

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
4 de octubre de 2012 (04.10.2012) WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/129715 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01K 63/02 (2006.01) A22B 3/08 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2011/000025

(22) Fecha de presentación internacional:
1 de abril de 2011 (01.04.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(72) Inventor; e

(71) Solicitante : NENADOVICH DEL RIO, Miguel
[CL/CL]; Marchant Pereira 650, Providencia, Santiago,
Código Postal 7500597 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM,

KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHOD FOR CHILLING FARMED SALMON IN ORDER TO RAPIDLY RENDER SAID FISH UNCONSCIOUS DURING HARVESTING

(54) Título : PROCESO DE ENFRIAMIENTO DE SALMONES CULTIVADOS PARA LOGRAR SU INCONCIENCIA RAPIDA DURANTE LA COSECHA

(57) Abstract: Method for chilling live salmon from offshore farming cages, using a chilling mixture formed by ice and common salt in fresh water, placed in a chilling pool mounted on a truck for transporting the fish, which method comprises the following steps: a) placing the fish in the chilling pool without the seawater in which they were farmed; b) homogenizing the temperature of the salmon and placing them in a state of unconsciousness; c) transporting the cold, unconscious fish to the processing plant, in order to produce a high-quality end product. The method for chilling the live salmon complies with bioethical standards for death involving no suffering or the minimum of suffering for the fish as the latter are rendered unconscious at an early stage, which allows high-quality products to be obtained.

(57) Resumen: Proceso de enfriamiento de salmones vivos provenientes de jaulas de cultivo en el mar, con una mezcla de enfriamiento formada por hielo y sal común en agua dulce, que se coloca en un estanque de enfriamiento montado en un camión para el transporte de los peces, constituido por las etapas de: a) ingreso de los peces al estanque de enfriamiento sin el agua de mar de su cultivo; b) homogenización de la temperatura de los salmones, y obtención de su estado de inconciencia; c) transporte de los peces fríos e inconcientes hasta la planta de faenamiento para obtener un producto final de alta calidad. El proceso de enfriamiento de los salmones vivos, respeta las normas bioéticas para la muerte sin o con el mínimo de sufrimiento de los peces al alcanzar la inconciencia temprana, permitiendo productos de alta calidad.



WO 2012/129715 A1

PROCESO DE ENFRIAMIENTO DE SALMONES CULTIVADOS PARA LOGRAR SU INCONCIENCIA RAPIDA DURANTE LA COSECHA

DESCRIPCIÓN

1. CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los procesos de cosecha de salmónidos provenientes de jaulas de cultivo en el mar. En particular se refiere a un proceso de tratamiento de salmones vivos previo a su faenamiento para producir una muerte humanizada de ellos, es decir con mínimo estrés, al tratarlos en un medio acuoso frío que les provoque rápida inconciencia, de acuerdo a las normas de la bioética para el tratamiento de peces. De esta forma se coloca a los salmones que provienen de jaulas de acopio de ejemplares que se van a cosechar, en una mezcla de hielo y sal a una temperatura baja predeterminada que les provoca su inconciencia en un tiempo de menos de 5 minutos, produciendo en todos ellos, de tamaños que son variables, un estado de inconciencia bajo el cual pueden ser trasladados a una planta de faenamiento, evitándoles estrés durante el transporte y durante el faenamiento, lo que conlleva a la obtención de productos de alta calidad.

2. DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

Es conocido que los peces poseen mecanismos específicos de comportamiento y de respuesta a estrés para enfrentar situaciones naturales adversas (Poli B. M., *Ital. J. Anim. Sci.*, 2009, 8(1), pag. 139-160; Harper, C., Wolf, J., *ILAR J.*, 2009, 50(4), pag. 387-396).

Algunos aspectos de la práctica de acuicultura impactan el bienestar de los peces. Los principales factores que reducen el bienestar de los peces de cultivo durante la cosecha comprenden aquellos relacionados a: i)

aglomeración; ii) manipulación; iii) transporte; iv) gestión de cosecha; y v) métodos de faenamiento.

Aglomeración, manipulación y transporte: Factores tales como la aglomeración, o los procedimientos de bombeo de los peces vivos, el consumo del oxígeno en los contenedores de transporte, la acumulación de CO₂ y de NH₃, contribuyen a un aumento importante de las condiciones de estrés y a una degradación del bienestar de los peces. El transporte generalmente induce estrés en ellos, el cual requiere un tiempo prolongado de recuperación. Una disminución de la temperatura durante el transporte es útil para inducir un efecto de sedación. El Scientific Panel on Animal Health and Animal Welfare en 2004, dio una serie de recomendaciones para asegurar el bienestar de los peces durante el transporte, tales como:

- Suficiente disponibilidad de oxígeno disuelto.
- Evitar la exposición de los peces al aire durante los procedimientos de carga y descarga.
- Un tiempo de inanición adecuado antes del transporte de acuerdo a la especie, tamaño y temperatura del agua.
- Vehículo de transporte bien equipado y aseguramiento de un mínimo de contacto físico con los animales.
- Monitoreo adecuado de la calidad del agua y de las condiciones de los peces.

El malestar físico y el confinamiento producen respuestas características de estrés tales como, aumento de cortisol y de glucosa pudiendo alterar la resistencia a enfermedades inmunológicas en varias especies cultivadas. Los peces aglomerados son más sensibles a un factor de estrés agudo adicional. Un buen manejo de los problemas de aglomeración incluye una técnica de manipulación cuidadosa, una evaluación de la calidad del agua, la adición de oxígeno al agua si los niveles caen bajo un valor crítico de 6 ppm, y un estrecho monitoreo del comportamiento y actividad de los peces.

Gestión de Cosecha: El interés en el bienestar de los peces, incluyendo el tiempo de faenamiento, es cada vez mayor tanto a nivel del consumidor como del productor, desde un punto de vista ético y de la calidad del producto.

Los procedimientos *pre-mortem* son críticos para el bienestar de los peces y deben ser efectuados de una forma adecuada, evitándoles miedo, sufrimiento y dolor innecesarios.

El tiempo del proceso de cosecha podría ser traumático para los peces cultivados ya que un tiempo prolongado de cosecha, un manejo intenso, y la aglomeración, disminuyen el oxígeno, involucrando el inicio del estado de estrés que puede comprometer la calidad organoléptica, sanitaria y de mercado del producto final. El estrés y el ejercicio antes de la muerte están unidos a una reducción de la calidad de la carne y esto está asociado principalmente con el estrés pre-faenamiento. De hecho la respuesta endocrina relativa implica alteraciones antes del proceso de inicio de la muerte del pez intensificando el consumo de reserva de glucosa lo que causa modificaciones de los procesos normales *post-mortem* y una mayor susceptibilidad al ataque microbiano. El estrés durante la cosecha y al momento de la muerte más las respuestas endocrinas relativas pueden influenciar fuertemente los procesos bioquímicos *post-mortem* tales como la velocidad de degradación de ATP, el inicio del *rigor mortis*, y el aumento de la tasa de degradación de la frescura de la carne.

Métodos de faenamiento: Los métodos de muerte que provocan una larga agonía en los peces son muy estresantes y deben ser evitados.

La opinión del Scientific Panel on Animal Health and Welfare de la EFSA estableció en el año 2004, que muchos métodos de muerte comercial existentes exponen a los peces a un sufrimiento sustancial sobre un período prolongado de tiempo y recomendó que los criterios para la aplicación humanizada de aturdimiento percusivo, golpe instantáneo y aturdimiento eléctrico deberían estar disponibles para la industria y en ningún caso deberían ser obligatorios, de modo que la etapa de aturdimiento/muerte sea incorporada antes del sangramiento o antes de que comience el eviscerado, etc. Más recientemente, la decisión del consejo de la UE, adoptada legalmente en junio de 2006, extiende las regulaciones del bienestar de los animales al sector de cultivo de peces de la UE, de modo que estos desarrollos podrían influenciar

eventualmente la importación de peces. Su artículo 19 referente a la muerte de emergencia, reconoce que los métodos de muerte a ser usados dependen del sistema de cultivo, de la especie, del tamaño y del número de peces a ser muertos y que debería considerarse una muerte rápida para grandes lotes de peces. En cualquier caso, los métodos usados deberían causar una muerte inmediata o llevar rápidamente a los peces a un estado de inconciencia antes de la muerte, o provocar la muerte del pez que ha sido anestesiado o efectivamente aturdido. A partir de 2008 varios países europeos han recomendado el no uso por ejemplo del clásico enfriamiento lento con hielo.

Los indicadores de efectividad de los procedimientos que evitan un prolongado estrés son: 1) la cesación inmediata e irreversible de los movimientos respiratorios (actividad opercular rítmica), y 2) la pérdida inmediata e irreversible del movimiento de los ojos (reflejo vestibulo-ocular, VOR, en que los ojos de un pez aturdido/muerto no se mueven cuando el pez se rota).

Así, es claro que la investigación empírica y científica en esta área está faltando. Hay una necesidad de un aumento en el conocimiento científico sobre el cual basar guías futuras y una potencial legislación.

Es importante reconocer que el estrés fisiológico no es sinónimo de sufrimiento. El monitoreo del estrés y sus efectos, a un nivel fisiológico, podrían contribuir a una parte del cuadro general del bienestar de los peces.

Las respuestas del estrés fisiológico pueden ser divididas en primarias, secundarias y terciarias.

Las respuestas primarias al estrés implican: 1) la rápida liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) de los tejidos cromafín (homólogos a la médula adrenal de mamíferos), y 2) la activación del factor hipotalámico de liberación de la hormona adrenocorticotrófica pituitaria que a su vez, promueve la secreción de cortisol por el tejido interrenal (homólogo a la corteza adrenal mamífera).

Las respuestas secundarias al estrés son caracterizadas por las reacciones inmediatas a dichas hormonas al nivel de tejido hemático. Estas respuestas adaptativas de corto tiempo (agudas) podrían no causar sufrimiento particular y necesitan algunas horas de recuperación.

Las respuestas terciarias al estrés determinadas por un estrés prolongado (crónico) podrían, por el contrario, inducir una reducción significativa del bienestar animal y producir respuestas de largo plazo influenciando de una forma negativa el apetito, el crecimiento, la reproducción y las respuestas inmunes.

Las respuestas de comportamiento de los peces son fácilmente observables y producen información inmediata sobre los cambios físicos y bioquímicos que tienen lugar en respuesta al estrés, sin el uso de técnicas invasivas. Respuestas de comportamiento, específicas, podrían ser usadas como indicadores de condiciones de estrés que pueden degradar el bienestar de los peces.

Hay ciertos indicadores que pueden usarse para evaluar la calidad, estrés y detrimento del bienestar de los peces tanto desde un punto de vista científico como desde un punto de vista práctico, a pesar de que ninguno de ellos es perfecto.

La mejor estrategia para una evaluación confiable del bienestar/sufrimiento de los peces y su impacto sobre la calidad del producto es un enfoque multidisciplinario que toma en consideración los cambios relativos principales de indicadores significativos de los procesos bioquímicos y fisiológicos *ante-mortem* y/o *post-mortem*. De esta forma el comportamiento puede ser un buen indicador temprano apropiado y no invasivo del bienestar/sufrimiento, aún cuando esto pueda ser rara vez un enfoque exhaustivo.

Los peces pueden dar respuesta a estímulos externos tales como:

- Capacidad para mantener el equilibrio cuando el pez es girado al revés;
- Movimiento de los ojos siguiendo cambios en la postura del cuerpo con respecto al eje longitudinal;
- Reacción al pinchazo de una aguja sobre la cabeza o la cola;
- Aplicación de electricidad de bajo voltaje.

La respuesta evocada visual (VER), con un destello de luz directamente en los ojos, y la respuesta somatosensorial evocada (SER), son métodos objetivos que indican el estado de inconciencia de los peces.

Sin embargo también son útiles métodos más simples que en parte indican si el pez está conciente o no, por un comportamiento autónomo tal como el movimiento de las branquias y el reflejo vestíbulo ocular (VOR).

Los peces son capaces de un comportamiento específico e inconciente, de respuestas fisiológicas y hormonales al estímulo estresante que, si es intenso y suficientemente extenso, puede ser dañino para su salud. Por lo tanto el objetivo a alcanzar debería ser minimizar y mantener bajo control el estrés de la sobrevivencia, de la *pre-muerte*, y del faenamiento.

Es importante estudiar métodos que sean útiles cuando no es posible la obtención de inducción instantánea de insensibilidad, siendo el objetivo que el animal debería estar inconciente e insensible hasta su muerte. En particular, la mejora del manejo *pre-muerte* y de su muerte tiene que ser obtenida no sólo desde un punto de vista ético, sino también porque hay una estrecha relación entre el bienestar del pez, aún durante su muerte, y la calidad del producto final.

En la presente invención se aborda la obtención del estado de inconciencia temprana de los salmones en la etapa de cosecha, a objeto de evitar al máximo el estrés o sufrimiento de ellos, considerando el estado del conocimiento técnico en esta materia, tal como se describe a continuación.

Fjaera, S. O.; Skjervold, P. O. y colab., describen en la patente, EP1293129, de 2005, un proceso y una planta para manejar peces de cultivo desde su ingreso a la planta hasta su faenamiento. Se describe cómo los peces son enfriados en el agua desde la temperatura ambiente en donde se les estimula a moverse en la dirección deseada utilizando sus instintos naturales, disminuyendo paulatinamente la temperatura hasta aproximadamente 10 °C con lo que se reduce el estrés al reducir además el tiempo de procesamiento, y por otra parte la calidad de los productos finales obtenidos es mejor.

En esta patente se destaca que los peces pequeños son enfriados más rápidamente que los peces grandes. Además, dependiendo de la temperatura y del estrés, el *rigor mortis* de los peces se produce algún tiempo después que los peces han sido enfriados. Dicha invención provee un proceso para manejar peces, de acuerdo a las siguientes etapas de manipulación:

1) Alcanzada la temperatura de 10 °C, se les transporta a tierra a través de un sistema ascensor de una cinta transportadora de peces en donde se les induce a nadar; desde el ascensor o desde la cinta transportadora, los peces son llevados a un estanque de enfriamiento donde se les enfría a una temperatura corporal predeterminada, normalmente hasta 1 °C durante 20 a 100 minutos. Una vez que los peces han alcanzado la temperatura corporal deseada, se les somete al efecto del dióxido de carbono como anestésico.

2) Luego se les corta la cabeza y se les conduce a un estanque de desangrado, el cual tiene una temperatura del agua de 0,5 a 1 °C más alta que el agua del estanque de enfriamiento anterior. Los estanques tienen adosado un equipo para ajustar la temperatura del agua de enfriamiento por medio del suministro de agua enfriada previamente.

La combinación de estas etapas de manipulación muestra que se llega a una ganancia de productividad significativa en el proceso de faenamiento.

La temperatura se mide utilizando una sonda de temperatura montada en una aguja que se coloca en el músculo de los peces; particularmente las medidas se hacen en el músculo cercano a la columna vertebral bajo el centro de la aleta dorsal. Varios grupos de peces fueron medidos por este método para varios períodos de enfriamiento desde 17 a 131 minutos de duración. Un pez muerto tenía un tiempo de enfriamiento de 25 a 57 minutos.

Este procesamiento en frío a las temperaturas indicadas proporciona una mejora sustancial en el mantenimiento de la calidad de los productos terminados y un mayor aseguramiento de que los peces no serán manipulados después del inicio del *rigor mortis*.

El enfriamiento uniforme de peces grandes y pequeños, de acuerdo a dicha invención, se consigue por un pre-enfriamiento de los peces a una temperatura de 8-10 °C en el estanque de recepción para los peces.

En síntesis, esta patente produce un enfriamiento de los peces de entre 1 °C y 20 °C, en agua con hielo como agente de enfriamiento, y procede al faenamiento in situ de los peces enfriados y sometidos a un anestésico, que en ningún caso se encuentran inconcientes por el sólo efecto de la temperatura.

En 2005 Skjervold, P. O. describió en la patente EP1294604 un método para producir productos cárneos a partir de peces mediante la remoción de las

partes principales del esqueleto y luego de las espinas de la carne de los peces antes de la resolución del *rigor mortis*, incluyendo el *pre-rigor* y el *in-rigor*.

El método incluye las etapas de proveer peces bajo condiciones que retardan el inicio del *rigor mortis*, manteniendo una temperatura baja de aproximadamente 5 °C, y una remoción de las espinas de dichas partes de la carne de los peces antes de la resolución del *rigor mortis* para obtener los productos finales de carne.

Las condiciones de los peces provistos que retardan el inicio del *rigor mortis*, pueden incluir el mantener los peces a una temperatura baja antes del faenamiento en el rango cercano a 10 °C, preferentemente alrededor de 5 °C, incluyendo 4 °C, 3 °C, 2 °C, y 1 °C. En estas condiciones se logra manejar el *rigor mortis* y la separación de las espinas de los peces durante el faenamiento, con alta eficiencia. Con ello el enfriamiento se usa como una forma de obtener productos de alta calidad.

Por su parte Po-Hsing Lee en la solicitud de patente de US. N° 20080286407 describe un método de producir carne de pescado que tiene un color fresco. Este método incluye: colocar los peces vivos en un estado de inconciencia al bloquear la conducción de los pulsos nerviosos a lo largo del sistema nervioso de los peces; desangrado de los peces y corte de los trozos de carne del pez mientras los peces están inconcientes; esterilizar los trozos de carne; colocar los trozos de carne esterilizada en un ambiente libre de oxígeno para preservar el color original de los trozos de carne; congelar los trozos de carne; y empaquetar los trozos de carne congelados.

El estado de inconciencia se logra usando una barra punteada para romper los nervios en la columna de los peces de tal forma que éstos sean incapaces de luchar. De esta forma los peces experimentan una deficiencia de oxígeno de modo que son incapaces de luchar.

El tiempo de procesamiento puede reducirse considerablemente para asegurar la frescura de la carne de los peces. Debido a que el tratamiento con nitrógeno puede ser completado en sólo algunos segundos, la carne de los peces puede ser aislada del aire ambiental de modo que el color blanco o rosado natural de la carne de los peces puede ser mantenido; esto es muy diferente del arte previo que utiliza monóxido de carbono como un agente

mejorador del color y que requiere un tiempo de reacción de cerca de 40-60 minutos para que el monóxido de carbono haga su efecto completo. Todo este proceso tiene su origen en la inconciencia en la que se encuentra el pez al inicio del proceso de cosecha. En este método no se usan compuestos químicos como anestésicos.

En la patente EP0917823 (Middleton, A. y Kestin, S, 2001) se describe un método y un aparato para dar muerte a salmones y otros peces de cultivo, por un sistema que se conoce como humanizante para esta etapa de la cosecha.

Para ello se coloca los salmones sobre una mesa en que primero se les aturde con un golpe de una maza de martillo para ese objeto, o colocándolos en un baño con agua de mar saturada con CO₂. Luego del aturdimiento los peces son muertos y desangrados usando un cuchillo arqueado. El desangrado del salmón y otros peces se hace en el mismo lugar de las jaulas de cultivo, produciéndose la muerte cerebral del pez con lo cual se cree que se produce una carne de mejor calidad.

De esta forma se establece un método para lo que se considera una muerte más humanizada de los peces que incluye:

- a) hacer que un pez se mueva a través de una dirección predeterminada,
- b) detener dicho movimiento del pez en una posición definida,
- c) mantener al pez en dicha posición usando medios laterales de retención liberables,
- d) aturdir al pez con dióxido de carbono,
- e) dar muerte al pez, sea por golpe o por stunners neumáticos, o eléctricos produciendo luego su desangrado, y
- f) retirar al pez muerto para su faenado.

Los peces pueden ser colocados manualmente en posición para su muerte con ayuda de paredes guía o sistemas de cinta transportadora.

De esta forma se utiliza un medio acuoso de dióxido de carbono para lograr la inconciencia, y su muerte con stunners y un cuchillo arqueado que penetra el corazón para su muerte final.

La patente GB2405073 (Saunders-Davies, C., 2006) describe, una invención titulada Aparato para Electrocutación de Peces, en donde se efectúa la

aplicación de un campo eléctrico para aturdir a los peces en el agua, que con voltaje suficiente los mata, o al menos los deja insensibles por un período determinado de tiempo para que ellos mueran por sofocación en aire antes de que recuperen la conciencia. Se acepta que tal electrocución forma la base de una muerte humanizada de peces.

El aparato consiste básicamente en un tambor cilíndrico provisto de otro cilindro concéntrico de menor diámetro, cerrados ambos en sus extremos comunes, colocados en forma horizontal de modo que el espacio interanular constituye el espacio al que entran los peces, y por el cual circulan movidos por la corriente de agua que los impulsa hacia una salida. Ambas paredes de los cilindros concéntricos se conectan independientemente a electrodos; el agua sirve como electrolito por el que pasan los peces. A los electrodos se aplica un voltaje a.c. para provocar su inconciencia o su muerte, en el agua, saliendo en ese estado bajo el cual se procesan a continuación de la salida. La corriente es de 1000 Hz, y el voltaje de aproximadamente 2,5 volts por cada 10 mm de separación de los electrodos.

Así, se provee un aparato para faenar los peces que se encuentran en posición controlada por las paredes guía de los cilindros del aparato, aislados entre sí, aplicando el voltaje de electrocución al pez en el agua, y retirando luego el pez electrocutado.

También la patente GB2421889 (Díaz, Jorge, 2006) describe un dispositivo para el aturdimiento de los peces, el que aplica la tradicional técnica japonesa de "Ike-Jime" para el procesamiento de cosecha de salmones. Este equipamiento consiste en una unidad de aturdimiento que golpea la cabeza del salmón por medio de un cilindro impulsado por aire comprimido; el pistón del cilindro termina en una punta aguda atornillada a él, la que penetra el cráneo de los salmones provocándoles la muerte cerebral, manteniendo sin embargo la función fisiológica de éstos, con lo que se mejora el desangrado y se alarga el inicio del *rigor mortis*. De esta forma se describe este método para producir una muerte rápida de los salmones y mejorar la calidad de la textura de la carne de los productos finales.

La solicitud de patente WO2008017104 (Comandante, B., AU) describe un método de acondicionamiento para mejorar finalmente la calidad de la

carne, induciendo un estado de hibernación al exponer los peces vivos a una solución de ácido carbónico. El método comprende las etapas de: inducir los peces vivos a un estado de hibernación al someterlos a una solución de ácido carbónico previo al transporte; transferir los peces vivos en estado de hibernación inducida en un contenedor, el cual se adapta para mantener los peces vivos en ese estado de hibernación como sólidos en condiciones no acuáticas; y transportarlos dentro de contenedores sin agua.

El estado de hibernación se obtiene en un tiempo de 5 a 20 minutos para peces de agua de mar temperada, luego de lo cual son transportados. Para prolongar un estado de bajo metabolismo, normalmente los peces requieren el uso de anestésicos para minimizar la captación de oxígeno y evitar los movimientos bruscos que son responsables del daño que experimentan los peces en los contenedores. Esto se evita con este proceso de hibernación.

Una forma alternativa al uso de ácido carbónico para transportar los peces en condiciones no acuáticas es con el uso de coral molido el que cuando se mezcla con agua induce un estado de hibernación el que reduce el estrés sin efectos adversos sobre los peces. Se asume que el carbonato (HCO_3^-) del coral se convierte parcialmente en ácido carbónico (H_2CO_3) que es el que induce el estado de hibernación en los peces. Los salmones, con una temperatura ambiental óptima de 10-12 °C, tienen un rango de temperatura de hibernación preferentemente más baja, de 0 a -2 °C. Preferentemente la temperatura es bajada gradualmente a 2-3 °C por minuto.

Experimentalmente los peces vivos se preparan, previo al transporte en condiciones no acuáticas, usando las siguientes etapas: los peces son sometidos a inanición durante 48 horas en el interior de estanques contenedores y luego son transferidos a estanques contenedores con recirculación que contenían 30 litros de agua salina de 18 ppt. Desde una temperatura ambiental inicial óptima de 26 °C, la temperatura del agua se baja a 4 °C por hora hasta que se obtuvo la temperatura de inicio apropiada de 6, 12 y 18 °C. En ese instante de las reducciones de temperatura se introducen 500 gramos de hielo por cada 10 litros de agua salina durante 20-30 minutos. Durante cada hora se hacen lecturas del movimiento opercular por minuto para cada pez.

De forma similar se registró el comportamiento de los peces enfocándose específicamente en la posición dorsal, pectoral, y aletas de los peces. Se hizo intentos para registrar el color de los peces, el movimiento de los ojos y manchas en el cuerpo.

Los datos para el transporte o almacenamiento de los peces bajo condiciones no acuáticas muestran una tendencia de disminución del movimiento opercular con el tiempo lo cual se entiende que es beneficioso para mejorar la sobrevivencia de los peces durante el transporte o el almacenamiento. Se entiende que el movimiento opercular aumentado indica niveles de estrés aumentados en los peces.

Actualmente se reconoce (Stevenson P., *EFSA Journal*, 2008, pag. 736) que el enfriamiento de los peces vivos se usa ampliamente previo al faenamiento del Salmón del Atlántico; el enfriamiento se hace antes de la inmersión en dióxido de carbono o del corte de las agallas a fin de preservar la calidad de la carne. En algunos casos este enfriamiento en vivo se efectúa rápidamente desde la temperatura ambiental hasta alrededor de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+1\text{ }^{\circ}\text{C}$, con lo que, según EFSA, se causaría estrés a los salmones. Esto actualmente hace que EFSA y otras organizaciones internacionales preocupadas del bienestar de los salmones tanto durante la cosecha como en el faenamiento mismo sugieran el no uso del *live-chilling* o enfriamiento en vivo en hielo, o en hielo con agua de hasta $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sin embargo lo que no se ha determinado es el comportamiento de los peces a temperaturas inferiores de aproximadamente $-3,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-3,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ en que el tiempo de obtención de inconciencia es de menos de 5 minutos y el eventual estrés es reducido. Esto es precisamente lo que aborda la actual invención, durante la cosecha.

En resumen, el estado del arte muestra que la cosecha de salmones se hace esencialmente en base a técnicas de aturdimiento rápidas, y que el método de enfriamiento en un medio acuoso salino sólo se ha hecho a temperaturas por sobre $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La presente invención que trata del control de la inconciencia de los salmones, hace un enfriamiento rápido hasta una temperatura de $-3,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-3,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, hecho que antes no se había registrado en el estado del arte y que

constituye un aporte al conocimiento técnico, en particular cuando los experimentos que se describirán a continuación como aporte de esta invención se refieren a experimentos de campo reales de la fase de cosecha productiva comercial, es decir de grandes cantidades de peces que se enfrían simultáneamente, y no de un tratamiento individual que lleva a que se produzcan efectos negativos sobre la carne de los salmones, ya sea por manipulación descuidada o porque obligadamente deben tratarse bruscamente debido a la tendencia a escapar a que se les somete con los stunners comerciales.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención corresponde a un proceso de tratamiento de salmones vivos, provenientes de jaulas de acopio de salmones que se van a cosechar, previo a su faenamiento para producir una muerte humanizada de ellos, es decir con mínimo estrés, al tratarlos en un medio acuoso frío que les provoque rápida inconciencia, de acuerdo a las normas de la bioética para el procesamiento de peces.

De esta forma se trata a los salmones, en una mezcla de hielo y sal a una temperatura baja predeterminada que les provoca su inconciencia en un tiempo de menos de 5 minutos, produciendo en todos ellos, de tamaños que son variables, dentro de un cierto rango, un estado de inconciencia bajo el cual pueden ser trasladados a una planta de faenamiento, evitándoles estrés durante el transporte y durante el faenamiento, lo que conlleva a la obtención de productos de alta calidad.

El proceso de enfriamiento en sí está constituido por las etapas de: a) ingreso de los peces a un estanque de enfriamiento sin el agua de mar de su cultivo; b) homogenización de temperatura de los salmones, y obtención de su estado de inconciencia; c) transporte de los peces fríos e inconcientes hasta la planta de faenamiento para obtener un producto final de alta calidad.

La inconciencia de los salmones se verifica *in situ* por los métodos estándares de evaluación de reflejos tales como el movimiento de los ojos, el

movimiento opercular de respiración, la natación, el equilibrio y la respuesta de los peces a estímulos físicos.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Distribución porcentual de inconciencia por tiempo y temperaturas de exposición.

Figura 2. Relación entre los tiempos de exposición al frío y las temperaturas del 100% de los salmones muestreados inconcientes.

Figura 3. Modelo exponencial ajustado a los datos de la muestra.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación se describen los experimentos de inconciencia en agua enfriada con hielo y sal, que se hicieron con salmones cultivados, por la empresa Trusal, en jaulas, en la localidad de Calbuco, Chile. Los resultados que se muestran corresponden a experimentos de campo, y no a experimentos de laboratorio; por lo tanto su representatividad es aquella de valores reales que se dan en producción durante la cosecha de salmones (Salmón del Atlántico).

En estos experimentos se determina el tiempo mínimo que se requiere para que el 100% de una muestra representativa de 380 salmones alcance el estado de inconciencia al estar expuestos a diferentes temperaturas de enfriamiento. Para ello en estos experimentos de campo se determina el efecto de la temperatura de enfriamiento sobre los salmones buscando la temperatura óptima a la cual los salmones se encuentran en estado de inconciencia. Los resultados de los experimentos se muestran cinco niveles de temperatura que son: i) $-0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$; ii) $-1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; iii) $-3,4\text{ }^{\circ}\text{C}$; iv) $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; y v) $-3,9\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para cada nivel de temperatura se hicieron mediciones de los reflejos de los salmones a distintos tiempos de exposición que varían entre los 5 y 90 minutos de enfriamiento. Lo que se determina por medio de la medición de reflejos, es el número de salmones que logran inconciencia a las temperaturas y tiempos que se indican en las tablas de resultados, las cuales se dan para muestras

con significado estadístico efectivo con salmones de distinto peso dentro de un rango determinado para cosecha.

El nivel mínimo de 5 minutos como tiempo de exposición se debe principalmente al tiempo de manejo experimental que requiere observar correctamente la conciencia e inconciencia del pez en el medio de enfriamiento. Así, los ejemplares medidos provienen de una selección aleatoria del centro de acopio de la empresa Trusal en Calbuco. Se observa que los pesos promedios de los ejemplares no difieren significativamente entre los diferentes intervalos de tiempo de exposición al frío. Las unidades experimentales están representadas por los peces provenientes de las jaulas que la empresa disponía en enero del año 2011.

Para estos experimentos se seleccionan al azar 10 ejemplares (unidades experimentales) por cada tiempo de exposición al frío y nivel de temperatura que se indica en las tablas específicas más adelante. Algunos experimentos fueron replicados con diferentes peces.

Los experimentos de campo incluyen un total de 380 ejemplares elegidos aleatoriamente del total de peces de cosecha distribuidos según se indica en la Tabla 1.

Mediciones de Inconciencia:

Para cada ejemplar se hicieron las siguientes mediciones:

- **Peso inicial de los ejemplares.** El peso de cada ejemplar se hace con una balanza digital marca Super-SS, modelo ACS-SS, y para hacer un seguimiento vía la determinación de los parámetros de inconciencia de los peces que se encuentran en el agua de enfriamiento, a cada uno de ellos se les puso una ficha con un número individual que los hacía fácilmente ubicables en el medio de enfriamiento de acuerdo a su peso correcto.
- **Nivel de inconciencia.** Para determinar la inconciencia de los peces se utilizó la metodología estándar para este efecto, de acuerdo a Guidance Notes N°5 "Humane Harvesting of Farmed Fish", de Humane Slaughter Association (UK), de 2003, que se basa en observar los reflejos de los peces posterior a la sedación por frío, u

Tabla 1. Distribución de las muestras de 380 salmones analizados, por temperatura y tiempo de exposición.

Tiempo de Exposición (min.)	Temperatura (°C)					Total
	-0,7	-1	-3,4	-3,5	-3,9	
5	-	10	10	20	20	60
10	-	-	20	20	20	60
15	-	-	10	20	20	50
20	-	10	-	20	20	50
30	-	-	10	-	-	10
40	-	10	-	-	-	10
50	-	10	10	-	-	20
60	-	10	-	-	-	10
70	30	-	10	-	-	40
80	30	10	-	-	-	40
90	30	-	-	-	-	30
Total	90	60	70	80	80	380

otro método alternativo como referencia. De acuerdo a este método estándar se determina los siguientes reflejos:

- movimiento de los ojos,
- movimiento opercular (respiración),
- natación,
- equilibrio y
- respuesta de los peces a estímulos físicos impuestos a los peces enfriados

Con estos parámetros se construye una matriz de trabajo que registra los reflejos de los peces a partir del momento que se someten a enfriamiento, y

con ella se determina la inconciencia (I) o conciencia (C) de los salmones enfriados.

A continuación se presentan los resultados de los experimentos de campo en las tablas 2 a 9, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.

Tabla 2: Medición de Reflejos, de fecha 05.01.11, a una temperatura de enfriamiento de $-1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	2.024	2.688	2.412	3.610	3.212	2.026	2.724	2.682	1.994	1.792
5 Minutos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Peso (gr)	2.714	2.910	3.534	2.344	3.340	-	2.828	2.304	2.290	1.902
20 Minutos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Peso (gr)	2.184	2.866	2.016	1.800	2.686	2.322	2.420	2.448	2.210	2.366
40 Minutos	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Peso (gr)	2.306	1.656	2.806	2.916	3.546	2.294	2.528	1.824	1.630	794
50 Minutos	C	C	C	C	C	I	I	I	I	C
Peso (gr)	3.212	1.894	2.248	2.928	1.926	1.858	2.906	2.164	1.720	2.510
60 Minutos	C	C	I	C	I	C	C	I	I	I
Peso (gr)	1.268	2.518	3.056	2.630	2.470	3.126	2.182	1.780	2.448	2.112
80 Minutos	C	I	I	I	I	I	I	I	I	I

donde:

I, corresponde a peces inconcientes;

C, corresponde a peces concientes; y

Muestra, corresponde a cada pez analizado.

De esta tabla se puede observar que un pez de 2.294 grs. comienza a mostrar inconciencia (I) a los 50 minutos de estar a una temperatura de $-1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Tabla 3: Medición de Reflejos, de fecha 07.01.11, a una temperatura de enfriamiento de -0,7 °C

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	1.924	1.966	1.844	3.588	2.222	1.368	2.498	1.904	2.260	3.016
70 Minutos	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Peso (gr)	2.330	2.356	3.200	2.694	2.782	1.992	2.962	1.298	2.076	2.836
80 Minutos	I	I	C	I	I	I	C	I	C	C
Peso (gr)	2.472	2.282	2.556	2.206	3.274	3.300	2.852	2.988	2.584	3.028
90 Minutos	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Peso (gr)	2.044	1.196	2.716	2.336	2.672	2.302	1.806	2.688	2.376	2.374
70 Minutos	I	I	C	I	I	I	C	I	C	C
Peso (gr)	3.062	2.750	1.544	1.800	2.532	2.194	2.168	2.790	1.980	1.438
80 Minutos	I	I	C	C	I	I	I	I	C	C
Peso (gr)	1.742	2.352	1.660	2.344	2.580	3.254	1.700	3.116	2.246	2.700
90 Minutos	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Peso (gr)	2.652	2.688	3.966	2.234	2.768	1.730	2.872	2.612	3.138	2.376
70 Minutos	I	I	I	I	C	I	I	C	I	I
Peso (gr)	1.900	2.758	2.578	2.310	3.196	1.462	2.816	2.178	2.770	1.562
80 Minutos	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Peso (gr)	2.310	2.344	3.352	3.120	1.974	1.884	1.792	1.454	2.110	2.876
90 Minutos	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

De esta tabla 3 se puede observar, con respecto a la tabla anterior, que a tiempos largos, y a temperaturas relativamente altas (-0,7 °C), la mayoría de los peces se encuentran inconcientes.

Tabla 4: Medición de Reflejos, de fecha 12.01.11, a una temperatura de enfriamiento de -3,4 °C

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	3.298	4.334	3.614	1.794	1.292	2.220	2.304	3.452	2.196	1.996
10 Minutos										
Peso (gr)	3.596	2.946	2.982	3.416	2.172	3.288	2.328	2.356	2.280	390
30 Minutos										
Peso (gr)	1.900	1.770	3.204	2.934	2.588	766	2.846	2.372	3.678	2.198
50 Minutos										
Peso (gr)	2.806	3.238	2.516	2.390	1.918	2.550	4.236	2.914	2.320	1.322
70 Minutos										

Tabla 5: Segunda Medición de Reflejos, de fecha 12.01.11, a una temperatura de enfriamiento de -3,4 °C

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	1.190	1.726	876	1.394	2.568	1.712	3.100	2.420	2.776	1.834
5 Minutos										
Peso (gr)	1.282	2.636	936	1.946	1.120	2.370	1.400	3.786	3.300	3.404
10 Minutos										
Peso (gr)	2.264	2.204	1.090	2.262	2.136	1.704	3.508	1.930	1.880	2.390
15 Minutos										

De las tablas 4 y 5 anteriores se puede observar que a una temperatura de enfriamiento de $-3,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ todos los peces se encuentran en estado de inconciencia a tiempos cortos de 5 minutos.

Tabla 6: Medición de Reflejos, de fecha 13.01.11, a una temperatura de enfriamiento de $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	2.134	2.196	2.250	3.018	3.530	1.870	1.996	1.616	1.080	950
5 Minutos										
Peso (gr)	1.060	2.390	2.392	3.060	1.526	736	2.142	1.076	2.360	2.298
10 Minutos										
Peso (gr)	2.538	2.548	2.314	1.290	1.266	2.860	2.388	2.056	1.236	-
15 Minutos										
Peso (gr)	2.658	1.326	2.532	2.458	1.262	2.364	2.592	912	2.254	2.154
20 Minutos										

Tabla 7: Segunda Medición de Reflejos, de fecha 13.01.11, a una temperatura de enfriamiento de $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	2.214	2.596	1.494	1.552	1.486	2.830	3.136	480	1.890	2.128
5 Minutos										
Peso (gr)	1.620	1.440	2.726	2.150	1.262	2.572	2.548	2.356	2.228	1.248
10 Minutos										
Peso (gr)	3.464	1.972	2.812	1.592	2.608	1.954	1.808	2.440	2.178	2.850
15 Minutos										
Peso (gr)	2.350	2.000	1.748	2.344	2.368	2.296	2.650	2.704	2.514	1.880
20 Minutos										

De las tablas 6 y 7 que corresponden a una réplica de los experimentos, se puede observar que a temperaturas de $-3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, independiente del peso de los peces, todos ellos se encuentran inconcientes a los 5 minutos de enfriamiento.

Tabla 8: Medición de Reflejos, de fecha 14.01.11, a una temperatura de enfriamiento de -3,9 °C

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	2.294	1.918	1.864	2.060	2.010	978	3.704	2.464	2.874	1.480
5 Minutos										
Peso (gr)	3.686	3.728	3.134	1.858	3.530	2.454	1.752	2.424	2.580	3.734
10 Minutos										
Peso (gr)	2.032	2.186	2.386	2.520	1.598	1.916	2.038	1.562	1.800	1.846
15 Minutos										
Peso (gr)	2.602	1.460	2.394	1.772	2.260	2.262	1.936	3.338	3.352	1.688
20 Minutos										

Tabla 9: Segunda Medición de Reflejos, de fecha 14.01.11, a una temperatura de enfriamiento de -3,9 °C

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10
Peso (gr)	2.706	2.308	2.252	2.352	2.856	1.530	2.830	2.964	2.962	4.402
5 Minutos										
Peso (gr)	2.570	2.790	2.140	2.340	2.370	1.968	2.250	2.638	2.548	2.064
10 Minutos										
Peso (gr)	2.900	1.356	1.364	2.316	2.966	2.038	2.730	3.088	2.218	1.680
15 Minutos										
Peso (gr)	2.616	2.962	2.192	2.770	1.966	2.040	2.570	2.562	2.840	2.114
20 Minutos										

De las tablas 8 y 9 anteriores se observa que a -3,9 °C, independiente del peso de los peces, todos ellos se encuentran inconcientes a tiempos de 5 minutos.

Análisis Estadístico de los datos experimentales

Análisis de regresión no lineal. Supuestos del modelo de regresión no

lineal: Se supone que la componente aleatoria del modelo sigue una distribución de tipo normal de varianza homogénea.

Con los datos experimentales, se ajustó una curva no lineal entre la temperatura y los tiempos de enfriamiento hasta obtener inconciencia. El mejor modelo final de ajuste de los valores experimentales dados en las tablas 2 a la 9 anteriores, resulta ser un modelo exponencial, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t_i = \beta_0 e^{\beta_1 T_i} e_i ; \quad i = 1,2,3,4,5 \quad (1)$$

donde:

t_i es la variable respuesta que representa el tiempo de exposición cuando el 100% alcanza la inconciencia.

T_i es la variable predictora que representa el nivel de baja temperatura.

$\beta_0; \beta_1$ son los coeficientes de regresión del modelo

e_i son los errores experimentales aleatorios con distribución normal, con media 0 y varianza σ^2 .

Análisis de varianza. Supuestos del diseño de varianza: El diseño utilizado para comparar los pesos promedios corresponde a un análisis de varianza para diseños de efectos fijos. La validez de las inferencias a partir de este análisis de varianza requiere el supuesto de poblaciones con varianzas iguales. Para ello se utiliza la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.

Adicionalmente se utiliza otros supuestos críticos para propósitos de pruebas estadísticas y construcción de intervalos de confianza que requieren normalidad de los errores. El modelo es aplicado para cada intervalo de tiempo a que fueron expuestos los salmones.

El modelo final que representa de mejor manera los datos experimentales de los enfriamientos de los peces se representa por la siguiente ecuación:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij} \quad (2)$$

$$i = 1,2,3, \dots, k ; j = 1,2, \dots, n_i$$

donde:

y_{ij} es la variable respuesta que representa el peso por nivel de temperatura $i = 1,2,3, \dots, k$ del individuo $j = 1,2, \dots, n_i$

μ es el peso medio global

μ_i es el peso medio asociado al tratamiento j .

e_{ij} son errores experimentales aleatorios con distribución normal con media 0 y varianza σ^2 .

La hipótesis nula H_0 del modelo de regresión no lineal permite probar si los K grupos de tratamiento (tiempo de exposición al frío) son iguales. Esta hipótesis equivale a probar que:

$$H_c: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k = \mu \quad (3)$$

contra la alternativa que al menos una de las medias μ_i difiere del resto.

Si se concluye que alguna media no es igual se busca qué provoca la diferencia, en este caso, usando el método de Scheffé.

Resultados y discusión

La distribución porcentual de los salmones inconcientes dada en la tabla 10 muestra que mientras más baja es la temperatura más rápido se logra que el 100% de los ejemplares alcancen la inconciencia. Esto se observa principalmente a partir de los $-3,4^\circ\text{C}$. En contraste, a niveles sobre -1°C , se

logra más lentamente el 100% de ejemplares con inconciencia. La Figura 1, representa los resultados encontrados.

Tabla 10. Distribución porcentual de los salmones inconcientes por tiempo de exposición al frío y nivel de temperatura.

Tiempo de exposición (minutos)	Temperatura en °C				
	-0,7	-1	-3,4	-3,5	-3,9
5	-	0%	100%	100%	100%
0	-	-	100%	100%	100%
15	-	-	100%	100%	100%
20	-	0%	-	100%	100%
30	-	-	100%	-	-
40	-	0%	-	-	-
50	-	40%	100%	-	-
60	-	50%	-	-	-
70	80%	-	100%	-	-
80	73%	90%	-	-	-
90	100%	-	-	-	-

La Figura 2 que representa estos datos, muestra que el 100% de los salmones alcanzan la inconciencia total a los 5 minutos si los niveles de temperatura son inferiores a $-3,4^{\circ}\text{C}$, mientras que si las temperaturas suben a -1°C ó $-0,7^{\circ}\text{C}$ se requieren de 80 o más minutos de exposición para alcanzar niveles de al menos el 90% de inconciencia.

Para el intervalo entre -1°C y $-3,4^{\circ}\text{C}$, no hay información de interpolación, lo que limita saber con mayor seguridad cuál es el comportamiento de los porcentajes de inconciencia. Sin embargo, es posible inferir que los tiempos de exposición deberían reducirse a medida que se disminuye la temperatura.

Considerando la presunción anterior se ajustó un modelo exponencial de 5 puntos entre el tiempo de exposición, y las temperaturas de enfriamiento

representado en la Figura 3, el modelo final resultante se representa por la siguiente ecuación:

$$\hat{t}_i = 194,308e^{1,011T_i} \quad (4)$$

La Tabla 11 siguiente muestra la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, concluyéndose de ésta que sólo en el rango de 10 minutos hay un rechazo de la igualdad de varianzas que no validaría la prueba Anova; en todos los otros casos, se concluye igualdad de varianzas. En consecuencia, se usa una prueba estadística no paramétrica de Tamhane que no requiere el supuesto considerado cuando el nivel es de 10 minutos.

Tabla 11. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene por tiempo de exposición al frío considerando los distintos pesos

Tiempo (min)	Estadística de Levene	gl1	gl2	Sig
5,00	0,206	3	56	0,892
10,00	4,088	2	57	0,022
15,00	0,220	2	47	0,803
20,00	0,061	2	47	0,941
50,00	0,010	1	18	0,923
70,00	0,428	1	38	0,517
80,00	0,152	1	38	0,699

La Tabla 12 siguiente, Anova, muestra que para un 2,5% de significancia estadística (sig) en ninguno de los tiempos considerados los pesos promedios difieren entre sí.

Tabla 12. Análisis de varianza Anova de considerando los distintos pesos por tiempo de exposición al frío de los salmones.

Tiempo (minutos)		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Estadística de F	Sig
5,00	Intergrupos	3298796,9	3	1099599,0	2,028	0,120
	Intragrupos	30359684	56	542137,211		
	Total	33658481	59			
15,00	Intergrupos	79729,070	2	39864,535	0,124	0,884
	Intragrupos	15104141	47	321364,693		
	Total	15183870	49			
20,00	Intergrupos	1804027,3	2	902013,660	3,492	0,039
	Intragrupos	12141894	47	258338,177		
	Total	13945922	49			
50,00	Intergrupos	191296,80	1	191296,800	0,294	0,594
	Intragrupos	11700318	18	650017,689		
	Total	11891615	19			
70,00	Intergrupos	351433,63	1	351433,633	0,858	0,360
	Intragrupos	15561361	38	409509,512		
	Total	15912795	39			
80,00	Intergrupos	1732,800	1	1732,800	0,006	0,940
	Intragrupos	11601149	38	305293,389		
	Total	11602882	39			

La Tabla 13 siguiente muestra que hay diferencias significativas (sig = 0,006) al comparar los promedios de los grupos a $-3,5^{\circ}\text{C}$ y $-3,9^{\circ}\text{C}$. Sin embargo, los promedios de los pesos considerados a las temperaturas $-3,4^{\circ}\text{C}$ no difieren significativamente de los pesos medios a las temperaturas $-3,5^{\circ}\text{C}$ y $-3,9^{\circ}\text{C}$.

Se concluye de estos resultados que los pesos promedios usados en los experimentos provienen de poblaciones similares que validan la consistencia del estudio de inconciencia de los salmones.

Tabla 13. Resultados de la prueba de Tamhane para 10 minutos de tiempo de exposición al frío de salmones con distintos pesos.

						Intervalo de confianza al 95%	
tiempo	(I) temp.	(J) temp.	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig	Límite inferior	Límite superior
10,00	3,40	3,50	474,50000	267,03853	0,234	-197,3959	1146,3959
		3,90	-193,90000	263,35829	0,849	-857,5515	469,7515
	3,50	3,40	-474,50000	267,03853	0,234	-1146,3959	197,3959
		3,90	-668,40000*	201,93706	0,006	-1172,8060	-163,9940
	3,90	3,40	193,90000	263,35829	0,849	-469,7515	857,5515
		3,50	668,40000*	201,93706	0,006	163,9940	1172,8060

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los experimentos de campo en la etapa de cosecha de salmones de jaulas de cultivo en agua de mar permiten afirmar que:

- Los salmones expuestos a las temperaturas de -3,4, -3,5 y -3,9 °C presentan total inconciencia a partir de los 5 minutos.
- Los pesos promedios usados en los experimentos provienen de poblaciones similares dentro del centro de acopio de la empresa Trusal.

Los resultados obtenidos confirman que el proceso de enfriamiento de salmones vivos provenientes de jaulas de cultivo en el mar, a temperaturas de -3,4 °C e inferiores, permite obtener un 100% de inconciencia a tiempos muy cortos. Estos tiempos que corresponden actualmente a 5 minutos podrían ser aún inferiores en función de métodos experimentales de evaluación de inconciencia más rápidos.

El estado de la técnica en cambio ha mostrado que la temperatura de enfriamiento de 0 °C hasta -1,0 °C produce tensión durante períodos prolongados de tiempo, motivo por el que este método de enfriamiento no es compartido como método estándar de enfriamiento.

En los experimentos de evaluación de esta invención se ha comprobado efectivamente que en el rango de 0,7 hasta aproximadamente -3,0 °C, efectivamente los peces son sometidos a estrés demorando en esas condiciones más de 30 minutos para alcanzar la inconciencia, y que sólo a partir de temperaturas de -3,4 °C hacia abajo se logra la inconciencia en cortos tiempos, lo cual reduce fuertemente el tiempo de estrés de los peces llevando posteriormente a una muerte más humanizada y a productos de alta calidad organoléptica.

REIVINDICACIONES

1. Proceso de enfriamiento de salmones vivos provenientes de jaulas de cultivo en el mar, con una mezcla de enfriamiento formada por hielo y sal común en agua dulce, que se coloca en un estanque de enfriamiento montado en un camión para el transporte de los peces, caracterizado porque el proceso está constituido por las etapas de:

- a) ingreso de los peces al estanque de enfriamiento sin el agua de mar de su cultivo;**
- b) homogenización de temperatura de los salmones, y obtención de su estado de inconciencia;**
- c) transporte de los peces fríos e inconcientes hasta la planta de faenamiento para obtener un producto final de alta calidad.**

2. Proceso de enfriamiento de salmones vivos, de acuerdo a la reivindicación 1, en donde el ingreso de los salmones al estanque de enfriamiento se hace sobre tubos de deslizamiento paralelos suficientemente separados para sacar el agua de mar, caracterizado porque se sumerge a los peces en la mezcla de enfriamiento compuesta por 30 a 40% de hielo y salmuera fabricada con 5% a 15% de sal en agua dulce, que se encuentra a una temperatura de entre -3,6 a -4,5 °C.

3. Proceso de enfriamiento de salmones vivos, de acuerdo a la reivindicación 2, caracterizado porque la temperatura de enfriamiento que alcanzan los peces en el estanque de enfriamiento es de -3,4 °C a -3,9 °C.

4. Proceso de enfriamiento de salmones vivos, de acuerdo a las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque a la temperatura de -3,4 °C los peces alcanzan el estado de inconciencia en 5 minutos o menos.

5. Proceso de enfriamiento de salmones vivos, de acuerdo a la reivindicación 4, caracterizado porque durante él se verifica *in situ* la inconciencia por los métodos estándares de evaluación de reflejos de movimiento de los ojos, movimiento opercular de respiración, natación, equilibrio y la respuesta de los peces a estímulos físicos.

6. Proceso de enfriamiento de salmones vivos, de acuerdo a las reivindicaciones 4 y 5, en donde la inconciencia de los salmones depende de la temperatura de la mezcla de enfriamiento T_i , de los coeficientes β_0 y β_1 de un modelo exponencial seguido por el proceso, y de los errores experimentales e_i aleatorios de distribución normal con media 0 y varianza σ^2 con significado estadístico, caracterizado porque el tiempo t_i para alcanzar el 100% de inconciencia está determinado por la siguiente expresión:

$$t_i = \beta_0 e^{\beta_1 T_i} e_i$$

7. Proceso de enfriamiento de salmones vivos, de acuerdo a todas las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque respeta las normas bioéticas para la muerte sin sufrimiento de los peces al alcanzar la inconciencia temprana, y lleva a productos de alta calidad.

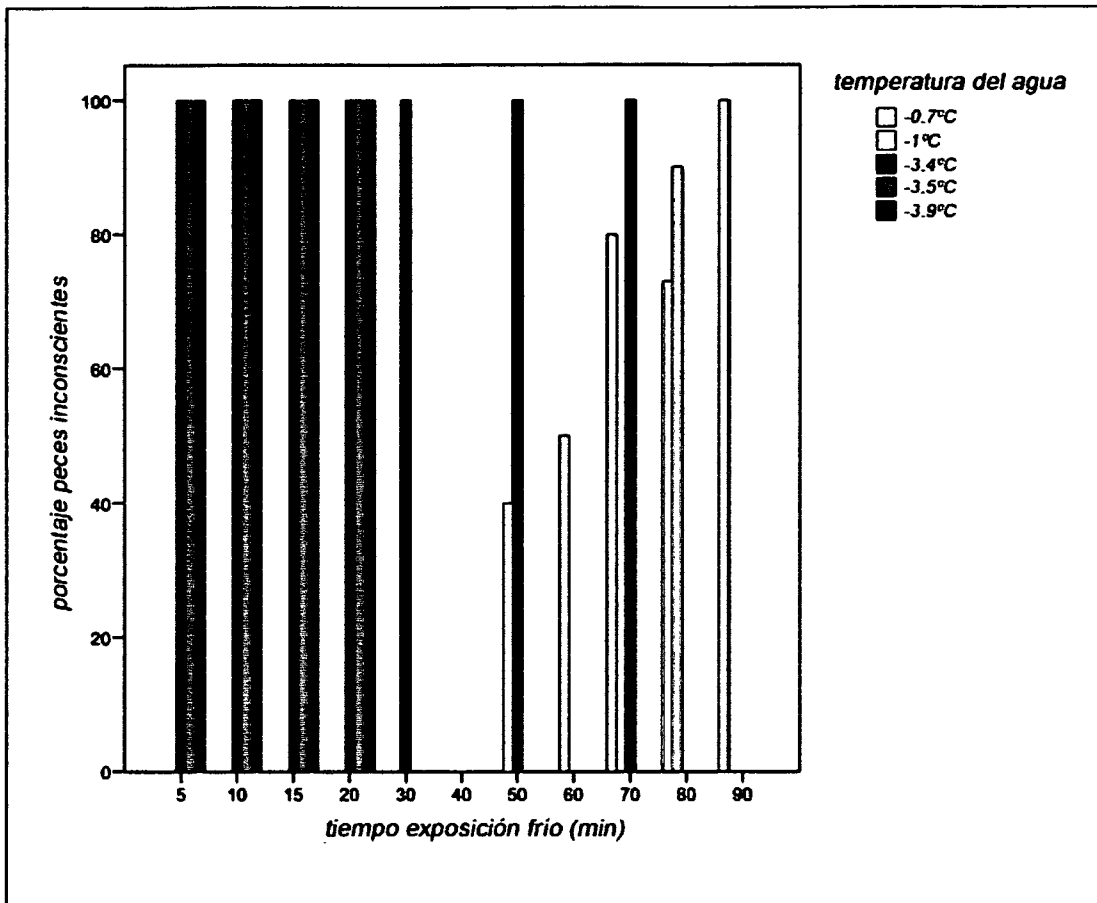


Fig 1

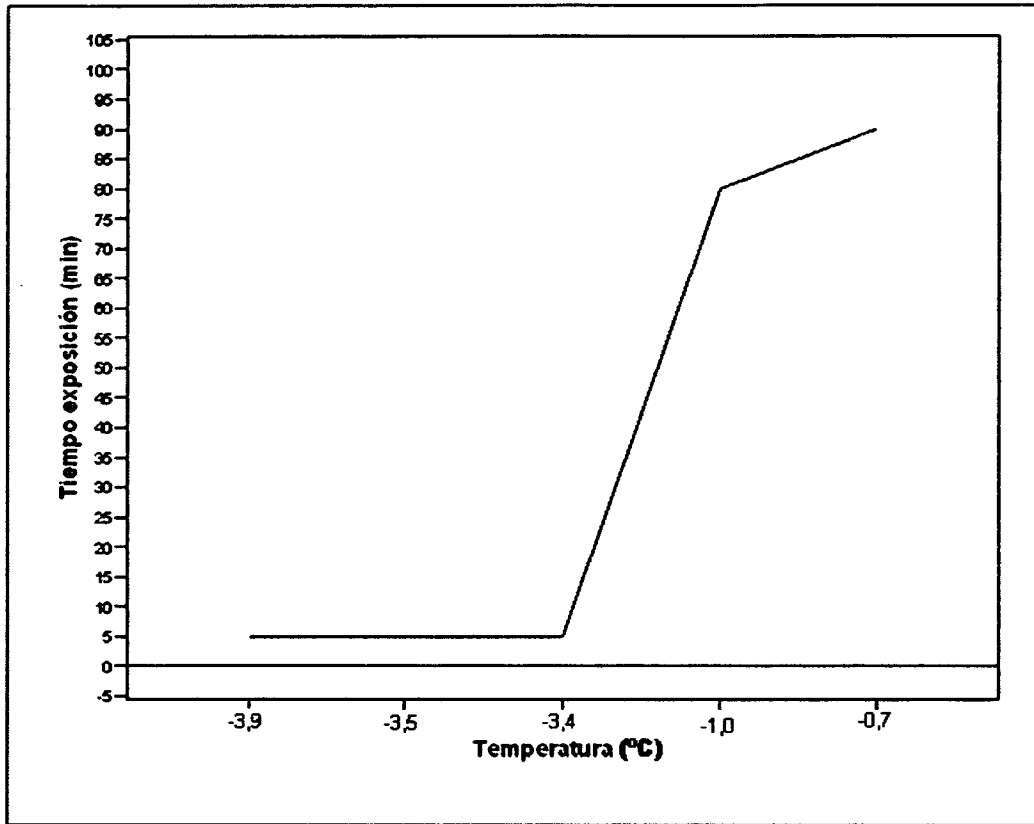


Fig 2

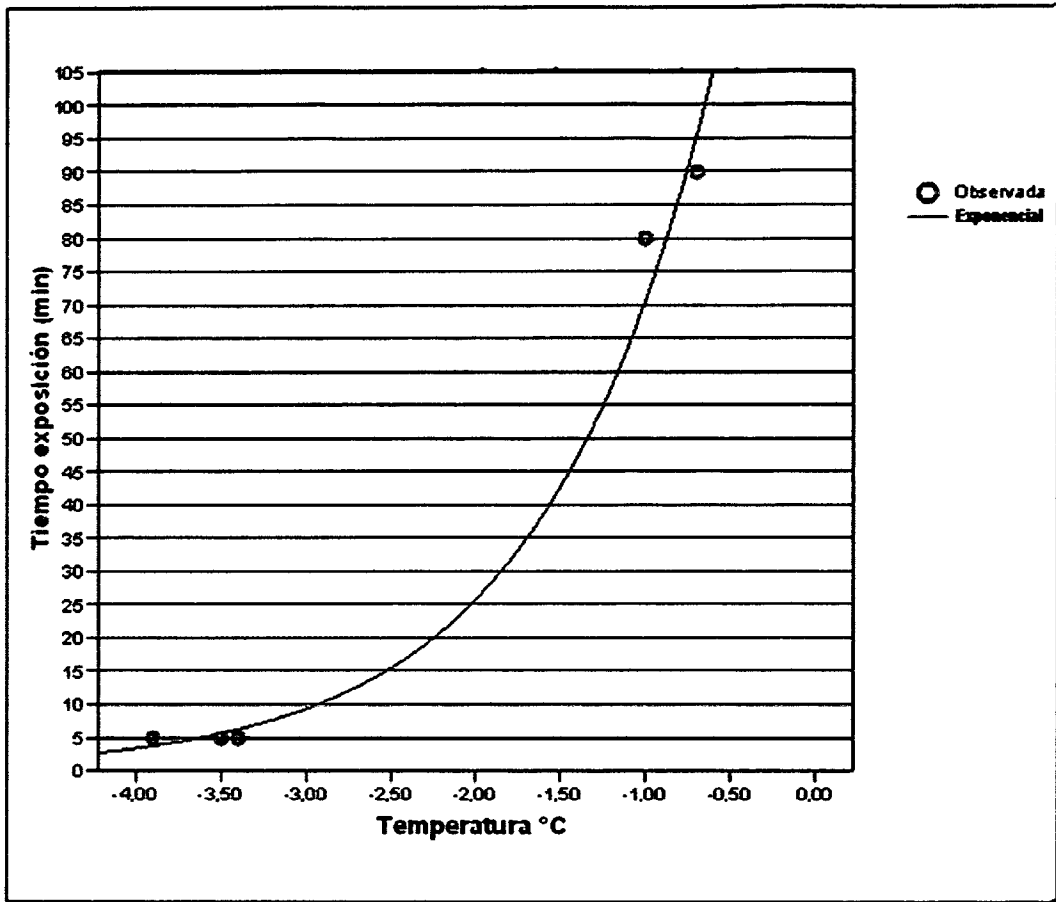


Fig. 3

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2011/000025

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A01K63/02 A22B3/08

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K A22B

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p>ERIKSON U ET AL: "Live chilling of Atlantic salmon (Salmo salar) combined with mild carbon dioxide anaesthesia", AQUACULTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 252, no. 2-4, 10 Marzo 2006 (2006-03-10), paginas 183-198, XP025040828, ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2005.05.013 [retrieved on 2006-03-10] pagina183, parrafo 1 - pagina185, paragraph 2.1. pagina186, paragraph 2.3. - paragraph 2.5. pagina188, left-hand column, parrafo 3.1.1. pagina190, parrafo 3.2. - page 193, parrafo 3.5. Resumen : table 1 paginas 195, 196, parrafo 4</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,5

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
16 Enero 2012	23/01/2012

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional	Funcionario autorizado
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2011/000025

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s: 6
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

Rule 39.1(i) PCT - Mathematical method

2. Las reivindicaciones N°s: 4, 7
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

- Indicación en cuanto a la protesta**
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2011/000025

C (continuación).	DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES	
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>US 4 700 547 A (HAYASHI TAKESHI [JP]) 20 October 1987 (1987-10-20) columna 3, line 39 - columna 4, line 11 columna 4, line 66 - columna 6, line 2 columna 11, line 48 - columna 12, line 58 columna 13, line 60 - columna 14, line 56 columna 15, line 63 - columna 17, line 37 figures 1-9</p>	1,5
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>US 5 572 952 A (MANOME HIROMICHI [JP]) 12 November 1996 (1996-11-12) columna 1, line 56 - line 61 columna 2, line 14 - line 61 columna 4, line 45 - columna 5, line 49 figures 1, 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,5

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2011/000025

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 4700547	A	20-10-1987	CA	1241810 A1		13-09-1988
			NO	861628 A		27-10-1986
			US	4700547 A		20-10-1987

US 5572952	A	12-11-1996	Ninguno			

Empty rectangular area for the international search report content.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CL2011/000025

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01K63/02 A22B3/08 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K A22B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ERIKSON U ET AL: "Live chilling of Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>) combined with mild carbon dioxide anaesthesia", AQUACULTURE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 252, no. 2-4, 10 March 2006 (2006-03-10), pages 183-198, XP025040828, ISSN: 0044-8486, DOI: 10.1016/J.AQUACULTURE.2005.05.013 [retrieved on 2006-03-10] page 183, paragraph 1 - page 185, paragraph 2.1. page 186, paragraph 2.3. - paragraph 2.5. page 188, left-hand column, paragraph 3.1.1. page 190, paragraph 3.2. - page 193, paragraph 3.5. abstract; table 1 pages 195, 196, paragraph 4 -/--	1,5
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 16 January 2012		Date of mailing of the international search report 23/01/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Been, Mathieu

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CL2011/000025

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(i) PCT - Mathematical method

2. Claims Nos.: 4, 7
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CL2011/000025

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	----- US 4 700 547 A (HAYASHI TAKESHI [JP]) 20 October 1987 (1987-10-20) column 3, line 39 - column 4, line 11 column 4, line 66 - column 6, line 2 column 11, line 48 - column 12, line 58 column 13, line 60 - column 14, line 56 column 15, line 63 - column 17, line 37 figures 1-9	1,5
X	----- US 5 572 952 A (MANOME HIROMICHI [JP]) 12 November 1996 (1996-11-12) column 1, line 56 - line 61 column 2, line 14 - line 61 column 4, line 45 - column 5, line 49 figures 1, 2 -----	1,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CL2011/000025

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4700547	A	20-10-1987	CA 1241810 A1 13-09-1988
			NO 861628 A 27-10-1986
			US 4700547 A 20-10-1987

US 5572952	A	12-11-1996	NONE

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 6

Rule 39.1(i) PCT - Mathematical method

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 4, 7

Present claims 4 and 7 encompass method steps defined only by their desired function of reaching a state of fish unconsciousness within 5 minutes on the one hand and respecting all bioethical norms for ensuring the death of fish without suffering after rapidly inducing unconsciousness on the other hand. These method steps defined only by their desired function are contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent that no meaningful search of claims 4 and 7 could be carried out at all (Article 17(2) PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.