kg)	0.5	0.4	0.6	2	0.35
Fósforo (g/kg)	4	4	3	5.5	2.2
Potasio (g/kg)	2	3.6	6.1	9.5	6
Sodio (g/kg)	r.d.	0.5	1.5	s.d.	2

- s.d. situación desconocida.
- r.d. requerida, pero desconocida.

## 1.1 Dietas de ingredientes naturales

Los ingredientes primarios provienen de fuentes naturales y se elaboran usando como elemento base cereales sin refinar (avena, trigo, etc.). Se clasifican en dos grupos: fórmulas comerciales cerradas y fórmulas abiertas.

### 1.1.1 Fórmula cerrada

Su composición no es conocida. La mezcla de materias primas utilizadas es secreta, y es propiedad del fabricante. En el etiquetado



suele aparecer la composición en nutrientes desde un punto de vista cuantitativo.

En general, en su fabricación se suelen utilizar dos fuentes primarias de proteínas: una de origen animal (harina de pescado o subproductos lácteos) y otra de origen vegetal (soja, gluten de maíz). Como fuente lipídica se utilizan grasas animales a las que se añade cierta cantidad de aceites vegetales poliinsaturados que suministran los ácidos grasos esenciales necesarios. La fuente de Hidratos de carbono se obtiene de mezclas de cereales (maíz, sorgo, arroz, cebada, trigo, avena). Como fuente fosfocálcica se utilizan el fosfato bicálcico y limestrone molido. Se suplementan con las vitaminas y los minerales restantes en forma de premezclas.

El uso de materias primas naturales hace que estas dietas cerradas presenten una notable variabilidad en el porcentaje de nutrientes, condicionada a su vez por la variabilidad intrínseca de los componentes naturales. Los factores de tipo ambiental (suelo, clima, prácticas de cultivo, etc.) y genéticos (variedad vegetales o razas animales influyen en la composición de las materias primas utilizadas. Asimismo, los procesos tecnológicos y de almacenamiento también tienen su repercusión al variar de un fabricante a otro.

**Relación de materias primas y otros elementos de una dieta estándar de  
Fórmula cerrada para roedores. Composición normal de una dieta**

**Materias primas**

- |                            |                             |
|----------------------------|-----------------------------|
| - Trigo                    | - Cebada                    |
| - Soja micronizada         | - Pescado rico en proteínas |
| - Aceite de soja o manteca | - Sal                       |
| - Fosfato bicálcico        | - Carbonato cálcico         |
| - Clorhidrato de lisina    | - Aglomerante               |
| - Antioxidante             |                             |

**Corrector tipo con la adición de los siguientes componentes**

- |                               |                                       |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| - Minerales                   | - Yodo                                |
| - Cobalto Manganeso           | - Vitamina B <sub>12</sub>            |
| - <i>Vitaminas</i> Vitamina A | - <i>Aminoácidos</i>                  |
| - Cobre                       | - Menacina                            |
| - Cinc                        | - Tiamina                             |
| - Vitamina D3                 | - Riboflavina                         |
| - Hierro                      | - Ac. Pantotenico                     |
| - Selenio                     | - Piridoxina Felacina Niacina Biotina |
| - Vitamina E                  | Colina.                               |

Esta elevada variabilidad entre diferentes partidas en el tipo y la cantidad de los componentes nutricionales y no nutricionales puede afectar a los resultados experimentales y disminuir la reproducibilidad de los mismos.

Estos datos ponen de manifiesto que el empleo de dietas de distintas marcas pueden modificar los resultados. En este sentido, a la hora de publicar los datos experimentales, se debe especificar la marca de la dieta utilizada y describir lo más correctamente posible su composición.

### **1.1.2 Fórmula abierta**

Tienen una composición conocida y pueden ser elaborados por los usuarios. Entre ellas, destacan la NIH-07, NTP-90, NTP-91, NTP-92 y NPT-2000 para roedores y conejos, descritas con detalle por el National Research Council (NCR) y el American Institute of Nutrition. El conocimiento cuantitativo y cualitativo de las materias primas utilizadas en la mezcla permite que se puedan fabricar, tomando como base estas fórmulas abiertas, dietas especiales en las que se ajusta la concentración en nutrientes a objetivos experimentales concretos y específicos.

## **1.2 DIETAS PURIFICADAS**

Se formulan con una combinación de ingredientes naturales, productos químicos puros e ingredientes refinados. Las dietas purificadas solucionan las limitaciones de las dietas de ingredientes naturales, especialmente las relacionadas con la variabilidad de las diferentes partidas y la presencia de contaminantes.

Estas dietas presentan frente a otras un balance más correcto de nutrientes esenciales, por lo que se consideran ideales, hasta la fecha, para estudios con ratas y ratones de laboratorio.

### **1.3 DIETAS QUÍMICAMENTE DEFINIDAS**

Se elaboran con fuentes químicamente puras de aminoácidos, mono o disacáridos y ácidos grasos o triglicéridos purificados. Los minerales se suministran mediante reactivos químicos, y las vitaminas empleadas son de una gran pureza. Las concentraciones en nutrientes de estas dietas son fijas en el momento de su elaboración, pero la disponibilidad puede verse mermada debido a oxidaciones o a interacciones entre los productos químicos utilizados.

Este tipo de dietas, ampliamente utilizadas, pueden plantear problemas derivados de la insipidez o de la textura, para su preparación es aconsejable moler los ingredientes lo más finamente posible.

### **1.4 DIETAS CARENCIALES Y ENRIQUECIDAS**

A partir de dietas de fórmula abierta, purificadas o químicamente definidas, se pueden confeccionar dietas especiales en las que se ajusta la concentración en nutrientes a objetivos experimentales concretos y específicos, por ejemplo, estudiar el efecto de un aumento en los porcentajes de grasa saturada en la dieta sobre la fisiología cardiovascular. Estas dietas serán, por tanto, pobres (carenciales) o ricas (enriquecidas) en algún nutriente.

El problema que presentan estas dietas es que al variar el contenido de un macronutriente se puede ver afectado el consumo de energía o de otros componentes de la dieta. En un régimen de alimentación ad libitum, los animales de laboratorio tienden a consumir una cantidad constante de energía; por tanto, si la densidad calórica de la dieta se

incrementa (aumento en el porcentaje de grasa), los animales consumirán menos alimento, lo que se traduce en un menor consumo generalizado de nutrientes y viceversa.<sup>9</sup>

#### D. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA REQUERIDA PARA UN ALIMENTO DE ROEDORES DE LABORATORIO.<sup>5</sup>

ANIMAL	Proteína Cruda %	Grasa Cruda %	Fibra Cruda %	Cenizas %	Consumo de alimento diario	Consumo diario de agua
Rata	12- 24	4 – 11	3 – 6	6 - 8	10 – 20 g	20 – 45 mL
Ratón	17 - 24	4 – 11	3 – 6	5 – 7	3 – 6 g	3 – 7 mL

Ref. Rev. De Investigaciones Veterinarias del Perú. Vol. 5 .1998

#### 1.1Dieta Para Ratas Y Ratones – Mantenimiento

CONTENIDO	%
Proteína	19,00 %
Grasa bruta	3,30 %
Fibra bruta	4,90 %
Ceniza bruta	6,70 %
Calcio	1,00 %
Fósforo	0,70 %
Sodio	0,25 %
Magnesio	0,20 %
Potasio	0,90 %

Ref. Rev. De Investigaciones Veterinarias del Perú. Vol.5 .1998

### 1.2 Dieta para Ratas – Cría

CONTENIDO	%
Proteína	21.00%
Grasa bruta	3,80 %
Fibra bruta	4,40 %
Ceniza bruta	6,70 %
Calcio	1,00 %
Fósforo	0,70 %
Sodio	0,25 %
Magnesio	0,20 %
Potasio	0,90 %

Ref. Rev. De Investigaciones Veterinarias del Perú. Vol.5 .1998

### 1.3. Dieta para Ratones- Cría

CONTENIDO	%
Proteína	22.00%
Grasa bruta	4,50 %
Fibra bruta	3,90 %
Ceniza bruta	6,80 %
Calcio	1,00 %
Fósforo	0,70 %
Sodio	0,25 %
Magnesio	0,20 %
Potasio	0,90 %

Ref. Rev. De Investigaciones Veterinarias del Perú. Vol. 5 .1998

## E. PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LAS DIETAS

Las dietas para animales de laboratorio se pueden fabricar con distinta forma física dependiendo del proceso al que se someta la mezcla de ingredientes:

- Molidas: alimento en forma de polvo más o menos fino.
- Granuladas: mezcla de harinas en agua formando una pasta, que posteriormente se somete a compresión y secado dándole distintas formas.

- Pellets: Pulverizado y moldeado en distintas formas. Se utilizan para roedores, cobayas y conejos.
- Expandidas: alimento a alta presión y temperatura a través de un molde. Se utilizan para gatos, primates y perros.
- Semihúmedas: alimentos enlatados o no para gatos y perros.

En el caso de roedores, el pienso en forma de pellets es el más utilizado. Ofrece ciertas ventajas, ya que aparte de satisfacer la necesidad de roer de estos animales es fácil de manejar, almacenar y administrar, siendo mínimo el desperdicio cuando se lo comen. Presenta el inconveniente de que para añadir un nutriente o producto, se requiere moler dicho pienso, a fin de lograr la mezcla adecuada.

Las dietas semihúmedas o en gel se utilizan cuando se incorporan compuestos experimentales en polvo o muy tóxicos. Presentan el inconveniente de ser más susceptibles al desarrollo bacteriano que las secas.

En general, el tipo de trabajo experimental determinará la presentación de la dieta a utilizar.<sup>3</sup>

## **F. CONSERVACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS DIETAS**

La contaminación puede ser de origen abiótico (residuos de pesticidas, metales pesados), biótico (microorganismos, hormonas), o debida a los antibióticos. En general, los contaminantes pueden influir en los procesos fisiológicos o metabólicos y en el estado sanitario de los animales utilizados, y consecuentemente en los resultados esperados.

## **1.1 Almacenamiento de las dietas**

El control debe empezar cuando el producto llega al centro de experimentación y antes de su aceptación definitiva. Los técnicos o investigadores deben:

- Asegurarse de que las condiciones de presentación de los alimentos en el momento de llegar a su poder sean óptimas (envasado correcto, ausencia de trazas de humedad, sacos en buen estado, fecha de fabricación o caducidad).
- Comprobar que las fórmulas que figuran en la etiqueta corresponden al pedido.

Se aconseja no aceptar partidas envejecidas y fabricadas con más de tres meses de antelación.

Deben almacenarse siempre en sitios fríos o frescos (ideal en cámara fría). En los piensos granulados la estabilidad durante el almacenamiento depende en gran medida de las características ambientales (Humedad relativa, temperatura de almacenamiento, grado de exposición al oxígeno atmosférico, pH del producto). Un nivel de humedad homogéneo es preferible a la existencia de «bolsas» con alto contenido de humedad. Toda actividad metabólica origina la producción de agua, que incrementa el contenido de humedad, contribuyendo a acelerar el nivel de deterioro del sabor y contenido nutritivo de los alimentos almacenados. Se aconseja el almacenamiento de las dietas sintéticas a bajas temperaturas en sacos opacos, realizando nuevas mezclas cuando se precise más pienso en experimentos de larga duración.

## **1.2 Control nutricional**

El llamado análisis proximal de una dieta es necesario en dietas de fórmula cerrada basadas en dietas estándar de fórmula abierta, sometidas a variaciones imprevisibles por cambios en las materias primas, alteración en la aplicación de los correctores, o variaciones en la premezcla y la mezcla antes



de la peletización o la extrusión. El objetivo es determinar posibles desviaciones sobre los valores aportados en las etiquetas de las diferentes partidas. Suponen el control del control que presentan las empresas productoras o abastecedoras.

Este control se debería realizar de manera rutinaria para garantizar la adecuada nutrición de los animales y evitar patologías o deficiencias en el crecimiento, desarrollo y tasa reproductora de la población. Igualmente, se hace necesario en estudios de tipo nutricional en los que estas dietas se utilizan como patrón o control.

### **1.3 Calibración de las composiciones**

Las fábricas productoras de dietas para animales de consumo y compañía que trabajan con normas ISO 9000 disponen de modelos de calibración de los piensos, que analizados con rapidez permiten determinar si las partidas fabricadas superan o no los niveles deseados. Estos análisis repetidos sirven como valores de referencia (patrón) o curvas de calibración para validar métodos de análisis rápidos en la misma fábrica, para el control de las desviaciones en el contenido en nutrientes de los distintos lotes de pienso. Para ello se analizan al menos 50 muestras de distintos lotes de piensos y se realizan en ellas 50 determinaciones de cada uno de los parámetros. El número total de muestras es de unas 10 000 (2500 por cada parámetro). La calibración mediante infrarrojos a partir de valores estándar se hace al menos para proteínas, grasas, hidratos de carbono, humedad y algún mineral diana como el calcio. Para posibles alteraciones en la aplicación del corrector se debe determinar alguna vitamina. Esto permite validar la composición en las diferentes partidas producidas, garantizando que la composición indicada en la etiqueta ha sido controlada experimentalmente antes de su distribución al usuario.

#### **1.4 El problema de la homogeneidad de las mezclas**

Constituye uno de los problemas diana en la fabricación de piensos. Las plantas más modernas son capaces de producir pienso a la carta, sin solución de continuidad y en cantidades con un amplio margen de variabilidad. Existen los controles de verificación de la homogeneidad de la mezcla que utilizan como elemento diana los cloruros analizados mediante la técnica NIR (espectroscopia de reflectancia en infrarrojo cercano). Se toman al menos 10 muestras del punto más próximo de la mezcladora al que se puede acceder, y no se aceptan valores superiores al 10 % de coeficiente de variación (CV %) sobre el valor de una mezcla patrón.

#### **1.5 Componentes que se deben controlar y métodos**

Un análisis proximal incluye la determinación cuantitativa de al menos los siguientes parámetros:

- Humedad: muestra (4-5 g) sometida a  $105 \pm 2$  °C en estufa hasta alcanzar un peso constante.
- Proteína bruta: determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl.
- Extracto etéreo (grasa): tras digestión clorhídrica (hidrólisis con C1H). Método de Stold.
- Cenizas (minerales totales): por calcinación de 1-2 g de muestra a 450 °C en horno eléctrico.
- Vitaminas clave, como la A, E o D3: mediante absorbancia por ultravioleta, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### **1.5.1 Contaminantes abióticos**

Su presencia se debe a una posible contaminación de las materias primas en los procesos de cultivo (utilización de pesticidas o herbicidas) y a los métodos de conservación y almacenamiento).

Tanto en animales de laboratorio convencionales de alta calidad como en SPF (specific pathogenfree: libres de patógenos específicos) no se puede permitir la presencia, en sus dietas, de contaminantes abióticos. Por ejemplo, los residuos de DDT (dentro del intervalo 0-1 mg/kg) influyen en la actividad de ciertas enzimas microsomales hepáticas de la rata, modificando la respuesta del hígado a procesos experimentales. Detectar su presencia/ausencia es particularmente importante en estudios de inducción de inmunotoxicidad, inducción enzimática, y desarrollo y reproducción de toxicidades.

Destacan por su importancia:

Los Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados, Un análisis completo supone la determinación de 13 organoclorados y 14 organofosforados diferentes.

Metales diana son el arsénico, cadmio, mercurio y plomo. Es importante la ausencia de nitratos y nitritos.

Los antibióticos (penicilina G y otros). Se añaden a las materias primas para incrementar su conservación y evitar contaminaciones microbiológicas.

Se ha definido el término genérico de disruptores endocrinos para designar al grupo heterogéneo de contaminantes con actividad hormonal.

Está demostrado que el uso de ingredientes que añaden sabor no incrementa significativamente el consumo de pienso por largos períodos en las especies comúnmente utilizadas en la investigación biomédica. Determinados aditivos aromatizantes, como colorantes, hormonas y promotores del crecimiento, no pueden permitirse para animales de experimentación.

Otros elementos relacionados con la contaminación abiótica, son los estrógenos y las aflatoxinas producidas por hongos y levaduras del tipo B2, G, y G2 (mínimo aceptado < 0.001 mg/kg). Otras micotoxinas producidas por hongos son las acratoxinas, la cerealenona y la esterigmatocistina. Su presencia se determina mediante cromatografía en fase iónica. Al menos se debe determinar la presencia/ausencia de aflatoxinas. Debido a su alta toxicidad, su presencia obligaría a desechar una partida de pienso. <sup>1</sup>

## **1.5.2 Contaminantes bióticos**

### **1.5.2.1 Valores de referencia microbiológicos recomendados**

Las dietas destinadas al consumo del animal de laboratorio, por su propia composición o por contaminación, constituyen de forma directa un medio de transmisión y cultivo de gérmenes específicamente patógenos, o que sin serlo, pueden originar alteraciones metabólicas y/o digestivas, e indirectamente repercutir sobre los bioensayos que se realizan con ellos. Con anterioridad al proceso de formación de pellets, ya sea por presión en seco o mediante vapor de agua, las harinas se someten a un preacondicionamiento con vapor a alta temperatura, que oscila entre los 50-90 °C, reduciendo la carga bacteriana de la mezcla a niveles inferiores al mínimo permitido. La extrusión de pellets con vapor de agua a presión elevada (8-9 bar) puede reducir hasta 2-4 veces el contenido bacteriológico total, pero aumenta la Humedad relativa de los pellets, favoreciendo a largo plazo la formación de hongos.

Existen diferentes patologías en roedores que se pueden asociar a la carga microbiológica de la dieta. Hongos y levaduras producen alteraciones metabólicas y estrogénicas debidas a los metabolitos fúngicos derivados de sus micotoxinas; junto con los agentes no patógenos aerobios (coliformes y enterococos), indican la humedad final del producto obtenido o su conservación en almacenes sin protección, por un período prolongado o en condiciones de temperatura y humedad inadecuadas.

Agentes patógenos de primer orden son *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus* y *Clostridium spp*, dependiendo de sus serotipos. Un elemento importante de contaminación es *Clostridium perfringens*, responsable de toxiinfecciones alimentarias (esporas tipo A) y enteritis necrótica (tipo B), producida por enterotoxinas citoplasmáticas de los gérmenes en fase de esporas, con la circunstancia añadida de que las del tipo A son muy resistentes al calor. La tolerancia máxima se ha establecido en  $10^2$ /g de producto, y su presencia indica fermentaciones anaerobias intensas al almacenar la materia prima en silos de gran tamaño, o mantener posteriormente el pienso en condiciones de humedad.<sup>1</sup>

## VALORES MICROBIOLÓGICOS DE REFERENCIA

VALORES DE REFERENCIA	UFC/g o ml
Bacterias aerobias mesófilas	$< 1 \times 10^6$ UFC/mL
Coliformes	$1 \times 10^2$ UFC/mL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1 g.
<i>Salmonella</i>	Ausencia en 25 g.
<i>Staphylococcus</i> patógenos (DNAasa, coagulasa y termonucleasa)	Máximo 10 UFC/mL
Hongos y levaduras	$< 1 \times 10^2$ UFC/mL
<i>Enterococo</i>	$< 1 \times 10^2$ UFC/mL
<i>Clostridium perfringes</i>	$1 \times 10$ UFC/mL

Ref. Ávila, Carolina, Soler G. Álvaro. Elaboración de concentrados para rata *Proechimys* de la especie *chrysaelus* para su manutención en el laboratorio.

### 1.6 Métodos y protocolos de esterilización de dietas

Un pienso en condiciones normales no suele presentar unidades formadoras de colonias (ufc), de coliformes, *Salmonella* y estafilococos; sin embargo, ninguno se libra de aerobios mesófilos, *Clostridium* y mohos o levaduras. Un pienso con valores superiores debe rechazarse.

La exposición temporal a vapor a presión elevada o a radiaciones gamma son los métodos de esterilización más utilizados. <sup>1</sup>

## G. PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS

### 1.1. Planes de Muestreo para Análisis Microbiológicos en Alimentos

El plan de muestreo es uno de los componentes del criterio microbiológico que comprende:

- El procedimiento de toma de muestra
- El criterio de decisión a aplicar en el lote de alimentos.

Existen dos tipos de planes de muestreo reconocidos internacionalmente:

Plan de dos clases (por ejemplo:  $n=5$ ,  $c=0$  /  $n=5$ ,  $c=2$ ,  $m=$ ) y el de tres clases (por ejemplo:  $n=5$ ,  $c=2$ ,  $m=103$ ,  $M=104$ ) donde:

$n$  = número de muestras examinadas de un lote;

$m$  = límite microbiológico que, en un plan de dos clases, separa la calidad aceptable de la rechazable y en un plan de tres clases separa la calidad aceptable de la marginalmente aceptable.

$M$  = límite microbiológico que en un plan de tres clases separa la calidad marginalmente aceptable de la rechazable

$c$  = número máximo permitido de unidades de muestra defectuosas (plan de dos clases) o marginalmente aceptables (plan de 3 clases).

El plan de dos clases es utilizado generalmente para patógenos, mientras que el plan de tres clases es utilizado frecuentemente para el análisis de indicadores de higiene donde es posible la cuantificación en unidades de masa o de volumen de los microorganismos.<sup>10</sup>

## **1.2. Recuento de Aerobios Mesófilos**

Se utiliza para monitorear la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura. El recuento refleja el contenido microbiano de materiales crudos e ingredientes, la eficiencia del procedimiento de elaboración / proceso, la condición de higiene del equipo y utensilios y la relación tiempo- temperatura de almacenamiento y distribución.

Alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar RAM elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo prolongado. En este caso, el RAM no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo. Por ello es que la utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra.

En el uso o la interpretación del recuento de aerobios mesófilos hay ciertos factores que deben ser tenidos en cuenta:

- Este recuento es sólo de células bacterianas vivas. Los procedimientos que sufre el alimento en su elaboración, por ejemplo proceso térmico, pueden enmascarar productos con altos recuentos o condiciones

deficientes de higiene. Además, el almacenamiento prolongado en congelación o con pH bajo resulta en la disminución del recuento.

- Este recuento no diferencia tipos de bacterias.

### **1.3 Identificación de *Salmonella sp.***

Se trata de una bacteria relativamente resistente sobrevive a temperaturas de 8 a 45 °C en un pH de 4 a 8, con un coeficiente de actividad de agua superior a 0,94, y es resistente a varios factores ambientales.

Contamina piensos que es fuente primaria de infección, aguas superficiales y efluentes, insectos, aves y roedores.

La contaminación secundaria está dada por la producción, el procesamiento y preparación de alimentos pudiendo ser la más importante *Salmonella enteritidis typhimurium* los serotipos más comunes y agresivos.

### **1.4 Recuento de *Staphylococcus aureus***

Se los utiliza como componentes de criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación y para aquellos que son sometidos a manipulación después del proceso térmico. Generalmente, los estafilococos se eliminan durante la cocción sin embargo no destruye la toxina producida por esta bacteria. Altos recuentos en alimentos sometidos a procesos térmicos se deben a contaminación posterior a este tratamiento (manipulación, contacto con equipo o aire contaminado y/o conservación inadecuada del mismo falta de refrigeración).

La presencia de *S. aureus* puede indicar un riesgo potencial para la salud. Un número elevado de estafilococos puede indicar la presencia de toxinas termoestables, no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas.



### **1.5. Recuento de Coliformes**

La presencia de bacterias coliformes en los alimentos no significa necesariamente que hubo una contaminación fecal o que hay patógenos entéricos presentes. Las bacterias coliformes son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación postproceso térmico.

Algunos coliformes (*E. coli*) son comunes en las heces del hombre y otros animales, pero otros (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*) comúnmente se encuentran en el suelo agua y semillas.

Estos organismos se eliminan fácilmente por tratamiento térmico, por lo cual su presencia en alimentos sometidos al calor sugiere una contaminación posterior al tratamiento térmico o que éste ha sido deficiente.

### **1.6 Hongos y micotoxinas**

Los alimentos balanceados al igual que otros alimentos concentrados son susceptibles al desarrollo de hongos y a la producción de micotoxinas. Los hongos y/o las micotoxinas pueden estar presentes en la materia prima pero si durante el almacenaje no se manejan correctamente, el problema se agrava. Cuando en un alimento hay más de 1.000.000 de unidades formadoras de colonias fúngicas por gramo, se produce una disminución de los valores de proteína y almidón lo que se traducirá en un menor poder nutricional. Las aflatoxinas, principalmente B1, no es sensible a los tratamientos térmicos y que es cancerígena.<sup>11</sup>

## **H. PARAMETROS BROMATOLOGICOS**

La muestra extraída para la realización del análisis bromatológico debe ser representativa y ella puede obtenerse como unidades o fracciones. Cuando se trata de un número grande de unidades debe buscarse una muestra representativa de la partida sospechada de infracción y ella se determina obteniendo la raíz cúbica de la cantidad de envases total del lote.

La Dirección Nacional de Medicamentos y Alimentos ofrece el cuadro que a continuación se transcribe y que facilita el trabajo <sup>12</sup>

<b>NÚMERO TOTAL DE ENVASES</b>	<b>NÚMERO DE MUESTRAS A EXTRAER</b>
2 a 3	<b>1</b>
4 a 8	<b>2</b>
9 a 27	<b>3</b>
28 a 64	<b>4</b>
65 a 125	<b>5</b>
126 a 216	<b>6</b>
217 a 343	<b>7</b>
344 a 512	<b>8</b>
513 a 729	<b>9</b>
730 a 1.000	<b>10</b>

Ref.- Alberto. H. Instrucciones generales para la toma de muestras. Thursday  
6 de November de 2003

### **1.1. Determinación de la humedad por método de secado**

La estabilidad de los alimentos balanceados es inversamente proporcional a su contenido en humedad, que ha de mantenerse por debajo del 15 %. El agua se encuentra en los alimentos especialmente en dos formas, como agua enlazada y como agua disponible o libre, la primera incluye moléculas de agua unidas en forma química, o a través de puentes de hidrógeno a grupos iónicos o polares, mientras que el agua libre es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y se puede congelar o perder con facilidad por evaporación o secado. La humedad de un alimento comprende todas las sustancias que se volatilizan por calentamiento y producen pérdida de peso, esta pérdida de peso se determina por medio de una balanza y se interpreta como contenido de humedad.

Los métodos de secado incluyen las mediciones de la pérdida de peso debida a la evaporación de agua a la temperatura de ebullición o cerca de ella. En algunos alimentos (por ejemplo, cereales) solamente una parte del agua que contienen se pierde a esta temperatura. El resto (agua combinada o

adsorbida) es difícil de eliminar y parece estar asociada a las proteínas presentes.

Determinar la humedad de un alimento permite juzgar el estado de conservación de este.

### **1.2. Análisis de proteínas por el Método de kjeldahl**

Este método se basa en la combustión en húmedo de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoniaco, el cual queda en solución en forma de sulfato de amonio. El digerido una vez alcalinizado, se destila directamente o por arrastre con vapor para desprender el amoniaco, el cual es atrapado y luego se titula con álcali para obtener el contenido de nitrógeno orgánico de la muestra.

### **1.3. Determinación de grasa por el método de extracción por solubilización**

El contenido de “grasa”, algunas veces llamado extracto etéreo, grasa neutra o grasa cruda el cual puede ser considerado como formado de constituyentes lípidos “libres” es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares, como fracciones ligeras del petróleo y éter etílico, mientras que los lípidos “enlazados” requieren disolventes más polares para su extracción.

Los lípidos asociados pueden ser liberados si la muestra del alimento se disuelve completamente antes de hacer la extracción con disolventes polares. La disolución del alimento se puede lograr por hidrólisis ácida o alcalina. Las proteínas se disuelven en el ácido y la grasa que se separa puede ser extraída por agitación, cuando menos tres veces, con éter dietílico o con una mezcla de éter dietílico y petróleo ligero. El éter dietílico tiende a coextraer algún material no-lípido, por lo que los lípidos extraídos y pesados en el extracto seco necesitan ser eliminados cuidadosamente con éter de petróleo y el residuo no-lípido se vuelve a secar y pesarse para dar por diferencia, el contenido de grasa total en la muestra. La hidrólisis ácida tiende a descomponer los

fosfolípidos, por lo cual la correlación con la extracción con cloroformo/metanol puede ser pobre en algunos alimentos.

#### **1.4. Análisis de fibra**

"Fibra cruda" es el residuo orgánico combustible e insoluble que queda después de que la muestra se ha tratado en condiciones determinadas tales como tratamientos sucesivos con petróleo ligero, ácido sulfúrico diluido hirviente, hidróxido de sodio diluido hirviente, ácido clorhídrico diluido, alcohol y éter. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda que consiste principalmente del contenido en celulosa además de la lignina y hemicelulosas contenidas en la muestra.

La fibra también le da las propiedades físicas a los alimentos, y generalmente baja la densidad calórica de los alimentos.

#### **1.5. Determinación de carbohidratos.**

El método de Fehling es el método que se ha utilizado para el procesamiento de las muestras cuyo fundamento es la hidrólisis ácida de la muestra, seguida de una alcalinización y posterior titulación del hidrolizado.

#### **1.6. Análisis de cenizas**

Se denomina así a la materia inorgánica que forma parte constituyente de los alimentos como las sales minerales. Las cenizas permanecen como residuo luego de la calcinación de la materia orgánica del alimento, el valor de cenizas se puede considerar como una medida general de calidad o grado, y a menudo es un criterio útil en la identificación de la autenticidad de un alimento. La calcinación debe efectuarse a una temperatura adecuada, que sea lo suficientemente alta como para que la materia orgánica se destruya totalmente, pero tenemos que observar que la temperatura no sea excesiva para evitar que los compuestos inorgánicos sufran alteración (fusión, descomposición, volatilización o cambio de estructura).

#### **1.7. Determinación de la acidez**

Durante el almacenamiento y el deterioro de los alimentos, ocurren cambios por acción enzimática y desarrollo de bacterias, que dependen de manera importante de la concentración del ión hidrógeno, más que de la acidez

titulable presente. La estabilidad de las proteínas también depende de la actividad del ión hidrógeno, por lo que la medición del pH es importante para conocer la eficacia de los conservadores y vigilar las operaciones de fabricación del alimento.

La mayoría de los microorganismos crecen a pH entre 5 y 8, en general de hongos y las levaduras son capaces de crecer a pH más bajos que las bacterias. La acidez se mide por titulación con un álcali hasta un punto final que depende del indicador seleccionado, y el resultado se expresa en términos de un ácido dado<sup>13</sup>.

## **VII. DISEÑO METODOLOGICO**

### **A. Tipo de investigación**

El método utilizado para el desarrollo de este estudio fue de tipo observacional prospectivo, de muestreo aleatorio, en el que se determinó las características microbiológicas, fisicoquímicas y nutricionales de 15 muestras de alimento balanceado para animales de laboratorio (ratas y ratones).

El presente estudio se desarrolló en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Bromatología del Instituto de Servicios de Laboratorio e Investigación en Salud, SELADIS, de la ciudad de La Paz.

### **B. Muestreo**

Se analizó un total de 15 muestras de 500 g cada una, número obtenido calculando la raíz cúbica del total de envases de cada lote<sup>12</sup> (Anexo 1) de alimento balanceado para animales de laboratorio (ratas y ratones), producidos y comercializados en nuestro medio, tomadas al azar a partir de lotes en uso de 4 laboratorios de investigación de la ciudad de La Paz que cuentan con bioterios de producción y experimentación con animales. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud - INLASA, Instituto de Servicios de Laboratorio e Investigación en Salud- SELADIS, Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Biología De

la Altura –IBBA, ubicados en el Complejo Hospitalario de la zona de Miraflores en la ciudad de La Paz.

### C. Estrategia de ejecución

Las 15 muestras fueron recolectadas e identificadas bajo un formulario de toma de muestra, anotando las características de cada una. (Anexo 2).

Todas las muestras fueron procesadas según normas técnicas bolivianas y de otros países para análisis microbiológico y bromatológico de alimentos con estas características.

Norma Técnica	Parámetro Microbiológico
NB 32003 – 05	Recuento de Aerobios Mesófilos
NB 32005 – 02	Recuento de Coliformes Totales
NB 32004 – 02	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>
NB 32006 – 03	Recuento de Mohos y levaduras
NB 32007 – 03	Investigación de <i>Salmonella</i>

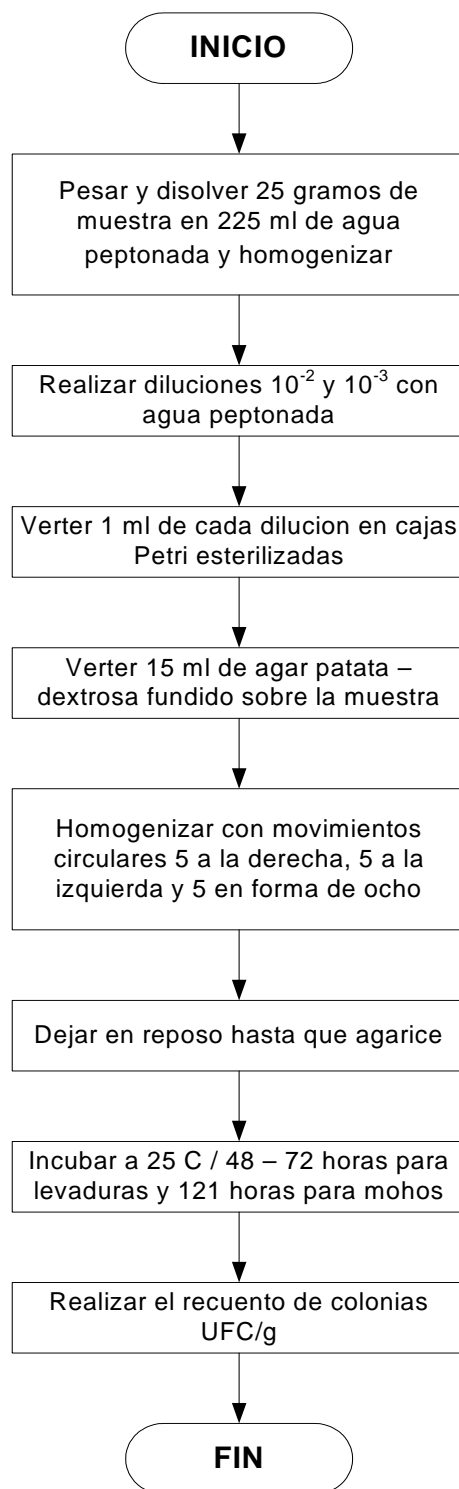
Norma Técnica	Parámetro fisicoquímico
NB – 074 – 74	Humedad
Norma Técnica Chilena	Acidez

Norma Técnica	Parámetro Nutricional
NB-104-75	Fibra cruda
NB 466-81	Proteínas
NB 075-74	Cenizas
NB – 103 – 75	Grasas

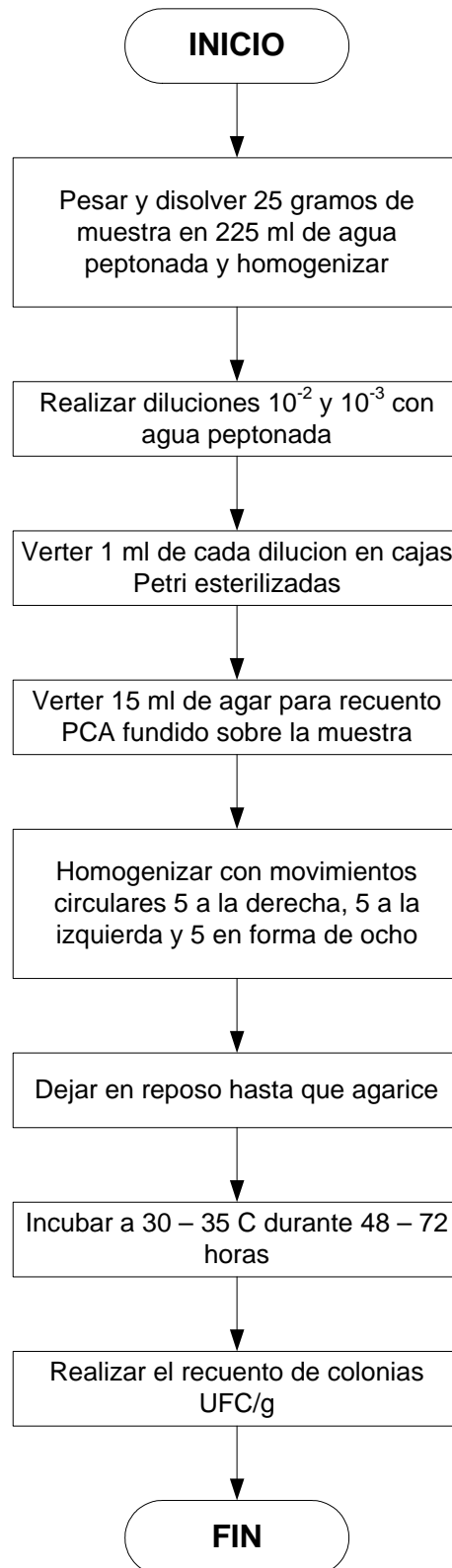
## D. Material y métodos

### 1.1 Procedimientos Microbiológicos

#### 1.1.1 RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

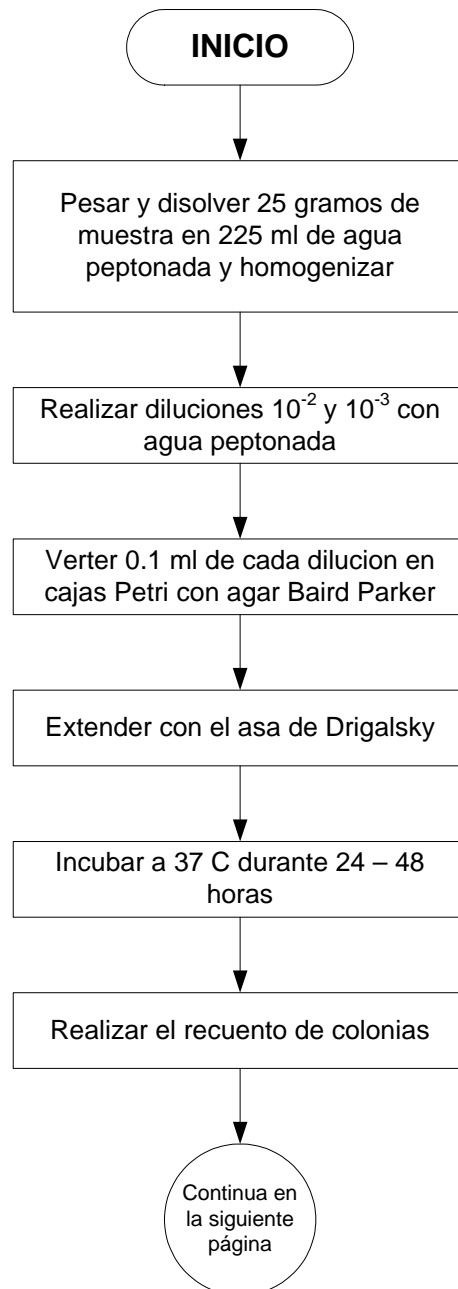


### 1.1.2 RECUENTO DE BACTERIAS AEROBIAS MESÓFILAS

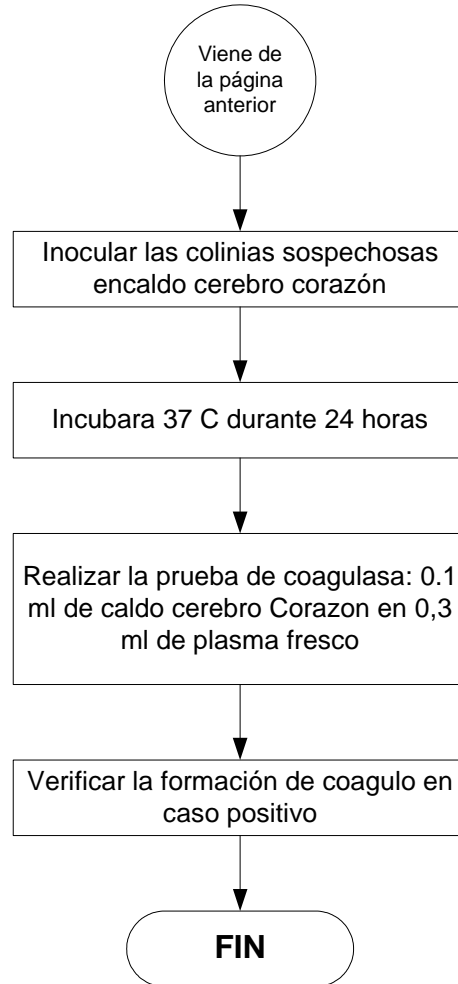




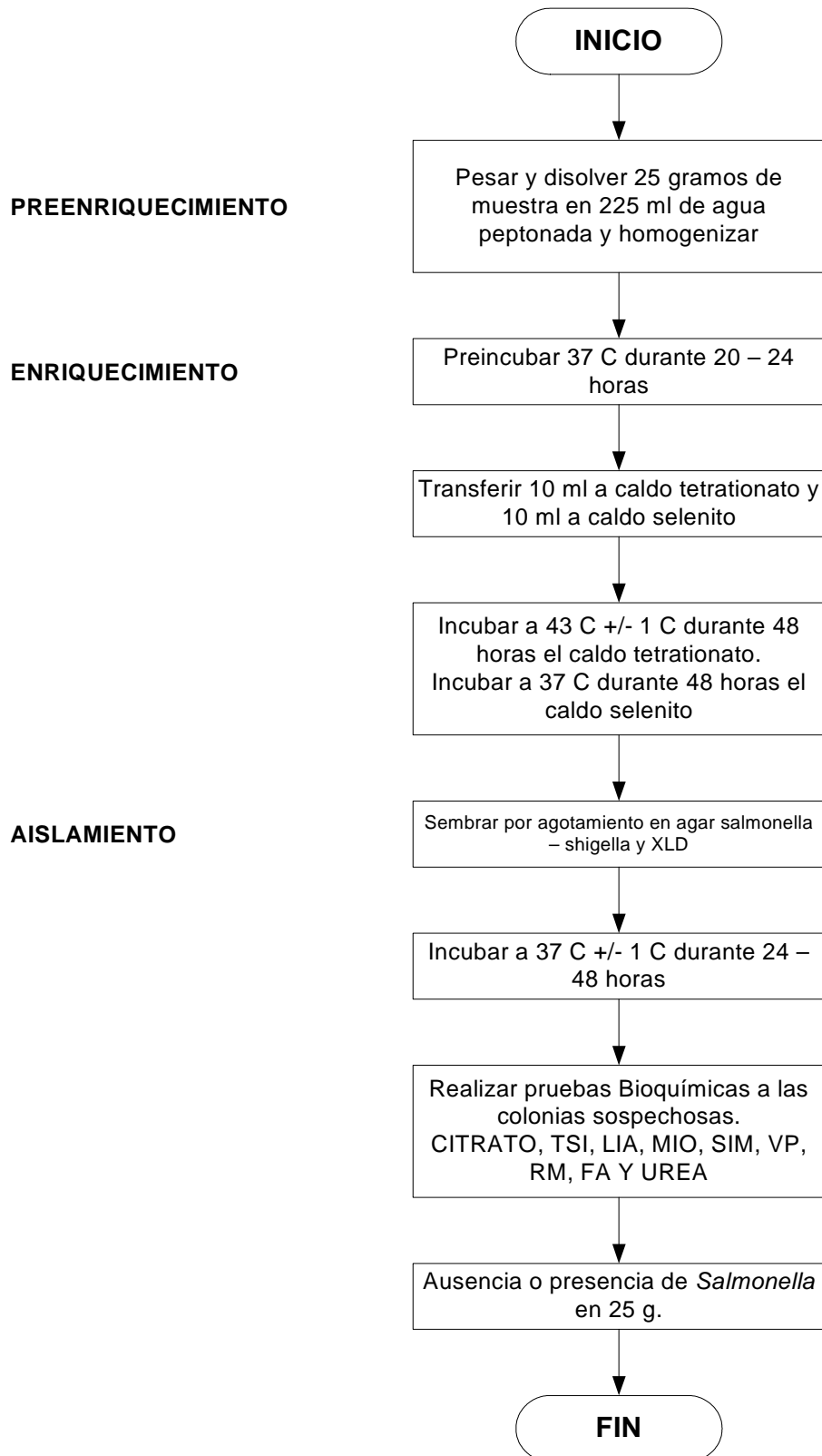
### 1.1.3 RECUENTO DE *Staphylococcus aureus*



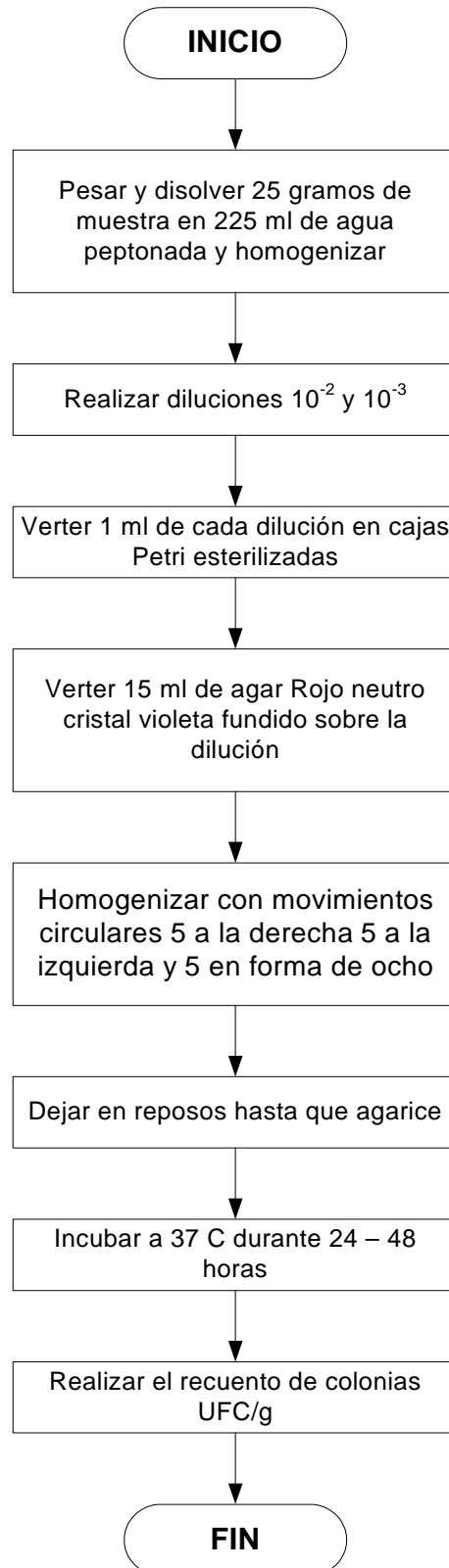
## PRUEBA CONFIRMATORIA



### 1.1.4 DETECCION DE Salmonella



### 1.1.5 RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES EN PLACA



## 1.2 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

### 1.2.1 DETERMINACIÓN DE PROTEINAS. MÉTODO DE KJELDAHL

Pesar 0,5 g de muestra pulverizada en un balón Kjeldahl.

Añadir 0,5 g de Sulfato de cobre, 10 g de Sulfato de sodio anhidro y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Calentar con llama fuerte, hasta observar una coloración azul-verdosa, dejar 40 minutos más para terminar la mineralización de la muestra.

Dejar enfriar, añadir 150 ml de agua destilada para disolver el residuo.

En un matríz Erlenmeyer se vertió 30 ml de HCl 0,1N, 25 ml de agua y el indicador naranja de metilo.

Conectar el refrigerante de reflujo.

Trasvasar a un balón de fondo redondo, añadiendo perlas de porcelana y 100 ml de NaOH 30 %.

El destilado se recibió en 2/3 partes de un matríz.

Titular el destilado con una solución de NaOH 0,1 N hasta el primer cambio de color.

#### **Cálculos:**

$$P\% = (V \text{ HCl} \times Fc - V \text{ NaOH} \times Fc) \times 14 \times 6,25 \times 100/1000 \times CM$$

### 1.2.2 DETERMINACIÓN DE GRASA. EXTRACCION POR SOLUBILIZACION

Pesar 2 g de muestra en un vaso de precipitado.

Disolver en 25 ml de agua destilada y 10 ml de Ácido sulfúrico al 50%.

Calentar hasta cambio de color.

Pasar a un embudo de separación con éter de petróleo y éter etílico en proporción 1:1.

Agitar constantemente, hasta recibir el primer extracto en un vaso de precipitación previamente tarado, dejar evaporar y secar, luego se pesó el vaso y el contenido.

Repetir la pesada hasta obtener un peso constante.

#### **Cálculos:**

$$C\% = (\text{Peso del vaso con grasa} - \text{Peso del vaso solo}) \times 100/ CM$$

### **1.2.3 DETERMINACION DE FIBRA. HIDRÓLISIS ACIDA Y ALCALINA**

Pesar aproximadamente 3 g de muestra.

Realizar una primera hidrólisis con solución de ácido sulfúrico al 5%, luego desconectar del refrigerante y neutralizar.

Realizar la hidrólisis básica, con solución de hidróxido de sodio al 5%, desconectar del refrigerante y neutralizar mediante lavados repetidos con agua destilada.

Pesar el papel filtro donde se vació el residuo neutralizado.

Sobre el papel filtro añadir alcohol comercial y éter etílico.

Dejar secar a 100 °C en la estufa y luego se pesó.

#### **Cálculos:**

$$F\% = (\text{Peso del papel filtro} + \text{residuo}) - (\text{Peso del papel filtro solo}) \times 100/\text{CM}$$

### **1.2.4 DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS. METODO DE FEHLING**

Pesar 10 g de muestra en un matríz Erlenmeyer

Añadir 100 a 150 ml de agua destilada y 10 ml de HCl concentrado, llevar a hidrolizar durante dos horas.

Retirar del hidrolizador, dejar enfriar y alcalinizar con Na OH al 40 % hasta obtener una reacción francamente alcalina comprobando con papel tornasol.

Trasvasar a una probeta, enjuagando el matraz erlenmeyer con un volumen de agua destilada que se incorpora a la probeta. A ese volumen se denomina volumen llevado, que se debe registrar para realizar el cálculo final.

Mezclar bien y filtrar.

El filtrado verter en una bureta de 50 mL.

Por otra parte medir un volumen de 5 ml de reactivo de Fehling A y 5 ml de Fehling B en un matraz Erlenmeyer.

En el momento en que empiece a hervir el reactivo de Fehling, comenzar con el goteo del filtrado.

Si cambia de color el reactivo o se pone más intenso añadir 2 a 3 gotas de azul de metileno y continuar titulando hasta que aparezca la coloración rojo-ladrillo.

**Cálculos:**

$C\% = \text{Factor Fehling} \times \text{Volumen llevado} \times 100 / \text{CM} \times Vg.$

**1.2.5 DETERMINACIÓN DE CENIZAS. CALCINACIÓN ORGÁNICA**

Pesar una cápsula de porcelana, a continuación sobre la misma pesar aproximadamente 3 a 5 g. muestra.

Llevar al baño de arena para eliminar todas las sustancias volátiles que se manifiesta por el desprendimiento de humos blancos y negros.

Llevar a la mufla a temperatura de 500 a 600 °C, durante 2 a 3 horas hasta obtener ceniza blanca o negra.

Dejar enfriando la cápsula dentro de la mufla.

Después de 24 horas retirar con ayuda de una pinza y se dejar en el desecador hasta enfriar completamente.

**Cálculos:**

$C \% = (\text{Peso de la cápsula} + \text{cenizas}) - \text{Cápsula sola} \times 100/\text{CM}$

**1.2.6. DETERMINACION DE LA HUMEDAD. METODO POR SECADO**

Pesar el cristalizador de vidrio que contiene arena. Utilizar arena lavada y calcinada por que da una superficie regular de mayor extensión y favorece el desprendimiento de agua.

Con una espátula añadir aproximadamente 5 a 10 g de la muestra y se pesar nuevamente.

Calcular la diferencia:

$(\text{Peso del cristalizador} + \text{arena}) - (\text{Peso del cristalizador} + \text{arena} + \text{muestra})$

Obtener la cantidad de la muestra.

Llevar a la estufa a temperatura de 100 a 150 °C durante una hora. En este proceso la temperatura y tiempo es importante para un buen resultado.

Retirar de la estufa y llevar al desecador, pesar: obteniendo la pesada 1.

Nuevamente llevar a la estufa a 100 a 150 °C durante 30 minutos.

Retirar de ésta y llevar al desecador para enfriar, pesar nuevamente: obteniendo la pesada 2.

Repetir esta operación, hasta obtener un peso constante, esto significa que en dos pesadas sucesivas haya una diferencia de solo 0,05 g (5 mg).

**Cálculos:**

Pt: Peso total = que es el peso del cristalizador con arena y muestra.

Pc ó final: Peso final o constante.

C:  $(Pt - Pc \text{ o final}) \times 100 / CM$

**1.2.7 DETERMINACION DE LA ACIDEZ. METODO DE TITULACIÓN**

Pesar 5 g. de muestra en un vidrio de reloj.

Depositar en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de agua destilada, agitar para obtener una buena mezcla de la muestra.

Añadir dos gotas de la solución de Fenolftaleina, agitando nuevamente.

Por otro lado llenar una bureta con solución de NaOH 0,1 N.

Titular la solución con la muestra, hasta virar de color “de incoloro a rosado tenue o leve que debe persistir por dos minutos.

Anotar el volumen gastado para realizar los cálculos.

**Cálculos:**

$A\% = Vg \times Cb \times Fa \times 100 / CM$

**Donde:**

Vg: volumen gastado de NaOH en la titulación de la muestra.

Cb : Concentración de la solución de NaOH en mol/litro por su factor de corrección.

CM: Peso de la muestra en gramos.

Fa: factor de acidez calculado en función al factor del ácido presente en la muestra.

Para cereales el ácido láctico: 0,009.

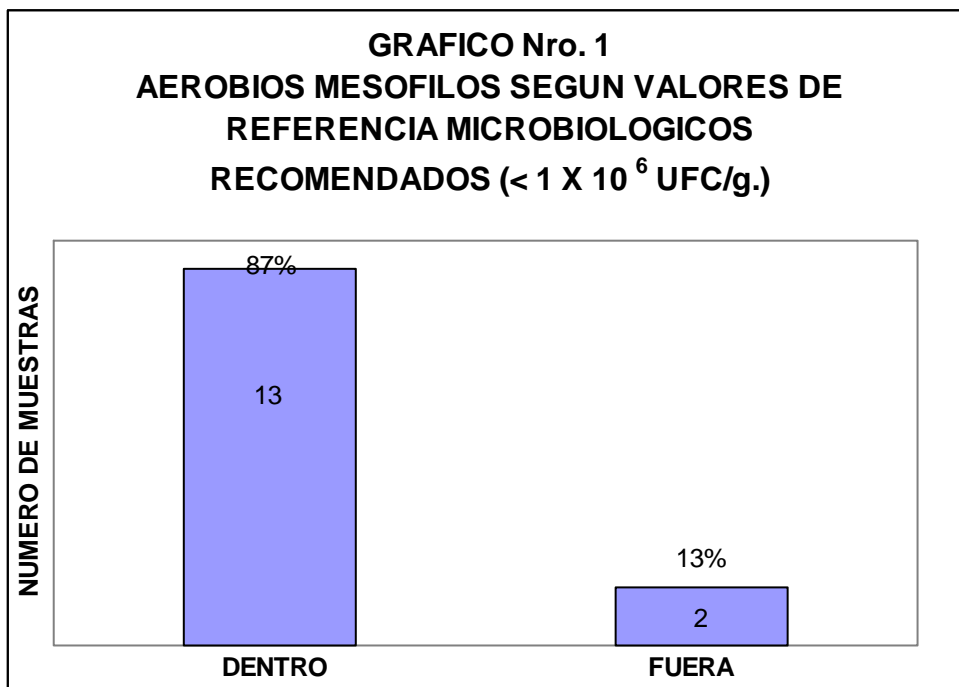
La diferencia mínima permisible entre determinaciones por duplicado no debe ser mayor a 1 % en caso contrario se recomienda repetir la determinación.

**1.2.8 DETERMINACION DEL VALOR ENERGETICO**

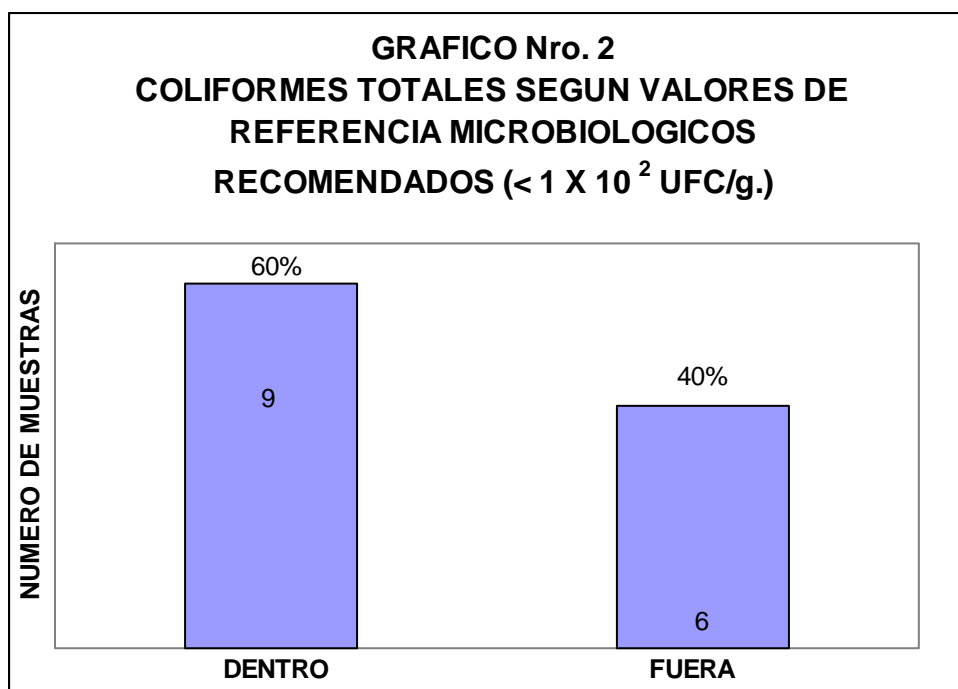
Este parámetro nutricional se obtiene por cálculo matemático.<sup>14</sup>



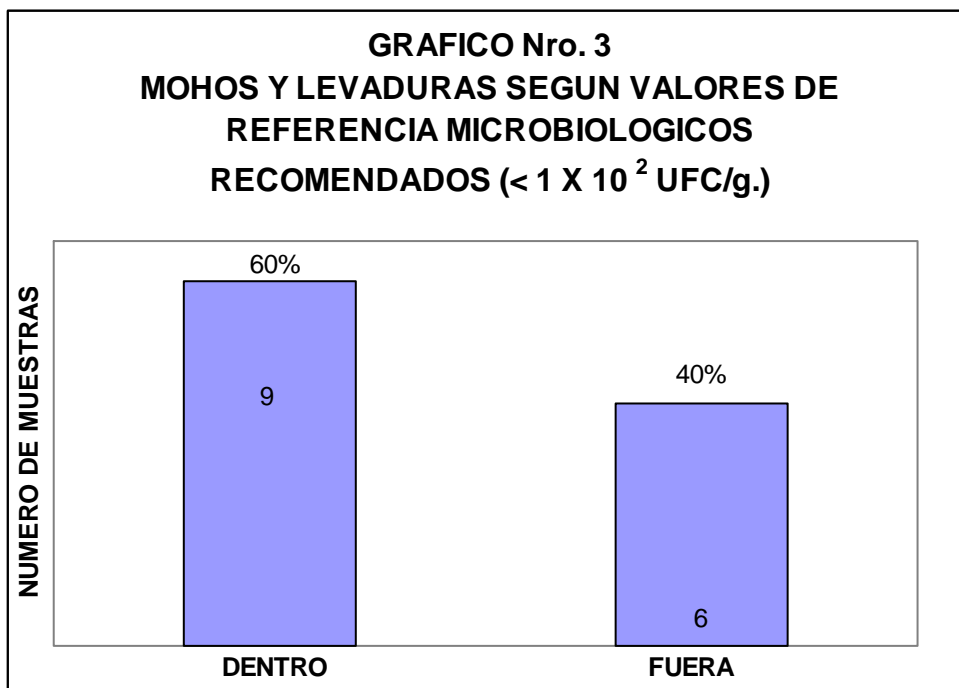
## VIII. RESULTADOS



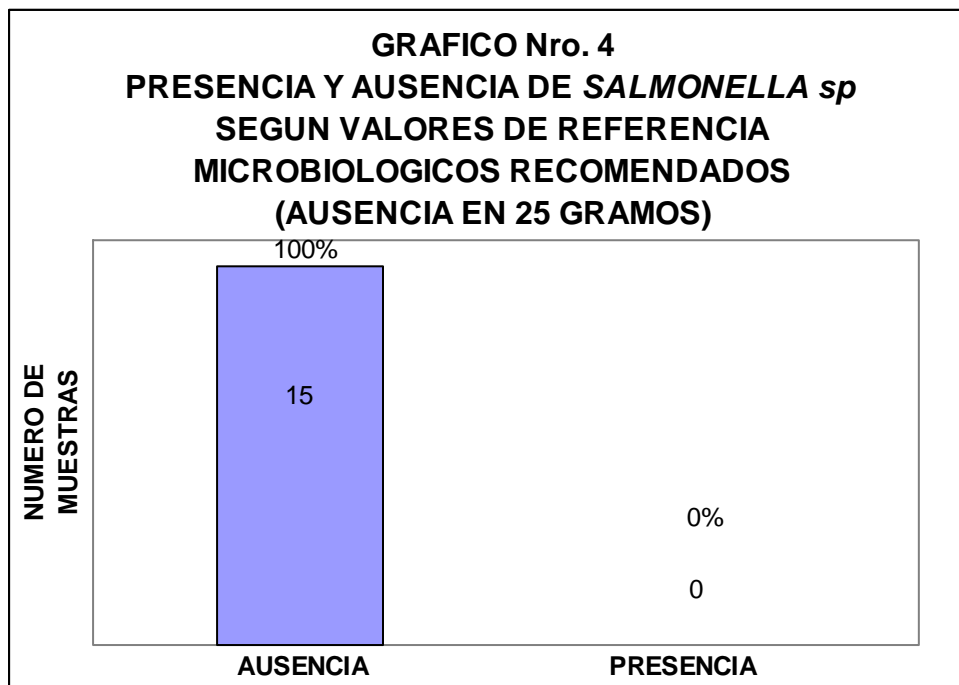
Se encontraron 2 muestras con recuentos altos de bacterias aerobias mesófilas.



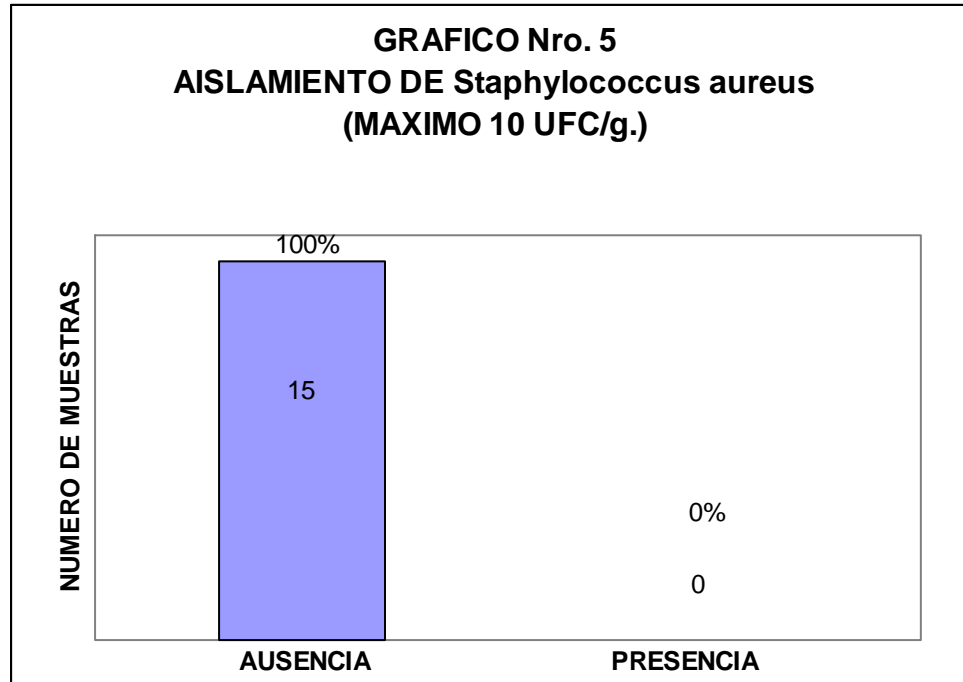
Se encontraron 6 muestras con recuentos altos de coliformes totales.



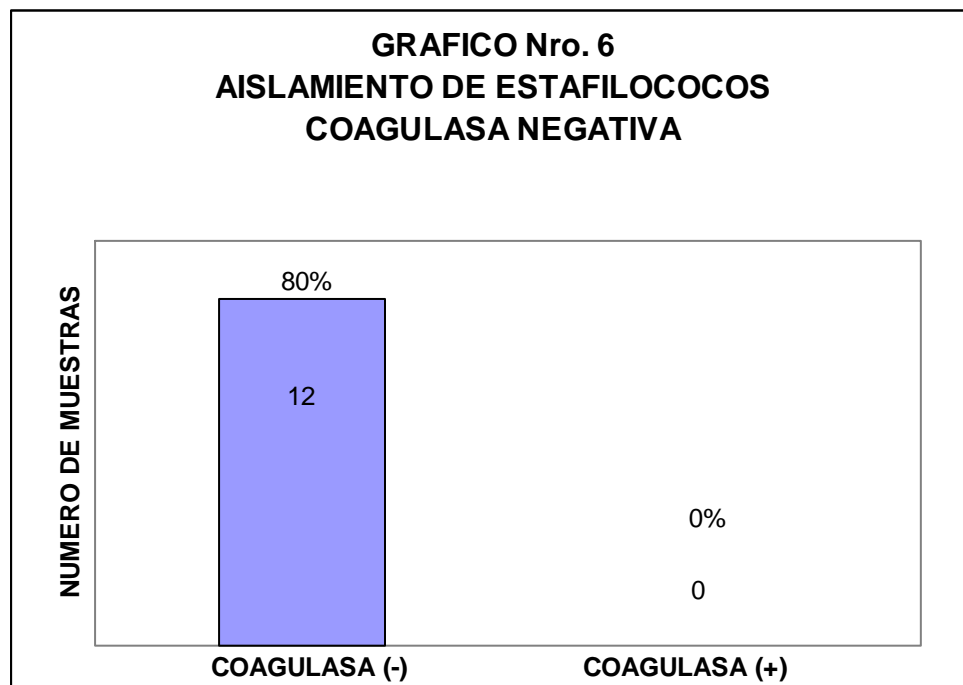
Se encontraron 6 muestras con recuentos altos de mohos y levaduras.



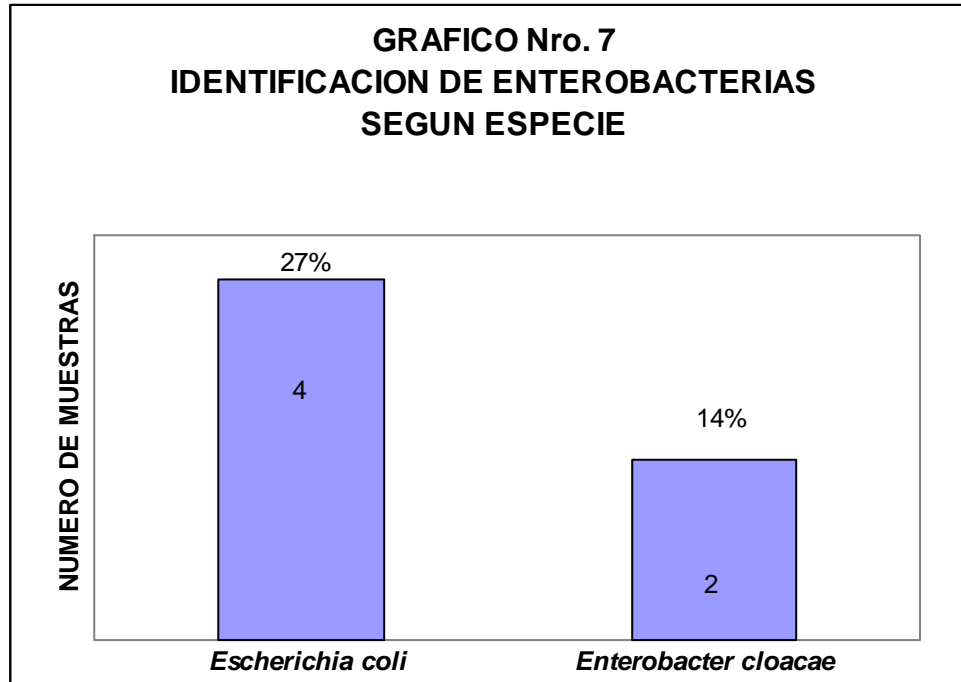
En el total de muestras se observó ausencia de *Salmonella* sp.



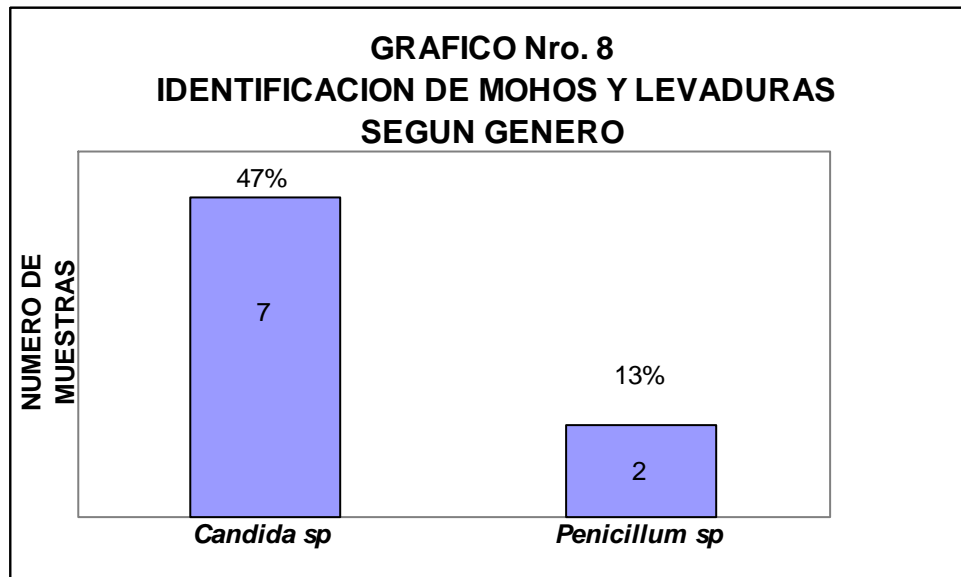
En el total de muestras se observó ausencia de *Staphylococcus aureus*.



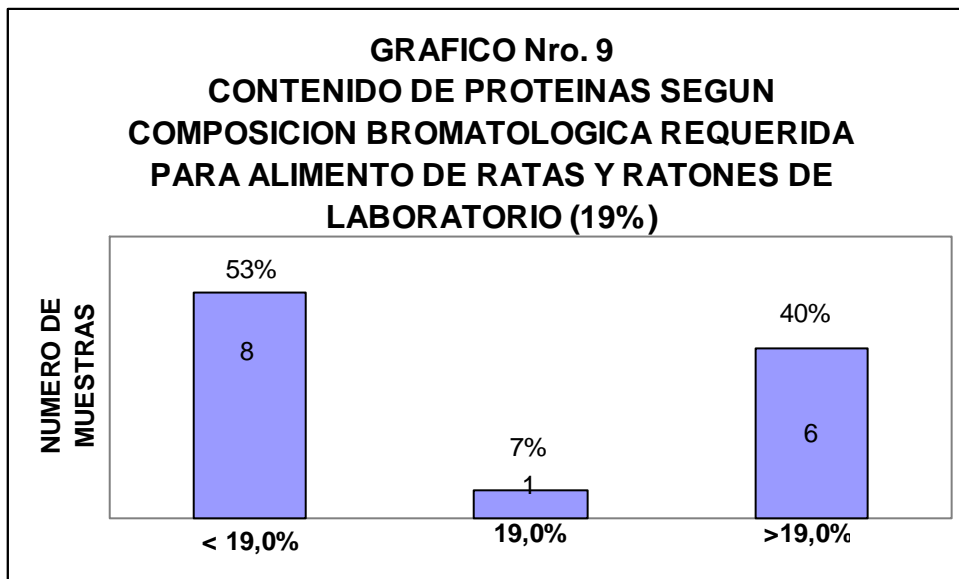
En 12 muestras se identificó estafilococos coagulasa negativa.



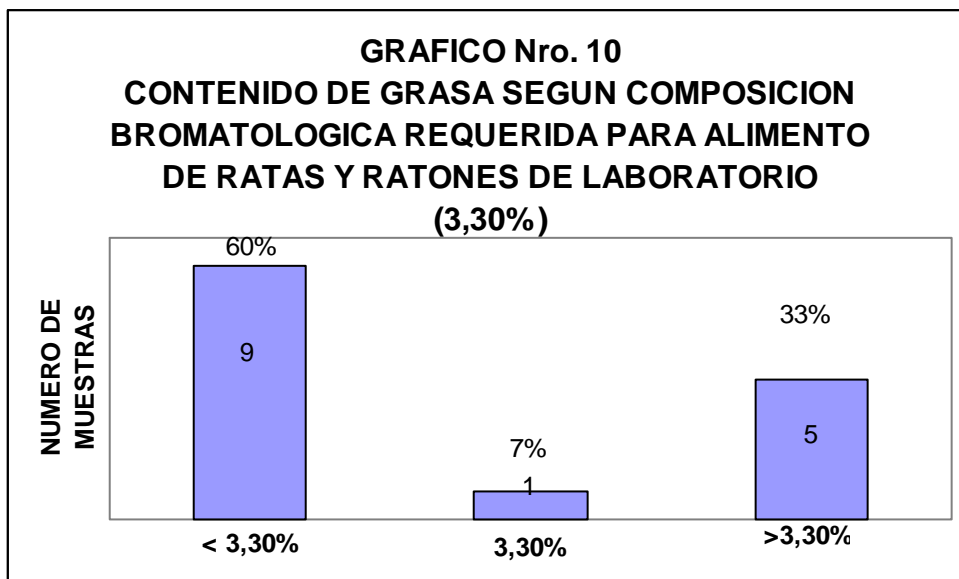
Cuatro muestras presentaron desarrollo de *E. coli*, y dos *E. cloacae*.



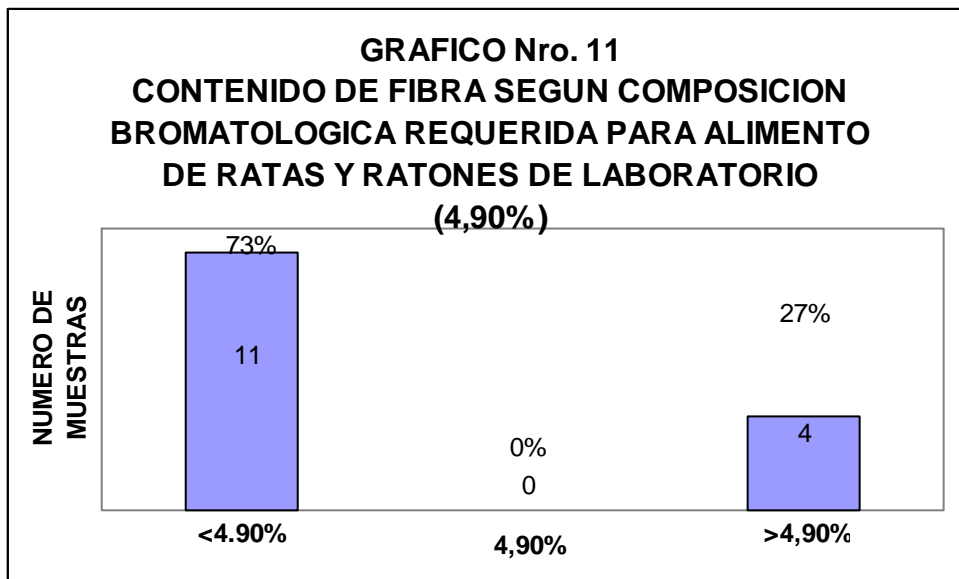
En 2 muestras se identificó *Penicillium sp.* y en 7 muestras con desarrollo de levaduras se identificó *Candida sp.*



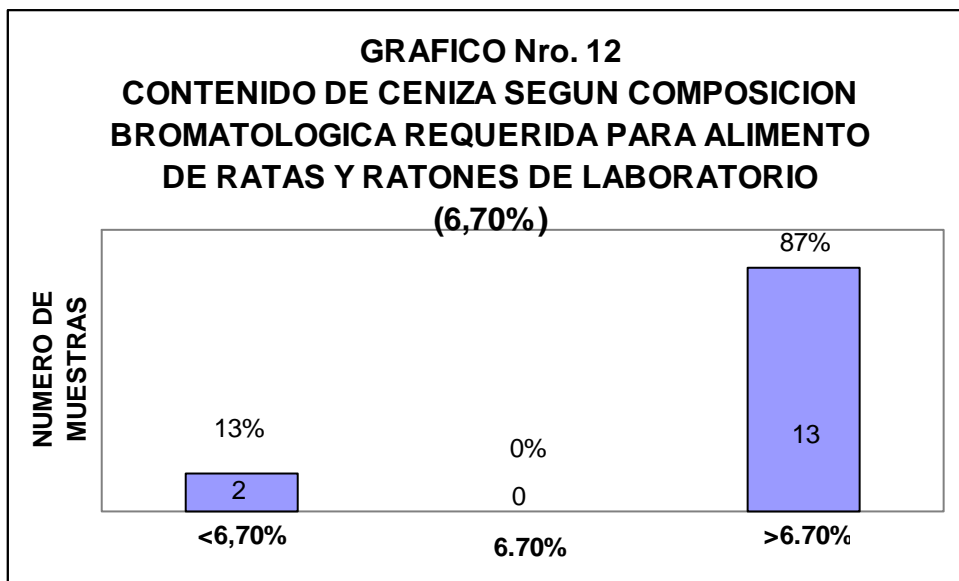
Solo 1 muestra cumple con el requerimiento bromatológico de proteínas para alimento de roedores (ratas y ratones). 8 muestras presentaron contenidos menores al requerimiento.



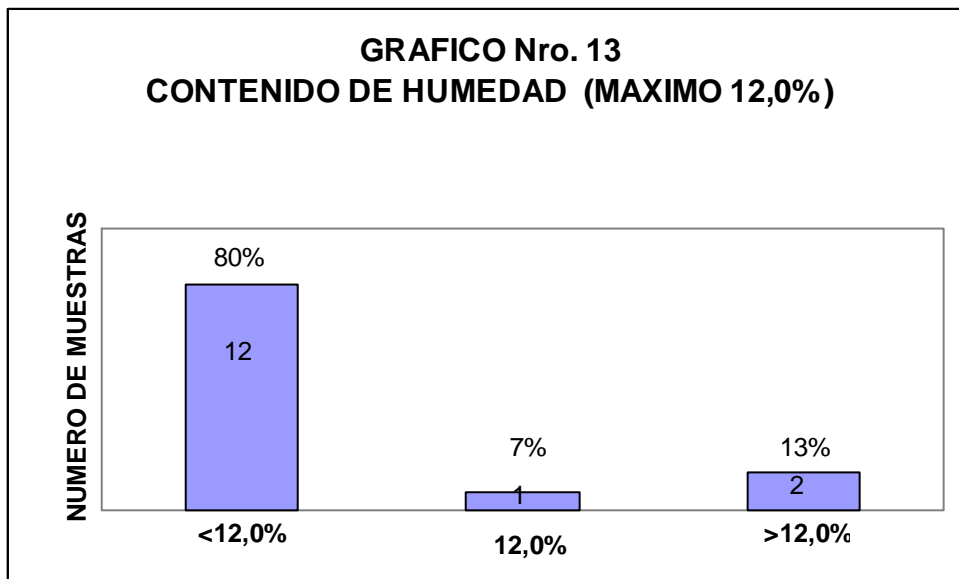
Solo 1 muestra cumple con el requerimiento bromatológico de grasa para alimento de roedores (ratas y ratones). 9 muestras presentaron contenidos menores al requerimiento bromatológico.



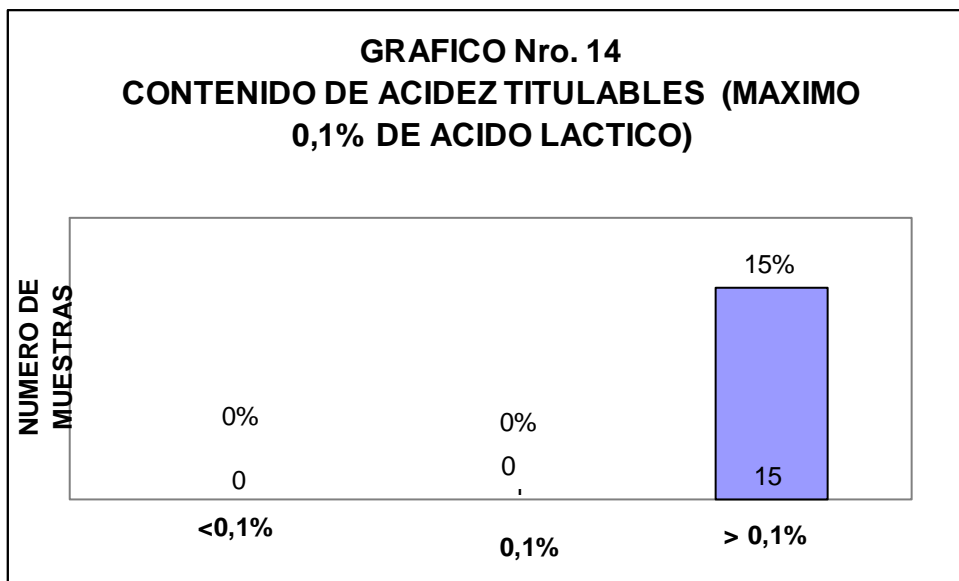
Ninguna muestra cumple con el requerimiento bromatológico de fibra para alimento de roedores (ratas y ratones). 11 muestras presentaron contenidos menores al requerimiento bromatológico.



Ninguna muestra cumple con el requerimiento bromatológico de ceniza para alimento de roedores (ratas y ratones). 13 muestras presentaron contenidos mayores al requerimiento bromatológico.



En 12 muestras el contenido de humedad se encontró dentro del valor máximo para alimentos de estas características fisicoquímicas. Una muestra se encontró en el límite aceptable.



Todas las muestras presentaron características ácidas, con respecto al valor máximo de 0,1 % de ácido láctico.

**TABLA VALOR ENERGÉTICO**  
**SEGÚN VALORES DE REFERENCIA 3.6 – 3.8 kcal/kg**

Nro. de muestra	Valor energético kcal/kg
1	2,2606
2	1,8808
3	2,4538
4	2,3057
5	1,8767
6	2,1004
7	1,9732
8	2,7661
9	2,776
10	2,6324
11	2,0924
12	2,1342
13	2,5353
14	2,1999
15	1,9513

## IX. DISCUSION

En el presente trabajo las muestras analizadas presentaron características microbiológicas aceptables, pero se pudo evidenciar que las características nutricionales y fisicoquímicas en la mayoría de las muestras analizadas no cumplen los requerimientos.

Por lo tanto estos productos son susceptibles de contaminación ya sea por bacterias y hongos, que afectarán por consiguiente las características fisicoquímicas y nutricionales, o por una mala calibración de los componentes durante su elaboración.

Existe una directa relación entre el tiempo de almacenamiento y la mala rotación de los envases de alimento balanceado y el incremento en los niveles de contaminación por microorganismos, además de las pérdidas de nutrientes ya sea por la degradación causada por bacterias y hongos o por procesos de oxidación, lo cual



reduce significativamente el aporte nutricional e higiénico de estos alimentos a los animales de laboratorio.

La mayoría de las muestras analizadas en este trabajo tenían más de 6 meses de almacenamiento y según La Dirección General de Servicios Agrícolas (ONPF - Uruguay) y división de protección de alimentos, establece los siguientes plazos de validez recomendados (máximos) para alimentos balanceados.<sup>3</sup>

- Alimentos balanceados y raciones suplementarias pelleteadas: 6 meses

Ninguna de las muestras fueron esterilizadas antes de ser administradas a los animales de laboratorio, según un estudio realizado para determinar el procesamiento y presentación de las dietas para animales de laboratorio (ratas del género *Proechimys*)<sup>1</sup>, se demuestra la efectividad de la esterilización del alimento balanceado a 110 °C y 15 minutos observándose ausencia de microorganismos tales como Aerobios mesófilos, coliformes, *Salmonella*, *Clostridium*, estafilococos, mohos y levaduras.

En este estudio las muestras procesadas presentaron ausencia de *Salmonella* y estafilococos coagulasa positiva, pero presentaron desarrollo de bacterias aerobias mesófilas, mohos y levaduras, debido a que no se esterilizaron.

Según un estudio realizado en alimento balanceado para rumiantes elaborado con pollinaza (excretas de aves de corral) se determinó el comportamiento de la contaminación microbiológica<sup>4</sup>, encontrando casi en un 900% para el caso de los coliformes fecales encontrados en el día 28 de muestreo en comparación con la cantidad encontrada en el día cero. En ninguna muestra analizada en este trabajo se encontró *Salmonella* ni *Shigella*. Probablemente debido a que estas bacterias son lábiles a cambios de temperatura.

En este trabajo no se realizó los análisis correspondientes a *Escherichia coli* y enterococos, porque se considera que al investigar los coliformes

(enterobacteriáceas lactosa +) y *Salmonella* (enterobacteriáceas Lactosa -) se cubre suficientemente la detección de bacterias fecales.

El análisis bromatológico demostró la falta de homogeneidad de las muestras de un mismo lote, respecto al contenido de los nutrientes analizados, lo cual determinaría una disminución en el valor nutritivo de este, estas muestras pudieron haber perdido su contenido de nutrientes original al ser sometidas a procesos de cocción o por acción de los microorganismos presentes.

En un estudio realizado en Lima Perú <sup>5</sup> cuyo objetivo fue evaluar a través de pruebas biológicas en ratas de laboratorio el valor nutricional de los insumos proteicos utilizados en los alimentos comerciales para perros se determinó que la harina de carne es el insumo proteico de menor calidad. Concluyeron que para evaluar la calidad de los insumos proteicos no es suficiente determinar su contenido proteico y digestibilidad, sino que además se requiere realizar las evaluaciones biológicas. Las muestras analizadas en este estudio contienen harina de carne por lo cual también debería evaluarse el aporte proteico de este componente.

Con relación al contenido de carbohidratos no existe requisito específico ya que está en función del aporte de energía que se desee proporcionar según la especie y experimento en cuestión.

Otro estudio realizado en la Universidad de Tolima – Mexico <sup>1</sup>, indica que para la verificación de la homogeneidad de la mezcla se utilizan como elemento diana los cloruros analizados mediante la técnica NIR (espectroscopia de reflectancia en infrarrojo cercano).

Las características ácidas de las muestras procesadas, se debería a la acción de las bacterias, mohos y levaduras sobre los componentes nutricionales, cuyo resultado es la producción de ácidos a partir de la degradación de dichos componentes. Puesto que la acidificación del interior celular conduce a la pérdida del transporte de nutrientes, los microorganismos no pueden generar más energía de mantenimiento y, a una velocidad variable según las especies, se produce la muerte celular, esto se ha

observado en las muestras cuyo pH se encontró ácido y además pudo influir en el desarrollo de las bacterias en los medios de cultivo.

El valor energético recomendado<sup>1</sup> para ratas y ratones es de 3,6 a 3,8 kcal/g, en las muestras analizadas se encuentran por debajo del valor recomendado, esto se debería a deficiencias en el control de la cantidad de energía que aporta cada nutriente.

El alto porcentaje de ceniza encontrado en las muestras procesadas refleja su contenido de minerales, lo que indica su alta composición inorgánica.

Es importante que el control se realice desde la selección adecuada de las materias primas, formulación adecuada de las dietas para animales de laboratorio según requerimiento específicos de especie y procesos de experimentación a los que sean sometidos, rotación adecuada del alimento de modo que se reduzca el tiempo de almacenamiento, control microbiológico, fisicoquímico y nutricional en la fábrica y por parte del consumidor que garantice la calidad cualitativa y cuantitativa del producto terminado.

## **X. CONCLUSIONES**

- La mayoría de las muestras analizadas presentaron características microbiológicas dentro de los valores de referencia recomendados para este tipo de productos.
- La mayoría de las muestras analizadas presentaron características bromatológicas que no cumplen los requerimientos establecidos para animales de laboratorio (ratas y ratones):
- Se encontró dos muestras (13 %) con recuentos de bacterias aerobias mesófilas por encima de los valores de referencia microbiológicos recomendados  $<1 \times 10^6$  UFC/g para este tipo de alimentos.
- En 6 muestras (40%) se encontró recuentos de coliformes totales fuera de los valores de referencia microbiológicos recomendados mayores a  $1 \times 10^2$

UFC/ g. Mediante pruebas bioquímicas se identificó *Escherichia coli* en 4 muestras (27%) y *Enterobacter cloacae* en 2 muestras (14%).

- En el recuento de mohos y levaduras se encontraron 6 muestras (40%) fuera de valores de referencia microbiológicos recomendados de  $< 1 \times 10^2$  UFC/mL,. Se identificó *Penicillium sp.* en 2 muestras (13%) y *Candida sp.* en 7 muestras (47%).
- Ninguna de las muestras procesadas presentó desarrollo de *Salmonella sp.*
- No se presentó desarrollo de *Staphylococcus aureus* en ninguna de las 15 muestras procesadas. Sin embargo 12 muestras (80%) presentaron desarrollo de *Staphylococcus coagulasa negativa*.
- Con respecto a las características nutricionales de las muestras procesadas, 8 (53%) presentaron un contenido de proteínas menor al requerimiento bromatológico requerido para alimento de roedores de laboratorio (ratas y ratones) (19,0%) ,1 muestra (7%) cumple con el requerimiento de proteínas y 6 (40%) muestras presentaron contenido de proteínas mayores al requerimiento nutricional.
- El contenido de grasa se encontró por debajo del requerimiento bromatológico en 9 muestras (60%) procesadas, 1 muestra (7%) cumple con el contenido requerido (3,30 %) y 5 muestras (33%) presentaron contenido de grasa mayor al requerimiento.
- Se encontró 11 muestras (73%) con contenido de fibra por debajo del requerimiento bromatológico requerido para alimento de roedores de laboratorio (4,90%), 4 muestras (27%) presentaron contenidos de fibra mayores al requerimiento y ninguna muestra cumple con el contenido de fibra requerido.
- Ninguna muestra (0%) cumple con el requerimiento de contenido de cenizas (6,70 %), 13 muestras (87%) presentaron contenido mayor y 2 muestras (13%) contenido menor al requerido.
- El porcentaje de humedad máximo es de 12 % para este tipo de alimentos, se encontró 2 muestras (13%) con contenidos de humedad mayores a

este valor, 12 muestras (80%) presentaron contenidos de humedad menores al valor máximo y solo 1 muestra (7%) se encontró con contenido de humedad en el límite máximo aceptable.

- Los valores de acidez se encontraron por encima del valor máximo permisible que es de 0,1% de ácido láctico.
- El contenido de carbohidratos no se analizó debido a que este componente no tiene un valor establecido ya que depende de la cantidad que el investigador desee aportar a un determinado alimento para un experimento específico.
- El valor energético de todas las muestras se encontró por debajo de los valores recomendados para esta especie (3,6 – 3,8 kcal/kg).

## **XI. RECOMENDACIONES**

- Con base en los resultados obtenidos del análisis microbiológico y bromatológico de alimento balanceado para animales de laboratorio (ratas y ratones) realizado en este trabajo, se puede indicar que es importante ampliar y continuar con este tipo de estudios, para de esta manera poder contar con más datos acerca de la calidad microbiológica y bromatológica de estos productos elaborados y comercializados en nuestro medio, de tal manera que se pueda implantar normas acordes con los requisitos que deben cumplir al momento de ser utilizados por centros de investigación con animales. De tal manera que todo conlleve a mejorar el campo de la investigación ya que será posible contar con animales de experimentación que cumplan con los requisitos biológicos adecuados para obtener resultados reales que evite el sacrificio inútil de individuos y una pérdida de tiempo y de recursos en investigación.
- Es importante poner énfasis en tres factores importantes, para que el alimento sea utilizado eficientemente por un animal, siendo estos los siguientes: la formulación adecuada del alimento, la manufactura del alimento y el manejo adecuado del alimento

- Es de gran importancia la rotación del alimento balanceado almacenado debido a que el tiempo óptimo de almacenamiento es un factor importante que afecta la calidad del alimento y está influenciado por el nivel de humedad a que se guarde el producto.
- Finalmente el control de calidad de los productos finales, como una política empresarial, es un área, que necesita ser desarrollada en la mayoría de las empresas dedicadas a la elaboración y comercialización de alimentos balanceados en nuestro país.

## **XII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Ávila, Carolina, Soler G. Álvaro. Elaboración de concentrados para rata *Proechimys* de la especie *chrysaelus* para su manutención en el laboratorio. Jueves, Agosto 03 de 2006. <http://www.monografías.com/trabajos36/nutrición-rata-laboratorio/nuticiónrata-laboratorio.shtml>.
2. Prof. Dr. Antonio G. Pisabarro. Dra. Cristina Solano MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS. Métodos generales de análisis microbiológico de los alimentos. Detección de microorganismos e índices e indicadores. Pamplona 2005. <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/10-patologias%20alimentarias.htm>
3. Subgerencia de protección y regulación pecuaria grupo de regulación y control de alimentos para animales. Buenas prácticas en la fabricación de alimentos para animales en Bogotá – Colombia. 1999. <http://www.ica.gov.co/servicios/Alimentos/BPFA.pdf>.
4. Arturo F. Castellanos-Ruelas, María de la L. Murguía-Olmedo Comportamiento de la contaminación microbiológica en alimentos balanceados Para rumiantes

- elaborados con Pollinaza Rev. Biomed 2002; 13(3) 171-177. <http://www.vady.mx/sitios/biomedic/rev.biomed/pdf/rb021333.pdf>
5. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú Rev. investig. vet. Perú vol.14 no.1 Lima Jan./jun. 2003. Facultad de Química de la Universidad Mayor de San Marcos. [Gerardo@peru.itete.com.pe](mailto:Gerardo@peru.itete.com.pe)
  6. Doyle, Michael. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de Análisis microbiológico. Acribia. Zaragoza-España. Ed. Acribia.1999.
  7. Prof. Dr. Antonio G. Pisabarro. Dra. Cristina Solano Microbiología de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos  
<http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/001-introducción%20micro%20alimentos%202htm>
  8. Drs. Manuel J. Jayo and F. Javier Cisneros. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council. Edicion Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996  
<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>
  9. Moreno Collado. Jorge. Director General Jurídico de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Rúbrica. Norma oficial mexicana NOM-061-ZOO-1999, especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Ciudad de México, D.F., a 18 de septiembre de 2000. <http://www.una.com.mx/content/sanidad/061zoo.pdf>.

10. Ing. Agr. G. Jaurena (MSc., PhD.) Recomendaciones para muestrear alimentos para animales. Prof. Adjunto Cátedra de Nutrición Animal. 2004.  
<http://www.agro.uba.ar/catedras/nutricion/muestreo.pdf>
11. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, Agentes microbianos, físico-químicos transmitidos por alimentos. Laboratorio de Microbiología Ambiental. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. México. 2002.  
<http://www.geocities.com/labmicrobiologiaambiental/>
12. Alberto. H. Instrucciones generales para la toma de muestras. Thursday 6 de November de 2003 Thursday 6 de November de 2003.  
<http://www.monografias.com/trabajos7/broma/broma.shtml>
13. Dr. CARLOS CAMPABADAL Ph D. Dr. HÉCTORA. NAVARROU. Clasificación de los ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos para animales. CENTRO DE INVESTIGACIONES EN NUTRICIÓN ANIMAL. UNIVERSIDAD DE COSTA RICA ASOCIACIÓN AMERICANA DE SOYA DIRECTOR DE NUTRICIÓN ANIMAL.  
<http://www.ag.uiuc.edu/~asala/espanol/nutricionanimal/publicaciones/Clasificaci%F20de%20Alimentos%20para%20Animales.pdf>.
14. Díaz. Lic. Marisol. Comité Científico AADYND  
[http://www.aadynd.org.ar/comunidad/detalle\\_inf.php?id=111](http://www.aadynd.org.ar/comunidad/detalle_inf.php?id=111)



# ANEXOS

## CALCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \sqrt[3]{\text{Numero Total de Envases de Lote}}$$

$$n = \sqrt[3]{70} = 4,12$$

$$n = 4$$

## REGISTRO DE TOMA DE MUESTRA

N° de Muestra: 1	N° de Muestra: 2	N° de Muestra: 3	N° de Muestra: 4
Procedencia: INLASA	Procedencia: INLASA	Procedencia: INLASA	Procedencia: INLASA
Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g
Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet
Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida
Olor: Característico	Olor Característico	Olor Característico	Olor Característico
Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Amarillo

N° de Muestra: 5	N° de Muestra: 6	N° de Muestra: 7
Procedencia: FCFB	Procedencia: FCFB	Procedencia: FCFB
Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g
Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet
Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida
Olor: Característico	Olor Característico	Olor Característico
Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Verde

Nº de Muestra: 8	Nº de Muestra: 9	Nº de Muestra: 10	Nº de Muestra: 11
Procedencia: IBBA	Procedencia: IBBA	Procedencia: IBBA	Procedencia: IBBA
Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g
Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet
Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida
Olor: Característico	Olor Característico	Olor Característico	Olor Característico
Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Amarillo

Nº de Muestra: 12	Nº de Muestra: 13	Nº de Muestra: 14	Nº de Muestra: 15
Procedencia: SELADIS	Procedencia: SELADIS	Procedencia: SELADIS	Procedencia: SELADIS
Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g	Cantidad: 500 g
Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet	Aspecto: pellet
Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida	Consistencia: Sólida
Olor: Característico	Olor Característico	Olor Característico	Olor Característico
Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Amarillo	Color: Amarillo

### PELLETS DE ALIMENTO BALANCEADO

