

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE  
OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO PARA CONSUMO  
HUMANO A PARTIR DE HARINA DE PESCADO**

**PRESENTADO POR Bach. JOHANN LUGI MEJIA ROCHA Y Bach.  
NADIA YSAMAR MENDOZA ARISTA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO  
AGROINDUSTRIAL**

Chimbote – Perú  
Año del buen servicio al ciudadano

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



### HOJA DEL AVAL DEL JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado “DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO PARA CONSUMO HUMANO A PARTIR DE HARINA DE PESCADO” para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por Bach. JOHANN LUIGI MEJIA ROCHA Y Bach. NADIA YSAMAR MENDOZA ARISTA, que tienen como Asesor al docente Ms. Jorge Domínguez Castañeda designado por resolución N° 268-2016-UNS-FI. Ha sido revisado y aprobado el día 05 de octubre del 2017 por el siguiente jurado evaluador, designado mediante resolución N° 166-2017-UNS-CFI.

---

**Dra. Elza Aguirre Vargas**  
Presidente

---

**Ms. Jorge Domínguez Castañeda**  
Secretario (Asesor)

---

**Ms. Williams Castillo Martínez**  
Integrante

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 12 p.m. del cinco de octubre del dos mil diecisiete se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 166-2017-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Presidente)
- **Ms. Jorge Domínguez Castañeda** (Secretario)
- **Dra. Elza Aguirre Vargas** (Integrante)
- **Ms. Williams Castillo Martínez** (Accesitario); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

**“DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO PARA CONSUMO HUMANO A PARTIR DE HARINA DE PESCADO”**, elaborada por el (os) bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **JOHANN LUIGI MEJIA ROCHA**
- **NADIA YSAMAR MENDOZA ARISTA**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Ms. Jorge Domínguez Castañeda**

Finalizada la sustentación, el (os) Tesistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
JOHANN LUIGI MEJIA ROCHA	<b>18</b>	<b>BUENO</b>

Siendo las 1:30 p.m. del mismo día, se dio por terminado dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 05 de octubre del 2017

---

**Dra. Elza Aguirre Vargas**  
Presidente

---

**Ms. Jorge Domínguez Castañeda**  
Secretario

---

**Ms. Williams Castillo Martínez**  
Integrante

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 12 p.m. del cinco de octubre del dos mil diecisiete se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 166-2017-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Presidente)
- **Ms. Jorge Domínguez Castañeda** (Secretario)
- **Dra. Elza Aguirre Vargas** (Integrante)
- **Ms. Williams Castillo Martínez** (Accesitario); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

**“DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO PARA CONSUMO HUMANO A PARTIR DE HARINA DE PESCADO”**, elaborada por el (os) bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **JOHANN LUIGI MEJIA ROCHA**
- **NADIA YSAMAR MENDOZA ARISTA**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Ms. Jorge Domínguez Castañeda**

Finalizada la sustentación, el (os) Tesistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspecto relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
NADIA YSAMAR MENDOZA ARISTA	<b>18</b>	<b>BUENO</b>

Siendo las 1:30 p.m. del mismo día, se dio por terminado dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 05 de octubre del 2017

---

**Dra. Elza Aguirre Vargas**  
Presidente

---

**Ms. Jorge Domínguez Castañeda**  
Secretario

---

**Ms. Williams Castillo Martínez**  
Integrante

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por su amor incondicional, por cuidarme todo este tiempo, por levantarme cuando he caído, por la familia unida que me brindó, y porque gracias a él llegue donde estoy y sin él nada fuera posible.*

*A mi madre Eloisa Arista y a mi padre Jacinto Mendoza por su gran esfuerzo, dedicación, confianza y su apoyo incondicional.*

*A mis hermanas Yuliana y Yoselin y sobrinos Nailea, Jhonatan por la confianza y el apoyo constante.*

*A mi hijo Evanthiago por ser mi alegría y felicidad, a Johann por el amor y paciencia. A todos los que apoyaron en la realización de la tesis ingenieros y profesores.*

**NADIA MENDOZA**

*A Dios, por su amor incondicional, por darme la vida día a día, por cuidarme todo este tiempo, por levantarme cuando he caído, por la familia unida que me brindó, y porque gracias a él llegue donde estoy y sin él nada fuera posible.*

*A mi madre Verminda Rocha y a mi padre Eladio Mejia por su apoyo incondicional y su gran esfuerzo, dedicación, que pusieron en mi crianza.*

*A mis amigos y demás familiares que forman parte de mi vida, que me apoyaron y confiaron en mí, que creyeron que podría y puedo seguir cumpliendo mis metas.*

*A Nadia por haberme dado a nuestro Evanthiago, por el amor y paciencia. A todos los que apoyaron en la realización de la tesis ingenieros y profesores.*

**JOHANN MEJIA**

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradecer a Dios, por darnos la fortaleza para lograr esta meta, por haber puesto en el camino a personas que han sido guía y compañía durante todo el periodo del proyecto.

A nuestros padres por infundirnos la perseverancia y el rigor de luchar por nuestros objetivos en el transcurso de nuestras vidas.

A los docentes de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial, por todo el apoyo académico otorgado durante nuestra vida universitaria, en especial a nuestro asesor el Ms. Jorge Domínguez Castañeda, por su asesoramiento científico y su capacidad para guiar nuestras ideas, ha sido un aporte invaluable, a los Ing. Daniel Sánchez Vaca, Ing. John Gonzales que gentilmente nos escucharon, aclararon nuestras dudas y aportaron en nuestra tesis con sus sugerencias; y al biólogo Fidel Castro, a todos ellos, por habernos facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta investigación.

También a los analistas del IITA, cuyo apoyo fundamental en laboratorio nos facilitó el manejo de los instrumentos en todo momento e hizo un ambiente grato de trabajo.

Por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo, a la Universidad Nacional del Santa, que nos brindó la formación para ser buenos profesionales.

A todos ellos, gracias

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	17
II.	MARCO TEÓRICO.....	23
2.1.	GENERALIDADES DE LA HARINA DE PESCADO .....	23
2.1.1.	DEFINICIÓN DE LA HARINA DE PESCADO .....	23
2.1.2.	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL .....	23
2.1.3.	SITUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HARINA DE PESCADO A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL .....	27
2.1.4.	PRINCIPALES MERCADOS DE LA HARINA DE PESCADO .....	32
2.1.5.	CLASIFICACIÓN DE LA HARINA DE PESCADO.....	33
2.1.6.	USOS DE LA HARINA DE PESCADO .....	35
2.1.7.	CONTROL DE CALIDAD DE LA HARINA DE PESCADO .....	39
2.2.	GENERALIDADES DEL CONCENTRADO PROTEICO.....	64
2.2.1.	DEFINICIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO .....	64
2.2.2.	MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS.....	65
2.2.3.	CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DEL CONCENTRADO PROTEICO.....	66
2.3.	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	67
2.3.1.	TIPOS DE EXTRACCIÓN .....	67
2.3.2.	PRE-TRATAMIENTOS CON ULTRASONIDO PARA EXTRACCIÓN .....	69
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	70
3.1.	MATERIALES.....	70



3.1.1.MATERIA PRIMA.....	70
3.1.2.EQUIPOS E INSTRUMENTOS, REACTIVOS Y OTROS MATERIALES .....	70
3.2. MÉTODOS .....	72
3.2.1.DISEÑO EXPERIMENTAL.....	72
3.2.2.DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL .....	72
3.2.3.CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE PESCADO Y CONCENTRADO PROTEICO.....	77
3.2.4.ANÁLISIS PARA EL MÁXIMO CONCENTRADO PROTEICO.....	78
3.2.5.NORMAS REGULADORAS O DE REFERENCIA .....	79
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
4.1. HARINA DE PESCADO.....	81
4.1.1.ANÁLISIS PROXIMAL.....	81
4.1.2.ANÁLISIS COLORIMÉTRICO (CIELAB).....	82
4.2. OBTENCIÓN DE LOS CONCENTRADOS PROTEICOS .....	83
4.2.1.ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	89
4.2.2.ANÁLISIS DE GRASAS.....	97
4.2.3.RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES RESPUESTAS .....	103
4.2.4.DETERMINACIÓN DE LAS TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN ACUOSA Y ALCOHÓLICA PARA LA OBTENCIÓN DEL MÁXIMO CONCENTRADO PROTEICO.....	105
4.2.5.BALANCE DE MATERIA.....	106
4.3. ANÁLISIS DE TRIMETILAMINA (TMA) .....	109

4.4. EVALUACIÓN SENSORIAL DE ORDENAMIENTO.....	111
4.5. MÁXIMO CONCENTRADO PROTEICO.....	113
4.5.1. ANÁLISIS PROXIMAL.....	113
4.5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	114
4.5.3. ANÁLISIS COLORIMÉTRICO (CIELAB).....	117
4.5.4. ANÁLISIS DE HISTAMINA.....	121
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	122
5.1. CONCLUSIONES.....	122
5.2. RECOMENDACIONES.....	123
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	124
VII. ANEXOS.....	134

## ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1: Composición nutricional de la harina de pescado (%).....	24
Cuadro 2: Composición química proximal de la harina de pescado peruana (%).....	25
Cuadro 3: Composición de aminoácidos de la harina de anchoveta peruana.....	26
Cuadro 4: Contenido vitamínico por kilo de harina de anchoveta del Perú.....	27
Cuadro 5: Producción de harina de pescado, según puerto, 2008-2014 (Tonelada Métrica Bruta).....	29
Cuadro 6: Composición media vitamínica de la harina de pescado .....	48
Cuadro 7: Características microbiológicas de la harina de pescado .....	61
Cuadro 8: Clasificación de la harina según su calidad.....	64
Cuadro 9: Productos hidrobiológicos deshidratados (concentrados proteicos, harinas y otros de consumo humano) .....	66
Cuadro 10: Diseño experimental de los tratamientos .....	76
Cuadro 11: Factores y dominio experimental.....	77
Cuadro 12: Especificaciones de la FAO .....	79
Cuadro 13: Especificaciones de la FDA .....	80
Cuadro 14: Caracterización de la harina de pescado como materia prima .....	81
Cuadro 15: Análisis colorimétrico de la harina de pescado .....	82
Cuadro 16: Concentración de proteínas en el producto final .....	84
Cuadro 17: Concentración de grasas en el producto final.....	84
Cuadro 18: Plan de experimentación mostrando sus respuestas .....	87
Cuadro 19: ANOVA para concentración de proteínas.....	90
Cuadro 20: Parámetros del modelo matemático para proteínas .....	94
Cuadro 21: Factores optimizados para el análisis de proteínas .....	95

Cuadro 22: ANOVA para concentración de grasas .....	98
Cuadro 23: Parámetros del modelo matemático para grasas .....	101
Cuadro 24: Factores optimizados para el análisis de grasas.....	102
Cuadro 25: ANOVA para regresión simple de Proteínas y Grasas .....	105
Cuadro 26: Balance de materia resumido para la harina de pescado.....	107
Cuadro 27: Resultados del análisis de trimetilamina .....	110
Cuadro 28: Resultados de la evaluación sensorial de ordenamiento .....	112
Cuadro 29: Caracterización de la harina de pescado y del máximo concentrado proteico ...	114
Cuadro 30: Análisis microbiológico del máximo concentrado proteico.....	115
Cuadro 31: Análisis colorimétrico de la harina de pescado y del máximo concentrado proteico.....	117
Cuadro 32: Análisis de histamina del máximo concentrado proteico.....	121

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ranking de empresas exportadoras de harina de pescado. Fuente: Informe anual 2014 desenvolvimiento del comercio exterior pesquero.....	30
Figura 2. Principales mercados destinados al CHI en el 2014. Fuente: Informe anual 2014 desenvolvimiento del comercio exterior pesquero .....	32
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso para la obtención del concentrado proteico.....	72
Figura 4. Esquema experimental que comprende el estudio .....	75
Figura 5. Harina de pescado prime .....	83
Figura 6. Diagrama de pareto de los efectos de las variables sobre la concentración de proteínas .....	91

<i>Figura 7.</i> Gráfica del comportamiento de los efectos principales en la concentración de proteínas .....	91
<i>Figura 8.</i> Gráfica del efecto de la interacción de las variables sobre la concentración de proteínas .....	93
<i>Figura 9.</i> Superficie de respuesta para la concentración de proteínas .....	96
Figura 10. Diagrama de pareto de los efectos de las variables sobre la concentración de grasas .....	99
Figura 11. Gráfica del comportamiento de los efectos principales en la concentración de grasas .....	99
Figura 12. Gráfica del efecto de la interacción de las variables sobre la concentración de grasas .....	100
Figura 13. Superficie de respuesta para la concentración de grasas .....	103
<i>Figura 14.</i> Gráfico del modelo ajustado para Proteínas y Grasas .....	104
Figura 15: Balance de materia del proceso de obtención del concentrado proteico .....	108
Figura 16. Valor Delta E ( $\Delta E^*$ ) para la harina de pescado y máximo concentrado proteico	118
Figura 17. Harina de pescado prime y máximo concentrado proteico (sin iluminación) ...	119
Figura 18. Harina de pescado prime y máximo concentrado proteico (con iluminación) ....	119
Figura 19. Aceite recuperado del etanol empleado en la extracción alcohólica, utilizando el rotavapor.....	120

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Equipos utilizados en la parte experimental (proceso) .....	134
ANEXO 2. Equipos utilizados en la parte experimental (análisis).....	136
ANEXO 3. Diagrama de flujo con imágenes del proceso de obtención del concentrado proteico .....	138
ANEXO 4. LABICER. Laboratorio de investigación y certificaciones-FC-UNI .....	139
ANEXO 5. Análisis de trimetilamina al concentrado proteico óptimo .....	140
ANEXO 6. Análisis microbiológico e histamínico al máximo concentrado proteico .....	146
ANEXO 7. Ficha de evaluación sensorial de ordenamiento .....	147
ANEXO 8. Tabla de Kramer .....	148

## RESUMEN

En este trabajo de investigación se obtuvo un concentrado proteico para consumo humano, a partir de harina de pescado procedente de la industria pesquera de Chimbote (DON FERNANDO S.A.C). La parte experimental consta de 3 etapas principales: la primera es una extracción acuosa con agua ultrapura, la segunda es una extracción de grasas con hexano en un soxhlet convencional y por último una extracción alcohólica con etanol. La primera y última extracción fue realizada en un baño ultrasonido. Los ensayos se hicieron bajo un diseño experimental factorial  $3^2$  por triplicado, donde los dos factores a manipular fueron la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica, cada factor con 3 niveles: 20, 40 y 60°C para ambos. Además, estas temperaturas de extracción acuosa y alcohólica fueron estadísticamente significativas para la evaluación de proteínas y grasas. Las temperaturas óptimas de extracción acuosa y alcohólica fueron 20 y 37°C respectivamente, las cuales permitieron obtener un concentrado proteico de  $76.7897\% \pm 1.4069\%$  de proteínas,  $0.0588\% \pm 0.0102\%$  de grasas, una concentración de trimetilamina menor a  $12 \text{ mg N-TMA Kg}^{-1}$ , con un color en el espacio  $L^*a^*b^*$  ( $L^*=52.71 \pm 1.69$ ,  $a^*=2.20 \pm 0.03$ ,  $b^*=22.56 \pm 0.45$ ).

### Palabras claves

Concentrado proteico, temperatura de extracción acuosa, temperatura de extracción alcohólica, ultrasonido, proteínas, grasas, trimetilamina, TMA, consumo humano, harina de pescado.

## ABSTRACT

In this research, a protein concentrate for human consumption was obtained from fishmeal from the fishing industry of Chimbote (DON FERNANDO S.A.C). The experimental part consists of 3 main stages: the first is an aqueous extraction with ultrapure water, the second is a extraction of fats with hexane in a conventional soxhlet and finally an alcoholic extraction with ethanol. The first and last extraction was performed in an ultrasonic bath. The tests were done under a triplicate experimental factorial design  $3^2$ , where the two handling factors were the aqueous extraction temperature and the alcohol extraction temperature, each factor with 3 levels: 20, 40 and 60°C for both. In addition, these aqueous and alcoholic extraction temperatures were statistically significant for the evaluation of proteins and fats. The optimum aqueous and alcoholic extraction temperatures were 20 and 37°C respectively, which allowed to obtain a protein concentrate of  $76.7897\% \pm 1.4069\%$  protein,  $0.0588\% \pm 0.0102\%$  fat, a trimethylamine concentration of less than 12 mg N-TMA  $\text{Kg}^{-1}$ , with a color in the space  $L^* a^* b^*$  ( $L^* = 52.71 \pm 1.69$ ,  $a^* = 2.20 \pm 0.03$ ,  $b^* = 22.56 \pm 0.45$  ).

## Keywords

Protein concentrate, aqueous extraction temperature, alcohol extraction temperature, ultrasound, proteins, fats, trimethylamine, TMA, human consumption, fishmeal.



## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, muchos de los países en vías de desarrollo, la malnutrición proteínica energética, es uno de los principales problemas nutricionales más importantes y el Perú no escapa a esta problemática.

La posibilidad de corregir este déficit, se dará estimulando la producción y el consumo de alimentos ricos en proteínas de buena calidad y de bajo costo. Entre estos productos esta también el pescado y sus derivados, especialmente la harina de pescado como materia prima y que sean aceptables para el consumo humano directo, genéricamente denominadas "Concentrados de Proteína de Pescado" (CPP).

La industria de la harina de pescado en el Perú, comenzó en 1946 y desde entonces se ha incrementado constantemente. En 1964, el Perú se convirtió en el primer país productor de harina de pescado en el mundo, posición que mantiene hasta la actualidad (Rojas, 1979. FAO, 1996).

Debido a los resultados satisfactorios obtenidos en la alimentación animal, en la década de los sesenta muchas instituciones reconocidas en el campo de la alimentación humana propusieron su uso directo; esto produjo una mejora en los procesos de elaboración lo cual se vio reflejado en una harina de pescado de mejor calidad (FAO, 1961. Medina, 1993). Los principales motivos del auge del concentrado proteico a nivel mundial son: el mejor aprovechamiento del recurso hidrobiológico desde el punto de vista nutricional, la versatilidad tecnológica ya que involucra una tecnología simple y de relativamente bajos costos de inversión, la expansión de mercados existentes y la alternativa de desarrollar nuevos productos atractivos que permitirá la ampliación del mercado de productos pesqueros.

Para la estructuración del proyecto nos basamos en los siguientes antecedentes realizados en distintos países tales como, Perú, Argentina, Colombia:

**ESTADO NUTRICIONAL Y CONDICIÓN FÍSICA DE FUTBOLISTAS ADOLESCENTES LUEGO DEL CONSUMO DE HARINA DE PESCADO COMO COMPLEMENTO NUTRICIONAL**, del año 2013. El objetivo del estudio fue determinar los cambios en los parámetros nutricionales y condición física en adolescentes deportistas luego de consumir harina de pescado como complemento nutricional. Para ello, se realizó un estudio cuasiexperimental, ciego para los investigadores, en 100 adolescentes futbolistas, divididos en dos grupos homogéneos en todos los parámetros de estudio. Se le brindó harina de pescado durante cuatro meses a uno de los grupos. Luego de evaluar el estado nutricional y la condición física, antes y después de la intervención, no se encontraron cambios en el estado nutricional, ni antropométricos ni de laboratorio, tampoco en la condición física; pero sí en los niveles de hemoglobina y hematocrito entre los que consumieron la harina de pescado y el grupo control. En conclusión, el consumo de harina de pescado no se tradujo en cambios en el estado nutricional ni en la condición física de adolescentes deportistas.

**EVALUACIÓN NUTRICIONAL DE GALLETAS ENRIQUECIDAS CON DIFERENTES NIVELES DE HARINA DE PESCADO**, del año 2013. En el presente estudio se evaluó el enriquecimiento de galletas con dos niveles de inclusión de harina de pescado en 3 y 5 %, los cuales fueron contrastados con una galleta testigo obtenida con una fórmula estándar enriquecida con harina de quinua y soya, además de leche entera deshidratada.

La evaluación de la calidad de la proteína de las galletas fue estimada mediante los métodos biológicos Razón Proteínica Neta (NPR) y Digestibilidad Aparente (Dap). En el caso de la prueba de NPR, ésta incluyó un control de caseína. El nivel de enriquecimiento con 5% de harina de pescado en los ensayos de NPR y Dap fue superior al nivel de 3% de harina de

pescado y al control. El tratamiento con un nivel de enriquecimiento de 5% con harina de pescado fue similar al tratamiento de caseína.

Se realizaron pruebas de aceptabilidad, con la participación de panelistas semientrenados de ambos sexos, su grado de satisfacción fue medido mediante la aplicación de una prueba de escala hedónica de nueve puntos. El sabor y la textura de la galleta enriquecida con un 3% de harina de pescado fue similar al control, sin embargo, la inclusión de harina de pescado en las galletas afectó el aspecto general, aroma y color.

Los resultados obtenidos confirman la factibilidad del enriquecimiento de galletas con harina de pescado, como un importante insumo proteico de características nutricionales favorables, pudiéndose mejorar su aceptabilidad mediante el empleo de una harina de pescado de calidad superior.

TRATAMIENTO DE LA HARINA DE PESCADO PARA HACERLA APTA PARA CONSUMO HUMANO del año 1970. El principal objeto de este trabajo fue desarrollar uno o varios productos aceptables para el consumo humano partiendo de la harina de pescado como materia prima. Además, se hizo un estudio de la composición química de la harina de pescado y se sigue un método para desodorizarla y desaborizarla. El aspecto tecnológico de la fabricación de helados y pudines y la aceptabilidad de estos productos usando paneles de degustación, complementaron el trabajo.

OBTENCIÓN DE CONCENTRADO DE PROTEÍNA A PARTIR DE ESPECIES DE PESCADO DE BAJO PRECIO del año 1970. En este trabajo se hizo un estudio de obtención de concentrado de proteína de pescado a partir de especies de bajo precio tales como jurel, *Trachurus trachurus* (L), caballa, *Scomber scombrus* (L) y bacaladilla, *Micromesistius poutassou* (Risso). Se ensayaron, asimismo diferentes métodos de fabricación de concentrados de proteína. a) Por extracción con alcohol isopropílico. b) Por extracción con alcohol etílico. c) Método alcalino, por tratamiento previo del pescado con disolución de

NaOH 0,5 N a 60°C, posterior precipitación de la proteína con ácido fosfórico y lavado final del concentrado obtenido con alcohol etílico. d) Método ácido, por tratamiento previo con  $\text{SO}_4\text{H}_2$  tal 1 %, seguido de otro con ácido fosfórico y lavado del producto final con alcohol etílico. Por lo que se refiere a la especie más barata, el jurel, el contenido en proteínas del orden del 90-96 %, mientras los valores de grasa sólo alcanzan valores de 0,01-0,1%. Estas características químicas sitúan al concentrado de proteína obtenido por nosotros a partir del jurel como superior al tipo FAO-A. Por último, las determinaciones de calidad realizadas sobre dicho concentrado (humedad, grasa, proteínas, pH, trimetilamina, y determinaciones bacteriológicas) demuestran que dicho producto es óptimo para su comercialización.

El problema formulado para este proyecto fue: ¿Cuáles son los parámetros óptimos del proceso para obtener un máximo concentrado proteico para consumo humano a partir de harina de pescado procedente de la industria pesquera de Chimbote?

En función al problema planteado, se determinó como objetivo general, determinar los parámetros óptimos del proceso de obtención de un concentrado proteico para consumo humano a partir de harina de pescado, y como objetivos específicos: realizar un análisis proximal de la harina de pescado, determinar las temperaturas de extracción acuosa y alcohólica para la obtención de un concentrado proteico, determinar la presencia de trimetilamina en la harina de pescado y concentrado proteico, realizar un análisis proximal al máximo concentrado proteico obtenido.

Como solución al problema, se formuló el hipótesis siguiente: Se obtendrá un máximo concentrado proteico para consumo humano, mediante extracción acuosa al 20% (p/v) a 20°C durante 45 minutos a la harina de pescado, con el fin de extraer la trimetilamina y disminuir su olor, seguido una extracción con solvente hexano (soxhlet), con el objetivo de extraer los lípidos presentes y desaborizarla, por último una extracción alcohólica con etanol al 20%

(p/v), a 20°C durante 45 minutos con la finalidad de extraer los productos nitrogenados de descomposición bacteriana de las proteínas.

Como todo trabajo de investigación, este proyecto fue realizado con un fin, un objetivo, o en busca de soluciones. Por ende, se formuló la siguiente justificación para la elaboración de este trabajo de investigación: Debido a que las dietas promedio de numerosos países, incluido el nuestro, no contienen las cantidades necesarias de proteínas para el requerimiento humano, y principalmente no existe una cultura de alimentación sana y de calidad, se ve la necesidad de elaborar un concentrado proteico con la finalidad de corregir este déficit o problema. De tal manera, esta investigación estimula a la realización de otras enfocadas a la elaboración de productos utilizando un concentrado proteico obtenido a partir de la harina de pescado, aceptables para el consumo humano.

A través del procedimiento realizado en la investigación, podemos dar un valor agregado a la harina de pescado convirtiéndola en un concentrado proteico para consumo humano y de esta manera aumentando los ingresos de las plantas que se dediquen a la producción de la misma, ya que el costo o precio de venta de este concentrado proteico debido a que se dirige al consumo humano, es mayor que la harina de pescado convencional.

Otra finalidad de esta presente investigación es aportar de manera académica y técnica, realizando un estudio de las características intrínsecas de la harina de pescado y el mecanismo de obtención del concentrado proteico a partir de esta misma.

No obstante, en la formulación y posterior realización del proyecto también se presentaron algunas limitaciones: Inconvenientes en el uso de algunos equipos, en el caso de las estufas (3) se tenía que separar con anticipación su uso, debido a que era utilizado por los alumnos de la E. A. P. Ingeniería Agroindustrial y otros tesisistas, caso similar ocurría con el uso de la balanza analítica, mortero, campana desecadora y los tubos de centrifugación; hacemos

mención a la dificultad que presentó realizar el análisis de trimetilamina e histamina en nuestras muestras, esto nos llevó a realizarlo fuera de los laboratorios de la Universidad Nacional del Santa. Carencia de reactivos químicos, específicamente hexano, éter, ácido sulfúrico, etanol. Escases de referencias bibliográficas publicadas en los últimos 10 años relacionados, específicamente papers que mencionen métodos no enzimáticos que trabajen con harina de pescado, solventes, donde señalen parámetros empleados.

## **II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. GENERALIDADES DE LA HARINA DE PESCADO**

#### **2.1.1. DEFINICIÓN DE LA HARINA DE PESCADO**

La harina de Anchoveta del Perú, es un producto industrial que se obtiene mediante la reducción de humedad y grasa del pescado entero, sin agregar sustancias extrañas salvo aquellas que tiendan a mantener la calidad original del producto. Se puede denominar con el nombre de una especie, siempre que contengan un mínimo del 90% de pescado de dicha especie. (ITINTEC, 1975 citado por Medina, 1993).

Se define a la harina de pescado como el producto obtenido por secado (con extracción de la materia grasa), y molienda de pescado; cuyos componentes que lo conforman varían en función a diversos parámetros, entre los que tenemos el tipo de proceso y calidad de materia prima principalmente (MIPE, 1999).

#### **2.1.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL**

La harina de pescado tiene un especial interés nutricional y económico por representar una de las fuentes principales de proteína en los alimentos para la industria pecuaria, así como uno de los ingredientes de mayor costo (Civera et al., 2000), representando hasta más del 50% de estos (Fraga Castro & Jaime Ceballos, 2011). En el cuadro1, podemos apreciar la composición nutricional de la harina de pescado en general, donde se detalla la presencia de algunos aminoácidos importantes, tales como la metionina, metionina + cistina, lisina y calcio.

Con respecto al contenido de lisina y metionina, Sambucetti y Sanahuja, 1970 demostraron que los mecanismos involucrados en las reacciones que afectan la

disponibilidad de estos dos aminoácidos son diferentes; al parecer, para la metionina serían sólo dependientes de la temperatura y, en cambio, para la lisina se hallarían relacionados no sólo a este factor, sino también a otros que podrían ser la humedad, presencia de grupos carbonilos, etc.

El contenido de energía metabolizable de la harina de pescado es notablemente alto y se debe al contenido de proteínas y de grasa y al bajo contenido de sustancias no digeribles como la fibra. La harina estabilizada con antioxidante tiene aproximadamente 18% más de energía metabolizable que la harina sin antioxidante, dicho efecto se debe aparentemente a una mejora de alrededor de 10% en la digestibilidad.

Cuadro 1: Composición nutricional de la harina de pescado (%)

COMPOSICION NUTRICIONAL	VALOR PROMEDIO
Proteínas	65.00 %
Metionina	1.80 %
Metionina + cistina	1.95 %
Lisina	4.00 %
Calcio	7.50 %
Fósforo disponible	3.80 %
Ácido Linoleico	0.15 %
Grasa	14.00 %
Fibra	1.20 %
Ceniza	16.50%

FUENTE: MARIÑO, 2012



La harina de pescado es superior en su aporte energético en relación a las tortas oleaginosas, el cual es tan alto como el maíz. La harina de pescado, por contener los esqueletos, es fuente importante de calcio y fósforo; la disponibilidad del fósforo es de 100%, mientras que en las oleaginosas es mucho más bajo. Asimismo, aporta sodio, cloro, manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, fluor y selenio; también contribuye con vitaminas tales como la vitamina A, vitamina E, B12, riboflavina, ácido nicotínico, ácido pantoténico y colina (FAO, 1975.Rojas, 1979).

Las especificaciones mostradas en el cuadro 2, son típicas para harina de pescado de Perú. Los productores en realidad ofrecen harina FAQ (secada directamente), harina Steam Dried (secada indirectamente), cada uno con distintas especificaciones para satisfacer las necesidades del mercado.

Cuadro 2: Composición química proximal de la harina de pescado peruana (%)

Características químicas proximales de la harina de anchoveta (%)	
Proteínas	64 - 68%
Grasas	12% máximo
Humedad	6 – 10%
Cenizas	12 – 18%
Histamina	Varía según la calidad <500ppm<1000, o no especificado

FUENTE: IFFO, 2008

Así mismo, en los cuadros 3 y 4, precisan la composición de los aminoácidos y contenido vitamínico de la harina de anchoveta respectivamente.

Cuadro 3: Composición de aminoácidos de la harina de anchoveta peruana

AMINOÁCIDOS	REFERIDO AL % DE HARINA
Lisina	4.87 ± 0.38
Metionina	1.94 ± 0.12
Cistina	0.60 ± 0.07
Triptófano	0.74 ± 0.10
Histidina	1.48 ± 0.18
Arginina	3.69 ± 0.26
Treonina	2.67 ± 0.20
Valina	3.36 ± 0.24
Isoleucina	3.00 ± 0.17
Leucina	4.87 ± 0.34
Tirosina	2.21 ± 0.18
Fenilalanina	2.75 ± 0.19
Acido aspártico	6.09 ± 0.64
Serina	2.30 ± 0.17
Alanina	3.98 ± 0.27
Acido glutámico	8.32 ± 0.59
Prolina	2.57 ± 0.10
Glicina	3.58 ± 0.18

FUENTE: THE NUTRITIVE CONTENT OF PERUVIAN, ANCHOVY MEAL EVALUATED BY CHEMICAL METHODS, 1968.

Cuadro 4: Contenido vitamínico por kilo de harina de anchoveta del Perú

VITAMINA	CANTIDAD
Vitamina A	4500 UI
Tiamina o B1	0.30 mg
B2	2.50 mg
B6	14.00 mg
Ácido Pantoténico	9.30 mg
Niacina	95.00 mg
Cloruro de Colina	3800 mg
Ácido Fólico	0.16 mg
Cianocobalina	0.18 mg

FUENTE: CONSORCIO PESQUERO DEL PERU S.A., 1965.

### **2.1.3. SITUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE HARINA DE PESCADO A NIVEL MUNDIAL Y NACIONAL**

La producción de harina de pescado a nivel mundial se ha diversificado en una multiplicidad de productos, con una clara tendencia a obtener harinas de una mayor calidad, que logren una más alta cotización de precios. En este sentido la FAO (1996), clasifica a los principales productores en tres categorías de acuerdo al tipo de las harinas: países productores de harina de pescado graso, países productores de harinas; solubles y alimentos similares y países productores de harina para consumo humano.

El Perú se ha mantenido como el primer país productor de harina de pescado graso; esta harina es destinada principalmente a la alimentación de animales

durante muchos años; superando ampliamente a otros productores. Sin embargo, su precio es muy bajo con respecto a otro tipo de productos (FAO, 1996).

Además, resulta importante destacar que la harina de pescado constituye la segunda fuente de ingresos de exportación más importante en el Perú, después del cobre. Sin embargo, las perspectivas peruanas en lo que se refiere a la exportación se orientan a lograr un producto de calidad superior y precio más elevado (FAO, 1997).

En el siguiente cuadro 5, nos mostrara la producción anual de harina de pescado por puerto en el Perú, desde el 2008 hasta el 2014, básicamente del recurso de anchoveta.

Durante el año 2014, los desembarques de anchoveta para el procesamiento de harina de pescado descendieron en 52.7% en relación al 2013, sin embargo, las exportaciones de este producto solo se redujeron en 0.1% en peso y 2.8% en valor, alcanzando 1.3 mil millones de dólares.

El principal destino de la harina de pescado peruana, China, redujo su demanda en 21%, disminuyendo su participación en 12 puntos porcentuales, cediendo ante Alemania con una variación de 27%, Chile con 27% y Japón con 44%. Del total de 67 empresas exportadoras, las primeras siete concentran el 85% del total, mientras que Tecnológica de Alimentos, Corporación Pesquera Inca y Pesquera Diamante representaron el 51% de la participación (Figura 1).

Cuadro 5: Producción de harina de pescado, según puerto, 2008-2014  
(Tonelada Métrica Bruta)

<b>Puerto</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>
<b>F Total</b>	<b>1 414 728</b>	<b>1 348 460</b>	<b>787 436</b>	<b>1 637 705</b>	<b>846 260</b>	<b>1 114 187</b>	<b>524 605</b>
U Paita	41 112	12 117	20 582	33 894	8 184	176	290
E Parachique	32 160	18 023	3 338	21 084	7 635	5 872	8 911
N Bayóvar	39 047	42 747	22 195	46 934	27 139	-	-
T Chicama	163 272	110 486	112 788	107 934	132 283	173 150	62 545
E Salaverry	72	-	-	-	-	-	-
: Chimbote	214 118	192 861	158 680	219 304	136 511	259 407	56 245
Coishco	71 840	87 962	54 129	69 769	51 301	55 781	12 893
MCasma	9 524	-	-	-	-	-	-
I Samanco	30 757	44 969	31 916	21 811	19 719	37 286	6 113
N Huarmey	44 589	63 273	29 479	27 719	9 042	22 746	-
I Culebras	5 926	-	-	-	-	-	-
S Supe	90 683	83 957	22 088	100 947	25 843	76 053	26 166
T Végueta	56 359	55 662	8 279	71 069	17 406	53 003	25 803
E Huacho/Carquín	37 981	26 189	8 727	45 708	14 451	28 310	17 641
R Chancay	96 655	84 715	46 160	164 039	67 272	111 403	49 068
I Callao	96 076	132 465	77 949	187 883	94 381	101 955	71 239
O Tambo de Mora	68 582	66 838	32 609	109 412	45 207	41 494	30 670
Pisco	112 346	195 307	87 066	250 349	103 958	87 383	76 722
D Atico	29 777	39 371	4 313	27 548	19 865	6 828	11 636
E Ocoña	-	-	-	3 683	-	5 656	16 043
La Planchada	39 011	22 349	2 576	22 433	16 579	-	-
L Mollendo	14 223	7 941	408	13 738	8 766	5 259	7 838
A Matarani	20 919	11 599	1 670	20 626	9 820	11 446	9 975
Quilca	-	2 458	145	2 847	-	-	-
P Ilo	99 699	47 171	62 339	68 974	30 898	30 979	34 807

PRODUCCIÓN, 2014



Figura 1. Ranking de empresas exportadoras de harina de pescado. Fuente: Informe anual 2014 desenvolvimiento del comercio exterior pesquero

Debido a la creciente demanda de harina y aceite de pescado y a la subida de los precios, se está produciendo más harina a partir de subproductos de pescado que anteriormente se desechaban a menudo. Esto puede influir en la composición y la calidad de la harina de pescado, concretamente aumentando la cantidad de ceniza (minerales) y la concentración de aminoácidos pequeños (como la glicina, la prolina y la hidroxiprolina) y disminuyendo la cantidad de proteína, lo que podría repercutir en la proporción de este producto que contienen los piensos que se utilizan en la acuicultura y la ganadería.

Según las últimas estimaciones, en 2012 aproximadamente el 35 % de la producción mundial de harina de pescado se obtuvo de residuos. A pesar de las fluctuaciones anuales debidas a las capturas de anchoveta, en general, la producción de harina de pescado entero ha descendido gradualmente desde 2005, China sigue siendo el principal mercado, ya que importa más de un 30 % de harina de pescado en cantidad, mientras que el Perú y Chile son los

principales exportadores. (FAO, 2014). Este descenso se ha visto compensado de forma parcial por un aumento del porcentaje de la producción de harina de pescado obtenida de subproductos pesqueros. En 2010, la FAO elaboró un modelo para analizar las perspectivas del sector de la pesca y la acuicultura en cuanto al potencial de producción, la demanda, el consumo, los precios y las cuestiones clave que podrían influir en la oferta y la demanda futuras. Los resultados de las proyecciones se actualizan anualmente para describir un escenario plausible durante un período de 10 años en determinados supuestos, como por ejemplo el entorno macroeconómico, los aranceles y las normas comerciales internacionales, el fenómeno El Niño, los obstáculos de gestión para la producción y las tendencias de la productividad a más largo plazo.

En 2022, en torno al 16 % de la producción de la pesca de captura se reducirá a harina y aceite de pescado, lo que supone un 7 % menos con respecto al promedio de 2010-12. Sin embargo, en 2022, la producción total de harina y aceite de pescado debería ser, respectivamente, un 15 % y un 10 % más que en el período de referencia. Casi el 95 % del aumento adicional de la harina de pescado se derivará de una utilización más adecuada de los desechos, cortes y restos de pescado. La demanda constante y los elevados precios de la harina de pescado, junto con la menor disponibilidad de materia prima y el crecimiento de los productos pesqueros con valor añadido destinados al consumo humano, darán lugar a un mayor uso de residuos en la fabricación de harina de pescado. En 2022, la harina de pescado obtenida a partir de subproductos de pescado debería representar el 49 % de la producción total de harina de pescado. Con una demanda mundial más fuerte que la oferta, los precios de la harina y el

aceite de pescado aumentarán el 6 % y el 23 %, respectivamente, en términos nominales para 2022. Se prevé que esta escasez de oferta contribuya a un aumento a medio plazo de la relación de precios de los productos de pescado y de semillas oleaginosas. (FAO, 2014).

#### 2.1.4. PRINCIPALES MERCADOS DE LA HARINA DE PESCADO

El principal mercado de exportación es el Continente Asiático: China, Taiwán, Japón, Filipinas, Irán, Indonesia, Turquía, Hong Kong, Corea, Malasia, Tailandia, Israel, Singapur, India y otros; siguiendo en orden de importancia, Europa: Alemania, Italia, Yugoslavia, Polonia, Hungría, Rusia, España, Francia, Bélgica, Grecia, Bulgaria, Rumania y otros; América: EE.UU. Colombia, Venezuela, Canadá, Guatemala, México, El Salvador, Panamá, Cuba y otros; África: Sudáfrica, Libia y otros; Oceanía: Australia y otros. (MIPE, 1999). Los más relevantes mercados son: China con 40.8% de participación, Alemania con 10.3%, Chile con 9.9%, Japón con 7.5% y Dinamarca con 5%; tal como se muestra en la figura 2.

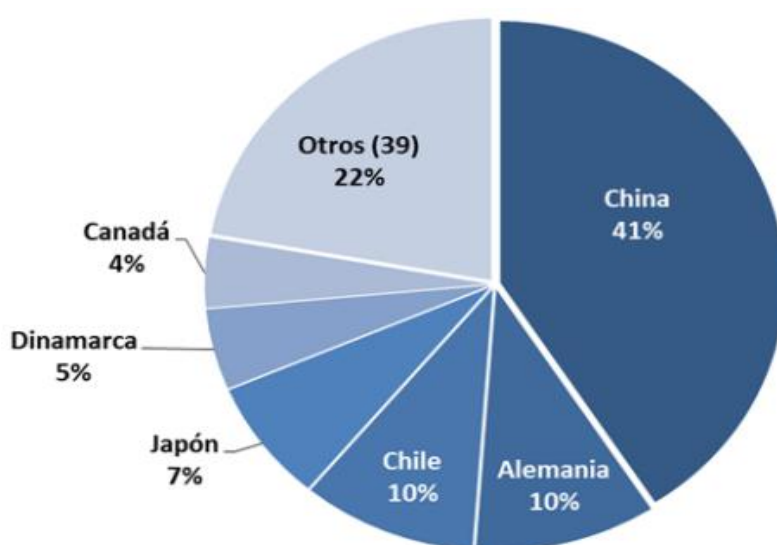


Figura 2. Principales mercados destinados al CHI en el 2014. Fuente: Informe anual 2014 desenvolvimiento del comercio exterior pesquero



En este rubro, China mantiene su liderazgo como principal destino de la harina de pescado debido al importante crecimiento de la actividad acuícola en dicho país, a pesar de haber cedido participación a los mercados mencionados, tras una disminución de sus exportaciones de 20%.

El número de empresas exportadoras en el 2014 disminuyó a 458, evidenciándose 32 menos empresas que el año 2013. Estas fueron clasificadas según su nivel de exportaciones en grande 2, grande 1, medianas, pequeñas y micro-empresas con un total de 19, 28, 125, 139 y 147 empresas para cada clasificación respectivamente.

#### **2.1.5. CLASIFICACIÓN DE LA HARINA DE PESCADO**

Existen diversas clasificaciones de la harina de pescado, las cuales varían de acuerdo a la materia prima empleada, tiempo de cocción y tipo de solventes empleados (en el caso de las harinas de pescado para consumo humano), sin embargo, destacan comercialmente:

A. Harina F.A.Q. (Fair Average Quality o Harina de Pescado de Calidad Promedio). - Se obtiene principalmente de la anchoveta (*Engraulis ringens J.*), la cual es sometida a procesos industriales con todos sus órganos, incluyendo sus vísceras y, contenido intestinal (Cortéz, 1962. Rojas, 1979). Esta harina preparada con pescado graso, incluye a todos sus componentes solubles. (ITINTEC, 1982, citado por Medina 1993).

B. Harina de Pescado Especial o Tipo "Prime". - No existiendo aún una definición común para las harinas especiales, se puede afirmar que son aquellas elaboradas a partir de una materia prima muy fresca y procesada en plantas a bajas temperaturas (menores de 90 °C en todas las etapas), con corto tiempo de permanencia en cada operación unitaria, control de la producción

por un sistema de calidad superior y permanente hasta su despacho al consumidor. Tampoco se puede hablar de una sola harina especial, hay varias harinas especiales cuyas características dependen del acuerdo entre el productor y el consumidor; por ello se encuentran nombres como harinas “prime”, “super prime”, super especiales, “especiales”, “aqua prime”, LT - 94 (en inglés Low Temperature y 94 % de Digestibilidad). (Pastor, 1995).

Una harina de pescado especial es aquella que se produce de una forma especial para una especie particular de animal, para la cual tendrá beneficios especiales. El primer requisito, y quizás el más importante de una harina de pescado especial, es la uniformidad física y nutritiva. El tamaño de las partículas y la fluidez deberán ser constantes de una partida a otra, como también, el contenido de nutrientes deberá ser uniforme (Pike, 1990).

En nuestro país la producción de harina de pescado tipo “Prime” se intensifica hacia el año 1988 por la exigencia en el mercado mundial de harinas de pescado de mayor calidad, comenzando así la implementación de plantas con tecnología moderna de elaboración de harina, principalmente con el uso de secadores indirectos y plantas concentradoras de agua de cola de película descendente, así como de materia prima de óptimo grado de frescura. Actualmente, en nuestro país se encuentran operando 6 plantas modernas para la elaboración de harina de pescado tipo “Prime” (Rojas, 1995).

C. Harina de Pescado para Consumo Humano. - En la actualidad el Grupo De Supervisión de Proteínas, conformado por especialistas de la FAO y el UNICEF, define dos tipos de harina de pescado para consumo humano:

- Grado A: Producto virtualmente libre de olor y sabor, con bajo contenido de grasa (máx. 0.5%) y un contenido mínimo de proteína de

80%.

- Grado B: Producto con mayor contenido de grasa y sin limitaciones específicas de olor y sabor, pero elaborado a partir de pescado fresco y en condiciones técnicas y sanitarias que garanticen su calidad.

## **2.1.6. USOS DE LA HARINA DE PESCADO**

### **a. Alimentación animal**

Desde hace más de 50 años la harina de pescado se emplea como alimento proteínico para la alimentación de cerdos, aves de corral y ganado vacuno (FAO, 1975. Zaldívar, 1996). Igualmente, la harina de pescado tipo “prime” se está empleando en la acuicultura en general, así como en harina para salmones, truchas, langostinos, camarones, anguilas y otro tipo de peces. También, se usa en la alimentación de cerditos precozmente destetados y marranas en gestación, así como para animales de peletería (Rojas, 1995). Es importante mencionar, los estudios realizados por la Universidad Nacional Agraria La Molina; la cual ha promovido ampliamente la investigación sobre análisis de la calidad biológica de la harina de pescado en diversas especies animales como aves de corral, cerdos y vacas. Durante estas pruebas de alimentación se evalúa principalmente a la harina en función a su digestibilidad, el crecimiento del animal y la eficacia del pienso (Pesca, 1962).

En estos estudios se evaluaron niveles elevados de enriquecimiento, los cuales llegaron a 10% en dietas de acabado de pollos de carne y gallinas en producción. Asimismo, en vacunos de carne, dietas con niveles de 23% de harina de anchoveta fueron suministradas hasta el beneficio sin afectar el

sabor de la carne. Estos resultados mostraron la factibilidad de sustituir parcial o totalmente, en las raciones para pollos de carne, la harina de soya por este insumo nacional (Rojas, 1996a).

#### **b. Alimentación humana**

Los organismos internacionales como FAO, OMS y UNICEF han reconocido la importancia del desarrollo de una harina de pescado de buena calidad que permita su uso como un complemento proteínico (FAO, 1961). A principios de 1960, en el Perú se realizó una importante investigación en la alimentación de niños desnutridos menores de dos años de edad con concentrados de proteína de pescado con favorables logros. (Pesca, 1964).

La harina de pescado para consumo humano es de buena calidad organoléptica y alimenticia y de precio moderado. La utilidad de este producto aumenta por el hecho de que nutre adecuadamente en combinación con los cereales - maíz, trigo, arroz, etc.- en proporciones hasta del 5% (Levin, 1964 citado por Del Valle, 1970).

A nivel mundial, los primeros reportes sobre el uso de harina de pescado en la alimentación humana datan del año 1937 en África del Sur, en donde se inició una campaña masiva para complementar la dieta de los habitantes de esa región con harina de pescado. En Alemania, casi simultáneamente, se produjo la llamada “Proteína Viking” en base a la harina de pescado. Esta podía utilizarse en pasteles, tortas, dulces, etc. Poco después se vendió en forma de tabletas. Durante la Segunda Guerra Mundial, se enriqueció el pan con harina de pescado. En el Lejano Oriente, desde tiempos remotos, se muele el pescado seco, se macera y se obtienen condimentos que, según los pescadores de esa región, son muy nutritivos y no perjudican la salud. En

Noruega, se elabora una harina de arenque de óptima calidad con la ventaja de que el sabor es neutro. En los Estados Unidos de Norteamérica las empresas VioBin y Smith han logrado producir harinas de pescado inodoras, insaboras y con un contenido proteico de 80%. En Chile, en la planta experimental de Quintero, la harina de pescado ha sido empleada con éxito en la elaboración de pan y otros alimentos compuestos (Pesca, 1964). Asimismo, en Chile se alcanzaron niveles del 10% de harina de pescado en panes destinados a la alimentación escolar. (Van Veen y Van Veen, 1973).

A principios de 1960, en el Perú se realizó una importante investigación en la alimentación de niños desnutridos menores de dos años de edad con concentrados de proteína de pescado con favorables logros. (Pesca, 1964). Estos estudios fueron realizados por un convenio entre el CINI (Centro de Investigación de Nutrición Infantil), la clínica Anglo-Americana y la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se estudiaron cuatro comunidades rurales, las cuales recibieron fideos enriquecidos con un 10% de harina Vio Bin (Harina de anchoveta con vísceras y cabeza, desodorizada y desgrasada con etanol como solvente). Asimismo, se realizaron estudios con niños malnutridos del CINI a los que se les dio papillas enriquecidas con harina Vio Bin. En el primer estudio, aparte de mejorar el desarrollo físico, se observó una disminución de la mortalidad en el grupo preescolar. En el segundo, el enriquecimiento con harina de pescado fue satisfactorio en la mayoría de los casos de marasmo, no así en el marasmo- kwashiorkor (Ramírez, 1974. Graham et al., 1962. Graham et al., 1963. Graham et al., 1965. Graham et al., 1966. Baertl et al., 1966. Baertl et al., 1970).

Además, en el año 1983 mediante un convenio entre la Universidad Nacional Agraria La Molina y el Instituto de Desarrollo Agroindustrial; se demostró la factibilidad de obtener hojuelas, chizitos y harina precocida, a base de una mezcla de pulpa de merluza y harina de maíz, que demostraron ser productos de buena calidad y aceptabilidad (UNALM-INDDA, 1983).

El Perú tuvo en 1994, una producción de 370 mil toneladas de harina de pescado especial “prime”. Este tipo de harina especial corresponde al concentrado de pescado tipo “B” que se elaboró en Noruega en la década de los 70 con pescado de óptima calidad, procesado entero por el método convencional, pero a bajas temperaturas. Dicho concentrado fue donado a países con problemas de hambruna por intermedio del Programa Mundial de Alimentos.

Por lo tanto, la harina de pescado especial es un insumo adecuado para fortificar los alimentos de consumo masivo tales como los elaborados con harina de trigo. Esta fortificación no sólo provee proteína adicional, sino también un mejor balance de aminoácidos, elevando la disponibilidad de la proteína presente en el alimento fortificado, lo mismo que la tasa de eficiencia proteica (P.E.R.), a niveles comparables a los encontrados en la leche. Algunos de los alimentos fortificados con la proteína de mar pueden ser: Pan de trigo, camotepan, papapan, fideos y pastas en general, galletas dulces y galletas saladas, enriquecidos lácteos, papillas instantáneas, harinas compuestas para sopas, etc. (Rojas, 1996 b).

### **2.1.7. CONTROL DE CALIDAD DE LA HARINA DE PESCADO**

La calidad de las distintas harinas de pescado, como se ha visto en el capítulo anterior, varía de acuerdo a tres factores:

- Materia prima utilizada y su frescura.
- Condiciones del proceso, principalmente de secado.
- Condiciones de almacenamiento.

Una materia prima lo más fresca posible es fundamental para lograr una harina de pescado de alta calidad, sin embargo, el tratamiento térmico aplicado (cocción preliminar, concentración del agua de cola y secado) tiene gran influencia en la calidad final del producto.

La etapa de secado es la que requiere mayores cuidados, ya que la exposición del producto a sobresecado y en ciertos casos a corrientes generosas de aire, influye directamente en la calidad y cantidad de nutrientes, así como en la ausencia de elementos indeseables (Zaldívar, 1995; Au Díaz, 1996 b).

Las proteínas del pescado son muy susceptibles al tratamiento térmico excesivo que puede producir una disminución de su "valor biológico" (fracción proteica utilizada eficientemente en el desarrollo celular) debido a una desnaturalización y destrucción parcial de algunos aminoácidos esenciales, particularmente de lisina y metionina. En consecuencia, la capacidad de promover el crecimiento de dicha harina disminuye correlativamente, lo cual resulta importante en el caso que la harina de pescado se utilice para cubrir deficiencias de estos aminoácidos en cereales (Bertullo, 1975; Zaldívar, 1995).

Muchas veces, la pérdida de aminoácidos debido al calentamiento excesivo de la harina va seguida de la formación de compuestos tóxicos, como puede ser la síntesis de "mollerosina", causante del vómito negro de las aves (Au Díaz,

1996b). Asimismo, las altas temperaturas y la presencia de aire, en el caso de la materia grasa, incrementan las reacciones de oxidación, con aumento del índice de peróxidos y formación de compuestos tóxicos derivados de los lípidos (Zaldívar, 1995).

Por lo tanto, la temperatura y el tiempo de los tratamientos térmicos aplicados, son dos parámetros fundamentales a controlar durante la elaboración de harina de pescado y, obviamente, es necesario trabajar a temperaturas lo más bajas posibles y acortar al máximo los tiempos de calentamiento para lograr la mejor calidad nutricional de la harina, siempre y cuando se parta de una materia prima fresca.

#### **a. Calidad físico química**

La calidad fisicoquímica de la harina está representada por el contenido bruto de los componentes que forman su composición proximal: humedad, proteínas, lípidos y cenizas. Se asume que la sumatoria de estos cuatro componentes brutos equivale al 100% de la muestra, debido a que el contenido de carbohidratos es despreciable para efectos de formulación de raciones. Además, la calidad fisicoquímica incluye otros nutrientes de interés como sales minerales y vitaminas que generalmente no se determinan debido a que sus contenidos son muy estables (Au Díaz, 1996b).

La valoración del contenido de proteínas totales, humedad, grasa, cenizas, cloruros y arena debe ser rutina del laboratorio de las plantas elaboradoras de harina de pescado, ya que son exigidos como norma general del mercado.



### **a.1. Proteína total**

La harina de pescado se caracteriza principalmente por su elevado contenido proteico, por lo cual su valor comercial está determinado básicamente por el resultado del análisis de este componente. Su contenido medio es del 65%, mientras que las harinas de cereales (trigo, avena, cebada, etc.) suelen contener sólo un 10-12% de proteína y la de soja alrededor del 45% (Madrid, y colab, 1995).

El contenido proteico se puede medir indirectamente, a partir del contenido de nitrógeno total, multiplicando este valor por 6,25 (factor de conversión de nitrógeno total a nitrógeno de proteína animal). Es decir que se determina el valor de "proteína bruta", que resulta exacta siempre que no existan grandes cantidades de nitrógeno no proteico (corno urea, cuando se emplean especies de Elasmobranquios), ya que la mayor parte del nitrógeno de los alimentos se encuentra formando parte de las proteínas (Au Díaz, 1996 b). Esta determinación suele realizarse según el método de Kjeldhal, el cual se basa en la conversión del nitrógeno orgánico en inorgánico por digestión con ácido sulfúrico. El sulfato amónico se diluye, se alcaliniza y el amoníaco liberado se destila y valora (IFOMA, 1998).

Los valores de proteína bruta proporcionan información acerca del nitrógeno existente en un alimento, pero no señala su utilidad para los animales, por lo tanto, es necesario conocer la fracción de "proteína bruta digerible" de la harina para conocer la proporción realmente aprovechable, lo cual se comenta con detalle más adelante.

### **a.2. Proteína soluble**

La solubilidad de la proteína es de suma importancia, dado que está relacionada con la mayor absorción de la fracción proteica de la harina y por tanto con su aprovechamiento. Dependiendo de los procesos productivos, los fabricantes de piensos requieren de mayores o menores cantidades de cada tipo de proteína. Por ejemplo, en el caso de alimentos para rumiantes se busca trabajar con bajos contenidos de solubles, en lo posible inferiores al 20% sobre el total proteico para favorecer el mejor aprovechamiento de la proteína e impedir su destrucción en el rumen. Para el caso de los Salmónidos, se busca que la harina contenga una parte importante de solubles, entre 25 y 33% y para la alimentación de camarones se busca un contenido intermedio de solubles, de alrededor del 20% (Zaldívar, 1994 a).

La medición del contenido de proteína solubles de la harina se puede realizar también por Kjeldahl, previa disolución en agua de la fracción soluble de la harina y a través de esta medición se puede diferenciar una harina común que sólo contiene un 6-7% de nitrógeno acuoso-soluble, de una harina integral que contiene 18-20% de esta fracción (Ferrando Grasso, 1973).

### **a.3. Lípidos**

Los lípidos tienen gran importancia en la alimentación animal desde el punto de vista energético, sin embargo, el alto costo de la harina de pescado no permite que ésta sea utilizada como fuente de energía, sino proteica (Au Díaz, 1996 b).

Se considera como grasa al material extraído de la harina mediante un solvente orgánico (generalmente hexano). El contenido de lípidos deseado en la harina suele especificarse por contrato y generalmente no debe superar el 7-10 %, debido a que se enrancian fácilmente y pueden llevar a la descomposición global del alimento. Además, un alto porcentaje de lípidos (12-18%) puede transmitir mal olor a la carne de los animales que la utilizan como pienso. En consecuencia, por razones de seguridad y para evitar problemas por oxidación, suele especificarse un contenido mínimo de antioxidantes en la harina, comúnmente 100 ppm, al momento del embarque (Cood y Zaldívar, 2000).

Asimismo, la presencia de antioxidantes en la harina debe ser lo más baja posible al momento de su utilización, para prevenir posibles complicaciones en la alimentación de los animales, principalmente en alimentación acuícola donde las formulaciones suelen incluir alta proporción de harina (Zaldívar, 1994 a; Madrid *et al.*, 1995). La composición de los lípidos de la harina de pescado se caracteriza por presentar altos niveles de ácidos grasos de cadena larga y poliinsaturados Omega 3 (003) principalmente DHA (Ácido Docosaheptaenoico, 22:6) y EPA (Ácido Eicosapentaenoico, 20:5) (Pike, 1999).

#### **a.4. Humedad**

El porcentaje de humedad de la harina de pescado varía generalmente entre 6 y 10% Y cifras superiores al 12%, pueden generar una actividad de agua tal que permita la actividad microbiana y

enzimática, con posible descomposición del producto que puede producir calentamiento y putrefacción, mientras que humedades inferiores al 6% generan la posibilidad de destrucción parcial de las proteínas y lípidos. De manera que es indispensable un adecuado control de humedad después de cada etapa de secado y una humedad final del 10% corresponde a una actividad de agua óptima para que las reacciones señaladas sean mínimas (Au Díaz, 1996 b; Cood y Zaldívar, 2000). El contenido de humedad de la harina de pescado se puede determinar por desecación en estufa a 103°C por 4 horas, según el método estándar internacional ISO 6494 recomendado por IFOMA (1998).

#### **a.5. Cenizas**

Las cenizas constituyen la fracción inorgánica de la harina, aportan sales minerales y arena. La arena proviene del intestino de los peces y de la movilización de la pesca de agua de mar cercana a la costa, mientras que las sales minerales corresponden mayoritariamente a la fracción ósea de la materia prima y su contenido en la harina varía dependiendo de:

- Proporción muscular-ósea de la materia prima: los pescados flacos y magros dan harinas de mayor contenido en cenizas, lo cual explica el menor contenido proteico en las harinas obtenidas de estas especies (Au Díaz, 1996 b). Las harinas de pescado blanco, como merluza, suelen contener un 20% de cenizas, mientras que las de pescados grasos como anchoveta y arenque suele contener un 15% y 10%, respectivamente (Madrid y colab., 1995).

- Las harinas obtenidas de residuos de fileteado o conservas (cabeza, cola, espinas, piel), contienen mayor cantidad de cenizas que las de pescado entero, compuestas principalmente por fosfato de calcio (Windsor y Barlow, 1983; Anderson y colab., 1993).
- Las materias primas degradadas (viejas) dan harinas de alto contenido de cenizas debido a que en los procesos de degradación parte de los sólidos insolubles presentes se hacen solubles y se escurren en el almacenamiento de la materia prima, de modo que disminuye el rendimiento del proceso productivo, se obtiene una harina de menor contenido proteico y, por tanto, aumenta el porcentaje de cenizas (Tanikawa, 1985; Au Díaz, 1996 b).
- Cuando se produce "quemado de la harina" por sobre calentamiento, aumenta el porcentaje de cenizas en la harina y disminuye la fracción proteica (Barlow y Windsor, 1984). El calcio y el fósforo son los minerales más importantes y resultan esenciales en la alimentación animal para el desarrollo de los huesos, cáscara de huevos, etc. La presencia de selenio también es de importancia para la incorporación de harinas de pescado en la formulación de alimentos balanceados, ya que las harinas de origen vegetal son pobres en este elemento (Madrid y colab., 1995).

La determinación de cenizas totales en la harina de pescado se puede realizar, según el método AOAC 18.008, por incineración de la harina a 550°C (Hart y Fisher, 1991).

- **Fósforo**

El fósforo es un componente esencial en la materia viva, especialmente cuando está presente en su forma orgánica. Es un elemento importante como tal, así como por su asociación con el calcio para formación de las partes óseas. Participa directamente en funciones vitales en el metabolismo energético, en la formación de fosfatos de azúcares, etc. Sin embargo, la importancia de su determinación tiene que ver principalmente con restricciones legales propias de cada país y/o intereses ecológicos, debidos a que el exceso de desechos producidos en criaderos de peces de agua dulce o salada, donde la circulación de agua es restringida, puede causar graves riesgo de contaminación ambiental debidos al fósforo no digerido (Au Díaz, 1996 b). El fósforo y el nitrógeno excretados por los peces son contaminantes potenciales producidos por los alimentos y en este caso, producidos por una digestibilidad deficiente de estos componentes de la harina de pescado. El fitoplancton puede asimilar el fósforo que aparece en las aguas incluso muy por encima de sus necesidades propias, sobre todo en las zonas de las aguas superiores atravesadas por la luz se puede producir un fuerte crecimiento de algas en presencia de alimentación rica en fósforo.

De esta manera, puede ocurrir que aguas que en un momento dado tenían oferta limitada de nutrientes, al recibir mayores

cantidades de éstos, pasen de un estado oligotrófico a un estado eutrófico. Es decir que, la descomposición del exceso de materia orgánica produce una gran disminución de la concentración de oxígeno en las aguas profundas y favorece los procesos de putrefacción, que traen como consecuencia un cambio en el equilibrio biológico del ecosistema (Bertullo, 1975; Margalef, 1977). En el caso de los animales de tierra, el suelo puede absorber positivamente el exceso de estos elementos excretados hasta límites convenientes por lo que la situación es menos crítica (Au Díaz, 1996 b). Una harina de pescado de buena calidad debe tener menos del 10% de fósforo o ácido fosfórico, el cual se puede medir por colorimetría (Au Díaz, 1996 b)

- **Cloruros (Sal)**

El contenido de sal en la harina debe ser lo más bajo posible, ya que el comprador no está dispuesto a pagar cloruros a precio de harina de pescado, pero, además, generalmente se admite un límite máximo del 5% o menor debido a que un exceso de sal en la dieta resulta peligroso para la alimentación animal, pudiendo ocasionar desarreglos osmóticos que pueden provocar diarrea en el caso de las aves (Windsor y Barlow, 1983; Basso y Vieites, 1995).

Por lo tanto, el contenido de sal debe reflejar exclusivamente las cantidades presentes en la materia prima y un aumento

podría deberse al uso de compuestos clorados para mejorar la coagulación de la materia prima (Ferrando Grasso, 1973).

La determinación de cloruros se basa en la consideración de que todos los cloruros presentes en la harina capaces de disolverse en agua se encuentran formando NaCl y su valoración se puede realizar combinándolos con plata, por métodos volumétricos, como puede ser el método de Volhard (Semapesca, 2000).

- **Arena**

La arena constituye la parte de las cenizas insolubles en ácido. Al igual que la sal su determinación es de interés comercial, por lo que su contenido debe ser lo más bajo posible, una harina de alta calidad no suele tener más del 1% de arena (Au Díaz, 1996b).

**a.6. Vitaminas**

La harina de pescado es una fuente rica en vitaminas del grupo B, cuya composición media es la siguiente:

Cuadro 6: Composición media vitamínica de la harina de pescado

Vitaminas	ppm
B12	0.06 - 0.25
Riboflavina (B2)	5.0 - 7.3
Ácido Pantoténico (B3)	9.0 - 30.0
Biotina	0.1 - 0.4
Niacina	50 - 125
Ácido fólico	0.15 - 0.5
Colina	4400

FUENTE: DOLORES SILVA ORTIZ (2003)



Según Ferrando Grasso (1973) estas vitaminas muestran gran estabilidad frente a los procesos de elaboración de la harina. Durante la cocción y el prensado, por ser acuosolubles, gran parte pasa al licor de prensa.

Por tanto, una harina que no contenga agua de cola, pierde gran parte de su aporte vitamínico. El secado las afecta poco, dependiendo de los tiempos de exposición, y no se producen pérdidas durante el almacenamiento de la harina. Respecto a las vitaminas liposolubles, el mismo autor destaca que, casi no están presentes en la harina, dado que se van con el aceite que se extrae por prensado y sólo las harinas grasas aportan algo de vitamina D mientras que la A se encuentra ausente. El alto contenido de colina permite que no sea necesario corregir esta vitamina cuando se preparan piensos con harina de pescado (Madrid y colab., 1995).

#### **a.7. Granulometría**

El tamaño de las partículas de harina es una propiedad física de la harina de gran importancia para la preparación de pellets. Estos requieren partículas de mínimo tamaño, especialmente cuando se preparan alimentos para peces en los inicios de vida y en menor escala para pollitos. Por lo que una granulometría inadecuada, implica mayores gastos energéticos para el fabricante de alimentos que debe molerlos. Es decir que esta determinación es principalmente de interés comercial. La medición consiste en un tamizado de la harina en mallas de distintos diámetros de abertura (de 1,2 y 4 rnm) de tal forma de

cuantificar las retenciones (%) por cada una de ellas (Au Díaz, 1996 b).

#### **a.8. Color y Olor**

El color y el olor de la harina de pescado son dos propiedades físicas de interés que suelen evaluarse sensorialmente. Una harina de pescado entero y fresco, recién hecha, tiene un color marrón-verdoso, que se toma marrón por oxidación. Un color muy oscuro, negruzco, puede ser resultado de un sobrecalentamiento de la harina durante su producción o almacenamiento, en especial si va acompañado de olor a quemado (Barlow y Windsor, 1984).

El olor típico a pescado en la harina, es producto de oxidaciones y puede acentuarse cuando se trabaja con materia prima en descomposición, cuando no está bien elaborada y/o almacenada (Ferrando Grasso, 1973). Asimismo, el olor y color se acentúa cuando se elabora harina a partir de residuos y cuando se procesan peces con alto contenido graso o músculo rojo (Tanikawa, 1985).

#### **b. Calidad bioquímica**

La calidad bioquímica está directamente relacionada con la calidad nutricional de la harina de pescado, es decir, la calidad real o aprovechamiento integral de sus componentes químicos, determinados como componentes brutos.

Por lo tanto, la calidad bioquímica brinda información acerca de la composición amino-acídica de las proteínas, de los ácidos grasos presentes y su estado de oxidación, contenido de aminas biógenas, bases volátiles, etc.

La medición de los componentes que hacen a la calidad bioquímica de la

harina es de gran importancia para el fabricante de alimentos que utiliza harina de pescado en la formulación y tiene carácter netamente nutricional.

### **b.1. Calidad proteica**

Los aminoácidos que forman las proteínas son los que determinan el valor real éstas. Por tanto, para que las proteínas de la harina sean de buena calidad deben preservar su perfil de aminoácidos y en condiciones adecuadas para ser utilizadas en la alimentación animal.

Las proteínas de la harina de pescado tienen una digestibilidad elevada y un alto valor biológico, del 80% mientras que el de una harina de soja es del 68% (FAO, 1970). Sin embargo, realizar un análisis de los aminoácidos que forman las proteínas de una determinada harina no es definitorio de la calidad proteica de esa harina, debido principalmente a las limitaciones impuestas por la digestibilidad. Puede suceder que un aminoácido presente en la harina se libere por hidrólisis analítica "in vitro" de la proteína y sea valorado, pero que el mismo no sea liberado por digestión fisiológica o esté en forma no utilizable. Por lo tanto, para evaluar la calidad nutritiva de las proteínas, se debe conocer la digestibilidad y disponibilidad de los aminoácidos (FAO, 1970).

#### **- Digestibilidad**

Si los aminoácidos que forman las proteínas no son digeribles, tampoco son aprovechados por el organismo que las ingiera. La digestibilidad de una proteína constituye entonces una excelente medida de su calidad nutritiva y disminuciones de la

digestibilidad estarían indicando tratamientos térmicos (secado principalmente) poco controlados (Au Díaz, 1996 b).

La buena o mala digestibilidad, se puede medir "in vitro", generalmente por el método denominado Torry Modificado (variación del método Torry tradicional), que consiste en someter la proteína a una digestión artificial por acción de la pepina (enzima que se encuentra en el estómago de los animales y el hombre) y posterior valoración de la proteína residual. Para una harina de muy buena calidad corresponden valores superiores al 94% de digestibilidad por pepsina. También se puede utilizar métodos "in vivo", empleando animales tales como visones, ratones y truchas, donde se mide el grado de digestibilidad (porcentaje asimilado) cuantificando las proteínas aportadas por la dieta y las excretadas por el animal.

Este método resulta más representativo que el primero y, en general, una buena digestibilidad es del 90% en visones y del 92% en truchas (Anderson et al, 1993; Zaldívar, 1994 a y 1995). Ensayos de digestibilidad por pepsina realizados por Moreno et al. (1967) en Mar del Plata, sobre la harina elaborada con diferentes especies, mostraron que la harina de pescado almacenada durante 90 días experimenta una pérdida de digestibilidad debida al envejecimiento y han sugerido que podría deberse a la formación de finas películas de lípidos oxidados y polimerizados que impiden el acceso de la enzima

a los sitios de ataque. Además, vieron que esta pérdida de digestibilidad es mayor en harinas elaboradas con peces grasos que en harinas de peces magros.

Cabe destacar que una digestibilidad deficiente también podría ocasionar problemas importantes de contaminación al ser eliminados al medio ambiente excretas con alto contenido de nitrógeno y fósforo, principalmente en alimentación acuícola (Au Díaz, 1996 b).

- **Lisina disponible**

Un aminoácido puede permanecer constante a lo largo de todo el proceso de reducción, lo cual no significa que esté disponible como elemento nutritivo. El contenido de lisina en la harina depende directamente del valor presentado en la materia prima, sin embargo, por ser un aminoácido termolábil muchas veces se encuentra en forma no disponible, con su grupo amino de la cadena lateral bloqueado, lo cual está directamente relacionado con la pérdida de su valor nutritivo (Moreno et al., 1967; Primo Yúfera, 1998).

La valoración de lisina disponible en la harina, al igual que la digestibilidad, permite medir el grado de deterioro proteico causado por tratamiento térmico inadecuado. Asimismo, se considera que cualquier posible efecto adverso del calor por el proceso de secado, afecta de igual forma a la metionina (Windsor y Barlow, 1983).

Esta determinación puede hacerse por ensayos biológicos, por aumento comparativo del peso de un lote de ratas o pollos, o por el crecimiento del microorganismo *Tetrahimena piriformis* W. También pueden realizarse por métodos químicos, más rápidos, que dan una buena aproximación a los biológicos. El método químico más comúnmente utilizado se basa en la reacción del grupo E-amino de la lisina con el reactivo flúor dinitro benceno (FDNB) y posterior determinación por colorimetría (Barlow y colab., 1984; Primo Yúfera, 1998).

Según ensayos realizados por la FAO (1970) por procedimientos biológicos, de disponibilidad de lisina, metionina y triptófano en distintas harinas, se vio que la harina de pescado y la de soja tienen disponibilidad de estos aminoácidos comparable, siendo de 93, 97 y 103 respectivamente para la harina de pescado y de 90, 101 y 103, para la de soja; mientras que la harina de carne presenta menor disponibilidad, 86, 75 y 77 para estos mismos aminoácidos. Además, se comprobó que la indigestibilidad de aminoácidos es la causa principal de esta menor disponibilidad en la harina de carne.

#### **b.2. Nitrógeno básico volátil (NBV)**

Cuantifica las bases nitrogenadas, trimetil-amina, dimetil-amina, monometil-amina y amoníaco, producidos durante el proceso de deterioro del pescado. Es una medida de deterioro del pescado, ya sea por acción microbiana o enzimática durante el almacenamiento de la

materia prima y/o acción bacteriana sobre los solubles durante el proceso. Es decir que el NBV informa sobre la frescura de la materia prima y de los solubles adicionados a la torta de prensa (Au Díaz, 1996b).

La determinación de NBV se puede realizar según el método AOAC 920.03, recomendado por IFOMA (1998), el cual se basa en el arrastre de las bases volátiles con vapor de agua en medio básico, con MgO. Luego se valora el nitrógeno presente por el método tradicional de Kjeldalh. Una harina de pescado de buena calidad debe tener como máximo entre 100 Y 150mg/100g de nitrógeno en el análisis de NBV (Au Díaz, 1996 b), para lo cual será necesario que este valor no exceda los 50 mg de NBV/100g en la materia prima que es recepcionada (Zaldívar, 1995).

### **b.3. Histamina**

La histamina es una amina biógena proveniente de la descomposición de histidina libre. La determinación de histamina en la harina proporciona un índice bastante correlacionable con el grado de deterioro de la materia prima. También, es un índice de frescura de los solubles incorporados, ya que la histidina y la histamina son compuestos de alta solubilidad en agua y gran parte de estos componentes se separan con el agua de cola luego del prensado del pescado. Por esta razón, el contenido de histamina será menor en una harina en la que no se hayan adicionado los solubles de pescado que en una harina completa (Tanikawa, 1985). Esta determinación es también de importancia por los efectos patógenos que puede producir

la histamina en los animales que consumen dosis importantes en sus dietas.

- Toxicidad de la histamina: La intoxicación por histamina está asociada con el desarrollo de reacciones alérgicas y la severidad de la intoxicación está relacionada con la cantidad de esta amina ingerida, la sensibilidad del consumidor y se cree que también podría influir la presencia de otros compuestos generados por acción bacteriana, que actúan como "potenciadores de toxicidad". Entre los posibles potenciadores están la trimetilamina, el óxido de trimetilamina y otras aminas biógenas (Albrecht Ruiz y Salas Maldonado, 2001).

Todavía no se ha establecido la dosis tóxica mínima de histamina para humanos, pero en la mayoría de los casos el nivel encontrado en pescados asociados a esta intoxicación es por encima de las 200 ppm y más comúnmente por encima de 500 ppm (Yeannes, 1995; Albrecht Ruiz y Salas Maldonado, 2001).

Respecto a la harina de pescado, los valores de histamina superan las 1000 ó 1500 ppm, en una harina común, mientras que una harina de alta calidad contiene menos de 500 ppm de histamina (Zaldívar, 1992; Au Díaz, 1996 b). Sin embargo, al evaluar el contenido de histamina en una harina, es importante considerar el aporte de esta en la masa total del alimento a consumir; así la harina de pescado que aporta un 10% en la preparación de un alimento balanceado, sólo aportará un décimo en la dieta del animal que la consuma. Es decir que, si la harina contiene 250 ppm de histamina, el alimento tendrá sólo 25 ppm (Albrecht Ruiz y Salas Maldonado, 2001).



Por otro lado, si bien hay una relación directa entre la aparición de la intoxicación y la presencia de altas concentraciones de histamina, aún no se conoce con precisión el agente causal en sí de esta intoxicación y considerar la histamina como único indicador de toxicidad no resulta arbitrario, ya que existen otras aminas biógenas y aún más tóxicas que la histamina e incluso una determinada amina biógena puede tener distinta acción sobre una especie y otra, por ejemplo, la histamina puede ser más tóxica en la alimentación de peces que en la de cerdos (Zaldívar, 1992).

~ Control de la formación de histamina en la harina de pescado:

La formación de histamina y de otras aminas biógenas debe controlarse fundamentalmente en el pescado crudo, ya que, tanto las enzimas formadoras de histamina como las bacterias pueden ser inactivadas por cocción, pero una vez que la histamina está formada no es posible eliminarla dado que es altamente termoestable. El desarrollo de aminas biógenas después de la cocción es poco frecuente y si se produce es por falta de higiene.

Entonces, para prevenir el crecimiento bacteriano y acción de la histidina decarboxilasa en la materia prima es determinante el rápido enfriamiento del pescado después de su muerte, así como su almacenamiento a baja temperatura antes de ser procesado (Albrecht Ruiz y Salas Maldonado, 2001). Como medida de control, es indispensable determinar la frescura de la materia prima midiendo el NBV, tanto en la recepción de ésta como al inicio del procesamiento (entrada al cocedor). Asimismo, el control de histamina debe

realizarse también cuando se utiliza agua de sangre en los procesos de fabricación y la misma debe retirarse rápidamente de la masa del pescado y enfriarse de inmediato, para evitar la formación de grandes cantidades de histamina (Zaldívar, 1992). En cuanto a las restantes etapas del proceso de elaboración, puede ser altamente peligrosa la manipulación y procesamiento del agua de cola, donde se dan las condiciones ideales para la descomposición de la parte proteica y formación de aminas biógenas, por esta razón se recomienda que los almacenamientos intermedios entre la etapa de prensado y de concentración, sean lo más corto posibles. Durante la etapa de secado sólo la falta de higiene podría generar la formación de aminas biógenas, ya que el producto entra con una concentración del 50 % de sólidos y el calor aplicado en los secaderos detiene cualquier proceso de descomposición. Con respecto al producto terminado, una humedad en la harina que no supere el 10%, asegura una actividad de agua tal que impide la acción de microorganismos y enzimas, sin embargo, un almacenamiento prolongado de la misma, en contacto con aire de humedad relativa elevada, podría generar una reiniciación de la actividad bacteriana y consiguiente formación de aminas biógenas (Zaldívar, 1992).

Existen varios métodos que permiten determinar el contenido de histamina como, métodos colorimétricos, enzimáticos, inmunológicos, fluorométricos y cromatográficos, entre otros, pero sólo los dos últimos son oficialmente aceptados (Semapesca, 2000; Alberecht Ruiz y Salas Maldonado, 2001).

#### **b.4. Aminas biógenas**

La acción negativa de las distintas aminas biógenas es todavía muy discutida. Según Zaldívar (1992 Y 1994a) algunas de ellas como la cadaverina, putrescina y agmatina, son transformadas en el tracto gastrointestinal, sin presentar incidencia negativa sobre el metabolismo animal e incluso la agmatina puede tener efectos beneficiosos en la digestión, mientras que otras como la histamina, la tiramina y la feniletilamina pueden ser nocivas, según las cantidades en que se encuentren presentes, ya que son aminas no sensitivas a la catálisis con aminoxidasas. Por esta razón, resulta adecuada la determinación de un indicador que considere diferentes aminas biógenas y que muchas veces es solicitado por el comprador. El Índice de Aminas Biógenas (BAI) de la harina de pescado, es un índice que considera la incidencia de diferentes aminas biógenas de acuerdo a su toxicidad, dando mayor valoración o incidencia a la tiramina, feniletilamina e histamina y menor a las que no inciden en el metabolismo animal como, cadaverina y putrescina. Además, tiene en cuenta la cantidad de proteína presente en la harina de pescado.

$$\text{BAI} = \text{Pu} + \text{Ca} + 10 \text{ Hi} + 20 \text{ Ty} + 10 \text{ Ph} \quad \% \text{ Proteína cruda}$$

#### **b.5. Calidad lipídica**

La alteración de la materia grasa puede ser biológica, como ya se ha señalado, originada por microorganismos y enzimas o química, originada por acción química del oxígeno. La primera tiene lugar fundamentalmente durante el almacenamiento de la materia prima, ya que por acción del calor los microorganismos y enzimas son

destruidos, mientras que la autooxidación podría considerarse la única causa de enranciamiento de las grasas anhidras, debido a la falta de agua en la harina para el crecimiento microbiano.

- **Acidez libre**

Es un índice de frescura de la parte lipídica de la harina y da una pauta de la descomposición total del producto. Mide el grado de descomposición lipolítica o hidrólisis que han sufrido los lípidos, es decir la formación de ácidos grasos de menor peso molecular.

Un nivel alto de acidez libre en la harina indica que el producto se ha elaborado a partir de materia prima alterada (Zaldívar, 1994 a; Au Díaz, 1996b).

La acidez de la materia grasa se valora por titulación del extracto graso de harina con solución de NaOH y se expresa como "acidez libre" o "Free Fatty Acid" (FFA), expresados en % de Ac. Oléico, cuyo resultado no debe exceder el 15% (Sernapesca, 2000).

- **Calidad Microbiológica**

La calidad microbiológica de la harina de pescado se puede medir de acuerdo a la presencia y/o recuento de: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia Coli*, Hongos y *Aspergillus*. Asumiendo que la pesca por muy deteriorada que esté es esterilizada por cocción y nuevamente calentada en el secador, no deberían existir problemas de contaminación en el producto final.

Sin embargo, el transporte de la harina dentro de la planta, principalmente en las etapas posteriores al secado, no está exento al riesgo de contaminación, debido al manipuleo de la harina por parte del operador, equipos mal lavados, programas de saneamiento y desinfección mal implementados o inexistentes.

Asimismo, las malas condiciones de almacenamiento de la harina, sobre todo en galpones a granel, el transporte y desembarco en puerto, pueden llevar a situaciones de alto riesgo de contaminación microbio lógica para la harina. Los estándares microbiológicos de la harina de pescado empleada en la alimentación animal, generalmente aceptados en el mercado internacional son los siguientes:

Cuadro 7: Características microbiológicas de la harina de pescado

Calidad Microbiológica	U.M.	LIMITES
<i>Salmonella spp.</i>	-	Ausencia en 25 g (n=5, c=0, m=0, M=0)
<i>Shigella</i>	-	Ausencia en 25 g (n=5, c=0, m=0, M=0)
Enterobacterias Mesófilas	UFC/g	n = 5, c = 2, m = 10/g, M= 300/g.
Hongos y Levaduras	UFC/g	< 10
<i>Escherichia Coli</i>	NMP/g	< 3
<i>Aspergillus</i>	-	Negativo

FUENTE: AU DÍAZ, 1996

Leyenda:

$n$  = número de unidades que integran la muestra

$m$  = Valor de umbral del número de bacterias, el resultado se considerará satisfactorio si el número de bacterias en una ó más unidades no excede de  $m$ ;

$M$  = valor máximo de número de bacterias, el resultado se considerará insatisfactorio si el número de bacterias en una o más unidades de la muestra es igual ó superior a  $M$ ;

$c$  = número de unidades de la muestra cuyo recuento de bacterias pueden situarse entre  $m$  y  $M$

La muestra sigue considerándose aceptable si el recuento de bacterias de las demás unidades de la muestra es igual o inferior a “ $m$ ”.

Los microorganismos señalados, la Salmonella es el más indicativo y exigido por los controles sanitarios internacionales, ya que es un microorganismo patógeno causante de enfermedades transmitidas por alimentos en hombres y animales (Zaldívar, 1994 b).

### **c. Calidad comercial de las harinas de pescado**

Existen diversas clasificaciones comerciales de la harina de pescado según se tome como base la materia prima utilizada, el país de origen, el tratamiento térmico aplicado o el contenido total de lípidos. Así

encontramos, por ejemplo, la harina de una sola especie, como "100% jackmackerel" (jurel), "100% menhaden" (lacha), o mix de especies como "mix pelágicas", "mix demersales", etc. También se encuentran harinas que hacen mención al lugar de origen como las "SouthChile", "Taiwan", "Thailand" o al tratamiento térmico recibido, como las harinas "LT" (LowTemp) o "Standard Steam" (secadas al vapor).

Otras harinas toman como base de referencia el contenido total de lípidos, distinguiendo las harinas de pescado "magras", como harinas de bacalao, merluza y especies afines, de las harinas de pescado "grasas", como harinas de arenque, sardina, atún, etc. (Basso y Vieites. 1995; Ferrando Grasso, 2002).

En la siguiente tabla 8, se observa un ejemplo de clasificación de distintos tipos de harina elaboradas en una fábrica de harina de pescado peruana, la cual divide su producción en tres calidades de acuerdo a distintos parámetros de calidad.

Cuadro 8: Clasificación de la harina según su calidad

REQUISITOS	SUPER PRIME	PRIME	ESTÁNDAR
Proteínas (%)	≥76 mín.	≥68 mín.	≥65 mín.
Grasa (%)	6 máx.	12 máx.	14 máx.
Humedad (%)	10 máx.	10 máx.	10 máx.
Cenizas (%)	16 máx.	17 máx.	18 máx.
TBVN (mg/100gr)	100 máx.	120 máx.	-
Cloruros (%)	2.5 máx.	2.5 máx.	>2.5
Sal y Arena (%)	4 máx.	4 máx.	5 máx.
Etoxiquin (ppm)	150 mín.	150 mín.	150 mín.
Histamina (ppm)	500 máx.	1000 máx.	-
Digestibilidad (%)	94 mín.	94 mín.	-

LIBRE DE *SALMONEILA* Y *SHIGEILA*. FUENTE: EL GOLFO, 2002

## 2.2. GENERALIDADES DEL CONCENTRADO PROTEICO

### 2.2.1. DEFINICIÓN DEL CONCENTRADO PROTEICO

Para la AAFCO (2000), el concentrado es un alimento combinado con otro para mejorar el balance nutritivo del producto y que será posteriormente diluido y mezclado para producir un suplemento o un alimento completo.

El concentrado proteico puede definirse como el producto estable resultante de pescado fresco apto para consumo humano, en el cual se ha concentrado la fracción proteica mediante la disminución del contenido de humedad y lípidos. (Windsor y Barlow, 1984).



El concentrado proteico de pescado (CPP), es una preparación estable de pescado pensada para el consumo humano, en donde la proteína se encuentra más concentrada que en el pescado original (FAO, 2001a).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define tres tipos de CPP:

- **Tipo A:** polvo inodoro e insípido que contiene un máximo total de grasa de 0,75 por ciento.
- **Tipo B:** polvo que no contiene límites de olor o sabor, pero que definitivamente mantiene un sabor a pescado con un máximo contenido de grasa de 3 por ciento.
- **Tipo C:** una harina de pescado normal producida bajo condiciones de higiene satisfactorias.

No obstante, existen otros tipos de FPC diferentes a la harina de pescado, producidos a partir de hidrolizados proteicos de pescado mediante enzimas u otros químicos, concentrando el producto en un extracto o pasta (FAO, 2001a).

### **2.2.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS PROTEICOS**

La idea de elaborar concentrados proteicos de pescados (CPP) se desarrolló como una alternativa para obtener un producto que pudiese ser destinado a grupos sociales con carencias nutricionales en su ingesta, de cantidad y calidad, de proteínas (Pigott y Trucker, 1994). Los métodos de obtención de CPP se pueden dividir en:

- a) *Físicos.* Se basan en la separación de agua y lípidos de los sólidos del pescado por acción mecánica (prensado hidráulico o mecánico o centrifugación) en pescado crudo, molido o cocido, posterior secado, molienda y envasado del producto (Bertullo, 1989).

b) *Químicos*. Mediante el uso de solventes se extraen agua y lípidos. Los solventes más utilizados son etanol, propanol, isopropanol y butanol. El proceso consiste en molienda de la materia prima, extracción de agua y lípidos con el solvente, centrifugación, secado al vacío, molienda y envasado (Windsor y Barlow, 1984).

c) *Enzimático*. Se utilizan enzimas proteolíticas (v. gr. Bromelina. Papaína, pepsina, tripsina) para la obtención del producto. El método comprende molienda de la materia prima, adición de la enzima, digestión a temperatura y pH controlados, filtración o tamizado del digerido, pasteurizado, secado al vacío y envasado del hidrolizado (Pigott, 1994).

### 2.2.3. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DEL CONCENTRADO PROTEICO

La Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano: 6.2 Criterios microbiológicos, dice: Los alimentos y bebidas deben cumplir íntegramente con la totalidad de los criterios microbiológicos correspondientes a su grupo o subgrupo para ser considerados aptos para el consumo humano:

Cuadro 9: Productos hidrobiológicos deshidratados (concentrados proteicos, harinas y otros de consumo humano)

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Mohos	2	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Levaduras	2	3	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Enterobacteriaceas</i>	5	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia/25g	

FUENTE: R.M. N°591 - MINS/DIGESA, 2008

## **2.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Los métodos para la separación de componentes más valiosos como terpenos y ésteres, toman ventaja de la variación de la solubilidad de las fracciones en un solvente en particular, como puede ser alcohol acuoso. El método frío, tiene la desventaja de ser lento y requerir más trabajo; sin embargo, necesita equipo simple y poca energía es requerida para la separación básica (Fernaroli s, 1975). Ya que la solubilidad depende de la temperatura, la temperatura de la extracción debe ser controlada; por otro lado, el proceso caliente tiene la ventaja de ser mucho más rápido, no obstante, requiere de mayores cantidades de energía y equipo más sofisticado para su operación, sobre todo en el control de temperatura, parámetro determinante para la extracción adecuada de los componentes deseados, debido a que algunos de estos componentes pueden presentar propiedades termo sensibles.

### **2.3.1. TIPOS DE EXTRACCIÓN**

#### **a. Extracción acuosa**

Eliminación con agua. Se refiere a un producto al cual las sustancias solubles le han sido eliminadas. (FAO, 1989.)

#### **b. Extracción con solventes**

En este método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. (Martínez, 2003).

Los disolventes derivados del petróleo, como éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos y al

contacto con la piel, y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. Los extractos obtenidos con este tipo de disolventes suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. El disolvente con el aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o a vacío. Los restos de disolventes deben separarse a temperatura baja (Ortuño, 2006).

#### **b.1. Método Soxhlet**

Es el más ampliamente utilizado, usa una extracción sólida- líquida en un aparato llamado de la misma manera, se tiene un flujo constante de un solvente orgánico, por lo general Éter de petróleo, éter etílico o Hexano- Diclorometano. Este solvente es calentado hasta ebullición, luego condensado y dispuesto en el tubo Soxhlet, en el cual extrae el aceite contenido en la biomasa hasta que el tubo se llena, cuando el tubo está lleno de solvente, este es sifonado hasta el balón que contiene el resto de solvente y se repite el proceso (González et Al., 2009).

#### **c. Extracción alcohólica**

Tratado con alcohol para eliminar todas las sustancias solubles en alcohol. (FAO, 1989.). En este tipo de extracción, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definido, los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rotavapores (Chua et al., 2008).

### **2.3.2. PRE-TRATAMIENTOS CON ULTRASONIDO PARA EXTRACCIÓN**

El ultrasonido se encuentra en la región de frecuencias entre 18 KHz y 100 MHz; puede dividirse en ultrasonido de alta intensidad, con frecuencias bajas, entre 20 y 100 KHz y ultrasonido de diagnóstico entre 1 y 10 MHz. El ultrasonido de alta intensidad tiene la capacidad de inducir cavitación. También se ha considerado una fuente potencial para incrementar la reactividad química. Puede usarse en diversos procesos químicos e industriales (Bendicho y Lavilla, 2000).

El ultrasonido se aplica como una alternativa de extracción o para asistir en procesos de extracción de componentes volátiles, incluyendo aceites esenciales. La proporción en la composición de los extractos y el rendimiento de estos depende de la temperatura a la que se lleve a cabo el proceso y del disolvente, o mezcla de disolventes, que se utilicen (Proestos y Komaitis, 2006).

La aplicación de ultrasónico de baja frecuencia o alta intensidad, incrementa la eficiencia de la extracción y reduce el tiempo de esta (Thongson et al., 2004; Proestos y Komaitis, 2006). También disminuye el riesgo de degradación térmica, cuando la extracción se realiza a temperaturas de 25°C (Kimbaris et al., 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIALES**

##### **3.1.1. MATERIA PRIMA**

Para la obtención del concentrado proteico se utilizó como materia prima: Harina de pescado Prime (5 kg) elaborado a base de anchoveta, adquirido de la planta pesquera Don Fernando S.A.C., ubicada en Chimbote.

##### **3.1.2. EQUIPOS E INSTRUMENTOS, REACTIVOS Y OTROS MATERIALES**

###### **a. Equipos e instrumentos**

- Balanza analítica marca: PRECISA GRAVIMETRICS A G., serie: 321LX., modelo: LX320A, desviación: 0.01 g.
- Determinador de humedad marca: PRECISA, modelo: XM-50, desviación: 0.001 g.
- Estufa marca: POL-EKO APARATURA, modelo: SW-17TC, serie: SW-1990.
- Mufla marca: THERMOLYNE, serie: 347034984
- Ultrasonido marca: BRANSONIC, serie: CPX5800H-E
- Centrifuga Refrigerada marca: Sigma
- Extractor Soxhlet convencional y semiautomático
- Refrigeradora
- Cocina de resistencia eléctrica
- Rotavapor

###### **b. Reactivos**

- Agua destilada
- Agua ultra pura
- Etanol 99%

- Hexano
- Éter de petróleo

**c. Materiales de laboratorio**

- Placas Petri
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Vaso de precipitación de 500 ml
- Probeta de 50 y 100 ml
- Crisol de porcelana
- Campana desecadora
- Espátula
- Termómetro
- Pinzas de metal y de madera
- Tubos de plástico de 45 ml

**d. Otros Materiales**

- Papel filtro
- Papel aluminio
- Bolsas de alta densidad
- Material de ayuda: algodón, alcohol, plumón indeleble, grapas, tijera, cinta masking

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.2.2. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

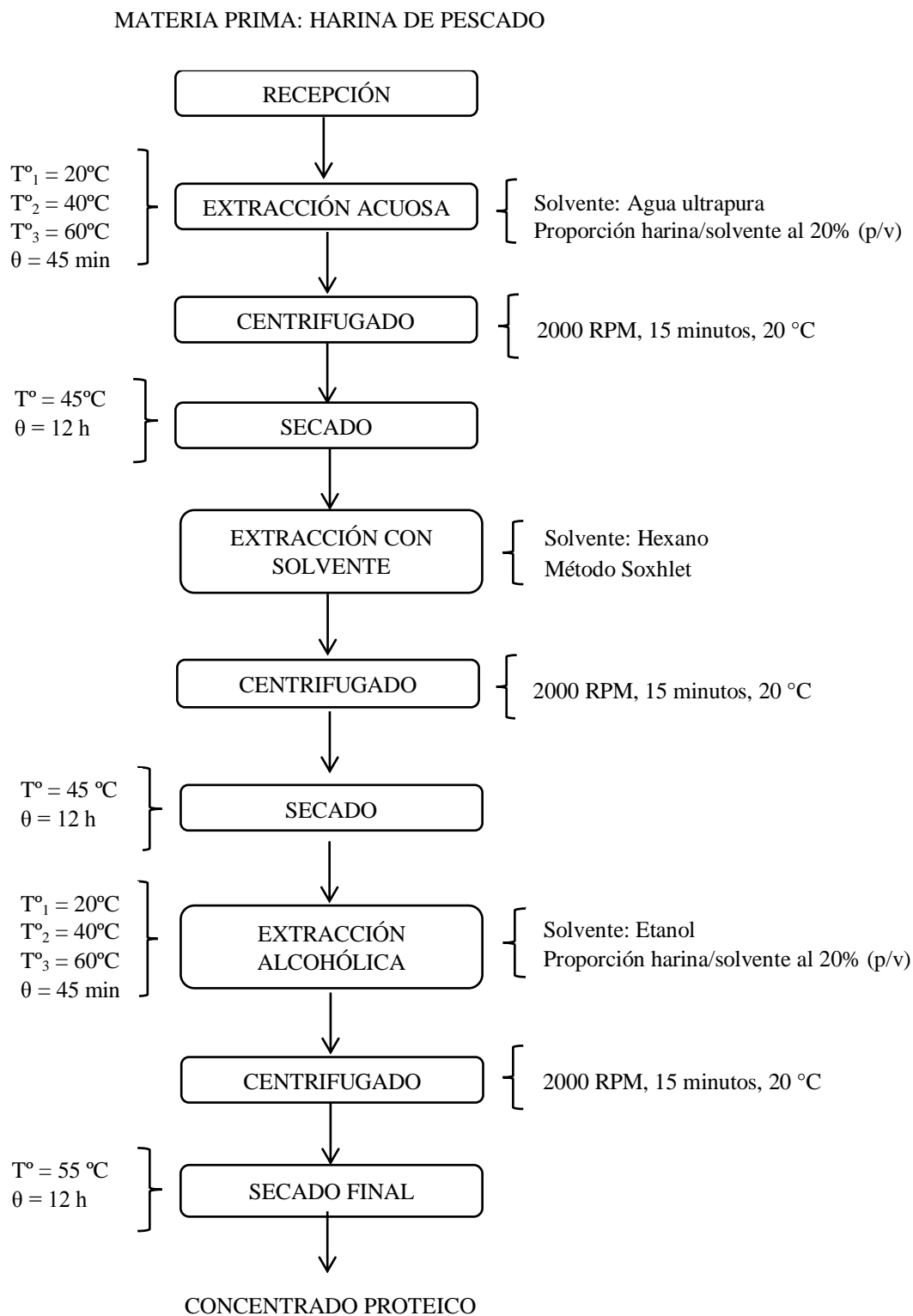


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso para la obtención del concentrado proteico



### **a.1. Materia prima**

Se utilizó harina de pescado (anchoveta) de calidad Prime proveniente de la industria pesquera de Chimbote, para la realización de este estudio.

### **a.2. Extracción acuosa**

En esta etapa se realizaron los primeros 3 tratamientos por separado, cada uno con su temperatura de extracción correspondiente (20, 40 y 60°C), pero permaneciendo constante los parámetros en el baño ultrasonido: tiempo de 45 minutos, frecuencia de 60 Hz, 100 ml de agua ultrapura, 20 g de harina de pescado.

Para ello pesamos 20 gramos de harina de pescado y la depositamos en un matraz Erlenmeyer, añadimos en este 100 ml de agua ultrapura a la temperatura de 60°C, posteriormente pasamos a dejarlo en el baño ultrasonido durante 45 minutos, 60 Hz de frecuencia y una temperatura de 60°C.

El procedimiento para los otros dos tratamientos fue similar, solo cambiamos las temperaturas por las correspondientes (20 y 40°C).

### **a.3. Centrifugado**

La solución harina de pescado-agua ultrapura de la etapa anterior se añadió a los tubos de centrifuga de 45 ml. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 20°C en la centrifuga refrigerada.

#### **a.4. Secado**

Se retiró el sobrenadante de la muestra centrifugada. El precipitado se secó en placas Petri previamente pesadas, dentro de una estufa a 45°C por 12 horas.

#### **a.5. Extracción de grasas**

Se pesó aproximadamente 5 g de harina seca en capachos de papel filtro para ser desgrasada en el soxhlet convencional, empleando como solvente hexano.

#### **a.6. Extracción alcohólica**

Posteriormente se realizó la extracción alcohólica, utilizando como solvente etanol a 3 temperaturas distintas (20, 40, 60°C) a cada muestra de harina proveniente de cada tratamiento diferente. Se utilizó el baño ultrasonido con los parámetros de tiempo de 45 minutos, frecuencia de 60 Hz y temperatura correspondiente al tratamiento.

#### **a.7. Centrifugado**

La solución harina de pescado-etanol de la etapa anterior se añadió a los tubos de centrifuga de 45 ml. Se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos a 20°C en la centrifuga refrigerada.

#### **a.8. Secado final**

Se retiró el sobrenadante de la muestra centrifugada. El precipitado se secó en placas Petri previamente pesadas, dentro de una estufa a 55°C por 12 horas. Después de esta etapa, se obtienen nuestros concentrados proteicos.

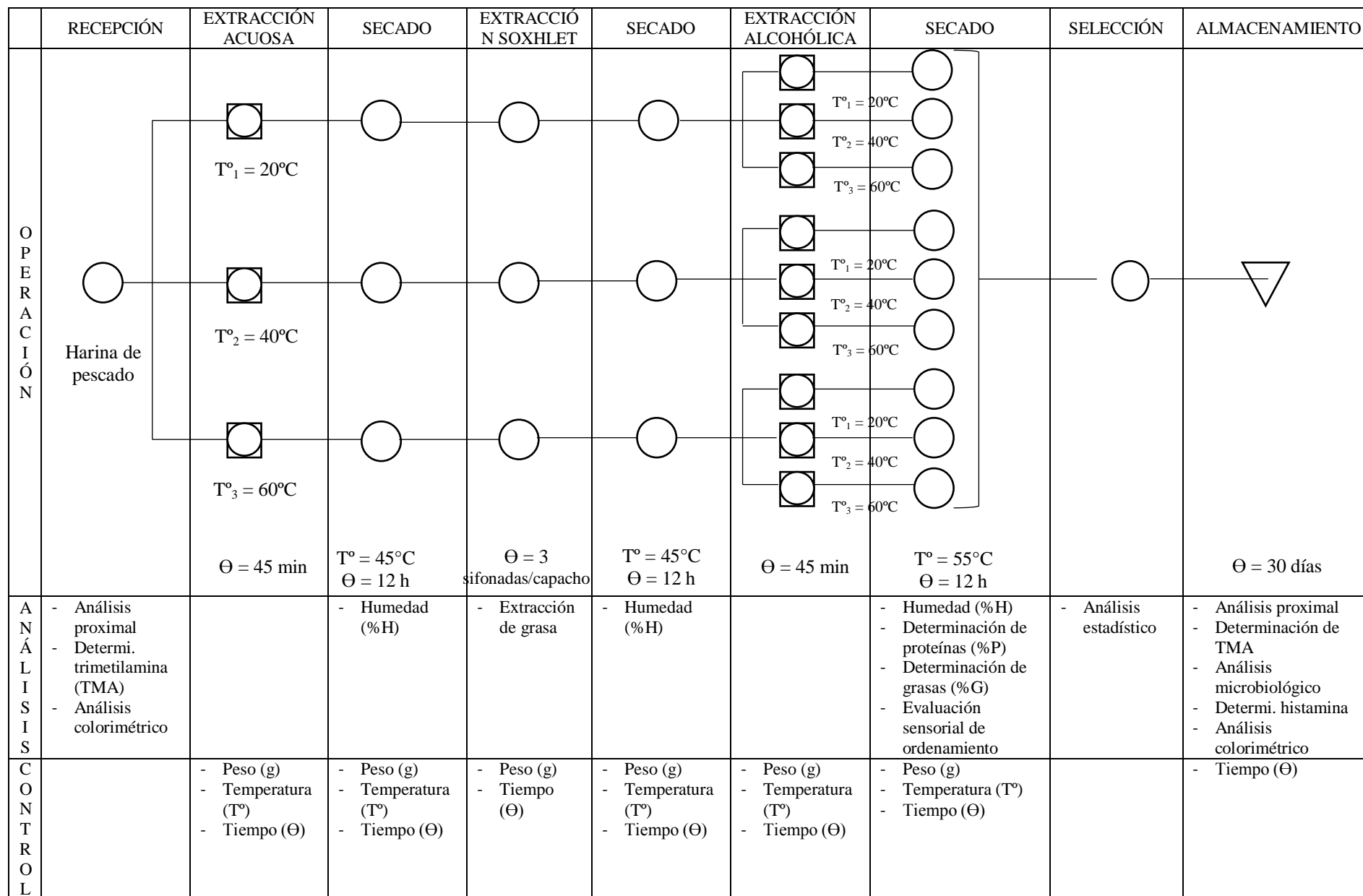


Figura 4. Esquema experimental que comprende el estudio

En la figura 4 se muestra el esquema experimental de este proyecto de investigación, que funcionó como mapa o guía para visualizar todo lo que abarcó la parte experimental.

### b. Esquema del Diseño Experimental

Se desarrolló un Diseño factorial  $3^2$ . El orden de los experimentos fue tal como se muestra en el cuadro 10, se realizó primero el ensayo 1 hasta llegar al ensayo 9, en cambio, para el análisis de las variables respuestas se esperó terminar las 27 corridas experimentales (9 tratamientos con su respectivo triplicado) para realizarlos.

Cuadro 10: Diseño experimental de los tratamientos

# Ensayo	Plan de experimentación		Variables Respuestas	
	Temperatura de extracción acuosa (°C)	Temperatura de extracción alcohólica (°C)	%P	%G
1	20	20		
2	20	40		
3	20	60		
4	40	20		
5	40	40		
6	40	60		
7	60	20		
8	60	40		
9	60	60		

Se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS centurión, en modo de prueba, para el análisis experimental y estadístico.

Con ayuda del análisis estadístico se seleccionó las condiciones óptimas del proceso para obtener el máximo concentrado proteico que cumpla con la normativa o requisitos que establecen algunas entidades. Las normas se muestran en el ítem 3.2.5. Normas reguladoras o de referencia.

En el cuadro 11 podemos observar la simbología que reciben los niveles con los que se trabajó cada factor.

Cuadro 11: Factores y dominio experimental

<b>Factores</b>	<b>Dominio Experimental</b>		
	<b>Nivel (-)</b>	<b>Nivel (0)</b>	<b>Nivel (+)</b>
#1: Temperatura de extracción acuosa (T°)	20	40	60
#2: Temperatura de extracción alcohólica (T°)	20	40	60

### **3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE PESCADO Y CONCENTRADO PROTEICO**

La caracterización se realizó a la harina de pescado adquirido de la empresa pesquera Don Fernando S.A.C., así como al concentrado proteico. Los análisis de proteínas, lípidos, humedad, cenizas, color, se realizaron en los laboratorios ubicados en la escuela de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa.

**a. Proteínas**

La determinación de la proteína total se realizó según el método por la N.T.P. ISO 5983:2002 (Revisada el 2013): Harina de Pescado. Determinación de proteínas Totales (Método de Kjeldahl), utilizando 6.25 como factor general.

**b. Grasas o lípidos**

Se utilizó el equipo Soxhlet semiautomático con éter de petróleo como solvente. Se determinó según la NTP 204.033:1985 (Revisada el 2010), método Soxhlet.

**c. Humedad**

Se determinó según la A.O.A.C. 930.15:2005 harina de pescado. Determinación del contenido de humedad.

**d. Cenizas**

Se realizó por la incineración de la materia orgánica en una mufla; siguiendo la metodología por la AOAC 942.05: 2012, Online 19 th, Ed.: Harina de pescado. Determinación de Cenizas.

**e. Análisis colorimétrico**

Se utilizó el colorímetro, bajo la metodología CIELAB.

**3.2.4. ANÁLISIS PARA EL MÁXIMO CONCENTRADO PROTEICO**

El análisis microbiológico y de histamina fueron realizados solos al máximo concentrado proteico, en cambio el análisis de trimetilamina fue evaluado en los concentrados proteicos obtenidos a partir de las corridas del diseño experimental.

**a. Análisis microbiológico**

Se realizó en COLECBI S.A.C., laboratorio de ensayo acreditado por la INACAL, ver ANEXO 6.

**b. Histamina**

Se realizó en COLECBI S.A.C., laboratorio de ensayo acreditado por la INACAL, ver ANEXO 6.

**c. Trimetilamina (TMA)**

Se determinó mediante cromatografía de gases (ANEXO 5), en el LABICER-Laboratorio de investigación y certificaciones-FC-UNI, ubicada en la ciudad de Lima, ver ANEXO 4.

**3.2.5. NORMAS REGULADORAS O DE REFERENCIA**

Para el presente proyecto de investigación se tuvo en cuenta la normativa expuesta por la FAO (1961), por la FDA (1967) y el Manual "Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación" (2016), que nos sirvieron como bases reguladores o referencia para la obtención de nuestro concentrado proteico de pescado para consumo humano.

Cuadro 12: Especificaciones de la FAO

	Humedad %	Grasa %	Proteínas %	Lisina en 100 g de proteína
FAO-A	Máximo 10.0	Máximo 0.75	Mínimo 67.5	Mínimo 6.5
FAO-B	Máximo 10.0	Máximo 3.00	Mínimo 65.0	Mínimo 6.5
FAO-C	Máximo 10.0	Máximo 10.00	Mínimo 60.0	Mínimo 6.5

FUENTE: FAO (1961), CITADO EN MANUEL LÓPEZ-BENITO Y MANUEL GIL (1974)

Cuadro 13: Especificaciones de la FDA

Parámetros	
Proteínas	Mínimo 75%
Humedad	Máximo 10%
Grasas	Máximo 0.5%
Solventes residuales	
	Isopropanol Máximo 250 ppm
	Dicloroetano Máximo 5 ppm
Bacterias	Máximo 10 <sup>4</sup> UFC/g
Libre de <i>Escherichia coli</i> y patógenos del género o tipo <i>Salmonella</i>	
Suave olor y sabor a pescado	

FUENTE: FEDERAL REGISTER 32 (1967)



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. HARINA DE PESCADO

Se realizó la caracterización antes de empezar con las corridas experimentales, para poder tener los parámetros iniciales con las que cuenta nuestra harina de pescado antes de someterla a las diferentes etapas del proceso.

#### 4.1.1. ANÁLISIS PROXIMAL

En el cuadro 14 se muestra la composición química de la harina de pescado de calidad Prime, donde las proteínas son el componente más abundante.

Ahora, si tenemos en cuenta los valores de calidad que reportan las fabricas a nivel nacional, con respecto a la harina de pescado de anchoveta, estos corresponden a: proteínas 64 - 68%, grasas 12% máximo, humedad 6 – 10% y cenizas 12 – 18%. (IFFO, 2008).

Cuadro 14: Caracterización de la harina de pescado como materia prima

Composición	Harina de pescado Prime
Proteínas	67.8240% ± 0.2371%
Grasas	8.8873% ± 0.0199%
Humedad	8.1420% ± 0.0084%
Cenizas	15.8001% ± 0.0778%

Contrastando los valores obtenidos en el presente trabajo con los reportados por las fábricas a nivel nacional, se determina que la concentración de proteínas, grasas, humedad y cenizas se encuentran dentro del rango de calidad o márgenes establecidos.

#### 4.1.2. ANÁLISIS COLORIMÉTRICO (CIELAB)

Debido a que el color responde a una interpretación subjetiva, donde puede ser complicada describir, refiriéndose a un mismo color de formas diferentes originando confusión o dudas en los reportes de resultados; se decidió utilizar un lenguaje objetivo donde el color se pueda expresar en términos numéricos. En este caso, decidimos utilizar el espacio de color  $L^*a^*b^*$ , también referido como CIELAB.

En el cuadro 15 se muestran los valores numéricos correspondientes al análisis colorimétrico para la harina de pescado, que nos sirvió para observar el cambio de color de manera objetiva que ocurre en el concentrado proteico obtenido.

Cuadro 15: Análisis colorimétrico de la harina de pescado

Índices de color	Descripción	Harina de pescado Prime
L*	Grado de claridad	$44.59 \pm 1.29$
a*	Denota el color verde/rojo	$3.97 \pm 0.12$
b*	Denota el color azul/amarillo	$28.51 \pm 0.46$

En la figura 5 observamos una muestra de la harina de pescado con la cual se trabajó, esta presentó un color marrón dorado muy similar a las harinas de pescado producidas por otras empresas pesqueras de la localidad que también se encargan de exportar. Esto indica que el aspecto de nuestra harina de pescado está dentro de los márgenes establecidos por la industria nacional.



Figura 5. Harina de pescado prime

#### **4.2. OBTENCIÓN DE LOS CONCENTRADOS PROTEICOS**

A cada muestra de harina se les sometió a tres etapas principales: extracción acuosa, desgrasado y extracción alcohólica. Con el fin de corregir sus propiedades organolépticas, es decir, reducir al máximo su olor y sabor, además de concentrar las proteínas y reducir su porcentaje de grasas.

Se realizaron 27 corridas en total, 9 tratamientos distintos con su respectivo triplicado como señala nuestro diseño experimental. Después se analizó la concentración de proteínas como se muestra en el cuadro 16 y la concentración de grasas como se muestra en el cuadro 17.

Cuadro 16: Concentración de proteínas en el producto final

CONCENTRADO PROTEICO	TRATAMIENTO T° extrac. acuosa - T° extrac. alcohólica	% PROTEÍNAS			
		R1	R2	R3	PROMEDIO
concentrado 1	20°C - 20°C	74.9438%	78.8698%	77.4708%	77.0948% ± 1.9898%
concentrado 2	20°C - 40°C	74.1817%	76.9796%	76.4554%	75.8723% ± 1.4873%
concentrado 3	20°C - 60°C	73.1505%	76.6355%	75.6858%	75.1572% ± 1.8016%
concentrado 4	40°C - 20°C	73.2252%	74.0982%	75.3642%	74.2292% ± 1.0755%
concentrado 5	40°C - 40°C	72.6845%	74.3384%	75.0348%	74.0193% ± 1.2072%
concentrado 6	40°C - 60°C	72.3027%	73.6961%	73.1736%	73.0575% ± 0.7039%
concentrado 7	60°C - 20°C	70.8562%	73.4773%	72.6036%	72.3124% ± 1.3346%
concentrado 8	60°C - 40°C	69.7494%	72.3420%	71.4778%	71.1897% ± 1.3201%
concentrado 9	60°C - 60°C	62.1525%	65.1609%	64.7311%	64.0148% ± 1.6271%

Cuadro 17: Concentración de grasas en el producto final

CONCENTRADO PROTEICO	TRATAMIENTO T° extrac. acuosa - T° extrac. alcohólica	% GRASAS			
		R1	R2	R3	PROMEDIO
concentrado 1	20°C - 20°C	0.0632%	0.0801%	0.0509%	0.0647% ± 0.0147%
concentrado 2	20°C - 40°C	0.0523%	0.0631%	0.0501%	0.0552% ± 0.0070%
concentrado 3	20°C - 60°C	0.0517%	0.0599%	0.0495%	0.0537% ± 0.0054%
concentrado 4	40°C - 20°C	0.0600%	0.0530%	0.0439%	0.0523% ± 0.0081%
concentrado 5	40°C - 40°C	0.0589%	0.0485%	0.0501%	0.0525% ± 0.0056%
concentrado 6	40°C - 60°C	0.0432%	0.0448%	0.0495%	0.0459% ± 0.0033%
concentrado 7	60°C - 20°C	0.0533%	0.0188%	0.0217%	0.0313% ± 0.0192%
concentrado 8	60°C - 40°C	0.0437%	0.0143%	0.0195%	0.0258% ± 0.0156%
concentrado 9	60°C - 60°C	0.0067%	0.0074%	0.0064%	0.0068% ± 0.0005%

Estas variaciones del contenido de proteínas y grasas en el concentrado proteico están obviamente vinculadas a la temperatura de extracción acuosa y alcohólica que se emplee. Siendo las etapas de extracción efectivas en este trabajo de investigación.

Por otro lado, la extracción con ultrasonido en la harina de pescado, aún no es investigada a profundidad, pero la utilización del ultrasonido o de equipos específicos como ultrasonificadores para la extracción, ya son empleados en la industria de los alimentos.

En nuestro caso, el baño ultrasonido no es un equipo diseñado especialmente para la extracción de compuestos, sin embargo, se utilizó como potenciador para las extracciones acuosas y alcohólicas, ya que el ultrasonido tiene una eficiencia 70 veces mayor que la extracción por solventes, 11 veces mayor que la extracción por destilación y 35 veces mayor que la extracción por soxhlet (Gao & Liu, 2005).

Además, esta sonicación por ultrasonido produce una corriente eléctrica que transmite su energía a un sistema mecánico que la convertirá en vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido, y estas a su vez, vibraciones en el material objetivo. Si contiene líquidos, se generarán millones de burbujas microscópicas, las cuales sufren rapidísimos procesos de expansión y colapso que pueden transmitir su energía a otros materiales, este fenómeno se llama cavitación y puede ser incrementado añadiendo al medio pequeñas esferas de vidrio (Técnicas de fragmentación y separación de los componentes de las células, 2009), aprovechando por lo tanto, la energía del sonido o ultrasonidos para agitar las partículas de nuestra muestra y aumentar la superficie de contacto con el fin de potenciar la extracción con el agua ultra pura y el etanol.

Gao & Liu (2005) ya han demostrado que la extracción asistida por ultrasonido es un método aceptable, tiene ventajas de eficiencia y simplicidad sobre métodos tradicionales como extracción por solvente a temperaturas ambiente, reflujo térmico y soxhlet.

Como apoyo a las técnicas de separación, la temperatura siempre tiene un papel importante, y en nuestro trabajo de investigación se comprobó que a mayor temperatura de extracción acuosa y/o alcohólica se tendrá un mayor rendimiento en la extracción, por lo tanto, el agua ultrapura y el etanol tendrán mayor facilidad de arrastrar compuestos como proteínas, grasas, trimetilamina, histamina, entre otros. En nuestro caso este comportamiento se refleja en la disminución de las proteínas y las grasas (cuadro 18).

Según el Centro de Sonoquímica (2006) de la universidad de Coventry en el Reino Unido, señala que el ultrasonido es utilizado por la posibilidad de realizar evaluaciones no invasivas no destructivas, y por ser fuente de energía. En discusión respecto a esto, podemos alegar que después de las extracciones con el ultrasonido, las muestras no presentaron algún cambio físico con respecto al tamaño de las partículas o textura.

En el cuadro 18 mostramos los resultados ordenados según el plan de experimentación.

Cuadro 18: Plan de experimentación mostrando sus respuestas

# Ensayo	Matriz de experimentos		Plan de experimentación		Variables respuestas			
	x1	x2	Temperatura de extracción acuosa (°C)	Temperatura de extracción alcohólica (°C)	% Proteínas		% Grasas	
1	-	-	20	20	77.0948%	±1.9898%	0.0647%	±0.0147%
2	-	0	20	40	75.8723%	±1.4873%	0.0552%	±0.0070%
3	-	+	20	60	75.1572%	±1.8016%	0.0537%	±0.0054%
4	0	-	40	20	74.2292%	±1.0755%	0.0523%	±0.0081%
5	0	0	40	40	74.0193%	±1.2072%	0.0525%	±0.0056%
6	0	+	40	60	73.0575%	±0.7039%	0.0459%	±0.0033%
7	+	-	60	20	72.3124%	±1.3346%	0.0313%	±0.0192%
8	+	0	60	40	71.1897%	±1.3201%	0.0258%	±0.0156%
9	+	+	60	60	64.0148%	±1.6271%	0.0068%	±0.0005%

Podemos observar que nuestros concentrados proteicos a partir de harina de pescado obtuvieron un porcentaje de proteínas dentro del rango de 64.0148% ± 1.6271% a 77.0948% ± 1.9898% y un porcentaje de grasas dentro del rango de 0.0068% ± 0.0005%. Notándose que el ensayo N° 1 es el que tiene mayor concentración de proteínas y grasas, mientras que el N° 9 es el que tiene menor concentración de proteínas y grasas.

Se puede considerar 4 métodos para la preparación de un concentrado de proteínas, método de extracción con alcohol isopropílico, método de extracción con alcohol etílico, método alcalino y método ácido (Manuel López-Benito & Manuel Gil, 1974), de los cuales, se puede considerar a nuestra metodología empleada como método de extracción con agua ultrapura-hexano-etanol.

Cabe recalcar, que nuestra materia prima fue harina de pescado prime, el cual es obtenido después de un procedimiento operacional conocido por parte de la industria

pesquera, aspecto muy importante debido a que prácticamente la totalidad de los estudios realizados con el fin de obtener un concentrado proteico de pescado o hidrolizado, emplean pescado como materia prima, lo que ocasiona variaciones en este producto final, específicamente con respecto al contenido de proteínas y cenizas.

Al trabajar con pescado como materia prima, este se puede limpiar, descabezar, eviscerar, filetear, preparar de diferentes formas, básicamente quitar piel y espinas con el objetivo de disminuir el porcentaje de cenizas en el producto final. La harina de pescado con la que trabajamos cuenta con  $15.8001\% \pm 0.0778\%$  de cenizas, lo que nos limita a aspirar obtener una concentración máxima de proteínas de casi 80% en nuestro producto final, teniendo en cuenta una humedad baja.

Manuel López-Benito & Manuel Gil (1974), reportan concentrados proteicos con un contenido de proteínas entre 90.5% - 96%, grasas entre 0% - 0.59%, humedad 3.3% - 4.9% y cenizas entre 0.71% - 3.14%, bajo los 4 métodos mencionados anteriormente. En discusión a esto, nuestro ensayo N° 1 (tabla 18) nos permite obtener un concentrado proteico con  $77.0948\% \pm 1.9898\%$  de proteínas y  $0.0647\% \pm 0.0147\%$  de grasas, lo cual indica que nuestro porcentaje de grasa compite con el de los autores, mas no el porcentaje de proteínas, esto se debe a que ellos trabajaron con el músculo del pescado, disminuyendo sus cenizas y por ende aumentando sus proteínas en sus concentrados proteicos.

Sin embargo, el contenido de cenizas en nuestros concentrados proteicos no es tan negativo, ya que las cenizas aportan sales minerales que corresponden mayoritariamente a la fracción ósea de la materia prima, siendo el calcio y el fosforo los más importantes (A. Madrid, J. M. Madrid y R. Madrid, 1995)



También existen concentrados proteicos en bibliografía cuyo contenido de proteínas varían entre 62% y 75%, esto depende mucho del método, equipos, materiales, insumos, especie de pescado, que emplees. Por lo tanto, el porcentaje mayor de proteínas que se obtuvieron en las corridas experimentales son aceptables, además que debemos tener en cuenta también las normas reguladoras.

#### **4.2.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

Del cuadro 19: ANOVA para concentración de proteínas, particiona la variabilidad de las proteínas en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

En este caso, podemos observar que 5 efectos tienen un Valor-P menor que 0.5, indicando que son significativamente diferentes de cero con un valor de confianza del 95%. Es decir, la variable A (Temperatura de extracción acuosa) en su forma lineal, su efecto cuadrático AA, la variable B (Temperatura de extracción alcohólica) en su forma lineal, y la combinación de ambas, son estadísticamente significativos para la determinación de proteínas, dicha de otra manera, influyen o tienen un efecto sobre la concentración de proteínas; sin embargo, el efecto cuadrático BB no causa ningún efecto significativo en la variable respuesta.

Cuadro 19: ANOVA para concentración de proteínas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:					
Temperatura extracción acuosa	212.332	1	212.332	121.96	0.0000
B:					
Temperatura extracción alcohólica	65.0575	1	65.0575	37.37	0.0000
AA	8.09813	1	8.09813	4.65	0.0441
AB	30.3372	1	30.3372	17.42	0.0005
BB	6.60758	1	6.60758	3.80	0.0663
Bloques	32.0048	2	16.0024	9.19	0.0016
Error total	33.0795	19	1.74103		
Total (corr.)	387.517	26			

En la figura 6 comprobamos que la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica influyen en la concentración de proteínas y lo hacen de manera negativa, ya sea por separado o interactuando, debido a que sus barras horizontales sobrepasan hacia la derecha del eje establecido por el efecto estandarizado aproximadamente 2.

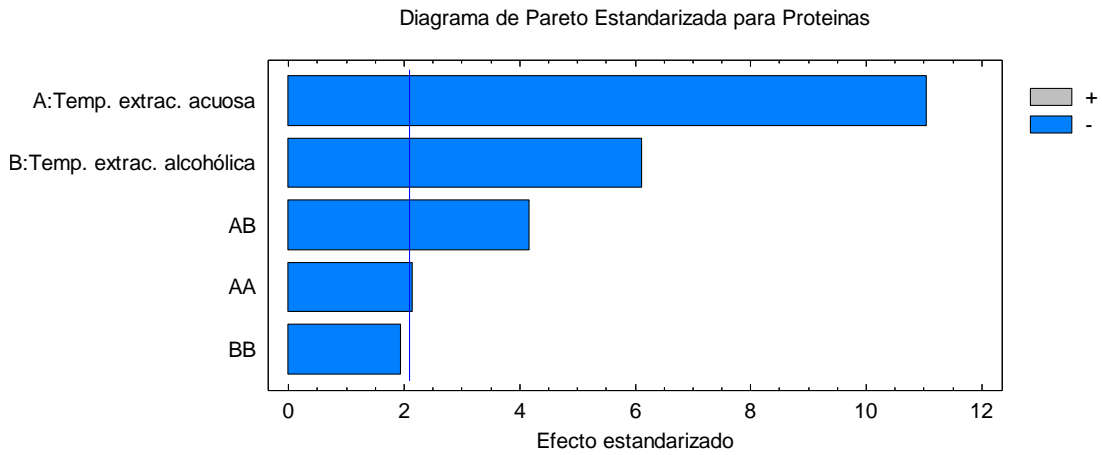


Figura 6. Diagrama de pareto de los efectos de las variables sobre la concentración de proteínas

En la figura 7 se observa el comportamiento que tendrían las proteínas si lo sometiéramos solo a una extracción, ya sea la acuosa o la alcohólica, donde se destaca que la extracción acuosa tiene mayor influencia en la concentración de proteínas, un aumento de temperatura causaría una mayor disminución de

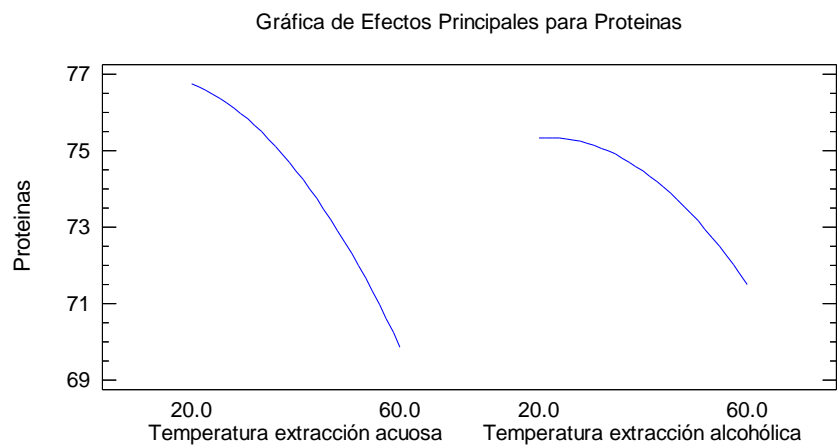
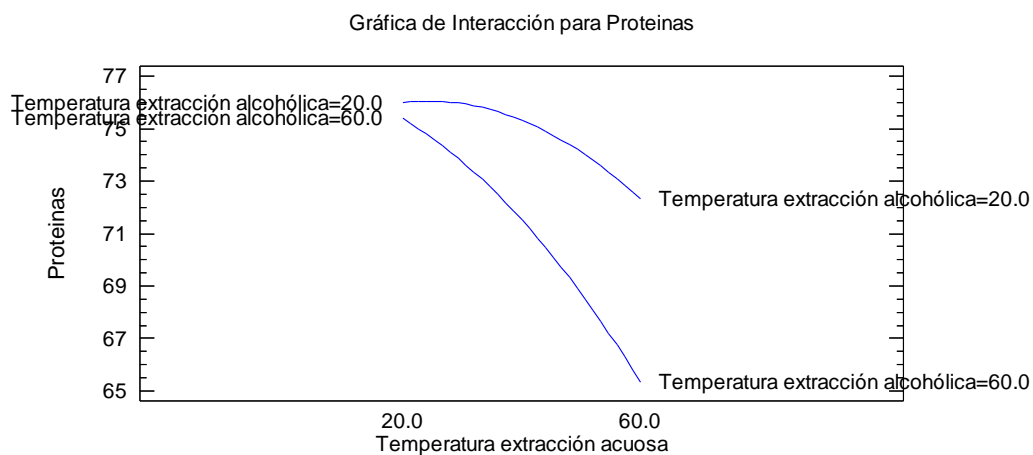


Figura 7. Gráfica del comportamiento de los efectos principales en la concentración de proteínas

Cabe recalcar, que cuando hablamos de disminución de proteínas, esto es relativo, ya que se refiere al comportamiento de las proteínas presentes en el concentrado proteico (producto final) y no a que nuestra materia prima entra con cierto porcentaje de proteínas y después del proceso termina con menos. Para esto, recordemos que nuestra materia prima entra con  $67.8240\% \pm 0.2371\%$  de proteínas y después del proceso puede salir con  $77.0948\% \pm 1.9898\%$  o  $64.0148\% \pm 1.6271\%$ .

Por otro lado, podemos visualizar en la figura 8, el comportamiento descendiente de la concentración de proteínas en función a la interacción de la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica. Es decir, si aumentamos la temperatura de extracción acuosa y mantenemos constante la temperatura de extracción alcohólica a  $20^{\circ}\text{C}$ , la concentración de proteínas en el concentrado proteico disminuirá de 76% a 72.5% aproximadamente. Pero, si aumentamos la temperatura de extracción acuosa y mantenemos constante la temperatura de extracción alcohólica a  $60^{\circ}\text{C}$ , la concentración de proteínas en el concentrado proteico disminuirá de 75.5% a 65% aproximadamente, siendo este último donde la concentración de proteínas disminuye de manera más rápida y se puede comprobar de manera visual porque obedece a la curva que tiene mayor pendiente negativa.



*Figura 8.* Gráfica del efecto de la interacción de las variables sobre la concentración de proteínas

Con los datos obtenidos se puede construir una curva o ecuación, que pase por la mayor cantidad de puntos (valores), de tal manera que ayude a predecir de manera teórica la concentración de proteínas que podemos obtener a determinada temperatura de extracción acuosa y alcohólica.

Para ello, a continuación, el cuadro 20 despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos.

Cuadro 20: Parámetros del modelo matemático para proteínas

Coefficiente	Estimado
constante	69.9349
A: Temperatura extracción acuosa	0.219624
B: Temperatura extracción alcohólica	0.273826
AA	-0.0029044
AB	-0.003975
BB	-0.00262353

La ecuación de modelo ajustado es:

$$[\text{PROTEÍNAS}] = 69.9349 + 0.219624 * (\text{Temperatura extracción acuosa}) + 0.273826 * (\text{Temperatura extracción alcohólica}) - 0.0029044 * (\text{Temperatura extracción acuosa})^2 - 0.003975 * (\text{Temperatura extracción acuosa}) * (\text{Temperatura extracción alcohólica}) - 0.00262353 * (\text{Temperatura extracción alcohólica})^2$$

Donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

De la ecuación del modelo ajustado se calculó la mayor concentración de proteínas (maximizó) en función de la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica, entonces los resultados calculados serían los valores óptimos.

Con respecto a la máxima concentración de proteínas tenemos:

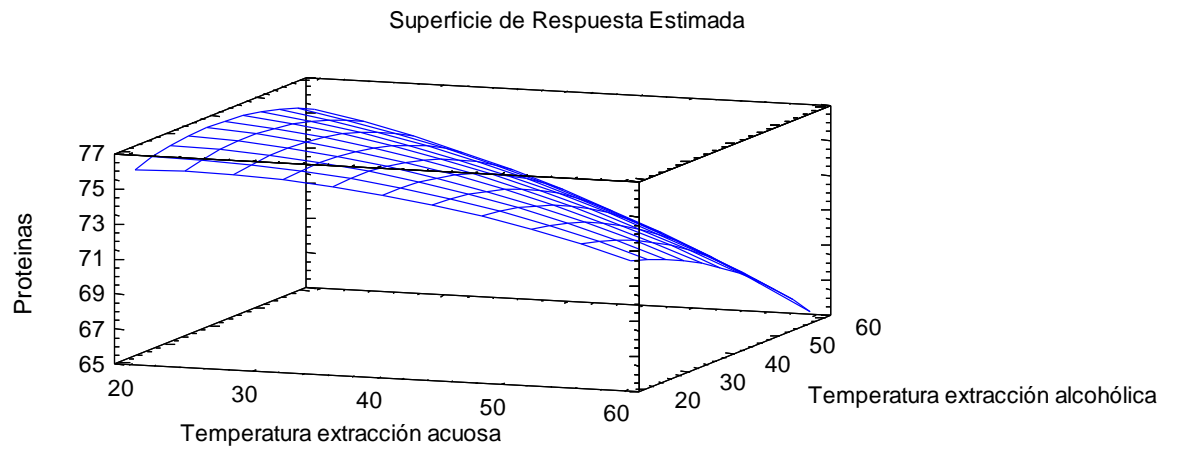
$$\text{Valor máximo} = 76.7641\%$$

Con respecto a las temperaturas de extracción acuosa y alcohólica, en el cuadro 21 se muestra estos valores optimizados que maximizan la concentración de proteínas.

Cuadro 21: Factores optimizados para el análisis de proteínas

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura extracción acuosa	20	60	20
Temperatura extracción alcohólica	20	60	37.0268

La figura 9, permite visualizar la superficie de respuesta en un espacio tridimensional, en el que la tercera dimensión representa la concentración de proteínas del concentrado proteico, sobre el plano bidimensional definido por las combinaciones de los niveles de los dos factores: Temperatura de extracción acuosa y temperatura de extracción alcohólica. Observamos que a una temperatura de extracción acuosa de 20°C y a una temperatura de extracción alcohólica de 37°C obtenemos una mayor concentración de proteínas, ya que en estos niveles se llega al punto o a la zona máxima de la superficie de respuesta; mientras que a valores mayores o menores de 37°C (extracción alcohólica) el porcentaje de proteínas disminuye en el concentrado proteico.



*Figura 9.* Superficie de respuesta para la concentración de proteínas

En otras palabras, la superficie de respuesta es el área que indica o predice los posibles comportamientos que puede tener la concentración de proteínas de nuestro concentrado proteico en función a las combinaciones de los niveles de temperaturas de extracción acuosa y alcohólica que se desee dar.



#### 4.2.2. ANÁLISIS DE GRASAS

El cuadro 22: ANOVA para concentración de grasas, particiona la variabilidad de las grasas en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental.

En este caso, podemos observar que 3 efectos tienen un Valor-P menor que 0.5, indicando que son significativamente diferentes de cero con un valor de confianza del 95%. Es decir, la variable A (Temperatura de extracción acuosa) en su forma lineal, su efecto cuadrático AA y la variable B (Temperatura de extracción alcohólica) en su forma lineal, son estadísticamente significativos para la determinación de grasas, dicha de otra manera, influyen o tienen un efecto sobre la concentración de grasas; sin embargo, el efecto cuadrático BB y la combinación de ambas AB, no causan ningún efecto significativo en la variable respuesta.

Cuadro 22: ANOVA para concentración de grasas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura extracción acuosa	0.00601339	1	0.00601339	63.06	0.0000
B: Temperatura extracción alcohólica	0.000879202	1	0.000879202	9.22	0.0068
AA	0.00067699	1	0.00067699	7.10	0.0153
AB	0.00013467	1	0.00013467	1.41	0.2493
BB	0.0000253519	1	0.0000253519	0.27	0.6121
Bloques	0.00046461	2	0.000232305	2.44	0.1143
Error total	0.00181192	19	0.0000953644		
Total (corr.)	0.0100061	26			

En la figura 10 comprobamos que la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica influyen en la concentración de grasas y lo hacen de manera negativa, por separado y no interactuando, debido a que sus barras horizontales sobrepasan hacia la derecha del eje establecido por el efecto estandarizado aproximadamente 2.

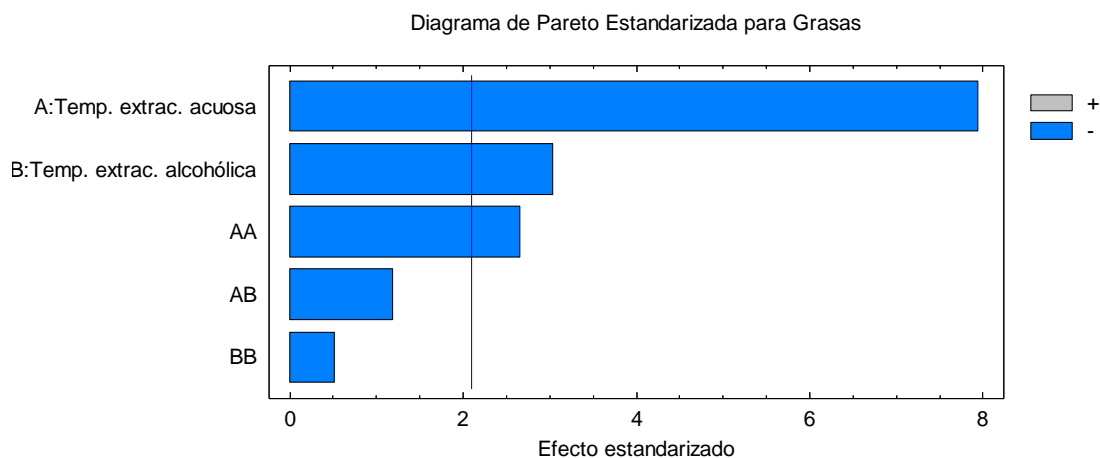


Figura 10. Diagrama de pareto de los efectos de las variables sobre la concentración de grasas

En la figura 11 se observa el comportamiento que tendrían las grasas si lo sometiéramos solo a una extracción, ya sea la acuosa o la alcohólica, donde se destaca que la extracción acuosa tiene mayor influencia en la concentración de grasas, un aumento de temperatura causaría una mayor disminución de grasas.

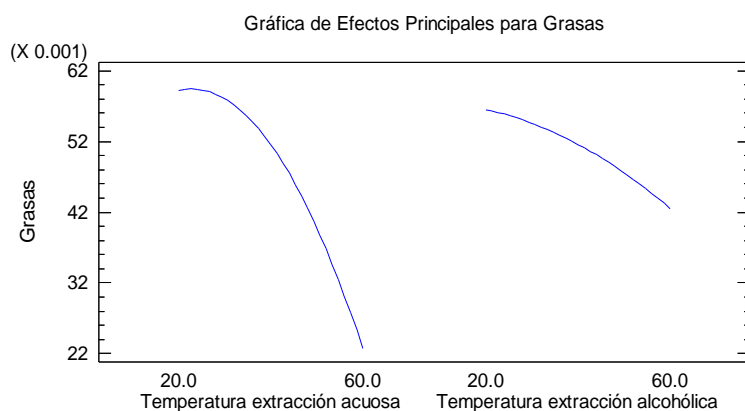


Figura 11. Gráfica del comportamiento de los efectos principales en la concentración de grasas

Cabe recalcar, que cuando hablamos de disminución de grasas, se refiere al comportamiento de las grasas presentes en el concentra proteico (producto final)

Por otro lado, podemos visualizar en la figura 12, que el comportamiento descendiente de la concentración de grasas en función a la interacción de la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica, es irrelevante o no significativo, como se indicaba en el cuadro 22: ANOVA para concentración de grasas. Ya que se muestran dos curvas con pendientes muy similares, lo que significa que, si aumento la temperatura de extracción acuosa de 20°C a 60°C manteniendo una temperatura de extracción alcohólica a 20°C, a 60°C o a cualquier otra temperatura, siempre disminuiré la misma cantidad de grasas a mi concentrado proteico.

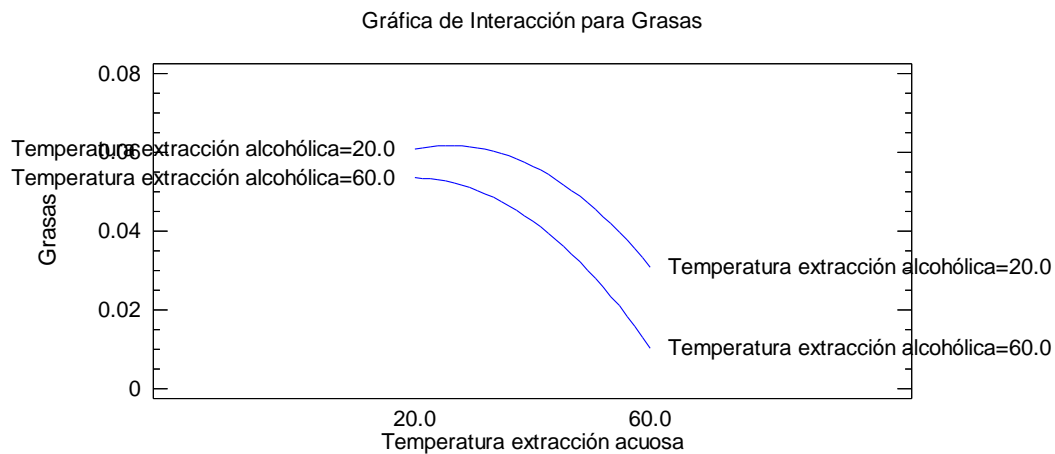


Figura 12. Gráfica del efecto de la interacción de las variables sobre la concentración de grasas

Con los datos obtenidos se puede construir una curva o ecuación, que pase por la mayor cantidad de puntos (valores), de tal manera que ayude a predecir de manera

teórica la concentración de grasas que podemos obtener a determinada temperatura de extracción acuosa y alcohólica.

Para ello, a continuación, el cuadro 23 despliega la ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos.

Cuadro 23: Parámetros del modelo matemático para grasas

Coefficiente	Estimado
constante	0.0380037
A: Temperatura extracción acuosa	0.00154556
B: Temperatura extracción alcohólica	0.000396667
AA	-0.0000265556
AB	-0.000008375
BB	-0.00000513889

La ecuación de modelo ajustado es:

$$\begin{aligned}
 [\text{GRASAS}] = & 0.0380037 + 0.00154556 * (\text{Temperatura extracción acuosa}) + \\
 & 0.000396667 * (\text{Temperatura extracción alcohólica}) - 0.0000265556 * (\text{Temperatura} \\
 & \text{extracción acuosa})^2 - 0.000008375 * (\text{Temperatura extracción} \\
 & \text{acuosa}) * (\text{Temperatura extracción alcohólica}) - 0.00000513889 * (\text{Temperatura} \\
 & \text{extracción alcohólica})^2
 \end{aligned}$$

Donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

De la ecuación del modelo ajustado se calculó la menor concentración de grasas (minimizó) en función de la temperatura de extracción acuosa y la temperatura de extracción alcohólica, entonces los resultados calculados serían los valores óptimos.

Con respecto a la mínima concentración de grasas tenemos:

**Valor mínimo = 0.010287%**

Con respecto a las temperaturas de extracción acuosa y alcohólica, en el cuadro 24 se muestra estos valores optimizados que minimizan la concentración de grasas.

Cuadro 24: Factores optimizados para el análisis de grasas

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Temperatura extracción acuosa	20	60	60
Temperatura extracción alcohólica	20	60	60

La figura 13, permite visualizar la superficie de respuesta en un espacio tridimensional, en el que la tercera dimensión representa la concentración de grasas del concentrado proteico, sobre el plano bidimensional definido por las combinaciones de los niveles de los dos factores: Temperatura de extracción acuosa y temperatura de extracción alcohólica. Observamos que a una temperatura de extracción acuosa de 60°C y a una temperatura de extracción alcohólica de 60°C obtenemos una menor concentración de grasas, ya que en estos niveles se llega al punto o a la zona mínima de la superficie de respuesta; mientras que a valores menores de 60°C (extracción alcohólica) el porcentaje de grasas aumenta levemente en el concentrado proteico.

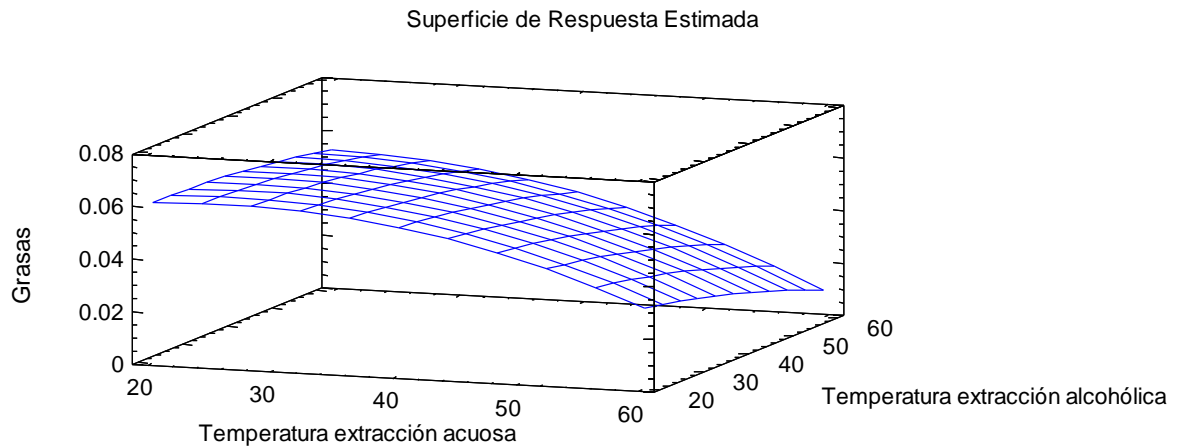


Figura 13. Superficie de respuesta para la concentración de grasas

En otras palabras, la superficie de respuesta es el área que indica o predice los posibles comportamientos que puede tener la concentración de grasas de nuestro concentrado proteico en función a las combinaciones de los niveles de temperaturas de extracción acuosa y alcohólica que se desee dar.

#### 4.2.3. RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES RESPUESTAS

Debido a que contamos con 2 variables respuestas, se decidió encontrar la relación entre ambas. Empleamos el software STATGRAPHICS CENTURION XV para realizar un análisis de regresión.

### Gráfico del Modelo Ajustado

$$\text{PROTEINAS} = 1 / (0.0130926 + 0.0000167416 / \text{GRASAS})$$

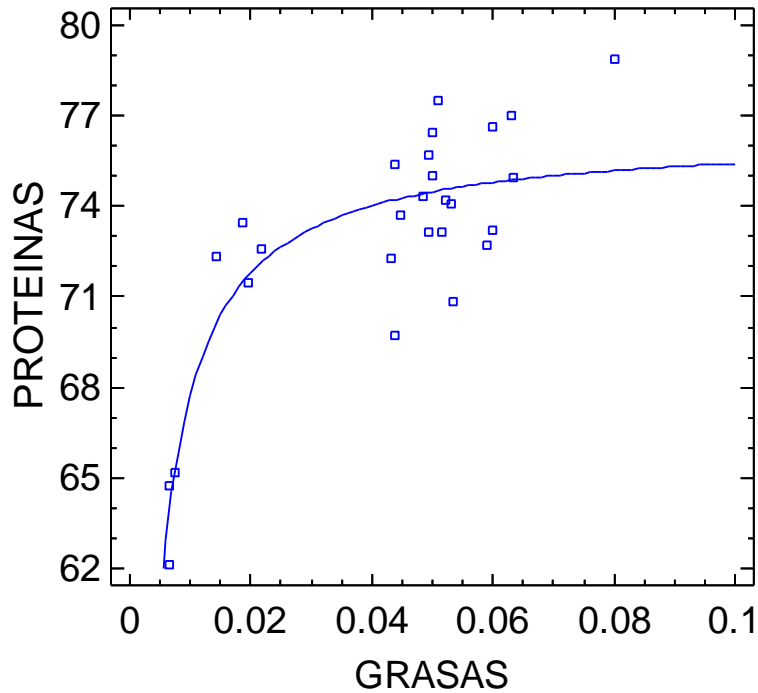


Figura 14. Gráfico del modelo ajustado para Proteínas y Grاساس

Según el software, para el análisis de regresión simple, el mejor modelo que se ajusta es el Doble Inverso con un coeficiente de correlación de 0.883702 y un R-cuadrada de 78.0929%, como se observa en la figura 14.

El estadístico R-cuadrada indica que el modelo ajustado explica 78.0929% de la variabilidad en PROTEINAS. El coeficiente de correlación es igual a 0.883702, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.



Cuadro 25: ANOVA para regresión simple de Proteínas y Grasas

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000124871	1	0.0000124871	89.12	0.0000
Residuo	0.00000350294	25	1.40118E-7		
Total (Corr.)	0.00001599	26			

También, observamos que el valor-P en el cuadro 25 es menor que 0.05, indicando que existe una relación estadísticamente significativa entre PROTEINAS y GRASAS con un nivel de confianza del 95.0%.

#### **4.2.4. DETERMINACIÓN DE LAS TEMPERATURAS ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN ACUOSA Y ALCOHÓLICA PARA LA OBTENCIÓN DEL MÁXIMO CONCENTRADO PROTEICO**

Para determinar las temperaturas de extracción óptimas, nos basamos en las variables respuestas. Se buscó obtener un concentrado proteico que cumpla con los requisitos dados por la FAO (1961) y por la FDA (1967), vitos en el ítem 3.2.5. Normas reguladoras o de referencia, especialmente: un máximo de 0.5% de grasas y un mínimo de 75% de proteínas.

Debido a que todos nuestros ensayos obtuvieron una concentración de grasas menor que 0.5%, solo tuvimos que enfocarnos en la variable respuesta proteínas y habiendo hecho ya su análisis estadístico, la tabla 21: Factores optimizados para el análisis de proteínas, nos indica que los parámetros óptimos que maximiza la concentración de proteínas a 76.7641%, son:

**Temperatura de extracción acuosa = 20°C y  
temperatura de extracción alcohólica = 37.0268°C.**

#### **4.2.5. BALANCE DE MATERIA**

Como parte del reporte de los resultados de este trabajo de investigación, se buscó indicar en lo posible, todos los parámetros de la parte experimental, desde cantidades de materia prima o insumos hasta equipos utilizados.

En el cuadro 26 se muestra el balance de materia para la harina de pescado resumido en sus tres etapas principales, donde indica que la mayor pérdida fue de 3.8060 g (19.03%) con respecto a 20.0023 g que fueron utilizados y ocurrió en la etapa de extracción acuosa, debido a sus compuestos solubles en agua, entre ellos los nitrogenados no proteicos. También es importante señalar que en la etapa de desgrasado se extrae el 8.33%, una cantidad significativa sabiendo que la harina de pescado inicialmente contó con un 8.8873%  $\pm$  0.0199% de contenido de grasa.

Viéndolo de manera general, podemos reportar que por cada 20.0023 g de harina de pescado empleado se puede obtener 14.5631 g de concentrado proteico, indicando un rendimiento de 72.81%, que es una cantidad aceptable para nosotros con respecto a nuestro proceso de obtención, ya que de este trabajo de investigación aún se puede rescatar los sobrenadantes de las centrifugaciones y el aceite del desgrasado no aprovechados, para estudiarlos o analizarlos.

Cuadro 26: Balance de materia resumido para la harina de pescado

Etapa	Ingresa	Sale	Pérdida por etapa (g)	% Pérdida por etapa
Extracción acuosa	20.0023	16.1963	3.8060	19.03%
Desgrasado	16.3037	14.9454	1.3583	8.33%
Extracción alcohólica	15.0159	14.5631	0.4528	3.02%
Rendimiento	72.81%			

Cabe resaltar que los balances de materia de los 9 tratamientos no tienen variaciones significativas, por lo que se decidió reportar el balance de materia del tratamiento 1 como balance de materia detallada del proceso de obtención del concentrado proteico (figura 15).

De la figura 15 (\*) señalamos que el hexano utilizado en total, para todas las corridas fue de 867 ml (100%), de los cuales se recuperó 482 ml (55.59%).

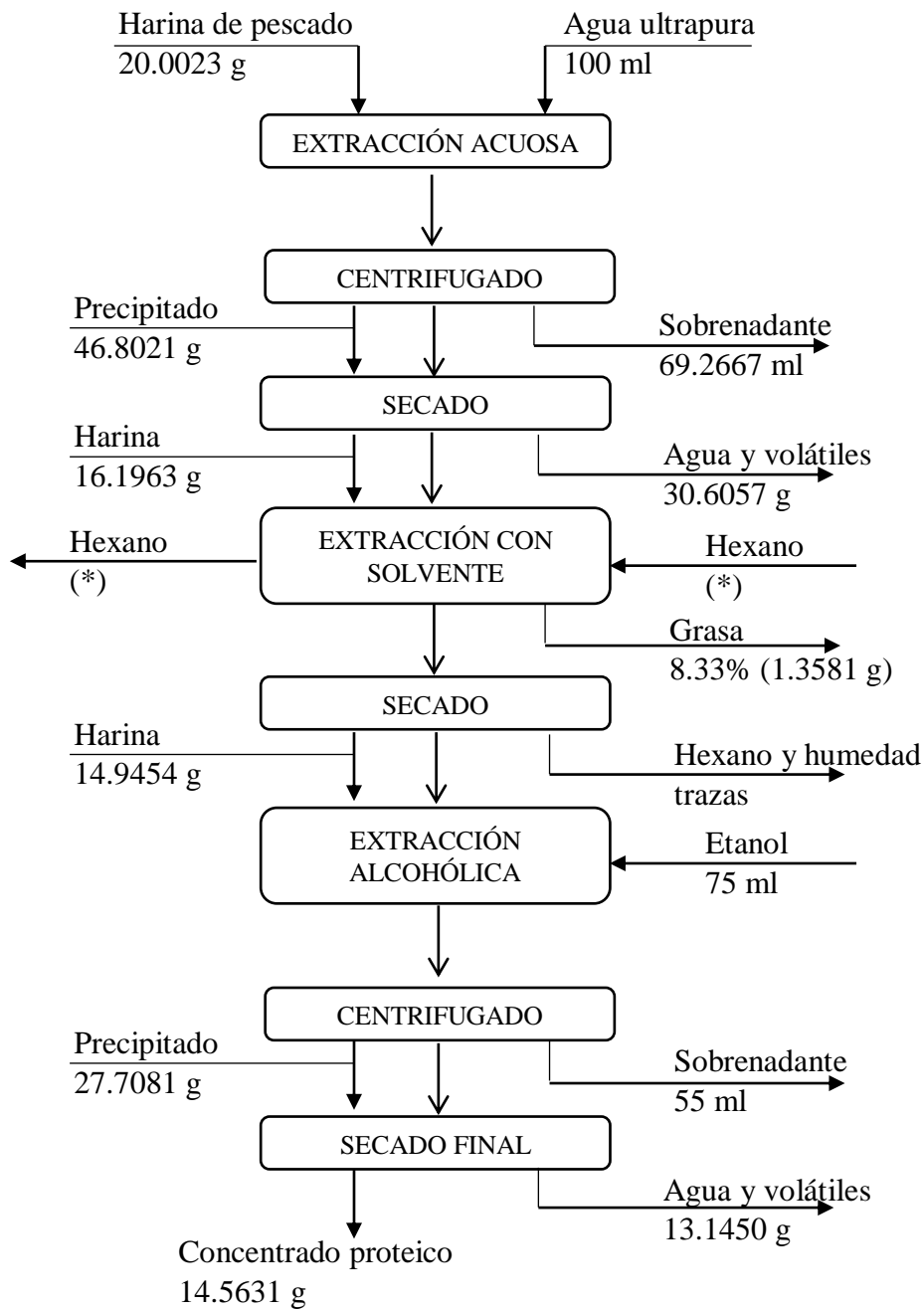


Figura 15: Balance de materia del proceso de obtención del concentrado proteico

### **4.3. ANÁLISIS DE TRIMETILAMINA (TMA)**

Como parte de la obtención del concentrado proteico, no solo se buscó maximizar el porcentaje de proteínas, sino, también extraer o minimizar la concentración de trimetilamina que es una amina volátil pungente, generalmente asociada con el olor típico "a pescado" del pescado en deterioro, su presencia en el pescado en deterioro es debido a la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA), el cual está naturalmente presente en el tejido vivo de muchas especies de pescados marinos (FAO, 1999).

Cabe resaltar que la FDA (1967), menciona con respecto a los concentrados proteicos de pescado para consumo humano, que no deben tener más que un suave olor y sabor a pescado.

Sabiendo esto, se evaluó la presencia de trimetilamina de manera sensorial (subjetiva) en el ítem 4.4. Evaluación sensorial de ordenamiento, y por cromatografía de gases (objetiva). El análisis cromatográfico fue realizado solo sobre 3 muestras: la harina de pescado (utilizada como materia prima), el concentrado proteico 1 (temperatura de extracción acuosa = 20°C, temperatura de extracción alcohólica = 20°C) y el concentrado proteico 9 (temperatura de extracción acuosa = 60°C, temperatura de extracción alcohólica = 60°C), se eligió estos concentrados porque representan los extremos de los tratamientos térmicos que se realizaron en nuestras corridas experimentales, siendo así, el concentrado proteico 1 el que fue obtenido a temperaturas más bajas y el concentrado proteico 9 el que fue obtenido a temperaturas más altas.

Los resultados de los análisis de trimetilamina se presentan en la siguiente tabla.

Cuadro 27: Resultados del análisis de trimetilamina

MUESTRA	RESULTADOS (ppm)	RESULTADOS (mg de N-TMA/100 g de muestra)	MÉTODO DE REFERENCIA
M1	15.97	1.597	BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.) 2005. N°. 128
M2	No detectado (*)	No detectado (*)	
M3	No detectado (*)	No detectado (*)	

(\*) Menor a 12 ppm. M1= Harina de pescado prime, M2= Concentrado proteico 1 y M3= Concentrado proteico 9. LABICER

En el cuadro 27 observamos que los concentrados proteicos mandados a analizar tienen una concentración menor a 12 ppm o 12 mg N-TMA Kg<sup>-1</sup>, y a la vez menor que la harina de pescado (15.97 ppm).

Teniendo en cuenta que trimetilamina es un indicador de calidad, frescura o grado de deterioro (FAO, 1999), la reducción de TMA en nuestros concentrados proteicos obtenidos es un buen resultado, ya que la TMA tiende a aumentar al pasar los días.

Esta reducción de TMA se debe a la extracción acuosa (agua ultrapura) y alcohólica (etanol) que se hizo apoyada del baño ultrasonido, ya que la TMA es un compuesto orgánico soluble en agua.

Lander Baliño-Zuazo & Alejandro Barranco (2016) indican que las cantidades de trimetilamina de aproximadamente 30 mg N-TMA Kg<sup>-1</sup> para peces marinos (merluza y caballa), 0.3 mg N-TMA Kg<sup>-1</sup> para pescado de río (trucha) son las máximas que puede ser aceptadas por un panel sensorial. Por otro lado; Marrakchi, Bennour, Bouchriti, Hamama, & Tagafait, (1990) clasifican las sardinas según su contenido de TMA. -Primer grado: TMA inferior a 10 mg/Kg: muy buena frescura. -Segundo grado: TMA de 10 a 30 mg/Kg: buena frescura. -Tercer grado: TMA de 30 a 50 mg/Kg: frescura intermedia.

Cantidades de TMA frecuentemente relacionada con olores punzantes de pescado y el rechazo sensorial de las muestras son 50-100 mg de N-TMA Kg<sup>-1</sup> (Marrakchi et al., 1990; citado por Lander Baliño-Zuazo & Alejandro Barranco, 2016).

Por lo consiguiente, nuestros concentrados proteicos presentan una concentración de < 12 mg de N-TMA Kg<sup>-1</sup>, lo que indica que son unos productos de buena frescura y calidad sensorial, y que se puede corroborar con lo expuesto por Manuel López-Benito & Manuel Gil, (1974) que señala que su concentrado proteico obtenido tiene una concentración de 21 mg de N-TMA Kg<sup>-1</sup> la cual, la hace una harina de buena calidad. Hay que tener en cuenta que esta concentración es aún mayor que la nuestra. Ahora, si el concentrado proteico 1 (M2) fue obtenido con las temperaturas de extracción más bajas del diseño experimental y el concentrado proteico 9 (M3) fue obtenido con las más altas, y ambos tienen concentraciones menores a 12 mg de N-TMA Kg<sup>-1</sup>, esto significa que, los demás concentrados proteicos obtenidos del diseño experimental también presentan una concentración de TMA de <12 mg de N-TMA Kg<sup>-1</sup>, indicando que todos los tratamientos realizados en este trabajo de investigación (9 ensayos experimentales) y los que se realicen, siempre y cuando estén dentro del rango de temperaturas del diseño experimental, nos servirán para obtener un concentrado proteico de buena calidad sensorial.

#### **4.4. EVALUACIÓN SENSORIAL DE ORDENAMIENTO**

Esta evaluación sensorial está vinculada con el análisis de trimetilamina, debido a que los panelistas de acuerdo a su criterio, ordenaron las muestras en función al olor a pescado que presentaban, de “menos intensa” a “más intensa”; y es sabido que el “olor a pescado” es atribuido por la presencia de TMA.

En función a los conocimientos previos, se esperaba que a medida que aumentase las temperaturas de extracción acuosa y/o alcohólica, la extracción de la trimetilamina

sería mayor, esto se podía experimentar cuando realizábamos la parte experimental, donde percibíamos que el sobrenadante centrifugado después de las extracciones a 60°C presentaba más olor a pescado que los demás tratamientos.

La evaluación fue realizada por 10 catadores o panelistas, los cuales, cada uno tuvo que ordenar 5 muestras diferentes (ANEXO 7).

Cabe resaltar que el olor en los 9 concentrados proteicos era evidentemente menos que en la harina de pescado, pero variaban de manera ligera entre ellos, por eso se emplearon 5 concentrados, los cuales presentaban mayor diferencia de temperaturas de extracción entre tratamientos. Además, que es mucho menos tedioso ordenar 5 muestras que 9.

Cuadro 28: Resultados de la evaluación sensorial de ordenamiento

Muestra	Panelista										Suma total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
148	5	4	5	4	5	5	3	4	5	5	45
915	4	5	4	5	3	3	5	5	4	4	42
364	2	2	3	1	4	4	4	2	3	2	27
785	3	3	2	3	1	2	1	3	2	1	21
215	1	1	1	2	2	1	2	1	1	3	15

148= Concentrado proteico 1 (20°C extrac. acuosa-20°C extrac. alcohólica), 915= Concentrado proteico 3 (20°C extrac. acuosa-60°C extrac. alcohólica), 364= Concentrado proteico 5 (40°C extrac. acuosa-40°C extrac. alcohólica), 785= Concentrado proteico 7 (60°C extrac. acuosa-20°C extrac. alcohólica), 215= Concentrado proteico 9 (60°C extrac. acuosa-60°C extrac. alcohólica).

En el cuadro 28 se muestran los resultados de la evaluación, donde a primera vista podemos observar que las sumas totales nos indican que se cumplió el orden que se esperaba obtener. De esta manera se comprueba que, a mayor temperatura de extracción, menor sería el olor, debido a que el calor ayuda a la separación de la TMA de otros compuestos.



Aplicando la tabla de Kramer (ANEXO 8) para 5 muestras o tratamientos y 10 repeticiones, se obtiene el par de número 20-40 que indican que los valores inferiores a 20 y superiores a 40 presentan diferencias significativas. Por esto, se puede afirmar que las muestras 148, 915 y 215 son diferentes.

La muestra 148 (calificada con 45 puntos) es la que tiene mayor olor y la muestra 215 (calificada con 15 puntos) es la que tiene menor olor. Las otras dos muestras (364 y 785) presentan una intensidad de olor intermedio y a pesar de la diferencia de puntuación (27 y 21), no puede decirse que una tenga más o menos olor que la otra, debido a que no son diferentemente significativos, con lo cual su posición relativa dentro de la ordenación es irrelevante.

#### **4.5. MÁXIMO CONCENTRADO PROTEICO**

Para la selección del máximo concentrado proteico, se hizo uso del análisis estadístico, el cual nos indicó que los parámetros óptimos: Temperatura de extracción acuosa = 20°C y temperatura de extracción alcohólica = 37.0268°C corresponden al máximo concentrado proteico. No obstante, debido a que estos parámetros no correspondían a ninguno de los 9 tratamientos o ensayos, se procedió a realizar otra corrida experimental con los parámetros mencionados por el análisis estadístico para obtener el máximo concentrado proteico.

##### **4.5.1. ANÁLISIS PROXIMAL**

En el cuadro 29 se muestra la composición del máximo concentrado proteico, la cual nos permite compararla con la harina de pescado. Se puede resaltar el aumento en el contenido de proteínas por parte del producto final de casi 9 puntos porcentuales, así como su disminución en grasas de también casi 9 puntos porcentuales.

Cuadro 29: Caracterización de la harina de pescado y del máximo concentrado proteico

Composición	Harina de pescado Prime	Concentrado proteico óptimo
Proteínas	67.8240% ± 0.2371%	76.7897% ± 1.4069%
Grasas	8.8873% ± 0.0199%	0.0588% ± 0.0102%
Humedad	8.1420% ± 0.0084%	4.2625% ± 0.0764%
Cenizas	15.8001% ± 0.0778%	17.2614% ± 0.0778%

Nuestro máximo concentrado proteico cumple con las especificaciones de proteínas mínimo 75%, humedad máxima 10%, grasas máximo 0.5%, expuestas por la FDA (1967); y se le puede clasificar como un concentrado proteico de tipo A según la categorización de la FAO (1961) para concentrados de proteína para uso humano.

Cabe señalar, que el DECRETO SUPREMO N° 015-2016-PRODUCE (2016), también clasifica 3 tipos de concentrados proteicos de forma similar a la FAO (1961), donde expresa que el Tipo A es un polvo virtualmente libre de olor y sabor y posee un contenido máximo de grasa de 0.75 por ciento. Basándonos en esto, nuestro máximo concentrado también clasifica como un concentrado proteico Tipo A.

#### 4.5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico se realizó sobre el máximo concentrado proteico, mientras que los valores microbiológicos de la harina de pescado prime fueron recogidos de los informes de ensayos que se realizó por parte de la empresa proveedora.

Cuadro 30: Análisis microbiológico del máximo concentrado proteico

Ensayos Microbiológicos	Unidades	Resultados		R.M.N°591-2008-MINSA			
		Harina de pescado	Concentrado proteico óptimo	n	c	m	M
Mohos	UFC/g	<10	14	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Levaduras	UFC/g	<10	<10	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Enterobacterias	UFC/g	<10	58	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella</i>	25 g	Ausencia	ausencia	5	0	ausencia	

En el cuadro 30, se muestra los resultados del análisis microbiológico tanto para la harina de pescado como para el máximo concentrado proteico, ambos ensayos realizados por laboratorios acreditados. Se aprecia que la materia prima cumple con los indicadores microbiológicos, que nos permiten medir el grado de higiene y control que se ha mantenido en los procesos de obtención del producto establecidos según la R.M. N°591-2008-MINSA “Norma Sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”, es decir se acepta la materia prima para el proceso.

El manual Indicadores sanitarios y de inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación (2016), menciona que en las categorías 4, 5, y 6 se encuentran los microorganismos no patógenos que suelen estar asociados a la higiene (microorganismos indicadores de higiene) tales como Coliformes (que para efectos de esta Directiva se refiere a Coliformes totales), *Escherichia Coli*, anaerobios sulfito reductores, *Enterobacteriaceas*.

En base a esto, de acuerdo a los resultados del máximo concentrado proteico, para el caso de las Enterobacterias se excedió al límite inferior o en todo caso aumentó, esto pudo deberse a algunas deficiencias en las prácticas de higiene, en la manipulación del alimento, a las condiciones microbiológicas de los equipos de proceso, a falta de control de temperaturas de almacenamiento o al hallazgo de microorganismos indeseables en el ambiente de proceso. Cabe resaltar, que nuestro producto mantiene su inocuidad.

Hay que tener en cuenta que en los ambientes del laboratorio donde se trabajó, también estuvieron otros tesisistas, por tal motivo había inconvenientes en el uso de ciertos equipos, que nos llevó a trabajar de manera no continua, teniendo que esperar algunos días para seguir con la parte experimental. En nuestro caso, se hizo uso de la campana desecadora y/o refrigeradora para guardar el producto hasta su siguiente etapa. Es aquí donde las condiciones higiénicas ya no estaban bajo nuestra manipulación, ya que tanto en la campana desecadora como en el refrigerador había otros productos o insumos, cada uno con su microflora bacteriana, la cual contaminaba nuestra muestra.

Por otro lado, se buscaba contrarrestar esto, usando el baño ultrasonido en los procesos de extracción acuosa y alcohólica; ya que los ultrasonidos son una técnica con gran potencial para utilizarla en la inactivación de las poblaciones microbianas ya que la cavitación causada por los cambios en la presión de las ondas ultrasónicas permite su reducción sin un incremento elevado de la temperatura del producto (Piyasena et al. 2003). Los aumentos de temperatura extremos, los cambios de presión y la formación de radicales provocan daños en las paredes de los microorganismos tras provocarles un estrés físico

importante. Tiene un efecto mayor en levaduras, bacterias grampositivas y gramnegativas que en las esporuladas.

De acuerdo a los resultados para las levaduras se evidencia que se mantuvo, a diferencia de los mohos, hay un ligero incremento, estos microorganismos están asociados con la vida útil y alteración del producto, lo que indica que se debe de mantener refrigerado y cerrado el producto durante su almacenamiento.

#### 4.5.3. ANÁLISIS COLORIMÉTRICO (CIELAB)

El análisis colorimétrico fue realizado sobre la harina de pescado prime (materia prima) y el máximo concentrado proteico (producto).

En el cuadro 31 podemos observar los valores numéricos que representan el color de la harina de pescado prime y del máximo concentrado proteico.

Cuadro 31: Análisis colorimétrico de la harina de pescado y del máximo concentrado proteico

Índices de color	Descripción	Harina de pescado Prime	Concentrado proteico
L*	Grado de claridad	44.59 ± 1.29	52.71 ± 1.69
a*	Denota el color verde/rojo	3.97 ± 0.12	2.20 ± 0.03
b*	Denota el color azul/amarillo	28.51 ± 0.46	22.56 ± 0.45

Donde nuestro concentrado proteico es más claro o luminoso (mayor valor L\*), y menos amarilla que la harina de pescado (menor valor b\*); pero de esta manera hallando el color visualmente por medio de las coordenadas, aún se puede caer de cierta forma en la subjetividad.

Para poder reportar el color de manera objetiva totalmente, se decidió acudir a la página web: <http://colormine.org/delta-e-calculator/> o herramienta virtual que utilizan otros laboratorios y empresas dedicadas a la evaluación sensorial, donde colocamos los valores numéricos y como resultado obtenemos un color directamente, sin la necesidad de estar buscándolo de manera visual en una gráfica.

En la figura 16 observamos el color que se obtiene al ingresar nuestros datos numéricos, y el valor Delta E ( $\Delta E^*$ ) que nos indica la magnitud de la diferencia total de color entre la harina de pescado prime y el concentrado proteico.



Figura 16. Valor Delta E ( $\Delta E^*$ ) para la harina de pescado y máximo concentrado proteico

Este color obtenido virtualmente representa de manera aceptable el color real de la harina de pescado y del máximo concentrado proteico, indicando indirectamente que las medidas realizadas y el equipo utilizado están en buenas condiciones. En la figura 17 se observa como lucen ambas muestras a

condiciones normales (dentro del laboratorio, durante la tarde); mientras que en la figura 18 se observa a ambas muestras bajo iluminación artificial. Es en estas condiciones donde se nota un cambio mayor de color.



Figura 17. Harina de pescado prime y máximo concentrado proteico (sin iluminación)



Figura 18. Harina de pescado prime y máximo concentrado proteico (con iluminación)

El concentrado proteico obtenido presenta una totalidad crema, un color más claro que la harina de pescado (marrón dorado). Este cambio de color se aprecia en primera instancia después de la etapa de desgrasado con hexano, por lo que deducimos que el cambio de color se debe a la extracción de grasas a la que fue sometida, debido a que la grasa influye en las características de

textura y sensoriales como el color, sabor, jugosidad y olor. (Leyva-Mayorga et al., 2002).

Cabe resaltar que en esta etapa el aceite de pescado que se obtiene presenta un color marrón-amarillo, muy similar a la harina de pescado sin procesar.

En segunda instancia, el cambio de color se acentúa un poco más después de la extracción alcohólica, debido a que en esta etapa también se extrajeron grasas solubles en etanol, pero en menor proporción que en la etapa de desgrasado propiamente.

Según López-Romero (2010) el color de un producto depende de los ingredientes con el que está formulado y de los factores como el agua libre y contenido de grasa. Esto explica el cambio de color de nuestro concentrado proteico, el cual fue sometido a extracciones (acuosa, de grasas, alcohólica) y secados.

En la figura 19 podemos observar el aceite de pescado que se recupera del etanol en el rotavapor, la cual presenta un color marrón-oscuro.



Figura 19. Aceite recuperado del etanol empleado en la extracción alcohólica, utilizando el rotavapor



#### 4.5.4. ANÁLISIS DE HISTAMINA

El análisis de histamina se realizó sobre el máximo concentrado proteico, mientras que la concentración de histamina de la harina de pescado prime fue recogida de los informes de ensayos que se realizó por parte de la empresa proveedora.

Cuadro 32: Análisis de histamina del máximo concentrado proteico

Ensayo	Unidades	Resultados	
		Harina de pescado	Concentrado proteico
Histamina	ppm	312.53	16

El cuadro 32 muestra los resultados de histamina en la harina de pescado, la cual no es apta para consumo humano; en cambio, el máximo concentrado proteico, según el manual Indicadores sanitarios y de inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación (2016), cumple con el estándar para certificar que es apta para el consumo humano con un valor promedio observado inferior a 100 ppm. Esto pudo deberse a las etapas de extracción que se sometía a la materia prima con el uso de ultrasonido, teniendo en cuenta la solubilidad de la histamina.

Estas tecnologías alternativas ofrecen la posibilidad de obtener alimentos de alta calidad con características similares al producto fresco, sin comprometer la seguridad alimentaria y en algunos casos mejorando las funcionalidades de estos (Soria y Villamiel 2010).

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- La harina de pescado prime de anchoveta procedente de la industria pesquera de Chimbote tiene como componente más abundante a las proteínas con un  $67.8240\% \pm 0.2371\%$ ; grasas  $8.8873\% \pm 0.0199\%$ , humedad  $8.1420\% \pm 0.0084\%$  y cenizas  $15.8001\% \pm 0.0778\%$ .
- Se comprobó que a medida que se eleva la temperatura de extracción acuosa y alcohólica por encima de 20 y 37 °C respectivamente, la concentración de proteínas y grasas, en el producto final, tienden a disminuir.
- Los parámetros óptimos para la obtención del máximo concentrado proteico para consumo humano a partir de harina de pescado son: Extracción acuosa al 20% (p/v) a 20°C (agua ultrapura) en baño ultrasonido (60 Hz) por 45 minutos, secado a 45°C por 12 h, extracción con solvente hexano, secado a 45°C por 12 h, extracción alcohólica al 20% (p/v) a 37.0268°C (etanol) en baño ultrasonido (60 Hz) por 45 minutos, secado final a 55°C por 12 h.
- El máximo concentrado proteico para consumo humano tiene  $76.7897\% \pm 1.4069\%$  de proteínas,  $0.0588\% \pm 0.0102\%$  de grasas,  $4.2625\% \pm 0.0764\%$  de humedad y  $17.2614\% \pm 0.0778\%$  de cenizas.
- La extracción de la trimetilamina y otros compuestos asociados al olor de “pescado”, ocurre en las etapas de extracción acuosa, desgrasado, extracción alcohólica, y tiene un comportamiento inverso proporcional de manera que, al aumentarse las temperaturas de las extracciones, disminuye la concentración de trimetilamina junto con su olor a pescado o pescado deteriorado.

- El máximo concentrado proteico tiene una concentración de trimetilamina menor a  $12 \text{ mg N-TMA Kg}^{-1}$  y una concentración de histamina de 16 ppm, que indican su buena calidad sensorial.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

- Determinar la concentración de proteínas solubles en la harina de pescado prime y en el concentrado proteico final, con el fin de evaluar su comportamiento frente a la extracción acuosa.
- Realizar un análisis de perfil de aminoácidos en el concentrado proteico para evaluar el efecto que tiene el tiempo y temperaturas de extracción sobre estos, empleando dos métodos: uno utilizando el baño ultrasonido como en este trabajo de investigación y otro sin utilizarlo.
- Evaluar sensorialmente productos elaborados a base de este concentrado proteico, dirigidos a un público infantil, adolescente y adulto mayor.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

- AAFCO (Association of American Feed Control Officials). (2000). Official Publication, Association of American Feed Control Inc. West Lafayette, IN 47971 USA, 444p.  
<http://www.aafco.org>
- Accinelli R., López L. (2013). Estado nutricional y condición física de futbolistas adolescentes luego del consumo de harina de pescado como complemento nutricional. Perú.
- Anzaldúa M. A. (1994). La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Editorial Acribia. Zaragoza.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis. 15th Ed. Arlington, Virginia. USA. 854-855pp.
- AOAC. (1995). Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemist. Washington DC. 1018 pp.
- A.O.A.C. (1984). Official Methods of Analysis 13 th Edition
- Albrecht Ruiz, M. y Salas Maldonado, A. (2001). El pescado y la histamina (escombrotóxina). Infopesca Internacional. 8: 20-26.
- Anderson, I. S., Lall, S. P., Anderson, D. M. y McNiven, M. A. (1993). Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. Aquaculture, 115: 305-325.
- Au Díaz, N. (1996b). Elaboración de harina de pescado de alta calidad. Manual preparado especialmente para Esmital Ltda. Concepción, Chile. 126 pp.
- Baertl Juan (1966). Apuntes sobre nutrición en el Perú.
- Baertl Juan, Enrique Morales, Gustavo Verastegui and George Graham (1970). Diet supplementation for entire communities. Growth and mortality of infants and children. The American Journal of Clinical Nutrition. Vol 23 N° 6. June. pp 707-715.

- Basso, L. R. Y Vieites, C. M. (1995). Requerimientos, alimentos y raciones. En: Manual de producción porcina. Capítulo 3. Ed. Vieites, C. M. Editorial Hemisferio sur, Buenos Aires, Argentina. 116 pp.
- Bendicho, C. y Lavilla, I. (2000). Ultrasound Extraction. En I.D. Wilson, E. R. Adlard, M. Cooke, y C. F. Poole (Eds). Encyclopedia of Separation Science. Academic Press. Reino Unido. Pp. 144 – 1454
- Bertullo, V. (1975). Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustaceos. Edición Hemisferio Sur. Buenos Aires, 1975, 537pp.
- Borgstrom G. (1965). Fish as Food, vol. 2, Michigan Academic Press. N. Y., London 377 - 422.
- Borgstrom G. (1965). Fish as Food, vol. 3, Michigan Academic Press. N. Y., págs. 411 - 443.
- Bryan A., Bryan C. y Bryan G. (1962). Bacteriology. Principles and Practice. 6th. Ed. Barnes & Noble, Inc. N. Y., págs. 97-122-123.
- Calaveras, J. (2004). “Nuevo Tratado de Panificación y Bollería”. Segunda Edición. Editorial Mundi Prensa Libros S. A. España.
- Chua, M. – T., Tung, Y.- T. y Chang, S. – T. (2008). Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology*. 99: 1919-1925.
- Civera, R., E. Goytortúa, S. Rocha, H. Nolasco, F. Vega-Villasante, E. Balart, E. Amador, G. Ponce, G. Colado, J. Lucero, C. Rodríguez, J. Solano, A. Flores-Tom, J. Monroy & G. Coral. (2000). Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. In: R. Civera-Cerecedo, C.J. Pérez-Estrada, D. Ricque-Marie & L.E. Cruz-Suárez (eds.). *Avances en nutrición acuícola IV*. La Paz, B.C.S., pp. 349-365.

- Cood C. y Zaldívar L., (2000). Transporte marítimo de harinas: ¿Es realmente peligrosa una carga de harina? Chile Pesquero 115: 21-24.
- CONSORCIO PESQUERO DEL PERU S.A. (1965). *Peruvian fishmeal*. Lima-Perú.
- Cortez J. (1962). ¿Qué es y para qué sirve la harina de pescado? Revista Pesca. Sociedad Nacional de Pesquería. Lima. pp. 11-17.
- Dalgaard, P. (1994). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int. J. Food Microbiol.* (In press).
- Dalgaard, P. (1994). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish *Int. J. Food Microbiol.* (In press).
- Del Valle Francisco (1970). Una contribución a la solución del problema de la desnutrición de proteínas en México: un método nuevo para la conservación rápida y barata del pescado. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). México. Buenos Aires.
- Eckles C., Combs W. y Macy H. (1951). *Milk and milk products*. 4th. Ed. N. Y., McGraw Hill, Co. Inc., pág 46.
- Esparza M., Dominguez R., Gonzalez N. - Mendez, Pacheco R. Y Ramos E. (1988). Caracterización de la calidad de algunas bolognas en México. III. Evaluación sensorial con panelistas no entrenados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol 38 N° 2. Junio. pp. 261-277.
- FAO (1961). Alimentación. Futura evolución de la producción y utilización de la harina de pescado. Vol 2. Roma. Italia.
- FAO (1975). La producción de harina y aceite de pescado. Roma. Italia.
- FAO (1986). Food and Nutrition Paper 14/7 Roma.
- FAO (1989). Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.
- FAO (1996). Anuario Estadístico de Pesca. Productos Pesqueros. Roma. Italia.

- FAO (2001a). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 págs.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América. U. S. P. XV, (1995), págs. 903-911.
- Federal Register (1967). 32, 1173 -5 Fraga Castro, I. & B. Jaime Ceballos. 2011. Efecto de ensilados de pescado hígado de tiburón en el crecimiento de *Litopenaeus schmitti*, en sustitución de la harina y el aceite de pescado. *Redvet*, 12(11): 1-15.
- Graham George G., Juan Baertl & Angel Cordano. (1962). Evaluation of fish flour in the treatment of infantile malnutrition. En *Fish in Nutrition*. Heen and Kreuzer De. London Fishing News. England. pp.271-276.
- Food and Drug Administration (FDA). (1967).
- Ferrando Grasso, L. C. (2002). Comunicación personal vía e-mail. 9 y 17 de Octubre.
- Guerrero, (2013). Evaluación nutricional de galletas enriquecidas con diferentes niveles de harina de pescado.
- Guillen, R. (1980). "Operaciones básicas de obtención de concentrado proteico de pescado y su aplicación en galletas". Tesis – UNFV, 96 Pag.
- Graham George G., Angel Cordano & Juan Baertl. (1963). Studies in infantile malnutrition. II. Effect of protein and calorie intake on weight gain. *The Journal Nutrition*. Vol 81 N° 3. November. pp.249-254.
- Graham George G., Angel Cordano & Baertl, J. (1965). Dietary protein quality in infants and children. I. Evaluation in rapidly growing infants and children of fish protein concentrate alone and in combination with wheat. *American Journal Diseases Child*. Vol 110 Set. pp.248-257.
- Graham George G., Juan M. Baertl & Angel Cordano. (1966). Studies in infantile malnutrition. V. Effect of protein and calorie intake on weight gain. *The Journal of Nutrition*. 18:16 Vol. 81 N° 3. Nov. pp.16-19.

- Grand R. & J. Sutphen. (1987). Diet and brain function: Available information and misinformation. Pediatric Nutrition. E.E.U.U.
- González, A., Kafarov, V. y Guzmán A. (2009). Desarrollo de métodos de extracción de aceite en la cadena de producción de biodiesel a partir de micro-algas. Prospect. Vol. 7, No. 2, Julio - Diciembre de 2009, págs. 53-60.
- Gutierrez, M. C., Droguet M. (2002). Identificación de compuestos volátiles por CG-MS. Edición UPC.
- Hart, F. L. y Fisher H. 1. (1991). Carne y productos cárnicos. En: Análisis moderno de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 217-269p.
- Hjaltason Baldur. (1989). New frontiers in the processing and utilization of fish oil. Eds. Somogyi JC, Müller HR: Nutritional Impact of Food Processing. Bibl Nutr Dieta. Basel, Karger . N° 43. pp 96-106.
- IFOMA (International Fishmeal and Fish Oil Manufacturers Association). (1998). Quality Control of Fish meal. < <http://www.iffco.org.uk/conmeal.htm> > (Consulta: 21 de Agosto de 2002).
- La Organización Internacional de la Harina y el Aceite de Pescado (IFFO). (2008).
- Kimbaris, A. C., Siaty, N. G. Daferera, D. J., Tarantilis, P. A., Pappas, C. S., y Polissiou, M. G. (2006). Comparison of distillation and ultrasoundassisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). Ultrasonics Sonochemistry. 13:54-60.
- López M., Gil M. (1974). Obtención de concentrado de proteína a partir de especies de pescado de bajo precio
- Luiz G. Elias, Roberto Jarquin, Ricardo Bressani y Constantino Albertazzi (1968). Suplementación del arroz con concentrados proteicos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol 18 N° 1. Marzo. pp. 27-38.



- Madrid, A., Madrid, J.M. y Madrid, R. (1995). Piensos, harinas, aceites y concentrados proteínicos de pescado. En: Piensos y alimentos para animales. Capítulo 4. Mundi-Prensa Libros, Madrid, España. 35-56p.
- Manual Indicadores sanitarios y de inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación (2016).
- Margalef, R. (1977). El ecosistema en el tiempo. En: Ecología (2da. Ed.). Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 753-761p.
- Mariño S. (2012). Harina de Pescado. Universidad Politécnica Territorial del edo Portuguesa J.J. Montilla. Ingeniería Agroalimentaria.
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. Recuperado de: <http://farmacia.udea.edu.co/ff/esencias2001b.pdf>
- Medina Rocío (1993). Implementación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos en la elaboración de harina de pescado. Tesis Ingeniero pesquero. UNALM. Lima. Perú.
- LA MICRO Y PEQUEÑA EMPRESA (MIPE). (1999). Chile
- Ministerio de la Producción - Dirección General de Políticas y Desarrollo Pesquero. (2014). Perú.
- Ortega, Ortega y Castro, (1970). Tratamiento de la harina de pescado para hacerla apta para consumo humano. Colombia.
- Ortuño M. F. (2006). Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes. España. 274p
- Paredi, M.E. Y Yeannes, M.I. (1987). Histamina en productos pesqueros. Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias. Revista de Ciencias Agrarias. vol. VIII no.1-2:5-12.

- Pastor Eduardo (1995). Harinas especiales: Procesos, desarrollo y mercado. Revista Pesca. Mayo-Junio.
- Pelt –SPDP. (1993). Sistematización de procesos del proyecto tecnología pesquera”. Puno-Perú, 60 pág.
- Pesca (1962). Revista editada por la Sociedad Nacional de Pesquería. Harina de pescado para consumo humano. pp. 11-17. Lima. Perú.
- Pesca (1964). Revista editada por la Sociedad Nacional de Pesquería. Guerra a la desnutrición. Vol 9 N° 3.
- Pike J. (1990). Perspectivas internacionales sobre las harinas de pescado especiales. Conferencia Anual de la IAFMM en Hong Kong. Reino Unido.
- Proestos, C. y Komaitis, M. (2006). Ultrasonically assisted extraction of phenolic compounds from aromatic plants: comparison with conventional extraction techniques. Quality Journal of Food. 29:56-582.
- Pike, I. H. 1999. Health benefits from feeding fish oil and fish meal. The role of long chain omega-3 polynsaturated fatty acid in animal feeding. IFOMA (International Fishmeal and Fish Oil Manufacturers Association), UK. Technical Bulletin No. 28. 22 pp.  
< <http://www.iffa.org.uk/tech/d5.htm> > (consulta: 5 de septiembre de 2002).
- Ramírez M. (1974). La harina de pescado para el consumo humano. Revista viernes médico. Vol 25 N° 2. pp. 207-211.
- Rehbein, H. y J. Oehlenschlager (1982). Zur Zusammensetzung der TVB-N fraktion (fluchtige Basen) in sauren Extrakten und alkalischen Destillaten von Seefischfilet. Arch. für Lebensmittelhyg. 33, 44-48.
- R.M.N°591-2008-MINSA/DIGESA “Norma Sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano”.

- Rojas Sergio (1979). *Nutrición Animal Aplicada*. Ed. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
- Rojas Sergio (1995). *Comercialización de la harina de pescado para consumo animal*. En *Mundo Avícola* N° 15. Lima. Perú.
- Rojas Sergio (1996 a). *Experiencia e investigación en el uso de harina de pescado en alimentación de animales*. UNALM. Lima. Perú.
- Rojas Sergio (1996 b). *La desnutrición y la proteína del mar*. En *Agroenfoco* N° 83.
- Sambucetti Maria E. y Juan C. Sanahuja (1970). *El valor nutritivo de las harinas de pescado y su relación con el contenido en lisina y metionina disponibles*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol 20 N° 2 .Junio. pp. 119-133.
- Sernapesca (Servicio Nacional de Pesca). (2000). *Métodos de análisis químicos para productos pesqueros de exportación*. Programa de laboratorio, norma técnica, sección 2. Sernapesca, departamento de Sanidad Pesquera, Chile.
- Silva Ortiz D. (2003). *Elaboración de harina de pescado*. 132p. Buenos aires, Argentina
- TABLES OF FEED COMPOSITION. (1982). United States-Canadian. National Academy Press. Washington, D.C.
- Tanikawa, E. (1985). *Fish scrap (cake) and fish meal*. In: *Marine products in Japan*. Revised Edition. Koseisha Koseikaku Co., Ud., Tokyo. 505 pp.
- TÉCNICAS DE FRAGMENTACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LAS CÉLULAS, 2009
- THE NUTRITIVE CONTENT OF PERUVIAN, ANCHOVY MEAL EVALUATED BY CHEMICAL METHODS. (1968). United States-Canadian
- The Merck Index of Chemical and Drugs (1960). Merck & Co. Inc., págs. 147 y 1068.

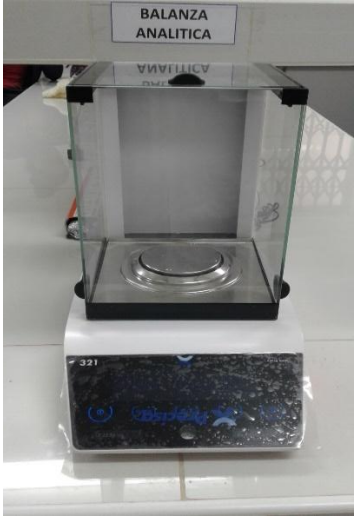



- Thongson, C., Davison, P.M., Mahakarnchanakul, W. y Weiss, J. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 401-406.
- UNICEF (1998). Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia. Estado mundial de la infancia.
- U. N. A. L. M. - INSTITUTO NACIONAL DE DESARROLLO AGROINDUSTRIAL (1983) Sub-proyecto 1.4: Desarrollo de alimentos a base de pescado, cereales y tubérculos. Lima. Perú.
- Van Veen A. Y M. Van Veen (1973). Labor precursora sobre alimentos ricos en proteínas. *Noticiario de Nutrición*. Vol 11 N° 4.pp. 23-26.
- Watts B.M., G.L. Ylimak, L.E. Jeffery Y L.G. Elías. (1992). Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. CIID. Ottawa. Canadá.
- WOOD C. D., R. MONTAÑO Y N.
- Windsor, M. y Barlow, S. 1983. Introducción a los subproductos de la pesquería. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. 1-139p.
- Windsor M. y Barlow S. (1984). Introducción a los subproductos de pesquería. Editorial Acribia.
- Yeannes, M.I. Y Casales, M.R. (1995). Influencia del proceso en el nivel de histamina en productos pesqueros. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. 262: 93-98. Madrid, España.
- Zaldívar L., J. (1992). Criterios de clasificación de harinas de pescado. *Chile Pesquero*. 71: 43-47.
- Zaldívar L., J. (1994a). Nuevas tendencias a las harinas especiales. *Chile Pesquero*. 82:52-58.

Zaldívar L., J. (1995). Calidad y competitividad de las harinas de pescado chilenas. Chile Pesquero. 85: 51-55.

Zaldívar Javier (1996). La calidad de la harina de pescado y sus formas de control. Revista Chile Pesquero N° 95. Noviembre. pp. 47-50.

## VII. ANEXOS

### ANEXO 1. Equipos utilizados en la parte experimental (proceso)

Balanza analítica	Baño ultrasonido
 A white analytical balance with a glass enclosure. A label above the enclosure reads "BALANZA ANALITICA". The balance has a digital display and a weighing pan.	 A white ultrasonic bath with a blue panel on the side that says "BRANSON" and "5800". A label above it reads "BAÑO ULTRASONICO". It has a digital display and control buttons on top.
Centrifuga refrigerada	Estufa
 A white refrigerated centrifuge with a digital display and a handle on top. A label on the front reads "CENTRIFUGA REFRIGERADA" and "Sigma".	 A stainless steel incubator with a digital display showing "43.2 °C". It has a logo on the front that says "HOL FAK".
Campana desecadora	Refrigeradora



Soxhlet



Rotavapor



**ANEXO 2.**  
**Equipos utilizados en la parte experimental (análisis)**

Kjeldahl



Soxtec 2043



Mufla



Colorímetro

Estufa

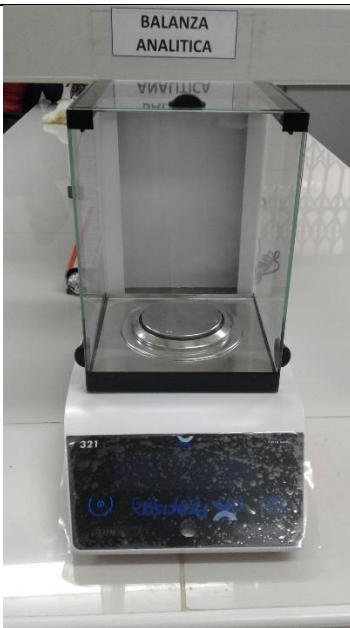




Balanza analítica

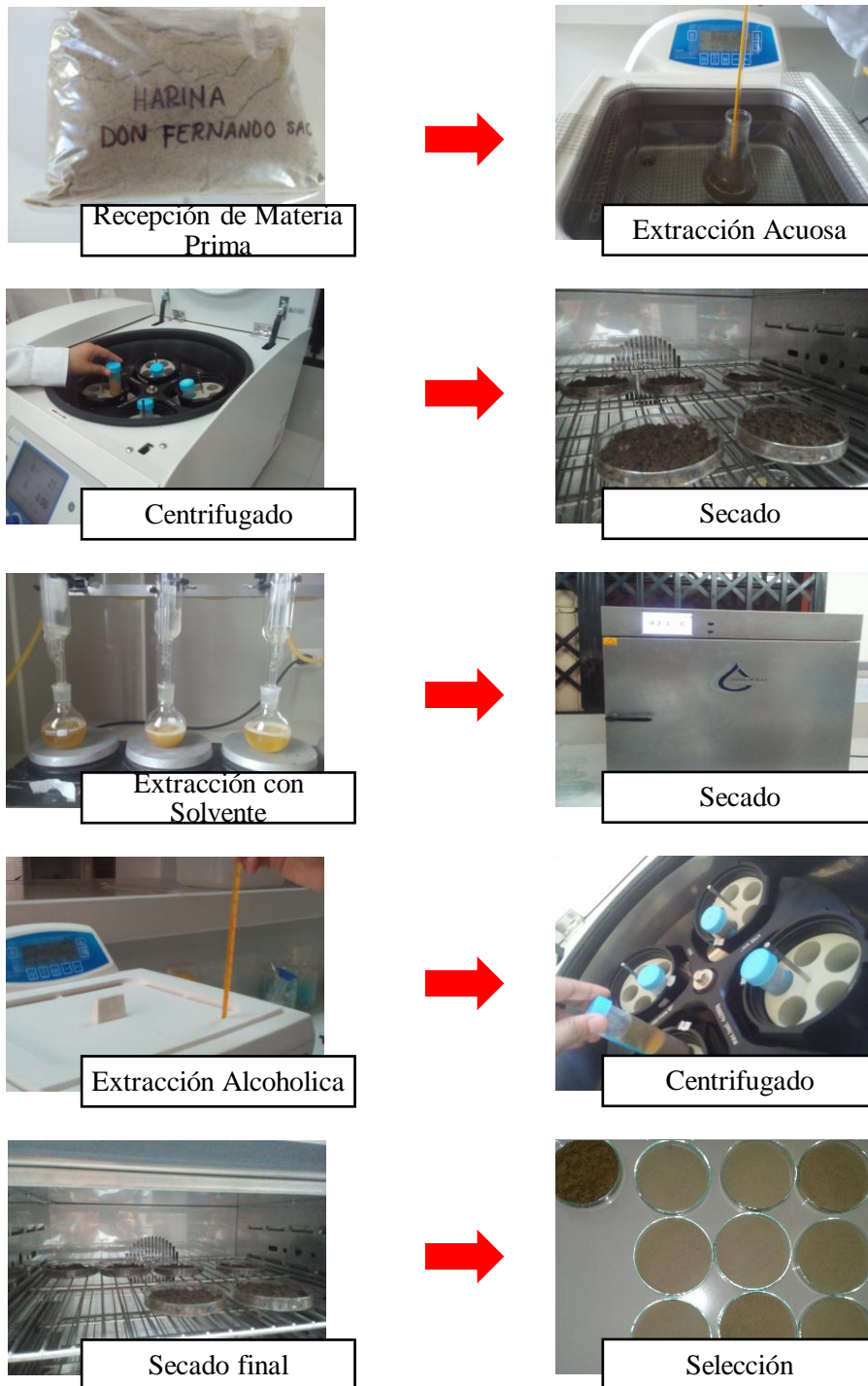


Cocinilla



### ANEXO 3.

#### Diagrama de flujo con imágenes del proceso de obtención del concentrado proteico



**ANEXO 4.**  
**LABICER. Laboratorio de investigación y certificaciones-FC-UNI**

LABICER	FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL - UNI
	



## ANEXO 5.

### Análisis de trimetilamina al concentrado proteico óptimo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABICER (Laboratorio N° 12)  
ANÁLISIS QUÍMICO, CONSULTORÍA E INVESTIGACIÓN



#### INFORME TÉCNICO N° 0977 - 17 - LAB. 12

1. DATOS DEL SOLICITANTE
    - 1.1 NOMBRE DEL SOLICITANTE : JOHANN LUIGI MEJIA ROCHA
    - 1.2 DNI : 70871720
  2. CRONOGRAMA DE FECHAS
    - 2.1 FECHA DE ENSAYO : 11 / 07 / 2017
    - 2.3 FECHA DE EMISIÓN : 12 / 07 / 2017
  3. ANÁLISIS SOLICITADO : ANÁLISIS DE TRIMETILAMINA
  4. DATOS REFERENCIALES DE LA MUESTRA
    - 4.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS : 03 MUESTRAS
- | CODIFICACIÓN | DESCRIPCIÓN             |
|--------------|-------------------------|
| M1           | Harina de pescado prime |
| M2           | Concentrado proteico #1 |
| M3           | Concentrado proteico #2 |
- 4.2 TESIS : "DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN CONCENTRADO PROTEICO PARA CONSUMO HUMANO A PARTIR DE HARINA DE PESCADO"
  5. LUGAR DE RECEPCIÓN : LABORATORIO LABICER - FACULTAD DE CIENCIAS
  6. CONDICIONES AMBIENTALES : Temperatura: 24.5 °C; Humedad relativa: 55%
  7. EQUIPO UTILIZADO : Cromatógrafo de gases acoplado con espectrómetro de masas, SHIMADZU GCMS -QP 2010 ULTRA
  8. PARAMETROS UTILIZADOS

[GC-2010]  
Temperatura del horno de columna. : 25.0 °C  
Temperatura de inyección: 70.00 °C  
Modo de inyección: Split  
Modo de control del flujo: Pressure  
Presión: 100.0 kPa  
Flujo total: 197.9 mL/min  
Flujo de columna: 1.93 mL/min  
Velocidad lineal: 49.7 cm/sec  
Flujo de purga: 3.0 mL/min  
Split Ratio: 100.0



#### Programación de temperatura del horno

VELOCIDAD (°C/MIN)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE ESPERA (MIN)
	25.0	3.00
2.00	35.0	2.00

INFORME TÉCNICO N° 0977-17- LAB. 12

Página 1 de 6

Av. Túpac Amaru 210 Lima 31, Perú. Central: 481 1070. Teléfono: 382 0500. E-mail: [otilia@uni.edu.pe](mailto:otilia@uni.edu.pe)

[GC Program]  
[GCMS-QP2010 Ultra]  
Temperatura de la fuente de iones: 160.00 °C  
Temperatura de la interface: 150.00 °C  
Tiempo del solvente de corte: 0.50 min

[MS Table]  
Tiempo de inicio: 1.00min  
Tiempo final: 10.00min  
ACQ Mode: Scan  
Tiempo de evento: 0.30sec  
Velocidad de escaneo: 1666  
Inicio m/z: 35.00  
Fin m/z: 500.00

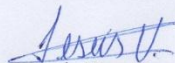
## 9. RESULTADOS

MUESTRA	RESULTADOS (ppm)	RESULTADOS (mg de N-TMA/100 g de muestra)	MÉTODO DE REFERENCIA
M1	15.97	1.597	BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.) 2005. N°. 128
M2	No detectado (*)	No detectado (*)	
M3	No detectado (*)	No detectado (*)	

(\*) Menor a 12 ppm

## 10. VALIDEZ DEL INFORME TÉCNICO

Los resultados de este Informe técnico son válidos solo para la muestra proporcionada por el solicitante del servicio en las condiciones indicadas del presente informe técnico.

  
Bach. Jesús Utano Reyes  
Analista  
LABICER -UNI

  
MSc. Otilia Acha de la Cruz  
Responsable de Análisis  
Jefa de laboratorio  
CQP 202

El Laboratorio no se responsabiliza del muestreo ni de la procedencia de la muestra.



**ANEXOS**

**CROMATOGRAMAS DE LOS ESTÁNDARES**

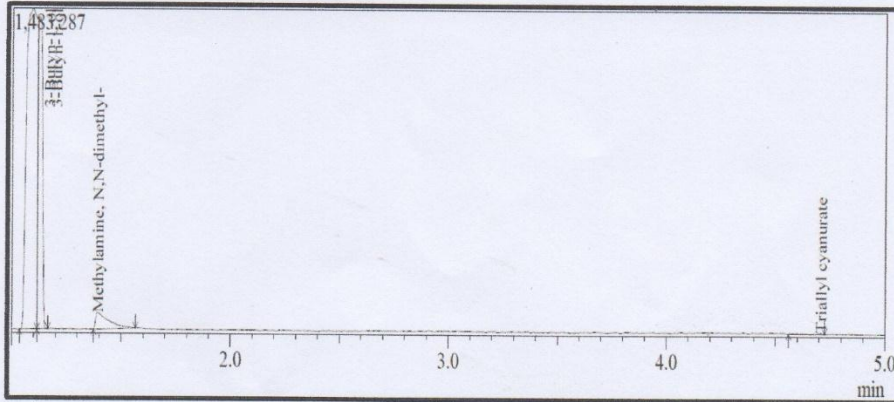


FIGURA N°1: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°1

TABLA N°1: DATOS DEL CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°1

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.091	5061159	70.20	1466861	49.40	3-Butyn-1-ol
2	1.125	1810199	25.11	1422139	47.89	3-Butyn-1-ol
3	1.394	320674	4.45	76905	2.59	Methylamine, N,N-dimethyl-
4	4.708	17490	0.24	3596	0.12	Triallyl cyanurate
		7209522	100.00	2969501	100.00	

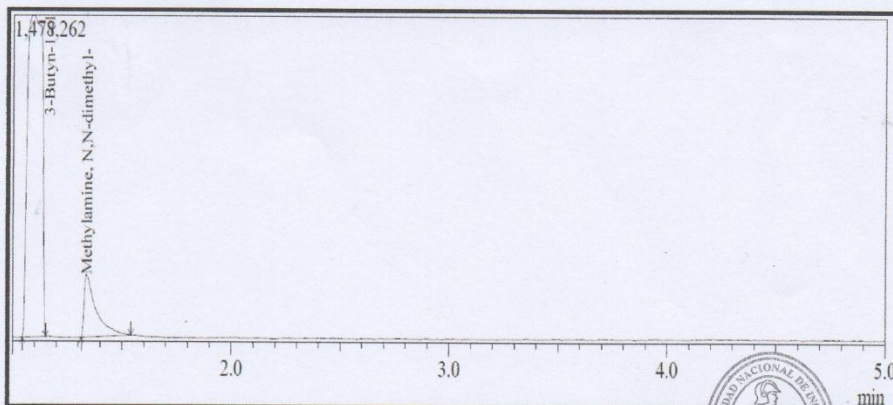


FIGURA N°2: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°2

TABLA N°2: DATOS DEL CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°2

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.087	6758945	86.18	1458214	83.55	3-Butyn-1-ol
2	1.337	1079590	13.76	283195	16.23	Methylamine, N,N-dimethyl-
3	5.825	4723	0.06	4002	0.23	Acetaldehyde, (3,3-dimethylcyclohexylid)
		7843258	100.00	1745411	100.00	

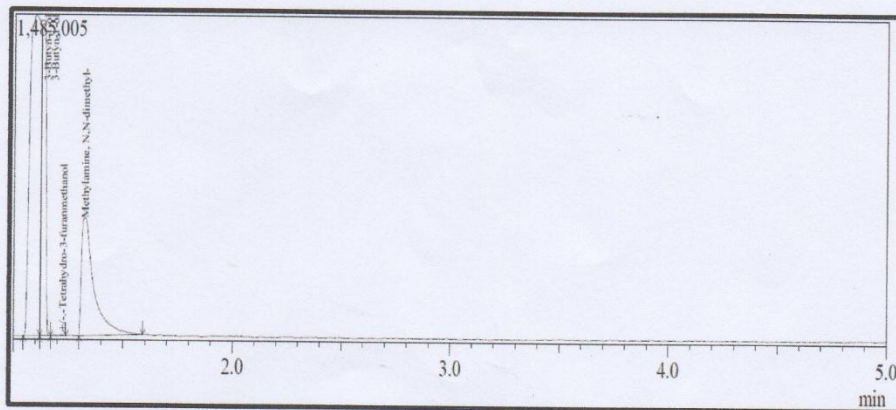


FIGURA N°3: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°3

TABLA N°3: DATOS DEL CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°3

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.095	5011704	55.12	1468960	42.77	3-Butyn-1-ol
2	1.130	1941562	21.35	1423520	41.45	3-Butyn-1-ol
3	1.225	8204	0.09	3633	0.11	.+/.-Tetrahydro-3-furanmethanol
4	1.323	2130458	23.43	538057	15.67	Methylamine, N,N-dimethyl-
		9091928	100.00	3434170	100.00	

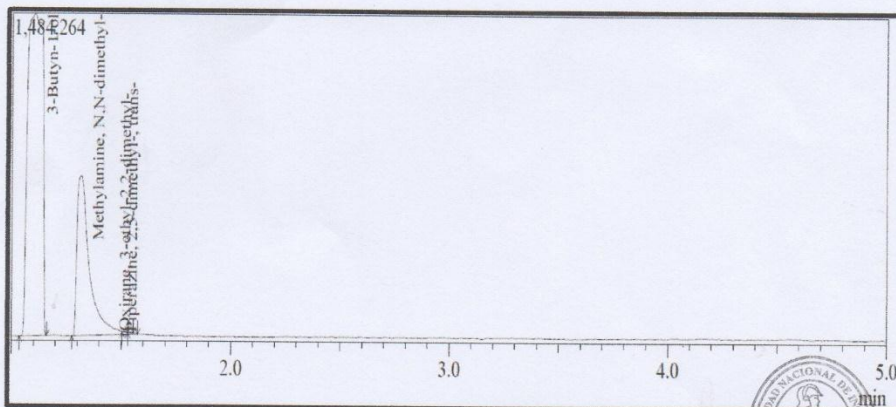


FIGURA N°4: CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°4

TABLA N°4: DATOS DEL CROMATOGRAMA DEL ESTÁNDAR N°4

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.101	6912162	70.38	1462408	66.58	3-Butyn-1-ol
2	1.316	2903260	29.56	726616	33.08	Methylamine, N,N-dimethyl-
3	1.515	1062	0.01	2007	0.09	Oxirane, 3-ethyl-2,2-dimethyl-
4	1.545	1231	0.01	2095	0.10	Piperazine, 2,5-dimethyl-, trans-
5	6.309	3364	0.03	3455	0.16	Trichloroacetic Acid
		9821079	100.00	2196581	100.00	



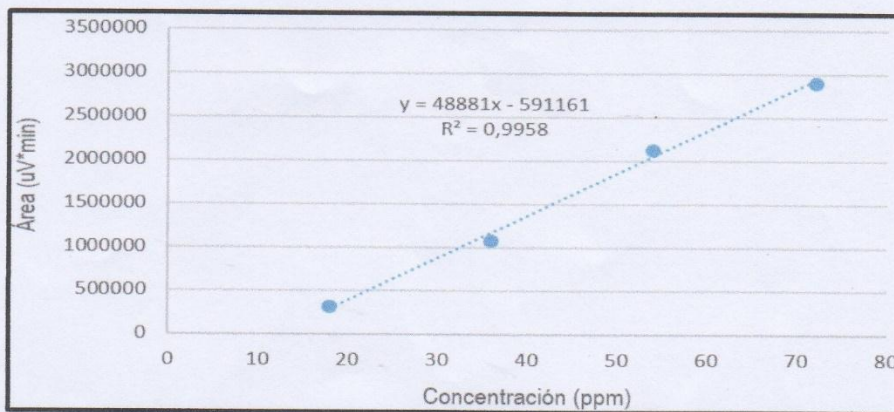


FIGURA N°5: CURVA DE CALIBRACIÓN "ÁREA (µV\*min) VS CONCENTRACIÓN (ppm)

**CROMATOGRAMAS DE LAS MUESTRAS**

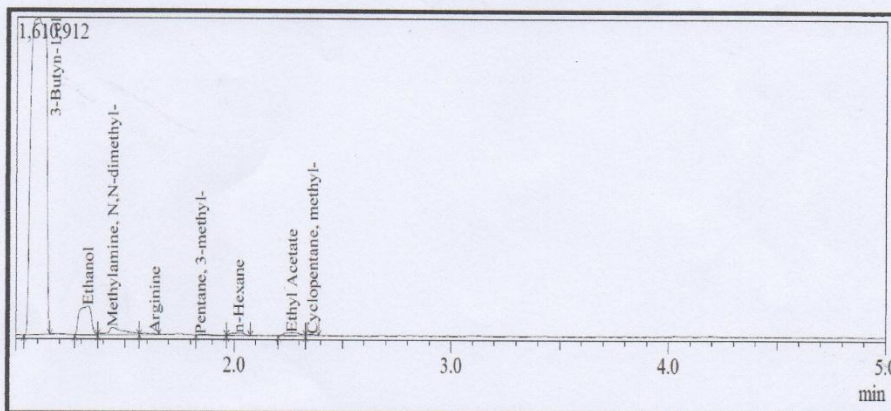
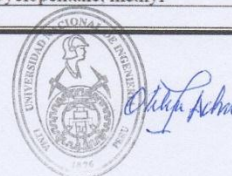


FIGURA N°6: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N°1

TABLA N°5: DATOS DEL CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N°1

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.099	7622951	89.23	1591611	87.55	3-Butyn-1-ol
2	1.329	551172	6.45	144784	7.96	Ethanol
3	1.441	189663	2.22	38328	2.11	Methylamine, N,N-dimethyl-
4	1.635	24389	0.29	4396	0.24	Arginine
5	1.845	10142	0.12	3896	0.21	Pentane, 3-methyl-
6	2.020	55851	0.65	13372	0.74	n-Hexane
7	2.265	72926	0.85	14764	0.81	Ethyl Acetate
8	2.360	15957	0.19	6792	0.37	Cyclopentane, methyl-
		8543051	100.00	1817943	100.00	





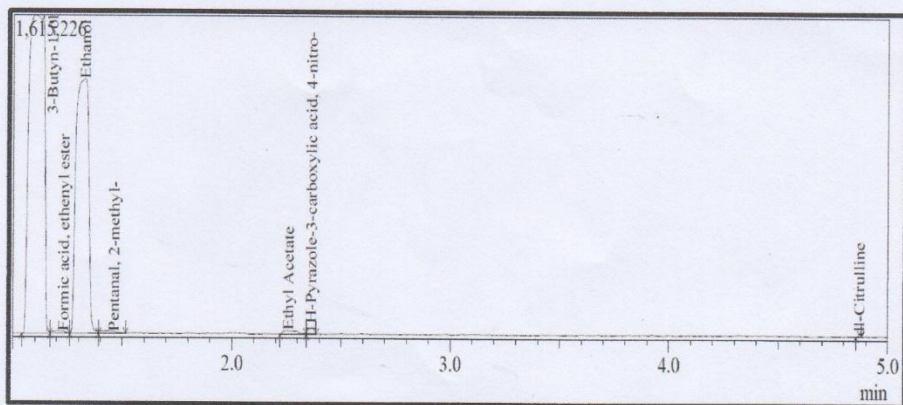


FIGURA N°7: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N°2

TABLA N°6: DATOS DEL CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N°2

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.099	7737626	59.28	1598504	54.75	3-Butyn-1-ol
2	1.230	46108	0.35	10404	0.36	Formic acid, ethenyl ester
3	1.326	5123005	39.25	1275960	43.70	Ethanol
4	1.460	57116	0.44	9385	0.32	Pentanal, 2-methyl-
5	2.256	77822	0.60	17047	0.58	Ethyl Acetate
6	2.361	8284	0.06	5140	0.18	1H-Pyrazole-3-carboxylic acid, 4-nitro-
7	4.869	2627	0.02	3162	0.11	dl-Citrulline
		13052588	100.00	2919602	100.00	

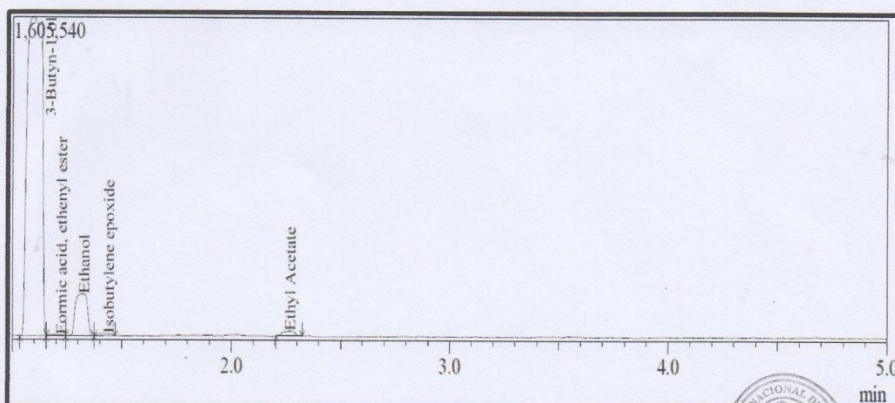


FIGURA N°8: CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N°3

TABLA N°6: DATOS DEL CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA N°3

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name
1	1.094	7502534	88.70	1587529	86.50	3-Butyn-1-ol
2	1.225	25460	0.30	4547	0.25	Formic acid, ethenyl ester
3	1.328	793142	9.38	207979	11.33	Ethanol
4	1.440	43505	0.51	10856	0.59	Isobutylene epoxide
5	2.269	93700	1.11	24456	1.33	Ethyl Acetate
		8458341	100.00	1835367	100.00	

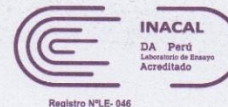


## ANEXO 6.

### Análisis microbiológico e histamínico al máximo concentrado proteico



**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL  
ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA  
CON REGISTRO N° LE - 046**



#### INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL N° 20170531-013

Pág. 1 de 1

SOLICITADO POR	: JOHANN MEJIA ROCHA
DIRECCIÓN	: Miraflores Alto Mz. C3 Lte. 3A Chimbote.
PRODUCTO DECLARADO	: <b>CONCENTRADO PROTEICO.</b>
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestra
PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA	: En bolsa de polietileno, transparente y cerrada.
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2017-05-31
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO	: 2017-05-31
FECHA DE TERMINO DEL ENSAYO	: 2017-06-05
CONDICIÓN DE LA MUESTRA	: En buen estado.
ENSAYOS REALIZADOS EN	: Laboratorio de Microbiología, Físico Químico.
CODIGO COLECBI	: <b>SS 170531-8</b>

#### ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

#### RESULTADOS

ENSAYOS	MUESTRA
	M - 1
Salmonella en 25g	Ausencia
Mohos (UFC/g)	14 + 24,85%
Levaduras (UFC/g)	<10
Enterobacterias (UFC/g)	58 + 28,73%

#### ENSAYO FÍSICO QUÍMICO

ENSAYO	MUESTRA
	M - 1
(*) Histamina (ppm)	16

(\*) El método indicado no ha sido acreditado por INACAL-DA.

#### METODOLOGIA EMPLEADA

**Salmonella** : UNE-EN ISO 6579:2003. Microbiología de los Alimentos para Consumo Humano y Alimentación Animal. Método Horizontal para la Detección de *Salmonella* spp. Excepto el ítem 9.5.4.5. Medio selectivo opcional empleado (de acuerdo a la norma ) : Agar Salmonella-Shigella.  
**Recuento de Mohos** : ICMSF 1983 Reimpresión 2000 Vol I 2da Ed. II Editorial Acribia - España pág.:166 a 167. Método del Recuento de Levaduras y Mohos por siembra en placa en todo el medio.  
**Recuento de Enterobacterias** : ICMSF 1983 Reimpresión 2000 Vol I 2da Ed. II Editorial Acribia - España pág.:149 a 150. Enterobacteriaceae. Recuento por Siembra en Placa.

**Histamina** : Journal of Foods Science Vol. 41 1976 pág 1282 a 1284

#### NOTA :

- Informe de ensayo emitido en base a resultados realizados por COLECBI S.A.C., sobre muestras ingresadas por el cliente.
- Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra ensayada.
- Estos resultados de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.
- No afecto al proceso de Dirimencia por su perecibilidad y/o muestra única.

Fecha de Emisión : Nuevo Chimbote, Junio 06 del 2017.

**A. Gustavo Vargas Ramos**  
 Gerente de Laboratorios  
 C.B.P. 326  
 COLECBI S.A.C.

LC-MP-HRIE  
Rev 04  
Fecha 2015-11-30

PROHIBIDA LA REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL DE ESTE INFORME  
SIN LA AUTORIZACION ESCRITA DE COLECBI S.A.C.

### COLECBI S.A.C.

Urb. Buenos Aires-Mz. A - Lt. 7 | Etapa - Nuevo Chimbote - Telefax: 043-310752  
 Nextel: 839\*2893 - RPM # 902995 - Apartado 127  
 e-mail: colecbi@speedy.com.pe/ medioambiente\_colecbi@speedy.com.pe  
 Web: www.colecbi.com

CORPORACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYOS CLÍNICOS, BIOLÓGICOS E INDUSTRIALES S.A.C.

**ANEXO 7.**  
**Ficha de evaluación sensorial de ordenamiento**

Nombre: ..... Fecha: .....

Frente a usted hay cinco muestras de "concentrado proteico" al azar, las cuales debe de ordenar en función la intensidad del olor a pescado que muestren.

Cabe resaltar que a cada grado de olor le corresponderá una puntuación.

Puntuación	Grado de olor	Orden de muestras
5	Mas intensa	
4	↑	
3		
2		
1	Menos intensa	

Gracias por apoyar este trabajo de investigación.



**ANEXO 8.  
Tabla de Kramer**

Tabla de Kramer de categorías totales necesarias para una significación del 5% (p 0.05)

<b>Numero de tratamientos o muestras ordenadas</b>									
<b>NR</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	- -	- -	- -	- 3-9	- 3-11	- 3-13	- 4-14	- 4-16	- 4-18
<b>3</b>	- -	- 4-8	- 4-11	4-14 5-13	4-17 6-15	4-20 6-18	4-23 7-20	5-25 8-22	5-28 8-25
<b>4</b>	- -	5-11 5-11	5-15 6-14	6-18 7-17	6-22 8-20	7-25 9-23	7-29 10-26	8-32 11-29	8-36 13-31
<b>5</b>	- 6-9	6-14 7-13	7-18 8-17	8-22 10-20	9-26 11-24	9-31 13-27	10-35 14-31	11-39 15-35	12-43 17-38
<b>6</b>	7-11 7-11	8-16 9-15	9-21 11-19	10-26 12-24	11-31 14-28	12-36 16-32	13-41 18-36	14-46 20-40	15-51 21-45
<b>7</b>	8-13 8-13	10-18 10-18	11-24 13-22	12-30 15-27	14-35 17-32	15-41 19-37	17-46 22-41	18-52 24-46	19-58 26-51
<b>8</b>	9-15 10-14	11-21 12-20	13-27 15-25	15-33 17-31	17-39 20-36	18-46 23-41	20-52 25-47	22-52 28-52	24-64 31-57
<b>9</b>	11-16 11-16	13-23 14-22	15-30 17-28	17-37 20-34	19-44 23-40	22-50 26-46	24-57 29-52	26-64 32-58	27-71 35-64
<b>10</b>	12-18 12-18	15-25 16-24	17-33 19-31	20-40 23-37	22-48 26-44	25-55 30-50	27-63 33-57	30-70 37-63	32-78 40-70
<b>11</b>	13-20 14-19	16-28 18-26	19-36 21-34	22-44 25-41	25-52 29-48	28-60 33-55	31-68 37-62	34-76 41-69	36-85 45-76
<b>12</b>	15-21 15-21	18-30 19-29	21-39 24-36	25-47 28-44	28-56 32-52	31-65 37-59	34-74 41-67	38-82 45-75	41-91 50-82
<b>13</b>	16-23 17-22	20-32 21-31	24-41 26-39	27-51 31-47	31-60 35-56	35-69 40-64	38-79 45-72	42-88 50-80	45-98 54-89
<b>14</b>	17-25 18-24	22-34 23-33	26-44 28-42	30-54 33-51	34-64 38-60	38-74 44-68	42-84 49-77	46-94 54-86	50-104 59-95
<b>15</b>	19-26 19-26	23-37 25-35	28-47 30-45	32-58 36-54	37-68 42-63	41-79 47-73	46-89 53-82	50-100 59-91	54-111 64-101
<b>16</b>	20-28 21-27	25-39 27-37	30-50 33-47	35-61 39-57	40-72 45-67	45-83 51-77	49-95 57-87	54-106 63-97	59-117 69-107
<b>17</b>	22-29 22-29	27-41 28-40	32-53 35-50	38-64 41-61	43-67 48-71	48-88 54-82	53-100 61-92	58-112 67-103	63-124 74-113
<b>18</b>	23-31 24-30	29-43 30-42	34-56 37-53	40-68 44-64	46-80 51-75	51-93 58-86	57-105 65-97	62-118 72-108	68-130 79-119
<b>19</b>	24-33 25-32	30-46 32-44	37-58 39-56	43-71 47-67	49-84 54-79	55-97 62-90	61-110 69-102	67-123 76-114	73-136 84-125