VOLUMEN 48
XXXI Verano De la Ciencia
ISSN 2395-9797
www.jovenesenlaciencia.ugto.mx

Determinación del tiempo óptimo de mezclado en alimento para ratas Wistar con el uso de dióxido de titanio como marcador

Optimizing mixing time for wistar rat feed using titanium dioxide as a tracer

Mario Alberto Macias-Flores[1], Ximena Nava-Guzmán[2], Brisa Sherlin Serrano-Contreras[2], Mariela Flores-Jaramillo[2], Fidel Avila-Ramos[2*]

[1]Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato – Salamanca, Universidad de Guanajuato, Carretera Irapuato – Silao km 9, C.P. 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

[2]Estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato –Salamanca, Universidad de Guanajuato, México.

[3]Departamento de Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato-Silao km 9, Irapuato, Guanajuato, México.

ma.maciasflores@ugto.mx, x.navaguzman@ugto.mx, bs.serranocontreras@ugto.mx, m.flores.jaramillo@ugto.mx, ledifar@ugto.mx*

Resumen

El objetivo del estudio fue determinar el tiempo óptimo de mezclado en alimento en harina para ratas Wistar con dióxido de titanio (TiO_2) como trazador externo. Se prepararon 300 kg de alimento en harina distribuidos en tres lotes independientes de 100 kg. El TiO_2 se adicionó a 5 g/kg del alimento para evaluar seis tiempos de mezclado (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min). El coeficiente de variación (CV) del contenido de TiO_2 y el volumen relativo del alimento se analizaron mediante un ANOVA de una vía. La prueba de Levene se empleó para determinar la homogeneidad del marcador entre lotes. La prueba de Levene demostró homocedasticidad dentro de los lotes en el contenido de TiO_2 para todos los tiempos evaluados ($P \geq 0.094$), a los 10 min se observó menor dispersión entre las tres repeticiones (3.19 a 3.95%). En el análisis general, no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tiempos de mezclado para el CV de TiO_2 ($P = 0.397$), ni para la densidad relativa del alimento ($P = 0.206$). Sin embargo, el menor CV general se registró a los 10 min de mezclado (3.66 ± 0.040 %). Bajo las condiciones del presente experimento, se concluye que el uso TiO_2 como trazador externo es adecuado para evaluar la eficiencia del proceso y 10 min de mezclado permiten obtener una distribución homogénea y uniforme del trazador.

Palabras clave: Homogeneidad, alimento balanceado, animales de laboratorio.

Introducción

Todos los seres vivos requieren nutrientes para sostener su metabolismo basal, el crecimiento y la reproducción. En animales de producción y laboratorio, estos nutrientes se aportan en dietas formuladas para cada especie, etapa fisiológica y objetivo productivo (NRC, 1995). El proceso inicial de fabricación y mezclado de la dieta no solo debe cumplir con una acción mecánica, sino también asegurar que cada alícuota contenga la misma proporción de nutrientes y aditivos (Williams, 1976). Los ingredientes de baja inclusión como son las vitaminas, micro minerales, aminoácidos y aditivos son factores críticos que pueden modificar el tiempo de mezclado necesario para lograr la homogeneidad (Groesbeck *et al*., 2007). La distribución deficiente del alimento modifica los nutrientes ingeridos por el animal, aumenta la variación experimental y compromete la interpretación de los estudios nutricionales (Rocha *et al.,* 2015).

El tiempo de mezclado general de la dieta también depende del tamaño de partícula, forma, nivel de inclusión, grado de aglomeración, carga estática, secuencia de adición, tipo de mezcladora y la velocidad de rotación; esto hace necesaria la estandarización del tiempo de mezclado según las condiciones particulares de cada proceso (Hernan y Behnke, 1994). La eficiencia de este proceso se evalúa mediante marcadores internos, como minerales o aminoácidos presentes en la dieta, o marcadores externos, como partículas de hierro, acero, grafito o compuestos inertes (Clark *et al*., 2007). El tipo de marcador seleccionado influye en la estandarización del tiempo de mezclado, por lo tanto, se recomienda utilizar un nivel de adición mayor o igual a 100 gramos por tonelada (Eisenberg, 2004).

En la actualidad, no se tiene suficiente información sobre el tiempo adecuado de mezclado en dietas para animales de laboratorio, el uso de mezcladoras verticales y la viabilidad del TiO_2 como marcador externo para estimar la uniformidad del alimento. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar el tiempo óptimo de mezclado de alimento para ratas Wistar en una mezcladora vertical utilizando TiO_2 como trazador externo.

Materiales y métodos

Ubicación experimental

La investigación se llevará a cabo en el laboratorio de bromatología y nutrición animal, de la Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato – Salamanca, México. Región ubicada a una altitud de 1,715 msnm, clima templado, temperatura promedio anual de 20.2 °C y precipitación de 692 mm.

Elaboración del alimento experimental

Se elaboraron 300 kg de alimento para ratas en tres tandas independientes de 100 kg cada una. La dieta estuvo compuesta por harina de maíz, salvado de trigo, salvado de maíz y pasta de soya (Tabla 1) siguiendo las recomendaciones de los requerimientos nutricionales de la NRC (1995). Como trazador se adicionó dióxido de titanio (TiO_2) a una inclusión de 5 g/kg de alimento. Todos los ingredientes se pesaron individualmente utilizando una báscula RHINO® (modelo BAR-6; precisión de 2 g). Posteriormente, se agruparon de la siguiente manera: (1) harina de maíz, salvado de trigo y salvado de maíz; (2) carbonato de calcio ($CaCO_3$), ortofosfato y sal; (3) lisina, metionina y premezcla vitamínico-mineral; (4) goma guar, goma xantana, TiO_2 y almidón; y (5) pasta de soya y aceite de soya.

Tabla 1. *Dieta para ratas Wistar.*

Ingredientes	Adición (%)
Maíz	41.30
Salvado de trigo	20.00
Salvado de maíz	20.00
Aceite de soya	2.00
Pasta de soya	7.75
Almidón	3.50
CaCo3	1.80
Ortofosfato	1.10
Sal	0.30
Premezcla[1]	0.30
Lisina	0.60
Metionina	0.60
Goma guar	0.60
Goma xantana	0.15
Composición calculada	
EM (Mcal kg^{-1})	1.73
PC (%)	13.78
Ca (%)	0.89
Pd (%)	0.26
Lys (%)	0.70
Met (%)	0.68

[1]Cantidad en mg por kg de alimento: vitamina A, 10,000 IU; vitamina D3, 2,500 IU; vitamina K3, 2 mg; tiamina, 2 mg; riboflavina, 7 mg; ácido pantoténico, 10 mg; piridoxina, 4 mg; ácido fólico, 1 mg; Vitamina B12, 0.015 mg; y biotina 0.010 mg (Vipresa.), Tepatitlán de Morelos, México. Cantidad en mg por kg de alimento: Se, 0.20; I, 0.30; Cu, 7; Fe, 65; Zn, 75; Mn, 65; y Co, 0.4 (Vipresa.), Tepatitlán de Morelos, México.

Cada grupo de ingredientes fue premezclado durante 2 min. El grupo 1 se mezcló en una mezcladora vertical (Azteca®, Mezcladora-Vertical 500). Los grupos 2, 3 y 4 se mezclaron manualmente, incorporando previamente harina de maíz hasta alcanzar un peso total de 5 kg para favorecer la distribución homogénea y la volatilización de los ingredientes de baja inclusión. El grupo 5 se mezcló manualmente en un recipiente con capacidad de 20 L. Una vez finalizado el premezclado, los grupos 2 al 5 se incorporaron secuencialmente a la mezcladora vertical siguiendo el orden numérico establecido. El tiempo de mezclado se contabilizó a partir del momento en que todos los ingredientes fueron adicionados a la mezcladora. Durante el proceso, se colectaron las muestras de alimento a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min de mezclado, estas fueron almacenadas hasta su análisis.

Determinación del dióxido de titanio en alimento

La concentración de TiO_2 en el alimento se determinó mediante espectrofotometría de luz visible (Biotek Epoch), de acuerdo con la metodología descrita por Short et al. (1996) con ligeras modificaciones. Para cada tiempo de mezclado y cada tanda de producción, el alimento colectado se extendió sobre papel Kraft y se obtuvieron 10 submuestras representativas (Figura 1). De cada submuestra se pesaron 100 mg, los cuales se pre-calcinaron a fuego directo por 30 minutos para calcinarlos en mufla (Arza AR-340) a 580 °C durante 2 horas. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de H_2SO_4 (7.4 M) y la mezcla se calentó en parrilla eléctrica (RCA; modelo: RC2000n) hasta la disolución de la muestra. El contenido se transfirió a matraces aforados de 100 mL a través de papel filtro Whatman 541, utilizando 25 mL de agua destilada para facilitar el trasvase. A continuación, se añadieron 20 mL de H_2O_2 y se completó el volumen con agua destilada. Finalmente, la absorbancia se midió a 410 nm. La concentración de TiO_2 se determinó a partir de la curva de calibración y la ecuación del modelo ajustado (Concentración = 0.000518365 + 0.131698 * Absorbancia; R^2 = 0.9988). Posteriormente, se determinó el coeficiente de variación de la concentración de TiO_2 para cada tanda de alimento mezclado.



Figura 1. *Toma de muestra en el alimento.*

Determinación del volumen relativo del alimento

Para determinar el volumen relativo del alimento, se pesaron 50 g de muestra de cada tiempo de mezclado y de cada tanda de producción utilizando una balanza analítica (OHAUS Explorer®, modelo H-4737; precisión de 0.0001 g). La muestra se depositó en una probeta graduada de 250 mL (Pyrex®) y se registró el volumen ocupado. El volumen relativo se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Volumen\ relativo = \frac{Peso\ de\ alimento}{Volumen\ de\ alimento}$$

Análisis estadístico

Los resultados del contenido de TiO_2 entre lotes se analizaron para obtener el coeficiente de variación (CV) de las muestras grupales. El CV de la concentración de TiO_2 y el volumen relativo del alimento se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) considerando el tiempo de mezclado como factor de estudio y utilizando los lotes independientes como repetición. Previamente se verificó la homogeneidad de varianza y la normalidad de los datos por la prueba de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. La prueba de Levene se utilizó para evaluar la uniformidad de los niveles de TiO_2 entre lotes en cada tiempo de muestreo. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R (versión 4.5.2). En caso de encontrar diferencias significativas entre tratamientos, las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P<0.05$).

Resultados

Coeficiente de variación y homogeneidad inter-lote del contenido de TiO2

Los resultados correspondientes a la homogeneidad del TiO_2 en el alimento para ratas Wistar por lote y tiempo de mezclado se muestran en la Tabla 2**.** Se demostró la homocedasticidad ($P \geq 0.094$) en el contenido de TiO_2 del alimento para todos los tiempos evaluados por la prueba de Levene. La mayor similitud en la homogeneidad de varianzas se observó a los 10 minutos ($P = 0.854$), coincidiendo con los coeficientes de variación (CV) más bajos y estables entre los tres lotes (3.19 a 3.95%).

Tabla 2. *Homogeneidad de varianza inter lote del contenido de TiO_2 (mg/ml) en el alimento y su CV (%).*

Minuto	Lote 1	Lote 2	Lote 3	*P – Value* [a]
5	0.00739	0.00593	0.00619	0.094
10	0.00697	0.00643	0.00593	0.854
15	0.00692	0.00681	0.00657	0.881
20	0.00629	0.00614	0.00645	0.522
25	0.00773	0.00644	0.00659	0.100
30	0.00618	0.00626	0.00624	0.274
		CV (%) [b]		
Minuto	**Lote 1**	**Lote 2**	**Lote 3**	-
5	9.29	5.57	6.94	-
10	3.95	3.19	3.83	-
15	8.87	10.99	11.9	-
20	5.19	6.96	10.9	-
25	21.30	4.79	7.80	-
30	5.55	5.41	14.4	-

[a] Probabilidad de diferencia de homogeneidad de la varianza entre lotes independientes para cada tiempo de muestreo por la prueba de Levene ($P>0.05$) indica homocedasticidad). [b]CV (%) de la concentración de TiO_2 por lote (10 submuestras).

Coeficiente de variación general de TiO2 en alimento y densidad

Los resultados del coeficiente de variación (CV) de la concentración de TiO_2 general en alimento y de la densidad relativa del alimento se presentan en el Cuadro 3. No se observaron diferencias estadísticas

significativas (P ≥ 0.05) en ninguna de las variables evaluadas entre los tiempos de mezclado, pero a los 10 minutos el CV de la concentración de TiO_2 fue menor (P = 0.397) comparado con los demás tiempos de mezclado. No hubo diferencia estadística significativa (P = 0.206) en la densidad relativa del alimento en los tiempos de mezclado evaluados.

Tabla 3. *CV (%) total del contenido de TiO_2 y densidad relativa (g/mL) del alimento.*

Tiempo	Variable	
	CV TiO_2	**Densidad relativa**
5	7.26±1.88	0.463±0.00
10	3.66±0.40	0.484±0.01
15	10.59±1.55	0.472±0.01
20	7.69±2.92	0.478±0.01
25	11.3±8.80	0.475±0.00
30	8.46±5.16	0.488±0.00
P- value	0.397	0.206

Ausencia de literales indica que no hubo diferencias estadísticas significativas (P > 0.05).

Discusión

En el presente estudio se utilizaron 5 gramos de TiO_2/kg de alimento, cumpliendo con los requerimientos mínimos establecidos por Eisenberg (2004) de 100 miligramos/ kg de alimento. El nivel de adición utilizada en el experimento permite reducir la varianza total, sensibilidad de la técnica, errores analíticos y errores puros como lo describe Clark *et al.* (2007). Además, de acuerdo con la metodología de Short *el al*. (1996) el nivel de adición de TiO_2 utilizado permite sensibilidad de análisis en espectrofotometría de luz visible.

La evaluación de homocedasticidad de varianza indica que no hubo diferencia en el contenido de TiO_2 en alimento entre lotes por ciclos. Los resultados confirman la eficiencia del mezclado del marcador en los ciclos sucesivos concordando con lo reportado por Rocha *et al.* (2015) en su evaluación de marcadores internos y externos sobre el tiempo de mezclado.

Además, se observó un CV total de 3.66% a los 10 minutos concordando con McCoy *et* al. (1994) y Rocha *et al*. (2015), que reportaron que el uso de L-Treonina como marcador interno permite disminuir el CV a 3.11% y de 13.13% con MicroTracer® cómo marcador externo. Físicamente, la dinámica del mezclado de alimento sigue una respuesta lineal donde el CV disminuye al incrementar el tiempo; una vez alcanzado el menor CV, la linealidad se pierde y la variación de las muestras tiende a ser aleatoria (Rocha *et al*., 2015). El CV mínimo es dependiente de los ingredientes utilizados, la mezcladora y el marcador, por lo que el tiempo óptimo de mezclado se estandariza de manera independiente y adaptada a las características propias de fabricación del alimento.

La densidad relativa en el presente estudio no mostró diferencias entre los tiempos de mezclado en revolvedora vertical, por lo que el esfuerzo mecánico ejercido por el equipo y la fuerza de fricción de los ingredientes en el momento de la molienda no fue suficiente para modificar el tamaño de las partículas del alimento en el tiempo evaluado (Rocha *et al*., 2015).

Conclusión

Los resultados sugieren que el uso de dióxido de titanio puede ser una alternativa de trazador para la estandarización del tiempo de mezclado. El mezclado durante 10 minutos representa el tiempo más eficiente para la dieta, la inclusión de TiO_2 y la mezcladora vertical utilizada en el presente experimento. Estos hallazgos apoyan la necesidad de estandarizar el tiempo de mezclado para cada dieta, equipo y marcador usado en la

industria. Por lo tanto, se sugiere evaluar siempre el tiempo óptimo de mezclado de la dieta experimental elaborada con marcadores internos para validar los resultados.

Referencias

Clark, P., Behnke, K., & Poole, D. R. (2007). Effects of Marker Selection and Mix Time on the Coefficient of Variation (Mix Uniformity) of Broiler Feed. *The Journal Of Applied Poultry Research*, *16*(3), 464-470. https://doi.org/10.1093/japr/16.3.464

Eisenberg, D.A. (2004). Mixer performance, cross-contamination testing examined. *Feedstuffs*, 76, 1 – 2.

Groesbeck, C. N., Goodband, R. D., Tokach, M. D., Dritz, S. S., Nelssen, J. L., & DeRouchey, J. M. (2007). Diet mixing time affects nursery pig performance. *Journal Of Animal Science*, *85*(7), 1793-1798. https://doi.org/10.2527/jas.2007-0019

Hernan, T., & Behnke, K. C. (1994). Testing mixer performance. Bulletin MF-1172. Feed Manufacturing. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. Kansas State University, Manhattan, KS.

Mccoy, R., Behnke, K., Hancock, J., & Mcellhiney, R. (1994). Effect of Mixing Uniformity on Broiler Chick Performance. *Poultry Science*, *73*(3), 443-451. https://doi.org/10.3382/ps.0730443

National Research Council (NRC). (1995). Nutrient requirements of laboratory animals. 4ed. The National Academies Press. Washington, DC.

Rocha, A., Montanhini, R., Dilkin, P., Tamiosso, C., & Mallmann, C. (2015). Comparison of different indicators for the evaluation of feed mixing efficiency. *Animal Feed Science And Technology*, *209*, 249-256. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.005

Short, F., Gorton, P., Wiseman, J., & Boorman, K. (1996). Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Science And Technology*, *59*(4), 215-221. https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00916-7

Williams, J. (1976). The segregation of particulate materials. A review. *Powder Technology*, *15*(2), 245-251. https://doi.org/10.1016/0032-5910(76)80053-8