



Programa Iberoamericano de Ciencia
y Tecnología para el Desarrollo
Subprograma Acuicultura
Red de Nutrición en Acuicultura



Proyecto II. 8: Optimización de alimentos y estrategias de alimentación para una Camaronicultura sustentable

Manual de Metodologías de Digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para ingredientes y dietas para camarón

Editores:

Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

Dra. Mireya Tapia Salazar

Dra. Martha G. Nieto López

M.C. David A. Villarreal Cavazos

Dr. Denis Ricque Marie

PROTEÍNAS Y GRASAS ANIMALES

con inmejorables características para alimentación de aves, cerdos, ganado de leche y carne, peces, camarones, mascotas, etc.



Alto contenido de energía

Alta digestibilidad de proteína



Alta disponibilidad de calcio y fósforo

Alta palatabilidad



Disponibilidad todo el año



NATIONAL RENDERERS ASSOCIATION, INC.

Oficina para Latinoamérica
Sierra Candela 111 oficina 501
Lomas de Chapultepec
11000 México D.F., México

Tel: +(52 55) 5980-6080
Fax: +(52 55) 5980-6081
Correo electrónico: nramex@nralatinamerica.org

Subprograma II: Acuicultura
Red Temática II. C
Proyecto II. 8. Optimización de alimentos y estrategias de alimentación para una
camaronicultura sustentable

Manual de Metodologías de Digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para Ingredientes y Dietas para Camarón

Editores:

Dra. L. Elizabeth Cruz Suárez

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas/Programa Maricultura
Ciudad Universitaria A.P. F56, San Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450

Dr. Humberto Villarreal Colmenares

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
La Paz, B.C.S. 23090, Baja California Sur, México
Ciudad Universitaria A.P. F56, San Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450

Dra. Mireya Tapia Salazar

Dra. Martha G. Nieto López

M.C. David A. Villarreal Cavazos

Dr. Denis Ricque Marie

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas/Programa Maricultura
Ciudad Universitaria A.P. F56, San Nicolás de los Garza, N.L. C.P. 66450

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio o método, sin autorización previa de los autores.

Ilustración de portada: Fotos tomadas por Dra. Martha G. Nieto López y Dr. Luis O. Peña.

Impreso en: Imprenta Universitaria

Editorial: Universidad Autónoma de Nuevo León

ISBN: 978-607-433-020-5

Se terminó de imprimir en la Imprenta Universitaria UANL, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, en Octubre, 2008.

Como citar: Autores del escrito. 2008. Nombre del capítulo. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Humberto Villarreal Colmenares, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos y Denis Ricque Marie. Manual de Metodologías de Digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para Ingredientes y Dietas para Camarón. Universidad Autónoma de Nuevo León, Mty., N.L., México. ISBN: 978-607-433-020-5. No. pp.

PREFACIO

En la actualidad debido al gran incremento que ha sufrido el costo de las materias primas las necesidades de formular alimentos balanceados para camarón en base a nutrientes digestibles y de técnicas rápidas de control de calidad de materias primas, son imperativas. Sin embargo, aunque el número de publicaciones internacionales que reportan datos de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de alimentos, ingredientes y nutrientes está en aumento, la información generada es difícil de comparar y aun más de transferir a la industria.

Con la finalidad de conocer y comparar las metodologías de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* desarrolladas por diferentes instituciones y discutir los factores que afectan la validez y la precisión de estas estimaciones en camarones pendedos, se realizó en junio de 2005, con el apoyo de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) (situada en la Ciudad de San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, un taller de trabajo internacional con expertos en el tema.

En este libro se integran los frutos de ese taller y se pone al alcance de sus lectores un Manual donde se presentan las metodologías utilizadas o desarrolladas por investigadores de las diferentes instituciones participantes: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNor), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Programa Maricultura de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) (México), Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) (Ecuador), Universidad de la Habana (Cuba), Universidad Nacional del Mar de Plata (UNMP)(Argentina), Australian Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation CSIRO (Australia), Dr. Divakaran (Investigador retirado, Texas) y de Texas A & M University (TAMU) (Estados Unidos).

El libro consta de 2 secciones, una sobre métodos de digestibilidad *in vivo* y otra sobre métodos de digestibilidad *in vitro* en camarones. Adicionalmente se incluye un capítulo sobre digestibilidad *in vivo* en langosta. En cada capítulo se describe a detalle la metodología desarrollada o implementada por cada laboratorio, con algunos ejemplos de resultados obtenidos, así como los métodos de análisis químicos usados y un listado de trabajos publicados sobre el tema por cada Institución.

Para facilitar un análisis global de las metodologías, al final de cada sección, se presenta un capítulo de integración.

En el caso de la digestibilidad *in vivo* se resume algunos aspectos o variables propias de las metodologías usadas por cada Institución que son importantes de comparar y de considerar cuando se quiera implementar la determinación de digestibilidad en un laboratorio o cuando se desee hacer uso práctico de datos publicados. Adicionalmente, se proponen recomendaciones de estandarización en los pasos de la metodología donde

esto es factible y en los pasos que tienen diferentes formas de realizarse, tomando en consideración el hecho de que cada laboratorio cuenta con equipos e infraestructura diferente; en lugar de proponer una estrategia estandarizada, se resaltan los factores de procedimiento que afectan la validez y la precisión de los resultados para que estos sean contemplados en su momento. No obstante, al usuario de este manual se le recomienda leer las experiencias de todos los laboratorios para aprovechar las estrategias implementadas por cada grupo y después, en base a sus posibilidades, implementar o mejorar su propia metodología de la mejor manera.

Cabe mencionar que este Taller fue muy provechoso ya que todos los participantes regresaron a sus respectivos laboratorios con ideas para mejorar algún aspecto de su metodología y para plantear protocolos con incógnitas que aún falta por resolver.

Un agradecimiento a todos los investigadores y a las Instituciones participantes. Esperamos que este Manual contribuya con el desarrollo de alimentos balanceados altamente digestibles que promuevan el desarrollo de una camaronicultura sustentable en Iberoamérica y el Mundo.

Lucia Elizabeth Cruz Suárez

Lista de autores

Revisión de la Metodología Utilizada para Determinar la Digestibilidad Aparente de Nutrientes en Camarones Peneidos Marinos	1
Joe M. Fox y Addison L. Lawrence	
Métodos Utilizados por la Universidad Nacional de Mar del Plata para la Medición de Digestibilidad in vivo e in vitro en Camarón	18
Jorge L. Fenucci	
Método Utilizado en el CIAD para Medir la Digestibilidad in vivo en Camarón	35
Crisantema Hernández, Blanca González Rodríguez, Isabel Abdo de la Parra, Leticia García Rico y Carlos Martínez Palacios	
Métodos utilizados por la Universidad Autónoma de Nuevo León para determinar la digestibilidad in vivo en camarón	48
Lucia Elizabeth Cruz-Suárez, Martha Nieto-López, Mireya Tapia-Salazar, Claudio Guajardo-Barbosa, David Villarreal-Cavazos, Alberto Peña-Rodríguez, Denis Ricque-Marie	
Método Utilizado en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) Ecuador para Medir la Digestibilidad in vivo en Camarón	84
Yela Paredes y César Molina	
Método Usado en el CSIRO para Medir la Digestibilidad in vivo en Camarón	108
D.M. Smith, S.J. Tabrett, S.J. Irvin	
- Metodologías utilizadas en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR para determinar la digestibilidad in vivo de nutrimentos de alimentos e ingredientes en camarón y langosta de agua dulce	122
Roberto Civera Cerecedo, Ernesto Goytortúa Bores, Sonia Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga	

Método Desarrollado por el CSIRO para Medir la Digestibilidad en langosta <i>P. ornatus</i> S.J. Tabrett, S.J. Irvin, D.M. Smith, K.C. Williams	167
Camarón (<i>Litopenaeus vannamei</i>): Méritos de Estudios <i>in vitro</i> para Diseñar Métodos de Digestibilidad <i>in vivo</i> Subramanian Divakaran, D.V.M.	176
- Integración y Análisis Global de las Metodologías de Digestibilidad <i>in vivo</i> presentadas en este Libro L. Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque Marie y Mireya Tapia Salazar	180
- Métodos Utilizados por la Universidad Autónoma de Nuevo León para la Medición de Digestibilidad <i>in vitro</i> para Camarón Martha G. Nieto-López, Denis Ricque-Marie, Mireya Tapia-Salazar, Claudio Guajardo-Barbosa y L. Elizabeth Cruz-Suárez	192
Métodos Utilizados por el Centro de Investigaciones Marinas y Facultad de Biología <i>Universidad de La Habana, Cuba</i> para la Medición de Digestibilidad <i>in vitro</i> para Camarón Olimpia Carrillo F., A.B. Forrellat, L.T. Estévez	207
Métodos Utilizados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para la Medición de Digestibilidad <i>in vitro</i> para Camarón Héctor Nolasco	215
Métodos Utilizados por la Universidad de Sonora para la Medición de Digestibilidad <i>in vitro</i> para Camarón J.M. Ezquerro y J.L. Cárdenas	226
Integración y Análisis Global de las Metodologías de Digestibilidad <i>in vitro</i> presentadas en este Libro Martha G. Nieto López	235

Revisión de la Metodología Utilizada para Determinar la Digestibilidad Aparente de Nutrientes en Camarones Peneidos Marinos

Joe M. Fox¹ y Addison L. Lawrence¹

¹Texas Agricultural Experiment Station, Shrimp Mariculture Research, Texas A&M University System.
1300 Port Street, Port Aransas, TX 78373. E-mail: Joe.Fox@tamucc.edu

Introducción

Con pocas excepciones, el cultivo internacional de camarones peneidos marinos se ha incrementado rápidamente en los últimos 40 años. A pesar de tal crecimiento, solo pocos estudios se han enfocado a las necesidades nutricionales de este organismo, con respecto a la digestión de nutrientes derivados de los ingredientes. En estos estudios (Akiyama, 1989; Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995; Davis *et al.*, 2002), las condiciones experimentales y protocolos han variado tanto que las comparaciones son a menudo difíciles de hacer. Las problemáticas para determinar la digestibilidad de nutrientes han sido asociadas con el comportamiento eco-fisiológico del camarón (por ejemplo, comportamiento de alimentación continuo, rápido crecimiento y ciclos de muda) y por lo tanto, son hasta cierto punto inevitables. Otras problemáticas están relacionadas al medio ambiente en donde el camarón vive. Por ejemplo, a diferencia de los animales terrestres, la determinación directa de coeficientes de digestibilidad para camarón por gravimetría es muy problemática (Smith y Tabrett, 2004), requiriendo de una cuantificación relativamente precisa del alimento ingerido y las heces excretadas. Por esta razón se han desarrollado los métodos indirectos en donde se determina diferencias de concentración de un marcador inerte entre el alimento y las heces (ver secciones siguientes).

La necesidad de un método apropiado para determinar la digestibilidad de nutrientes para camarón es crítica para una formulación de dietas al mínimo costo. Son necesarios datos exactos son necesarios para formular dietas precisas con el fin de cubrir los requerimientos nutricionales, permitir una sustitución por costo (i.e. mínimo costo) de ingredientes y una reducción del desperdicio de nutrientes. Desafortunadamente, muchas fórmulas comerciales se han desarrollado usando datos derivados de estudios en estanques semi-controlados y de estudios de laboratorio. Estos experimentos a menudo generan resultados de crecimiento que son interpretados sin considerar la disponibilidad de nutrientes. Considerando que el alimento abarca la mayor parte de los costos de producción (Akiyama *et al.*, 1992; Sarac *et al.*, 1993) la falta de investigación es desafortunada,

Digestibilidad aparente de nutrientes vs verdadera

El término de “digestibilidad del alimento” es usado para describir únicamente la porción del alimento absorbido por el organismo y es comúnmente medido en sistemas terrestres como la diferencia entre el total del alimento ingerido y la cantidad de heces totales producidas sobre un tiempo determinado. Debido a que las heces también contienen una cierta cantidad de nutrientes perdidos por el intestino como un resultado de la descamación del epitelio intestinal, estos valores son normalmente restados de la producción fecal para obtener una medida más precisa o “verdadera” de la digestibilidad. Estas pérdidas son comúnmente referidas como pérdidas metabólicas fecales (por ejemplo nitrógeno metabólico fecal, NMF, o energía metabólica fecal, EMF). Debido a que es difícil determinar estas pérdidas con algún nivel de precisión usando métodos empíricos, la mayoría de los nutricionistas de organismos acuáticos determinan la “digestibilidad aparente”. Aunque no es una

medida verdadera de la digestibilidad, la digestibilidad aparente todavía proporciona una estimación útil de la digestibilidad del ingrediente o del alimento. Las pérdidas metabólicas, como se describió anteriormente, han demostrado ejercer una influencia menor en el análisis de nutrientes fecales (Forster y Gabbott, 1971; Colvin, 1976). Una vez digeridos, los nutrientes son absorbidos en el intestino medio, y la formación fecal y la defecación se llevan a cabo en el intestino posterior. Este arreglo permite que *Litopenaeus vannamei* sea altamente eficiente en digerir proteína (Akiyama, 1989; Aquacop, 1989) a pesar de carecer de la principal proteasa, la pepsina y de un estómago ácido.

Factores que afectan la digestibilidad en el camarón

El tracto digestivo de *L. vannamei* puede ser descrito como un simple tubo que se extiende a lo largo del cuerpo desde la boca hasta el ano, terminando en el último segmento. Una excelente descripción del proceso digestivo y anatomía de crustáceos decápodos puede ser encontrada en Ceccaldi (1997). La secreción de enzimas es limitada en la glándula del intestino medio (hepatopáncreas), la cual está compuesta por un gran número de túbulos ciegos simples y frágiles [vea Dall (1967) para una descripción detallada de la función de la glándula digestiva]. Las proteínas dietarias son hidrolizadas por proteinasas tales como tripsinas, quimotripsinas (Lu *et al.*, 1990; Lan y Pan, 1993; Chevalier y Van-Wormhoudt, 1998) y carboxipeptidasas (Tsai *et al.*, 1991). Un estudio de Lan y Pan (1993) demostró que las enzimas proteolíticas encontradas en extractos intestinales de *Penaeus monodon* poseen dos pH óptimos: 7.5 y 4. La alfa-amilasa y la alfa-glucosidasa son secretados para digerir carbohidratos (Chevalier y Van-Wormhoudt, 1998) en condiciones de pH ligeramente básicas (pH~8) (García-Carreño *et al.*, 1997).

Se han desarrollado estudios para determinar el efecto de la especie (Lee, 1970; Akiyama, 1988; Lemos *et al.*, 2000), edad (Smith *et al.*, 1985), factores ambientales (Egusa, 1961; Coelho 1984; Seidman y Lawrence 1985), estresantes (Córdova-Murueta *et al.*, 2004) y la dieta (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002) sobre la digestibilidad aparente. Lemos *et al.* (2000) demostraron claras diferencias en patrones de la proteasa entre adultos de *Farfantepenaeus californiensis*, *F. paulensis*, *L. schmitti* y *L. vannamei*, y sugirieron que la digestión de proteína podría ser específica a la especie. Lee (1970) reportó diferencias menores en la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) para *P. monodon*, *Marsupenaeus japonicus*, *P. semisulcatus* y *Metapenaeus monoceros*, mientras que Akiyama (1988) encontró diferencias en la digestibilidad aparente de lípidos y carbohidratos en *L. vannamei*, *P. monodon* y *M. japonicus* alimentados con una dieta a base de soya. Estos datos sugieren la existencia de diferencias en digestibilidad entre crustáceos, inclusive de especies cercanas, lo cual refuerza el argumento de que deben efectuarse estudios extensos de digestibilidad para cada especie que se considere.

La edad también provee variaciones en digestibilidad. En un estudio efectuado por Lovett y Felder (1990), larvas de *L. vannamei* presentaron actividad de tripsina, carboxipeptidasa A y B, amilasas y esterasa no específica (no se observó pepsina o lipasa). Es interesante, su estudio encontró que la dieta no era la principal causa del cambio en la actividad de las enzimas digestivas. Gamboa-Delgado *et al.* (2003) evaluaron las variaciones en la actividad de enzimas digestivas de *L. vannamei* en estanques comerciales bajo condiciones semi-intensivas. Incrementos significativos en la actividad de lipasa y quimiotripsina fueron observadas con el aumento del peso promedio del camarón. La actividad proteasa total disminuyó en camarones que pesaban 6 g o más y la actividad de la tripsina repuntó a los 6 g. La actividad de la amilasa aumentó el doble en camarones que

excedieron los 2 g. Estos descubrimientos sugieren una adaptación de la actividad enzimática a dietas con menor contenido de proteína conforme aumenta el peso corporal y esto puede estar relacionado a la variación de los diferentes sustratos encontrados en el estómago. Smith *et al.* (1985) reportaron que la digestibilidad de *L. vannamei* pequeños (peso promedio 4 g) estaba altamente correlacionado con el nivel de proteína en la dieta; sin embargo, no existió ninguna correlación para los grupos de camarones pequeños y grandes (ejemplo 9.8 y 20.8 g respectivamente). Los autores también determinaron que no existe correlación entre la clase de talla y la digestibilidad de lípidos o la digestibilidad total de la dieta. Una relación positiva entre la actividad enzimática y el crecimiento del camarón fue demostrada por Van Wormhoudt *et al.* (1980) y Maugle *et al.* (1983).

Cohelo (1984), determinó que la salinidad tenía un mínimo efecto sobre la digestibilidad cuando proporcionó dietas que contenían un nivel de proteína mayor al 20%. Seidman y Lawrence (1985) demostraron que la digestibilidad en *L. vannamei* no se afectaba aun cuando los camarones habían sido expuestos a concentraciones de oxígeno disuelto de 1 mg/l. Córdova-Murueta *et al.* (2004) expusieron *L. vannamei* a un estrés alimentario cambiando de un alimento de 45% de proteína a uno de 35% y manipulando físicamente a los camarones durante el pesaje. Se observó una disminución de la actividad de tripsina y quimotripsina en las heces y en la glándula del intestino medio en ambos tratamientos, con un efecto mayor atribuido a la manipulación física. Por esta razón, tal parece que las pruebas de digestibilidad deben efectuarse bajo condiciones ambientales “normales” usando *L. vannamei* >8 g previamente aclimatados a la dieta de prueba y al sistema de cultivo. La regulación de la actividad enzimática digestiva también se ha relacionado con el ritmo circadiano y con el estado de muda (Molina *et al.*, 2000).

Los efectos de la composición de la dieta en la digestibilidad también han sido verificados por Córdova-Murueta *et al.* (2002), quienes determinaron que la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* eran afectadas no solamente por la fuente del suplemento proteico, si no también, por la cantidad de proteína en la dieta. Chuang *et al.* (1985) propusieron que la actividad de las enzimas digestivas aumenta con el nivel de proteína en la dieta. Akiyama (1989) sugieren que las dietas para estudios de digestibilidad deben de ser formuladas en su totalidad por el ingrediente a evaluar para eliminar cualquier efecto asociativo de los componentes de la dieta; sin embargo, también fue sugerido que los valores bajos de la digestibilidad aparente de la materia seca obtenidos en este estudio podrían relacionarse con el uso de dietas nutricionalmente incompletas. Otros autores han recomendado el uso de una dieta de referencia compuesta debido a que las dietas de producción raramente están compuestas de un solo ingrediente.

Las comparaciones entre la digestibilidad de dietas de un solo ingrediente y dietas compuestas son problemáticas debido a las variaciones en las condiciones de cultivo, metodología de elaboración, etc.; sin embargo, en algunos casos pueden ofrecer una idea de la respuesta del camarón. Un estudio reciente de Siccardi (2006) determinó coeficientes de digestibilidad aparente de proteína para varios ingredientes ofrecidos a *L. vannamei* usando un formato de dieta de 70:30. Los resultados indican que los valores de coeficientes de digestibilidad son comparables a los datos reportados previamente por Akiyama (1989) usando el formato de un solo ingrediente en la dieta (Tabla 1). La falta de discrepancia entre los dos estudios sugiere que los coeficientes de la digestibilidad aparente de proteína son mínimamente afectados por la asociación de nutrientes (estudio actual) o dietas nutricionalmente incompletas. La diferencia mínima entre los estudios puede ser atribuida al mismo proceso de extrusión usado (extrusión en frío usando una batidora Hobart).

Se ha visto que las técnicas de extrusión afectan los coeficientes de digestibilidad aparente (Davis y Arnold, 1995). Las diferencias en digestibilidad aparente atribuidas a la metodología de extrusión no son universales para todos los ingredientes (Davis y Arnold, 1995), lo que sugiere la importancia de utilizar un “método de extrusión de referencia” que permita la comparación entre distintos estudios. Independientemente del método que es escogido, las diferencias en digestibilidad aparente pueden esperarse debido a que nunca en los diseños experimentales se utilizan dietas experimentales con un contenido de proteína constante. A pesar de que los valores de digestibilidad de los ingredientes pueden dar información valiosa al formulador de alimentos, se deben de considerar todos los factores que afectan su medición.

Tabla 1. Digestibilidad aparente de proteína (%) de ingredientes consumidos por *L. vannamei*, por tipo de dieta empleada

Ingrediente	Ingrediente único ¹	Mezcla 70:30 ²
Caseína	99.1	96.4
Harina de pescado	80.7	83.7
Gelatina	97.3	99.7
Aislado de soya (90% PC)	96.4	93.7
Pasta de soya (48% PC)	89.9	92.9
Harina de músculo de calamar	79.7	84.6
Gluten de trigo	98.0	95.8

¹Akiyama, 1989: Dieta conteniendo 93% de ingrediente a evaluar (materia seca).

²Siccardi, 2006: Dieta conteniendo 70% de mezcla compuesta de ingredientes + 30% ingrediente a evaluar.

Comparación de métodos de digestibilidad *in vivo*

Para determinar la digestibilidad aparente de nutrientes en camarón, la mayoría de los estudios siguen utilizando la metodología *in vivo* y en particular, el método indirecto de óxido de cromo (Smith *et al.*, 1985; Akiyama, 1989; Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995; Davis *et al.*, 2002). Varios compuestos han sido evaluados como marcadores en pruebas de digestibilidad *in vivo*: óxido de cromo (Akiyama, 1989; Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995, Davis *et al.*, 2002), acetato de iterbio (Smith y Tabrett, 2004) o dióxido de titanio (Smith y Tabrett, 2004). La mayoría de los estudios referentes a digestibilidad aparente de nutrientes para *L. vannamei* han utilizado el método de óxido de cromo debido a la facilidad de producir resultados consistentes (Akiyama, 1989; Smith y Tabrett, 2004). Aunque pueden ser obtenidos resultados consistentes empleando el método gravimétrico, su uso se ha limitado debido el esfuerzo adicional que implica la recuperación completa del alimento no consumido y de las heces excretadas.

Para poder producir resultados válidos con marcadores inertes es necesario: 1) que pasen por el intestino al mismo tiempo que el alimento, 2) que no sean lixiviados de las heces o absorbidos por el intestino del camarón, 3) que sean fisiológicamente inertes y 4) que la relación de nutriente a marcador en el alimento sea la misma que la ingerida por el camarón. Aunque algunos estudios cuestionan la validez del método del óxido de cromo para langosta *Homarus sp.* (Bordner *et al.*, 1983; Leavitt, 1985), langostino de agua dulce *Procambarus clarkii* (Brown *et al.*, 1986) y camarones carideos *Pandalus serratus*, *Palaemon platyceros* (Forster y Gabbot, 1971), al parecer estas presunciones son válidas en estudios que involucran camarones peneidos (Smith y Tabrett, 2004). Deering *et al.* (1996) demostraron que el óxido de cromo, la ceniza insoluble en ácido y el acetato de iterbio, producen valores equivalentes de digestibilidad aparente de proteína. Estos datos sugieren que el óxido de cromo es fisiológicamente inerte tal como lo es la ceniza ácida insoluble y es un

marcador inerte válido para estudios de digestibilidad. Akiyama (1989) reportó que los niveles de óxido de cromo fueron homogéneos en heces de *L. vannamei* y lograron obtener una desviación estándar baja entre los replicados, lo cual, sugiere la reproducibilidad del método indirecto del óxido de cromo. Smith y Tabrett (2004) determinaron que un máximo de 3.4, pero posiblemente menos de 1% de óxido de cromo era absorbido por el camarón. Esto llevaría a un valor máximo de subestimación de la digestibilidad aparente de proteína de solo el 0.2%, asumiendo que el alimento tiene una digestibilidad aparente de la materia seca del 80%. Esta absorción podría en realidad ser mucho menor que la reportada debido a que los autores atribuyen la mayoría de la “absorción” a la radioactividad adherida al camarón durante la alimentación. La validez del óxido de cromo como marcador se reforzó aún más por Fenucci *et al.* (1982) quienes determinaron que no hay lixiviación o degradación bacteriana de proteína, carbohidratos u óxido de cromo desde el alimento y las heces después de seis horas de inmersión. Estos estudios proveen una fuerte evidencia de que el óxido de cromo es inerte, que pasa uniformemente a través del intestino, que es mínimamente absorbido y no hay pérdidas significativas desde el alimento o las heces.

Uso potencial de la metodología *in vitro*

Lee y Lawrence (1997) sugirieron que ensayos *in vitro* podrían ser utilizados por nutricionistas en crustáceos basados en la evidencia preliminar de que estos producen un patrón de digestibilidad aparente similar a estudios *in vivo* previamente reportados. Como resultado, muchos estudios se han enfocado en comparar los métodos *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vitro* tienen el beneficio potencial de manejar un gran número de muestras, costo-eficacia y economía con respecto a las cantidades de materia prima (Ezquerro *et al.*, 1997; Ezquerro *et al.*, 1998; Lemos *et al.*, 2000; Córdova-Mureta y García-Carreño, 2002). Tradicionalmente, los métodos *in vitro* se han basado en análisis químicos tales como las determinaciones de composición de nitrógeno Kjeldhal y la composición de aminoácidos (Anderson *et al.*, 1993). Debido a que estos métodos se llevan a cabo usando criterios experimentales distintos del proceso natural digestivo (i. e. reacciones químicas más fuertes), a menudo liberan una cantidad de nutrientes mayor que los que se encuentran típicamente disponible para el animal, lo que puede producir resultados inexactos (Anderson *et al.*, 1993).

La mayoría de la investigación sobre digestibilidad *in vitro* se lleva a cabo ya sea con el método de caída del pH o con el de pH stat. El método de pH Stat, como lo describen Ezquerro *et al.* (1997), evalúa el grado de hidrólisis (GH) de fuentes de proteínas dietarias por extractos de enzimas intestinales o las mezclas de enzimas y está basada en investigaciones realizadas por Hsu *et al.* (1977). La hidrólisis se lleva a cabo dentro de un controlador de pH (pH stat) y es mantenido a un pH específico (ejemplo 8.0) añadiendo NaOH. Ezquerro *et al.* (1997) calcularon el GH usando la siguiente ecuación (Adler-Nissen, 1986).

$$GH\% = [(B * N_b * 1.5) / (M * (S\%/100))] / 8 * 100$$

Donde:

B = son los mL de NaOH 0.1 N usado para mantener la mezcla de reacción a pH 8.0, N_b = es la normalidad del titulador, M = es la masa (g) de reacción de la mezcla; S = concentración de la proteína en la mezcla de reacción.

Aunque es conveniente, existen ciertas preocupaciones con el método de pH stat relacionadas con el corto tiempo de incubación, especialmente en el caso de proteínas estructuralmente estables, cuya digestibilidad podría ser subestimada (Porter *et al.*, 1984).

Con el método de caída de pH (Ezquerro *et al.*, 1998), una muestra de 10 ml de proteína cruda (8 mg/mL de agua destilada) es ajustada a pH 8.0 usando un álcali similar (ejemplo 0.1 N NaOH) y HCl mientras se agita a 37 °C. Una pequeña cantidad de extracto de hepatopáncreas de camarón (como se describió anteriormente), previamente ajustado el pH a 8.0, es entonces añadida a la suspensión de proteína. El pH de la mezcla de reacción es registrado durante 10 min. y la digestibilidad de la proteína se determina por la cuantificación de la caída de pH en la proteína de prueba comparado con azocaseína tratada de manera similar:

$$\left[\frac{(-\Delta\text{pH}_{\text{ingrediente}})}{(-\Delta\text{pH}_{\text{azocaseína}})} \right] * 100$$

Lazo *et al.* (1998) evaluaron tres ensayos de enzimas *in vivo* para estimar la digestibilidad de la proteína en camarón: el ensayo Lazo con una sola enzima, con tripsina porcina; el método multienzimático de Hsu *et al.* (1977) (tripsina porcina, α -quimotripsina, peptidasa) y el método multienzimático de Satterlee con las enzimas porcinas anteriores mas una proteasa bacteriana. Sus investigaciones se basaban en la digestibilidad relativa de proteína (DRP) de varios ingredientes purificados e ingredientes prácticos comparados al de la caseína. Se demostró, una relación fuertemente inversa entre el pH *in vitro* (en todos los métodos) y el de las determinaciones *in vivo* indicando que el cambio de pH puede servir como un predictor de la digestibilidad *in vivo*. El rango de los valores de DRP para estos ingredientes usando el método con una sola enzima es relativamente similar al observado en métodos *in vivo* (Tabla 2) (Akiyama, 1989; Nieto-López, 1995). El método de una sola enzima (solamente tripsina porcina) demostró resultados similares a los que se obtuvieron con los métodos de multienzimáticos.

Tabla 2. Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína *in vivo* y coeficientes de digestibilidad relativa de la proteína¹ (medias \pm desviación estándar) de algunos ingredientes selectos

Ingrediente	<i>In-vivo</i> ¹	ensayo de Lazo <i>et al.</i> (1998)	ensayo de Hsu <i>et al.</i> (1977)	ensayo de Satterlee
Caseína ²	99.1 \pm 0.01 ^a	100.00 \pm 3.48 ^a	100.00 \pm 5.43 ^a	100.00 \pm 1.23 ^a
Gluten de trigo ²	98.0 \pm 0.04 ^a	81.74 \pm 12.81 ^b	72.15 \pm 0.57 ^c	96.91 \pm 0.87 ^a
Gelatina ²	97.3 \pm 0.5 ^a	103.77 \pm 1.81 ^a	81.53 \pm 1.15 ^b	87.65 \pm 1.75 ^b
Pasta de soya ²	89.9 \pm 0.09 ^b	60.67 \pm 3.48 ^c	71.18 \pm 0.10 ^c	87.35 \pm 0.43 ^b
Harina de Menhaden (especial) ³		57.10 \pm 3.29 ^c	65.63 \pm 0.57 ^d	76.85 \pm 0.44 ^c
Harina de Menhaden (regular) ^{2,3}	80.7 \pm 1.7 ^c	39.71 \pm 1.81 ^d	38.31 \pm 1.15 ^e	65.43 \pm 4.36 ^d
Salvado de arroz ²	76.4 \pm 0.8 ^d	29.57 \pm 0.10 ^d	39.95 \pm 0.10 ^d	58.64 \pm 0.10 ^e
Harina de camarón ²	74.6 \pm 1.6 ^d	30.43 \pm 0.10 ^d	36.27 \pm 1.73 ^e	46.61 \pm 1.31 ^f

¹Los valores representan la digestibilidad *in vitro* (DRP) de la proteína en los ingredientes en relación a la caseína: DRP = $\left[\frac{(-\Delta\text{pH}_{\text{ingrediente}})}{(-\Delta\text{pH}_{\text{caseína}})} \right] * 100$, donde $-\Delta\text{pH}$ es la magnitud de la caída de pH en cada ensayo.

²De Akiyama, 1989.

³Digestibilidad con pepsina, Zapata Haynie Corporation, Hammond, Louisiana, USA

Ezquerro *et al.* (1997) obtuvieron fuertes correlaciones entre la digestibilidad *in vivo* e *in vitro* usando el método pH stat. Desafortunadamente, esta correlación fue solamente válida cuando los coeficientes de digestibilidad fueron determinados y comparados de acuerdo al tipo de proteína/origen (i. e. animal o planta). Las comparaciones de los coeficientes de digestibilidad *in vitro*

para mezclas de proteína vegetal/animal solamente se aproximaban a aquellos obtenidos *in vivo*. Ezquerria *et al.* (1998) también demostraron una correlación significativa entre el método de caída pH y la digestibilidad *in vivo*; sin embargo, la correlación fue baja y el método tenía las mismas limitaciones descritas para el método de pH Stat. Los ensayos *in vitro* también son obstaculizados por su inhabilidad para determinar la digestibilidad de nutrientes no proteicos. Los valores de digestibilidad de materia seca, lípidos y energía han sido usados ampliamente por la industria avícola para formular dietas amigables con el medio ambiente y de bajo costo y esta información también podría ser valuable para el nutricionista en crustáceos. Aunque los métodos *in vitro* han sido mejorados substancialmente desde 1997, aún parecen incapaces de remplazar las pruebas de digestibilidad aparente *in vivo* especialmente cuando uno desea determinar algo más que solo la digestibilidad aparente de proteína.

En un estudio reciente conducido por Siccardi (2006) en el TAES-SMP, se enviaron 14 ingredientes (harina de sangre convencional, harina de sangre liofilizada, gluten de maíz, harina de cangrejo, granos de destilería, harina de plumas, harina de anchoveta, harina de arenque, harina de menhaden, harina de subproducto de pollo, pasta de soya 48%, pasta de soya integral, harina de músculo de calamar- Lima y harina de músculo de calamar-Paita) a Zeigler Brothers (Gardners, PA), para determinar la digestibilidad aparente *in vitro* de la proteína (DAPC) usando pepsina al 0.20% o 0.0002%. Los valores de DAPC *in vitro* obtenidos usando 0.20% de pepsina variaron desde 97.6% para la harina de sangre convencional a 76.6% para harina de cangrejo y desde 98.3% para harina de sangre convencional a 36.7% para la harina de pluma usando 0.0002% de pepsina (Tabla 3). Los coeficientes de DAPC *in vivo* fueron positivamente correlacionados a los valores *in vitro* obtenidos usando 0.0002% de pepsina. No se observó una correlación entre los coeficientes *in vivo* de DAPC y los valores *in vitro* obtenidos usando 0.20% de pepsina. El valor de r obtenido en este estudio fue el mismo que el obtenido por el método de caída de pH ($r^2=0.55$), pero menor que la correlación obtenida con el método de pH-Stat ($r^2=0.73$ a 0.80 ; Ezquerria *et al.*, 1998). El empleo de 0.0002% de pepsina tendió a subestimar la digestibilidad de muestras con un alto contenido de cenizas y a sobreestimar la digestibilidad de muestras pobremente digestibles, lo que también fue observado cuando las muestras fueron analizadas usando el método de caída de pH (Ezquerria *et al.*, 1998). La pérdida de correlación usando 0.2% de pepsina no es sorprendente, ya que *L. vannamei* no posee esta enzima en su tracto digestivo (Lee y Lawrence, 1982). Mientras que estas observaciones preliminares sugieren que concentraciones diluidas de pepsina podrían ser utilizadas para aproximar los resultados *in vivo*. Lemos (2003) reportó que la digestibilidad de pepsina no es aplicable para alimentos preparados o ingredientes vegetales. Mas investigación es requerida antes de que estos resultados puedan ser usados para complementar los bioensayos de digestibilidad *in vivo* en *L. vannamei*. Los resultados de digestibilidad *in vitro* solamente podrán reemplazar el trabajo *in vivo* si pueden predecir la naturaleza compleja de la digestión del camarón, la cual se ha visto que es modulada por los componentes en el alimento produciendo diferencias de DAP de 10-44% sobre el control (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002).

Tabla 3. Comparación de la digestibilidad *in-vivo* y la digestibilidad con pepsina de algunos ingredientes para *L. vannamei*.

Ingrediente	Digestibilidad <i>in-vivo</i>		0.20% de pepsina	0.0002% de pepsina
	ADMD ¹	ACPD ¹	ACPD ¹	ACPD ¹
Harina de sangre (Convencional) ²	57.0 ± 3.8	66.2 ± 1.6	97.6	98.3
Harina de sangre (Liofilizada) ²	63.4 ± 4.5	70.8 ± 1.8	93.3	96.1
Gluten de maíz ²	41.8 ± 1.0	59.1 ± 1.9	97.7	45.3
Harina de cangrejo ²	43.3 ± 1.4	84.0 ± 1.9	76.6	61.0
Granos de destilería ²	47.2 ± 3.7	78.5 ± 1.4	79.3	41.7
Harina de plumas ²	61.3 ± 0.9	63.9 ± 0.7	86.9	36.7
Harina de pescado (Anchoveta) ²	78.3 ± 2.3	87.9 ± 0.7	95.3	88.6
Harina de pescado (Arenque) ²	72.7 ± 3.9	90.1 ± 1.1	94.3	85.4
Harina de pescado (menhaden) ²	68.1 ± 2.1	89.0 ± 2.2	96.4	93.6
Subproducto de pollo ²	63.9 ± 3.9	78.7 ± 1.7	92.0	61.7
Pasta de soya (48%) ²	75.9 ± 1.6	91.9 ± 0.3	92.9	83.6
Pasta de soya (integral) ²	63.5 ± 2.2	87.1 ± 1.8	95.2	89.6
Harina de calamar (Músculo -Lima) ²	69.8 ± 2.6	84.6 ± 2.4	97.4	81.9
Harina de calamar (Músculo -Paíta) ²	74.7 ± 1.4	86.6 ± 0.8	96.1	82.9

¹Todos los valores se reportan como porcentaje ± desviación estándar, donde aplica.

²Zeigler Brothers, Gardners, PA, USA.

A pesar de los problemas con la aplicabilidad directa de los resultados, las pruebas de digestibilidad *in-vitro* han proporcionado una comprensión substancial de los mecanismos de proteólisis de las proteínas de los alimentos. Lan y Pan (1993) investigaron la proteólisis usando extractos de enzimas de *P. monodon* y encontraron que usando una hidrólisis de dos pasos, a pH 7.5 y 4 podría servir para aproximarse a la digestibilidad *in vivo*. La digestibilidad de la proteína fue positivamente correlacionada con el contenido de lisina y arginina del alimento ($r= 0.99$) e indicó la influencia relativamente alta de la tripsina comparada a otras enzimas proteolíticas. También demostraron que el perfil de aminoácidos de las proteínas (i. e. la proporción de aminoácidos aromáticos) afectaba la digestibilidad.

Mientras que los métodos *in vitro* han mejorado ampliamente, parece que aún no son capaces de reemplazar las pruebas de digestibilidad aparente *in vivo*, especialmente cuando uno desea determinar más que la digestibilidad aparente de la proteína.

Estado actual de la investigación *in vivo*

La digestibilidad de la proteína ha sido determinada para muchos ingredientes comúnmente usados en dietas para *L. vannamei*, que han sido probados individualmente (Akiyama 1988; Akiyama 1989; Fox *et al.*, 1995), mezclados con una dieta de referencia (Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995; Siccardi, 2006) o en conjunto con investigaciones *in vitro* (Lazo *et al.*, 1998; Ezquerra *et al.*, 1997; Ezquerra *et al.*, 1998). Sin embargo, los valores de digestibilidad de energía para ingredientes usados en las dietas para *L. vannamei* son escasos. A la fecha, los únicos estudios publicados sobre digestibilidad aparente de la energía se han enfocado a maíz agrietado por vapor, harina de maíz, milo, Nutribinder™, harina de arroz, trigo entero y almidón de trigo (Davis y Arnold, 1993; Davis y Arnold, 1995) o almidón de maíz, papa y trigo (Cousin *et al.*, 1996). En un estudio reciente, Siccardi (2006) investigaron la digestibilidad aparente de proteína y energía de varios ingredientes convencionales y no convencionales para *L. vannamei* (Tabla 4). No se observaron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) (de 70.58-

72.06%) o en los coeficientes de digestibilidad aparente de energía (DAE) (de 84.30-86.00%) entre las cinco diferentes clases de peso empleadas (8.56, 9.75, 11.33, 13.14, 15.09 g). Los coeficientes de digestibilidad aparente de la energía (DAE) variaron de 65.4% para gluten de maíz a 102.2% para la gelatina. Mientras que un grupo de ingredientes puros tenían los coeficientes de DAE más altos variando de un valor bajo de 80.6% para tierra de diatomeas a un alto como 102.2% para gelatina. La gelatina tenía el valor numérico de DAE más alto pero no era significativamente diferente de la caseína, aislado de proteína de soya (90%) y gluten de trigo o almidón de trigo. Los valores de DAE para harina de pescado menhaden (83.3) y la harina de pescados de especies misceláneas asiáticas (81.3) fueron menores que el resto de los valores de DAE para harinas de pescado (rango de 81.3 a 89.5%) y correspondían a los dos valores de coeficientes de DAMS más bajos del grupo; sin embargo, la variabilidad en los coeficientes de DAE fue menor que los coeficientes de DAMS. Los valores de DAE para harinas vegetales convencionales (rango de 65.4-89.5%) tenían el menor grado de variabilidad. La harina de gluten de maíz tenía un valor de DAE (65.4%) significativamente más bajo que el resto de los ingredientes, mientras que la DAE para el aislado de proteína de soya 90% (95.0%) no fue significativamente diferente que el ingrediente con el valor más alto de DAE. Los ingredientes de origen animal tenían como grupo los menores valores promedio de DAE (de 72.2-82.1%) y de contenido de cenizas de todas las clases de ingredientes. La harina de subproducto de pollo, que contenía la mayor cantidad de cenizas del grupo, tenía un coeficiente de DAE significativamente mayor que el resto de los ingredientes del grupo. Los coeficientes de DAE para las harinas marinas variaron de valores bajos de 67.6% para el harina de hígado de calamar a 87.2% para el harina de krill. No se encontraron diferencias significativas entre las dos harinas de músculo de calamar; sin embargo, se encontró una diferencia significativa en los coeficientes de DAE de los dos productos de calamar entero. La digestibilidad aparente de energía fue positivamente correlacionada ($r=0.91$ $P<0.0001$) con la digestibilidad aparente de proteína cruda. La DAE no se correlaciono con el contenido de proteína cruda ($P>0.05$), contenido de energía ($P>0.05$) o el contenido de cenizas ($P>0.05$) de los ingredientes.

Tabla 4. Digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), de la proteína (DAP) y de la energía (DAE) de los ingredientes para *L. vannamei*.*

Ingrediente	DAMS (%)	DAP (%)	AED (%)
Harina de Sangre (Convencional) ^{1,C}	57.0 ± 3.8 ^{l,m}	66.2 ± 1.6 ^l	72.2 ± 1.6 ^{ij}
Harina de Sangre (Liofilizada) ^{1,C}	63.4 ± 4.5 ^{h,i,j,k,l}	70.8 ± 1.8 ^k	75.1 ± 2.1 ^{h,i}
Caseína ^{4,E}	89.5 ± 1.4 ^b	96.4 ± 1.0 ^b	100.9 ± 1.8 ^a
Gluten de Maíz ^{1,D}	41.8 ± 1.0 ^o	59.1 ± 1.9 ^m	65.4 ± 1.7 ^l
Harina de Cangrejo ^{1,B}	43.3 ± 1.4 ^{n,o}	84.0 ± 1.9 ^{f,g,h}	80.6 ± 1.9 ^{f,g}
Tierra de Diatomeas ^{5,E}	4.3 ± 2.1 ^p	NA	80.6 ± 2.1 ^{f,g}
Granos de Destilería ^{1,D}	47.2 ± 3.7 ⁿ	78.5 ± 1.4 ^{ij}	69.6 ± 1.4 ^{h,k}
Harina de Plumasi ^{1,C}	61.3 ± 0.9 ^{i,k,l,m}	63.9 ± 0.7 ^l	72.7 ± 0.2 ^{ij}
Harina de Pescado (Anchoveta) ^{1,A}	78.3 ± 2.3 ^{c,d}	87.9 ± 0.7 ^{d,e,f}	89.5 ± 0.5 ^b
Harina de Pescado (Anchoveta-Peru) ^{2,A}	78.0 ± 1.0 ^{c,d}	88.5 ± 2.4 ^{d,e}	87.1 ± 2.1 ^{b,c,d}
Harina de Pescado (Arenque) ^{1,A}	72.7 ± 3.9 ^{d,e,f,g}	90.1 ± 1.1 ^{d,e}	89.4 ± 0.7 ^b
Harina de Pescado (Hoki-Nueva Zelanda) ^{2,A}	67.1 ± 2.0 ^{g,h,i,j,k}	88.1 ± 1.0 ^{d,e,f}	88.8 ± 1.2 ^{b,c}
Harina de Pescado (Macarela-Chile) ^{2,A}	73.5 ± 3.9 ^{d,e,f,g}	88.8 ± 2.8 ^{d,e}	88.3 ± 2.1 ^{b,c}
Harina de Pescado (menhaden) ^{1,A}	68.1 ± 2.1 ^{f,g,h,i,j}	89.0 ± 2.2 ^{d,e}	88.4 ± 2.0 ^{b,c}
Harina de Pescado (menhaden) ^{1,A}	55.6 ± 3.7 ^m	83.7 ± 0.7 ^{g,h}	83.3 ± 1.2 ^{c,d,e,f,g}
Harina de Pescado (menhaden) ^{3,A}	60.2 ± 0.5 ^{k,l,m}	83.2 ± 1.4 ^h	86.7 ± 1.9 ^{b,c,d,e}
Harina de Pescado (especies varias asiáticas) ^{2,A}	55.8 ± 4.0 ^m	78.6 ± 0.9 ^{ij}	81.3 ± 1.0 ^{f,g}
Harina de Pescado (especies varias -Peru) ^{2,A}	70.7 ± 4.0 ^{e,f,g}	87.6 ± 2.6 ^{e,f,g}	87.3 ± 1.6 ^{b,c,d}
Gelatina ^{4,E}	96.5 ± 1.9 ^a	99.7 ± 1.9 ^a	102.2 ± 2.0 ^a
Harina de Krill ^{1,B}	72.6 ± 0.2 ^{d,e,f,g}	80.5 ± 1.1 ⁱ	80.6 ± 0.9 ^{f,g}
Harina de Krill ^{2,B}	81.7 ± 1.0 ^c	89.4 ± 1.1 ^{d,e}	87.2 ± 0.6 ^{b,c,d}
Subproducto de Pollo ^{1,C}	63.9 ± 3.9 ^{h,i,j,k,l}	78.7 ± 1.7 ^{ij}	82.1 ± 1.3 ^{d,e,f,g}
Pasta de Soya (48% extracción por solventes) ^{1,D}	75.9 ± 1.6 ^{c,d,e}	92.9 ± 0.3 ^{b,c}	85.6 ± 0.7 ^{b,c,d,e,f}
Harina de Soya (integral) ^{1,D}	63.5 ± 2.2 ^{h,i,j,k,l}	87.1 ± 1.8 ^{e,f,g,h}	80.8 ± 1.9 ^{f,g}
Harina de Soya (Aislado, 90%) ^{1,D}	78.7 ± 0.7 ^{c,d}	93.7 ± 0.8 ^{b,c}	95.0 ± 5.5 ^b
Harina de hígado de calamar (Asiático) ^{2,B}	61.8 ± 3.3 ^{i,j,k,l,m}	66.4 ± 1.9 ^l	74.0 ± 1.5 ^{ij}
Harina de músculo de calamar (Lima) ^{1,B}	69.8 ± 4.6 ^{e,f,g,h}	84.6 ± 2.4 ^{f,g,h}	81.8 ± 1.6 ^{e,f,g}
Harina de músculo de calamar (Paíta) ^{1,B}	74.7 ± 1.4 ^{d,e,f}	74.7 ± 1.4 ^{d,e,f}	84.1 ± 0.7 ^{b,c,d,e,f}
Calamar (Entero) ^{1,B}	68.6 ± 1.0 ^{f,g,h,i}	68.6 ± 1.0 ^{f,g,h,i}	67.6 ± 7.8 ^{k,l}
Calamar (Entero, Asiático) ^{2,B}	61.9 ± 0.8 ^{i,j,k,l,m}	61.9 ± 0.8 ^{i,j,k,l,m}	78.5 ± 1.4 ^h
Gluten de Trigo ^{4,E}	89.4 ± 1.0 ^b	89.4 ± 1.0 ^b	99.5 ± 1.4 ^a
Almidón de Trigo ^{4,E}	92.3 ± 2.3 ^{a,b}	NA	98.9 ± 0.9 ^a

*Los valores son medias de tres determinaciones ± d.s.

[†]Las medias con letras similares indican diferencias no significativas (P>0.05).

¹Zeigler Brothers, Gardners, PA, USA; ²Evalis, Vannes Cedex, Francia; ³Omega Protein Corporation Inc., Houston, TX, USA; ⁴MP Biomedicals, Cleveland, OH, USA; ⁵Sigma, St. Louis, MO, USA; ^AHarinas de Pescado; ^BHarinas Marinas;

^CHarinas de origen animal convencional; ^DHarinas vegetales convencionales; ^EIngredientes Puros .

Digestibilidad y formulaciones de mínimo costo

El camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, es una de las especies de camarón comúnmente cultivadas en el mundo. Mientras que eficientes técnicas de cultivo han reducido los costos en el cultivo de *L. vannamei*, todavía se pueden producir ahorros mediante la optimización de las formulaciones de alimento ya que éste es el mayor costo de producción (Akiyama *et al.*, 1992 y Sarac *et al.*, 1993). Las formulaciones de alimentos hoy en día están basadas en datos obtenidos de estudios que miden parámetros de crecimiento del cultivo de *L. vannamei*. Las dietas están formuladas al mínimo costo, mediante el ajuste de las fuentes de proteína, mientras se cumplen los requerimientos de proteína cruda que han demostrado producir un crecimiento óptimo. Las

formulaciones que confían solamente en la composición bruta dietaria, en lugar de la composición digestible, pueden producir un alimento que estará sobre-formulado, aumentando tanto los costos como los niveles de contaminación, ya que la proteína en la parte más cara del alimento (Córdova-Mureta y García-Carreño, 2002; Shiau *et al.*, 1992), y pueden elevar la acumulación de nitrógeno inorgánico en el agua de cultivo (Velasco *et al.*, 1999). A pesar de que Lee y Lawrence sugirieron en 1997 que las regulaciones ambientales podrían tener un rol mayor en la investigación de digestibilidad que las consideraciones económicas, pocos estudios se han enfocado a dichos aspectos (Cuzon *et al.*, 2004).

Una revisión rápida a la industria avícola revela que se puede formular un alimento ambientalmente adecuado a menor costo basándose en la digestibilidad (i. e. disponibilidad de nutrientes) de los ingredientes utilizados en la dieta. Este método de formulación permite seleccionar ingredientes para cumplir con los requerimientos tanto nutricionales como económicos de una dieta de mínimo costo. El conocimiento de los coeficientes de digestibilidad también representa una medida adicional de garantía ya que la digestibilidad de ingredientes puede variar considerablemente dependiendo de su frescura y proceso.

Protocolo de TAES para determinaciones de digestibilidad *in vivo*

A continuación se describe la metodología usada por el Proyecto de Maricultura de Camarón de la Estación Experimental de Agricultura de Texas (TAES-SMP) para determinar *in vivo* la digestibilidad aparente de nutrientes para camarones peneidos marinos. Se obtienen post larvas de *L. vannamei* certificadas como libre de patógenos específicos y son almacenadas a baja densidad (i. e. 1,000/m²) en tanques de fibra de vidrio de 2.4 m de diámetro. Las postlarvas son alimentadas con una mezcla de nauplios vivos de *Artemia* sp. y alimento comercial para post larvas (ejemplo Rangen 45/10; Rangen Inc. Buhl, ID) dos y doce veces diariamente, respectivamente, siguiendo una guía de alimentación estándar. Los camarones son mantenidos aproximadamente por 9 semanas lo que permitirá la aclimatación a las condiciones de laboratorio (i. e. temperatura y salinidad) y para asegurar el peso mínimo deseado para las pruebas de digestibilidad (i. e. >8 g).

El sistema experimental consiste en 60 tanques rectangulares blancos (119 L de volumen y 0.3m² de área superficial de fondo) conectados a un sistema de recirculación semi-cerrado (10% de recambio de agua diariamente) de 43,000 L bajo techo. Los tanques blancos son ideales para la identificación de los camarones, heces y el alimento no consumido. El agua de mar es bombeada a través de un filtro de arena para lograr una tasa de recirculación de 1.89 L min./tanque (2,400% de intercambio por tanque/día). Se provee de un fotoperiodo de luz: oscuridad de 12:12 h por la suplementación de luz fluorescente. En cada tanque se colocan 30 camarones *L. vannamei* (8-10 g) para lograr una biomasa de 180-300 g. No se recomiendan grandes coeficientes de variación en el peso promedio de los camarones debido a la gran variación en la actividad enzimática relacionada al peso (Gamboa-Delgado *et al.*, 2003). La temperatura, salinidad y oxígeno disuelto (DO) son monitoreados diariamente usando un medidor YSI 85® (YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). El nitrógeno amoniacal, NO₂-N, NO₃-N, y pH son monitoreados semanalmente (para bioensayo replicados) usando métodos adaptados de Spotte (1979a, b) y Solarzano (1969), Mullen y Riley (1955) y Strickland y Parsons (1972), y un método medidor de pH Brinkman Metrohm® respectivamente.

Un sistema experimental constituido por un mínimo de 4 tanques replicados por tratamiento es considerado como óptimo cuando se evalúa digestibilidad y más replicados podrían necesitarse considerando la gran variabilidad de los datos. El número de tanques usados es determinado por el

número de ingredientes a probar; sin embargo, un mínimo de 4 tanques replicados por dieta es recomendado. Por ejemplo, si un estudio investiga la digestibilidad aparente de proteína de 10 ingredientes, se usan cuatro tanques para la colección de heces de camarones que son alimentados con la dieta de referencia (DR). Otros 40 tanques (4 x 10) son usados para las dietas prueba, sumando un total de 44 tanques. El número de tanques replicados por tratamiento también puede variar dependiendo de los resultados históricos o la experiencia con ciertas determinaciones. Por ejemplo, el análisis de minerales en heces de camarón típicamente presenta una variabilidad mayor que la del de análisis de proteína, debido a la baja concentración relativa y al potencial para pérdida-ganancia de minerales debido a la lixiviación/intrusión de agua marina en las heces. Para compensar una mayor variabilidad, más replicados son requeridos. Estas consideraciones valen para cualquier nutriente soluble en agua, independientemente del ingrediente que se investigue. La duración de las pruebas individuales de digestibilidad *in vivo* debería ser relativamente corta, sobre un periodo de menos de cuatro días para impedir la optimización de las enzimas del tracto digestivo en las dietas experimentales. Si se requiere de más de un periodo de colección (i. e. debido a la poca cantidad de heces producidas), debería de ser considerado un periodo de acondicionamiento intermedio. Se pueden conducir también bioensayos secuenciales repetidos de duración similar sin embargo, un periodo de acondicionamiento de tres días entre bioensayos consecutivos es recomendado. Las pruebas de digestibilidad de TEAS-SMP están limitadas a menos de tres pruebas consecutivas de tres semanas cada una. Es importante notar que las dietas para digestibilidad no son dietas para crecimiento y su objetivo es el de acumular cantidades adecuadas de heces (base seca), representativas de las dietas prueba. Las heces colectadas en estas pruebas secuenciales deben mantenerse separadas para confirmar que no ha ocurrido una variación temporal/ edad.

Los estudios de digestibilidad en TAES-SMP usan típicamente el método de marcador de óxido crómico descrito por Cho *et al.* (1982). Una dieta de referencia de 35% de proteína cruda y 8.4 kJ/g, se elabora en lotes de 35 Kg. para asegurar la uniformidad entre las dietas de prueba.

Para prepararla, todos los ingredientes para la dieta de referencia (Tabla 5), con excepción del alginato y el metafosfato de sodio se mezclan en una batidora (Modelo L-800, Hobart Corporation, Troy, Ohio, USA) por tres horas. Las dietas experimentales son preparadas para contener 700g/Kg. de los ingredientes derivados de la dieta de referencia (700g/Kg. menos el alginato y hexametfosfato) en la batidora (Modelo A-200, Hobart Corporation, Troy, Ohio, USA) mas 300/Kg. del ingredientes a prueba. Después de que estos dos componentes fueron mezclados por 40 min., el alginato y el hexametfosfato de sodio se agregan de acuerdo a las siguientes instrucciones. En un tazón por separado se añaden el alginato y el metafosfato de sodio a agua desionizada (400 mL/Kg. de mezcla seca) y se mezclan usando una batidora manual (Sunbeam Products Inc., Milford, Massachusetts, USA) por aproximadamente 45 seg. La mezcla de aglutinante húmeda es entonces añadida a los ingredientes secos y se mezcla por un minuto adicional para obtener la consistencia de masa adecuada para extrusión. Dependiendo del tipo de ingredientes, la cantidad de agua adicionada puede variar; esto se determina con la experiencia.

Tabla 5. Composición en la dieta de referencia de 35% de proteína cruda, 8.40 kJ/kg.

Nivel de Inclusión		Nivel de Inclusión	
Ingrediente	(g/kg)	Ingrediente	(g/kg)
Alginato ⁵	20.00	Krill ¹	105.00
Carbonato de calcio ²	14.60	Premezcla de Mineral-Vitaminas	2.70
Celulosa ⁴	20.00	MgO ³	17.30
Colesterol ²	2.00	Fosfolípidos ¹	42.00
Oxido de cromo ³	10.00	Metafosfato de sodio ³	10.00
Fósforo dicálcico ²	65.60	Calamar ¹	150.00
Harina de Pescado ²	150.00	Vitamina C ¹	0.50
Aislado de soya (90%)	79.40	Premezcla de Vitaminas- Minerales	2.30
KCl ⁶	18.50	Almidón de trigo ²	290.10
Proteína Cruda (%)	35.00*	Energía, Kcal. g ⁻¹	2.01*
Proteína Digestible (%)	31.63*	Energía Digestible, Kcal. g ⁻¹	1.72*
Ceniza (%)	17.01*	Lípidos (%)	8.03*

¹Zeigler Brothers, Gardners, PA, USA; ²MP Biomedicals, Cleveland, OH, USA; ³Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA; ⁴Sigma, St. Louis, MO, USA; ⁵Keltone HV Alginate, NutraSweet-Kelco Company, Chicago, IL; ⁶Omega Protein Corporation Inc., Houston, TX, USA; *Calculado en base húmeda..

La elaboración del alimento a baja temperatura se logra usando un accesorio para corte de carne (Modelo A-200, Hobart Corporation, Troy, Ohio, USA) equipado con un dado con 3 mm de diámetro. El alimento húmedo es secado sobre charolas de alambre dentro de un horno de aire forzado a 35 °C por 18 h para lograr un máximo contenido de humedad de 8-10%. El contenido de humedad en el alimento es confirmado después de que los pellets hayan sido enfriados y rotos hasta obtener un tamaño de partícula adecuado. Para camarones de 8 g, el alimento seco, es molido y tamizado hasta alcanzar un tamaño de partícula de 2-4 mm (longitud) x 3 mm (diámetro), usando un mortero de mazo, colocado en bolsas de plástico selladas y almacenado a 4 °C hasta su uso.

Los camarones son aclimatados a las dietas prueba y a las condiciones de cultivo por cuatro días antes del inicio de la colecta de heces. Al inicio de cada día de colecta los tanques son sifoneados para remover el material fecal y las mudas de camarón. Los camarones son alimentados con aproximadamente 0.2 g de alimento por camarón por hora por seis horas consecutivas. El alimento no consumido es entonces removido de los tanques antes de cada alimentación y el material fecal es colectado una hora después de cada alimentación sifoneando las heces en una malla de 42µm. El material colectado sobre la malla es posteriormente enjuagado con agua desionizada para remover las sales, transferido a frascos etiquetados individualmente y congelado (-84 °C) hasta su análisis. Las heces de la primera colecta diaria normalmente son eliminadas para minimizar la influencia que pueda tener la ingestión previa de material fecal. Como se mencionó previamente, las heces se colectan por cuatro días consecutivos y se mezclan de modo que cada replicado consiste en las heces de un tanque colectados por cuatro días consecutivos.

Previo al análisis proximal, las muestras de alimento y heces son liofilizadas, molidas en polvo fino usando un mortero con mazo, y analizados para determinar el porcentaje de materia seca (AOAC, 1990). El contenido de proteína (Método 990.3 AOAC; analizador de nitrógeno/proteína FP-528; Leco Corporation, St. Joseph, Missouri, USA); energía (bomba calorimétrica adiabática modelo 1241; Parr Instrument Co., Moline, Illinois, USA) y óxido de cromo (McGinnis y Kasting, 1964), son

determinados en cada muestra liofilizada y reportados en base a materia seca. El análisis de aminoácidos es realizado por HPLC usando una precolumna de derivatización usando ortoftaldeído. El análisis de minerales es conducido por la digestión de las muestras secas en HNO₃ 12 N usando un digestor de microondas MarsExpress™ (CEM Corporation, Matthews, North Carolina, USA) seguido del análisis elemental usando un generador de plasma acoplado por inducción (Varian Corporation, Palo Alto, California, USA). Para estas determinaciones es importante que las muestras de alimento y de heces sean simultáneamente digeridas (ya sea para digestibilidad de la materia seca o minerales). Esto ayuda a reducir la varianza dentro de los protocolos analíticos.

Los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) para cada dieta de prueba y la de referencia son calculadas empleando la siguiente ecuación (Pond *et al.*, 1995):

$$\text{CDA (\%)} = 100 - \frac{\% \text{ indicador en la dieta}}{\% \text{ indicador en heces}} \times \frac{\% \text{ nutriente en las heces}}{\% \text{ nutriente en la dieta}} \times 100$$

Donde:

el “indicador” es el óxido crómico y el “nutriente” es la materia seca, proteína, energía, aminoácidos, minerales, etc. Para determinar el CDA de la materia seca, proteína y energía para el ingrediente a prueba (no la dieta, sino el ingrediente) se usa la siguiente ecuación (Bureau y Hua, 2006):

$$\text{CDA}_{\text{ingrediente a prueba}} = \text{CDA}_{\text{dieta a prueba}} + [(\text{CDA}_{\text{dieta a prueba}} - \text{CDA}_{\text{dieta referencia}}) \times (0.7 \times D_{\text{ref}} / 0.3 \times D_{\text{ingr}})]$$

Donde:

D_{ref} = % del nutriente (o Kcal. g⁻¹ de energía bruta) de la dieta de referencia; D_{ingr} = % del nutriente (Kcal./g de energía bruta) del ingrediente a prueba.

Los valores de CDA son sometidos a un análisis de varianza (SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA, 1989-2004) para determinar si existen diferencias entre los ingredientes. Diferencias significativas ($P < 0.05$) son separadas usando el método de desigualdad Bonferroni para asegurar que el error experimental es menor o igual a 0.05.

Conclusión

Resumiendo, este trabajo: (1) enfatiza la importancia del uso de los datos de nutrimentos disponibles para la formulación de mínimo costo y minimizar el impacto ambiental; (2) indica porque los valores de digestibilidad aparente de nutrimentos (DAN) se determinan para estimar la disponibilidad de los nutrimentos; (3) resume la DAN; (4) resume los datos de digestibilidad aparente *in vivo* vs *in vitro*; (5) recomienda un método *in vivo* para determinar la DAN en camarón penaeido marino.

Referencias

- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier, London, 427 pp.
- Akiyama, D.M., 1988. Soybean meal utilization by marine shrimp. American Soybean Association, Singapore.
- Akiyama, D.M., 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Nippon Suisan Gakkaishi 55, 91-98.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A., 1992. Penaeid shrimp nutrition. In: Fast, A.W., Lester, J. (Eds.), Marine Shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam, pp. 535-567.
- Anderson, S.J., Lall, S.P., Anderson, D.M., McNiven, M.A., 1993. Evaluation of protein quality in fish meals by chemical and biological assays. Aquaculture 115, 305-325.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed., Vol. 1. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Aquacop, 1989. Production results and meeting operating costs of the first super intensive shrimp farm in Tahiti. Abstract from the 1989 WAS Meeting, Los Angeles.
- Bordner, C.E., D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., 1983. Assimilation of nutrients by cultured hybrid lobsters (*Homarus sp.*) fed experimental diets. Proceedings of the World Mariculture Society 14, 11-24.
- Brown, P.B., Williams, C.D., Robinson, E.H., 1986. Evaluation of methods for determining digestion coefficients for adult red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Journal of the World Aquaculture Society 17, 19-24.
- Bureau, D.P., Hua, K., 2006. Letter to the Editor of Aquaculture. Aquaculture 252, 103-105.
- Ceccaldi, H.J., 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. In: D'Abramo, L.R./, Conklin, D.E., Akiyama, D.E. (Eds.). Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 261-291.
- Chevalier, P. L., Van-Wormhoudt, A., 1998. Alpha-glucosidase from the hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea-Decapoda). The Journal of Experimental Zoology 280, 384-394.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J., Bayley, H.S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. Comparative Biochemistry and Physiology 73B, 25-41.
- Chuang, J.L., Lee, M.F., Jenn J.S., 1985. Comparison of digestive enzyme activities of five species of shrimp cultured in Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan 12, 45-53.
- Coelho, S.R., 1984. Effects of environmental salinity and dietary protein levels on digestibility in four species of penaeid shrimp. Master's thesis, Texas A&M University, College Station, Texas, USA, pp 66.
- Cousin, M., Cuzon, G., Guillaume, J., 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: *in vivo* and *in vitro* study on eight samples of various origin. Aquaculture 140: 361-372.
- Colvin, P.M., 1976. Nutritional studies on penaeid prawns: protein requirements in compounded diets for juvenile *Penaeus indicus* (Milne Edwards). Aquaculture 7, 315-326.
- Córdova-Murueta, J.H., García-Carreño, F.L., 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. Aquaculture 210, 371-384.
- Córdova-Murueta, J.H., García-Carreño, F.L., Navarrete-del-Toro, M.A., 2004. Effect of stressors on shrimp digestive enzymes from assays of feces: an alternate method of evaluation. Aquaculture 233, 439-449.
- Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J., 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. Aquaculture 235, 513-551.
- Dall, W., 1967. The functional anatomy of the digestive tract of a shrimp *Metapenaeus bennettiae* Racek & Dall. Australian J. Zool. 15, 699-714.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., 1993. Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. Aquaculture 114, 285-292.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., 1995. Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*. Aquaculture 133, 287-294.
- Davis, D.A., Arnold, C.R., McCallum, I., 2002. Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 8, 87-94.
- Deering, M.J., Hewitt, D.R., Sarac, H.Z., 1996. A comparison of inert markers used to estimate protein digestibility in the leader prawn *Penaeus monodon*. J. World Maricul. Soc. 27, 103-106.
- Egusa, S., 1961. Studies on the respiration of the 'kuruma' prawn, *Penaeus japonicus* Bate. II. Preliminary experiments on its oxygen consumption. Bull. Jpn. Soc. Fish 27, 650-659.
- Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L., Civera, R., Haard, N.F., 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 157, 251-262.
- Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L., Carrillo, O., 1998. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 163, 123-136.
- Fenucci, J.L., Fenucci, A.C., Lawrence, A.L., Zein-Elden, Z.P., 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp, *Penaeus stylirostris*. J. World Maricul. Soc. 13, 134-145.

- Forster, J.R.M., Gabbot, P.A., 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 51, 943-961.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L., Chan, E.L., 1995. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acid sources. Aquaculture 131, 279-290.
- Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C., Cahu, C., 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. Aquaculture Research 34(15), 1403-1411.
- García-Carreno, F.L., Navarrete-del-Toro, A., Ezquerro, J.M., 1997. Digestive shrimp proteases for evaluation of protein digestibility *in vitro*: I. Effect of protease inhibitors in protein ingredients. J. Mar. Biotechnol. 5, 36-40.
- García-Carreno, F.L., 1998. Prediction of protein digestibility in shrimp and use of second generation protein ingredients in aquaculture feeds. En: IV Simposio Internacional de Nutrición en Acuicultura. La Paz, BCS, México, noviembre 15-18. CIBNOR, La Paz, BCS, México, Conferencia.
- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D. Miller, G.A., 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. Journal of Food Science 42, 1269-1275.
- Lan, C.C., Pan, B.S., 1993. In-vitro digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 109, 59-70.
- Lazo, J.P., Romaine, R.P., Reigh, R.C., 1998. Evaluation of three *in vitro* assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 29(4), 441-450.
- Leavitt, D.F., 1985. An evaluation of gravimetric and inert marker techniques to measure digestibility in the American lobster. Aquaculture 47, 131-142.
- Lee, D.L., 1970. Study on digestion and absorption of protein in artificial feeds by four species of shrimps. China Fisheries Monthly 208, 2-4.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1982. A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp, influences of diet, age and species. Physiologist 25, 241.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. In: D'Abramo, L/R/, Conklin, D.E., Akiyama, D.E. (Eds.), Crustacean Nutrition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 194-260.
- Lemos, D., Ezquerro, J.M., García-Carreno, F.L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture 186, 89-105.
- Lemos, D., 2003. *In vitro* determination of protein digestibility with enzymes from the target species. International Aqua Feed 6, 40-42.
- Lovett, D.L. and Felder, D.L., 1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus*. Biol. Bull., 178, 146-159.
- Lu, P.J., Liu, H.C., Tsai, I.H., 1990. The midgut trypsin of shrimp (*Penaeus monodon*). Proceedings Annual Meeting of Taiwan Fisheries Society, Taipei, December 5-8, Taiwan Fisheries Society, Keelung, Taiwan.
- Maugle, P.D., Deshimaru, O., Katayama, T., Nagatan, T., Simpson, K.L., 1983. Effect of microencapsulated amylase and bovine tyrosine dietary supplements on growth and metabolism of shrimp. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 49, 1421-1427.
- McGinnis, A.J., Kasting, R., 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide used to study food utilization by phytophagous insects. Agricultural and Food Chemistry 12, 259-262.
- Molina, C., Cadena, E., Orellano, F., 2000. Alimentación de camarones en relación a la actividad enzimática como una respuesta natural al ritmo circadiano y el ciclo de muda. En: V. Simposio Internacional de Nutrición Acuícola (Ed. E.L. Cruz-Suárez, Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civero Cerecedo, R.), pp. 358-380. Mérida, Yucatán, México.
- Mullen, J.D., Riley, J.P., 1955. The spectrophotometric determination of nitrite in natural waters, with particular reference to sea-water. Anal. Chim. Acta., 12, 464-480.
- Nieto-Lopez, M.G., 1995. Efecto de las diferencias en el procesamiento de las harinas de pescado y la toxicidad de las mismas, sobre la digestibilidad aparente en el camarón blanco del Pacífico (*P. vannamei*) en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. FCB/UANL, México.
- Pond, W.G., Church, D.C., Pond, K.R., 1995. Basic animal nutrition and feeding, 4th edn. John Wiley and Sons Inc., New York. 615 pp.
- Porter, D.H., Swaisgood, H.E., Catignani, G.L., 1984. Characterization of an immobilized digestive enzyme system for determination of protein digestibility. J. Agric. Food Chem. 32, 334-339.
- Sarac, Z., Thaggard, H., Saunders, J., Gravel, M., Neill, A., Cowan, R.T., 1993. Observations on the chemical composition of some commercial prawn feeds and associated growth responses in *Penaeus monodon*. Aquaculture 115, 97-110.

- Seidman, E.R., Lawrence, A.L., 1985. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of juvenile *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* grown at different dissolved oxygen levels. J. World Maricul. Soc. 16, 333-346.
- Shiau, S.Y., Lin, K.P., Chiou, C.L., 1992. Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and in sea water. Journal of Applied Aquaculture 1, 47-53.
- Siccardi, A.J. III., 2006. Daily digestible protein and energy requirements for growth and maintenance of sub-adult Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). PhD. Disertación, Texas A&M University, College Station, Texas, USA, 124 pp.
- Smith, L.L., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Strawn, K., 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. Aquaculture 46, 85-96.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2004. Accurate measurement of *in vivo* digestibility of shrimp feeds. Aquaculture 232, 563-580.
- Solarzano, L., 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. Limnol. Oceanogr. 14, 799-801.
- Spotte, S., 1979a. Fish and invertebrate culture: water management in closed systems, 2nd ed. Wiley, New York, 179 pp.
- Spotte, S., 1979b. Seawater aquariums: the captive environment. Wiley, New York, 413 pp.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis, 2nd ed. Bull. 167, Fish. Res. Board Can., Ottawa, 310 pp.
- Tsai, I.H., Lu, P.J., Chuan, J.L., 1991. The midgut chymotrypsins of shrimp (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus penicillatus*). Biochim. Biophys. Acta 1080,59-67.
- Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, H.T., Martin, B.J., 1980. Adaptation of the level of hepatopancreatic digestive enzyme in *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda) to the composition of experimental diets. Aquaculture 21,63-78.
- Velasco, M., Lawrence, A.L., Neill, W.H., 1999. Efectos de la proteína y el fósforo dietario en la calidad de agua de acuicultura. In: Cruz, L.E., Mendoza, R.E Ricque, D. (Eds.), Memorias del Tercer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México, pp. 597-612.

Método Utilizado por la Universidad Nacional de Mar del Plata para la Medición de Digestibilidad *in vivo* en Camarón

Jorge L. Fenucci*

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata / CONICET, Argentina. Funes 3350, Mar del Plata 7600, Argentina. Teléfono: +54 223 475 1107; Fax: +54 223 475 3150; E-mail: jfenucci@mdp.edu.ar

Introducción

En general la evaluación de una dieta para camarones se realiza tomando en cuenta parámetros tales como: crecimiento, supervivencia y factor de conversión del alimento, aunque este tipo de trabajos llevan tiempo y son costosos.

Existen otras técnicas de evaluación más rápidas como la determinación de la digestibilidad de las dietas que se puede realizar de dos maneras: *in vivo* e *in vitro*. La primera de estas técnicas determina la digestibilidad aparente de un alimento o sus componentes como proteínas, carbohidratos, lípidos, etc., utilizando como referencia un marcador inerte como es el Cr₂O₃ que no se absorbe a lo largo del tracto digestivo de los animales (McGinnis y Kasting, 1964; Fenucci *et al.*, 1982a; Fenucci *et al.*, 1982b). Se ha observado que este método no es adecuado para carideos como *Palaemon serratus* y *Pandalus platycerus* (Forster y Gabbott, 1971) pero si lo es para camarones peneidos en especial si el marcador se utiliza en bajos porcentajes en las dietas, entre 0,25 y 1%, (Divakaran *et al.*, 2000; Medina Martí *et al.*, 2005).

El método de determinación *in vitro* se utiliza mayormente para cuantificar la digestibilidad de proteínas y se basa en la determinación del grado de hidrólisis que sobre estos compuestos produce un extracto de hepatopáncreas de los camarones, este método si bien es rápido no tiene en cuenta las condiciones ambientales en las que se encuentran los ejemplares. Por otra parte se ha comprobado que la correlación de los resultados entre ambos métodos se da solo cuando se compara la digestibilidad de proteína de origen animal con vegetal, pero si existe una mezcla de proteínas de distintos orígenes los resultados que se obtienen son solo aproximados, por lo que deben ser validados por experimentos de digestibilidad *in vivo* (Divakaran *et al.*, 2004). Se debe destacar que Ezquerro *et al.* (1997) utilizando el método de pH estático o constante (pH stat) para determinar la digestibilidad de proteínas en el camarón *Litopenaeus vannamei* no encontraron diferencias significativas con el método de determinación *in vivo* utilizando óxido de cromo como compuesto de referencia.

En este capítulo se describen las técnicas de digestibilidad *in vivo* e *in vitro* para distintas especies de penaeoideos utilizadas del año 1978 a 1981 en el National Marine Fisheries Service de Galveston, Texas y la Texas A&M University, Texas, USA y en la actualidad por el grupo de Investigación de Acuicultura de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Determinación de digestibilidad aparente de proteínas y carbohidratos en *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei*.

Preparación de las dietas

Se utilizó el método de extrusión en frío (Meyers, 1972, Zein- Eldin y Meyers, 1973, Fenucci, 1981) con alginato de alta viscosidad como agente ligante y hexametafosfato de sodio como secuestrante. Ambos componentes se disuelven en agua caliente (80° C) agitando antes de agregarlos a los ingredientes secos según lo indicado en la fórmula (Tabla 1). Las dietas así obtenidas son estables y atractivas por más de 18 horas. Se utilizan solubles de pescado como atractantes. El nivel de óxido de cromo (Cr₂O₃) en dietas es de 1% reemplazando igual porcentaje de afrechillo de arroz o trigo. El secado de los pellets se realiza en estufa a 60 ° C por 24 horas.

La cantidad de agua agregada por Kg. de dieta es de aproximadamente 500 mL, de acuerdo con la calidad de ingredientes. El tamaño de partícula de las harinas utilizadas fue inferior a los 140 µm. Tamaño de los pellets: 3-3,5mm.

Tabla.1 Constitución porcentual de dietas utilizadas para determinar porcentaje de digestibilidad aparente de proteínas e hidratos de carbono en *Litopenaeus stylirostris* y *L. vannamei* (Fenucci *et al.*, 1982)

Ingrediente	Dieta				
	Control K	1	2	3	4
Harina de pescado	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Harina de camarón	31,5	28,4	28,4	28,4	31,5
Harina de calamar	5,0	12,7	6,4	0	3,2
Proteína de soya	3,0	0,0	6,2	12,4	9,3
Afrechillo de arroz	43,0	41,4	41,5	41,7	41,6
Lecitina	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Alginato de Sodio	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Hexametafosfato	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Solubles de pescado	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Mezcla de vitaminas	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Los experimentos se llevaron a cabo en acuarios de 0,72 m² de fondo y un volumen de 520 L. ¼ de la superficie de cada acuario se preparó con un filtro de grava con un fondo de conchilla molida y fue separada del área sin fondo por una barrera constituida por una red plástica. La densidad de animales por acuario fue de 17 y 25 animales.

Una vez recibidos los animales, se colocaron en los tanques y se alimentaron por 4 días con un alimento comercial (Purina MR 25). Luego se sometieron a ayuno por 24 horas. Cada día los animales se movían a la parte con grava y la otra parte se limpiada de heces, exuvias, etc. Los animales se alimentan en el área de alimentación y se dejan en esta zona por una hora luego de la alimentación, las primeras heces coloreadas aparecen de 15 – 50 minutos. Al cabo de una hora, se mueven a la zona con fondo de vidrio. Luego de 6 horas los animales son transferidos al área de alimentación, así se recogen las heces con una red, se lavan con agua destilada y se guardan a – 20° C para su posterior análisis. Los muestreos se repitieron por 5 días consecutivos. En la tabla 2 se muestran los resultados de digestibilidad aparente de proteína e hidratos de carbono obtenidos.

Tabla 2. Porcentaje de digestibilidad aparente de proteína cruda e hidratos de carbono de dietas para *L. stylirostris*, pesos medios varían entre 3,40 y 3,98g. Los valores son medias \pm Error estándar. Se utilizaron 20 camarones por acuario. (Fenucci *et al.*, 1982).

Dieta	Peso medio (g)	% de digestibilidad de proteínas		% digestibilidad de hidratos de carbono	
		Primeros 5 días	Luego 7 días de adaptación	Primeros 5 *días	Luego 7 días de adaptación
1	3,83 \pm 0,161	83,1 \pm 1,20 (5)	87,2 \pm 1,33 (4)	66,4 \pm 1,15 (5)	70,7 \pm 1,05 (3)
2	3,98 \pm 0,240	85,2 \pm 2,13 (5)	87,9 \pm 1,49 (4)	57,7 \pm 1,36 (3)	68,6 \pm 2,29 (4)
3	3,40 \pm 0,257	84,8 \pm 1,31 (5)	86,2 \pm 0,54 (4)	59,4 \pm 0,89 (4)	71,9 \pm 2,36 (4)
4	3,75 \pm 0,166	78,1 \pm 1,56 (5)	86,1 \pm 1,10 (2)	57,5 \pm 5,86 (4)	52,7 \pm 3,11 (3)
K	3,76 \pm 0,268	82,2 \pm 1,30 (5)	88,4 \pm 2,28 (4)	58,9 \pm 5,85 (2)	66,2 \pm 3,60 (3)

- Valores entre paréntesis n° de muestras analizadas.

En otros experimentos se evaluó el porcentaje de asimilación relativa de proteínas e hidratos de carbono de las mismas dietas, pero en períodos de tiempo de distinta duración (Tabla 3). Los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones descritas anteriormente pero se tomaron muestras los primeros 5 días, luego por 7 días se continuo alimentando sin tomar muestras y posteriormente se realizaron estudios de digestibilidad por cuatro días más. En este caso, se observó que para las dietas utilizadas que no existían cambios en la asimilación de proteínas pero en todos los casos se observó un incremento significativo en la digestibilidad de carbohidratos luego de los 7 días de adaptación (Tabla 3).

Tabla.3.- Porcentaje de asimilación relativa de proteína cruda e hidratos de carbono de dietas para *L. vannamei*. Pesos medios varían entre 7,01 y 7,89g. Los valores son medias \pm Error estándar. Se utilizaron 20 camarones por acuario, 14,4 ejemplares/m². (Datos no publicados).

Dieta	Peso medio (g)	% de digestibilidad de proteína		% digestibilidad de hidratos de carbono	
		Primeros 5 días	Luego 7 días de adaptación	Primeros 5 *días	Luego 7 días de adaptación
1	7,75 \pm 0,390	81,8 \pm 3,43 (4)	77,3 \pm 3,70	75,7 \pm 3,86 (3)	65,9 \pm 4,18 (4)
2	7,89 \pm 0,447	83,7 \pm 2,61 (5)	-	68,9 \pm 3,77 (4)	
3	7,68 \pm 0,316	83,0 \pm 5,42 (4)	72,2 \pm 2,85	68,4 \pm 4,33 (4)	67,5 \pm 1,84 (4)
4	7,64 \pm 0,385	54,7 \pm 3,83 (4)	-	42,7 \pm 4,40 (4)	
K	7,45 \pm 0,343	78,5 \pm 1,56 (3)	-	65,8 \pm 1,61 (4)	

- Valores entre paréntesis: n° de muestras analizadas.

Digestibilidad aparente de colesterol

Se formularon una serie de dietas y se determinó el porcentaje de digestibilidad aparente de colesterol en el camarón Argentino (*Artemesia longinaris*) y el langostino (*Pleoticus muelleri*), en función del contenido de colesterol en las mismas.

Se utilizaron el mismo tipo de acuarios que en el caso anterior, pero de 150 litros con 0,80 m² de fondo, con 22 animales en cada tanque (17,7 m²), talla de ejemplares 1,83-1,96 g de peso medio. Temperatura del agua 20-24° C y salinidad 34 ups. Los camarones se alimentaron al atardecer, al cabo de 2 horas se limpia el fondo y luego se recogían heces la mañana siguiente, la colecta de las mismas se realizo por 14 días consecutivos.

Tabla 4. Composición porcentual de dietas y digestibilidad aparente del colesterol de las mismas por el camarón Argentino *Artemesia longinaris*. (Martínez Romero *et al.*, 1991)

	Dietas			
	E ₀	E _{0,5}	E ₂	E ₃
Harina de calamar	15,0	15,0	15,0	15,0
Harina de pescado	20,0	20,0	20,0	20,0
Harina de mejillón	30,0	30,0	30,0	30,0
Harina de soya	5,0	5,0	5,0	5,0
Solubles de pescado	3,0	3,0	3,0	3,0
Mezcla vitamínica	2,0	2,0	2,0	2,0
Alginato de sodio	2,0	2,0	2,0	2,0
Hexametáfosfato de sodio	1,0	1,0	1,0	1,0
Afrechillo	21,0	20,5	19,0	18,0
Colesterol	0	0,5	2,0	3,0
Cr ₂ O ₃	1,0	1,0	1,0	1,0
Colesterol real en dieta	0,4	1,2	2,5	3,7
% de digestibilidad aparente de Cr ₂ O ₃	37,4±5,71 (4)	82,9±5,27 (5)	82,3±2,27 (6)	66,4±4,65 (4)*

+Cantidad de muestras analizadas

Experimentos de digestibilidad de colesterol en *Pleoticus muelleri*.

La dieta patrón fue la E₀ y a partir de ella se diseñaron otras dietas con distintos porcentajes de colesterol reemplazando el afrechillo.

Tabla 5. Dietas utilizadas para la determinación de la digestibilidad aparente del colesterol por el langostino argentino, *Pleoticus muelleri* (Harán y Fenucci, 1996).

Ingrediente	Dieta				
	E ₀	E _{0,5}	E ₁	E ₂	E ₃
H. mejillón	30,0	30,0	30,0	3,0	30,0
H. calamar	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
H. Soya	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
H. pescado	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Alginato	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Hexametáfosfato de sodio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cola de pescado	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Vitaminas	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Colesterol	0,00	0,5	1,0	2,0	3,0
Afrechillo	22,45	21,95	21,45	20,45	19,45
Cr ₂ O ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Colesterol determinado (%)	0,44	0,87	1,50	2,40	3,38
Digestibilidad aparente (%) *	46,67 ±4,73	55,33±3,21	75,00±2,65	78,66±4,04	68,67±2,52

*de colesterol

Los experimentos de digestibilidad se realizaron durante 9 días, en acuarios de 100 litros, sin sustrato, fondo de vidrio. Los ejemplares se colocaron a una densidad de 20 ejemplares m², se colectaron heces igual manera que en los anteriores casos. Tamaño de los ejemplares: 3,36-3,47g, temperatura, 18-23° C, salinidad 33 unidades prácticas de salinidad (ups).

Determinación de digestibilidad aparente de proteínas de dietas conteniendo distintos porcentajes de harina de soya reemplazando harina de pescado, por el camarón *Artemesia longinaris*

Para evaluar la digestibilidad aparente de proteínas de la harina de soya y la harina de pescado se prepararon 8 dietas isoproteicas que contenían 0, 15, 23 y 35% de harina de soya como sustituto de la harina de pescado y se emplearon dos concentraciones diferentes (0.25 y 1%) del marcador indigerible óxido de cromo (Cr_2O_3) en todas ellas.

Tabla. 6 Composición porcentual de las dietas utilizadas en el experimento de digestibilidad de proteína de soya por ejemplares de *A. Longinaris*. (Medina Martí *et al.*, 2005)

Ingrediente	Dieta							
	A	A'	B	B'	C	C'	D	D'
H. de calamar	13.83	13.83	18.10	18.10	20.37	20.37	23.79	23.79
H. de pescado	35.00	35.00	20.00	20.00	12.00	12.00	0.00	0.00
H. de soya	0.00	0.00	15.00	15.00	23.00	23.00	35.00	35.00
Oxido de cromo	0.25	1.00	0.25	1.00	0.25	1.00	0.25	1.00
Fécula	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00	22.00
Alginato de sodio	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Afrechillo	17.72	16.97	13.45	12.70	11.18	10.43	7.76	7.01
Hexametafosfato de sodio	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Lecitina de soya	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamina	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Colesterol	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Aceite de pescado	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Cola de pescado	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65

Tabla 7. Coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas de dietas que contenían cuatro niveles diferentes de harina de soya (0, 15, 23 y 35%) y dos niveles de óxido de cromo (0,25 y 1%), determinados con ejemplares de *Artemesia longinaris* en condiciones de cultivo. (Medina Martí *et al.*, 2005).

Dieta		Coeficiente de digestibilidad aparente (% ± s)
Harina de soya (%)	Cr_2O_3 (%)	
0	0,25	92,7 ± 1,12
15	0,25	87,3 ± 0,30
23	0,25	82,3 ± 1,65
35	0,25	88,6 ± 1,04
0	1,00	86,8 ± 0,45
15	1,00	78,8 ± 0,68
23	1,00	78,9 ± 0,44
35	1,00	78,5 ± 0,36

s: desviación estándar

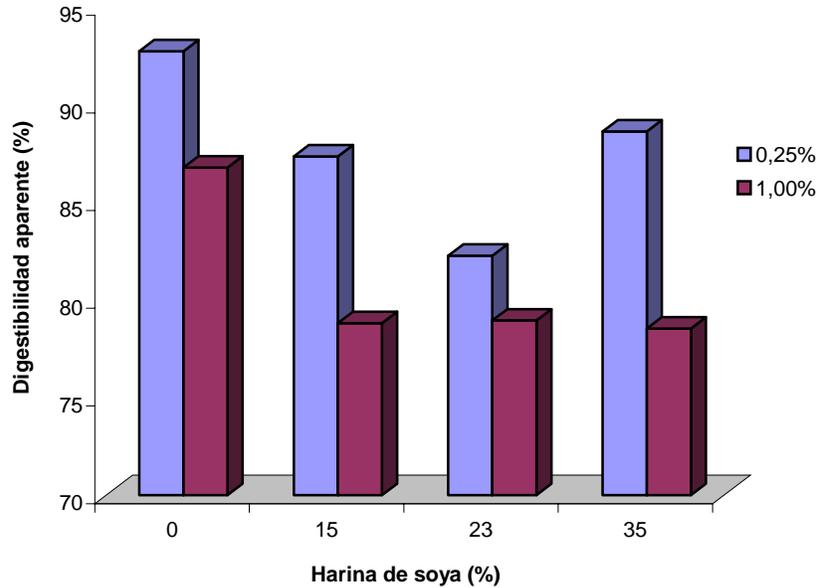


Figura 1: Digestibilidad de proteínas en *Artemesia longinaris* con dietas con distinto contenido de harina de soya y Cr₂O₃.

El experimento de digestibilidad se realizó por un lapso de 21 días. Los primeros 7 días correspondieron al período de adaptación a la dieta, en los que se alimentó a los camarones con la dieta correspondiente. Luego, se recolectaron diariamente las heces, empleando redes, durante 14 días. Las mismas se lavaron con agua destilada y se congelaron a -20 ° C para su posterior análisis.

Talla de los animales: 1,81 - 1,89 g de peso medio; temperatura 18 - 20 ° C; salinidad 33 ups.; densidad 35 animales m².

La fórmula utilizada para determinar porcentaje de digestibilidad aparente en todos los casos fue la siguiente:

$$\text{Digestibilidad aparente (\%)} = \frac{(1 - \% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta} \times \% \text{ compuesto en heces}) \times 100}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces} \times \% \text{ compuesto en dieta}}$$

Previamente se realizaron estudios para determinar si el grado de lixiviación de los compuestos analizados era significativo, para lo cual las heces de ejemplares alimentados con las dietas patrón se colocaron en agua de mar, determinándose el porcentaje de los compuestos estudiados en las mismas al cabo de un tiempo de permanencia en el agua.

Tabla 8. Cantidad de Cr₂O₃, proteínas y carbohidratos en heces de *Litopenaeus stylirostris* de 10 g de peso mantenidas por 15 minutos 1 hora y 6 horas respectivamente en agua de mar (Fenucci *et al.*, 1982).

Compuesto	Tiempo en agua de mar		
	15 minutos	1 hora	6 horas
% Cr ₂ O ₃	2,4±0,22	2,4±0,32	2,3±0,22
% Proteínas	11,5±0,44	11,0±0,47	11,0±0,47
% Carbohidratos	9,5±0,51	9,3±0,62	8,7±0,37

Tabla 9. Cantidad de Cr₂O₃ y colesterol remanentes en heces de *Artemesia longinaris* de 1,4 g de peso medio mantenidas por 15 minutos, 1 hora y 12 horas en agua de mar. Datos no publicados.

Compuesto	Tiempo en agua de mar		
	15 minutos	1 hora	12 horas
% Cr ₂ O ₃	2,0±0,18	2,0±0,22	1,8±0,25
% colesterol	0,1±0,07	0,1±0,09	0,09±0,00

Por esta razón no se aplicaron las fórmulas de corrección que aplican Marín Saldívar *et al.* (2002) para determinar pérdida de materia seca (PMS) y proteína (PP.) aplicables a otros compuestos.

$$\%PMS = 100 \times \frac{(P_1 - P_c) \times MS - (P_2 - P_c)}{(P_1 - P_c) \times MS}$$

Donde:

PMS = Pérdida de materia seca.

P1 = Peso de contenedor + alimento.

Pc = Peso de contenedor seco.

Ps = Relación peso materia seca / peso alimento.

P2 = Peso contenedor + alimento lixiviado seco.

MS= Relación peso materia seca/ peso del alimento.

$$\%PP = \frac{(100 P_d - P_{ld} \times (100 - \%PMS))}{P_d}$$

Pd= Concentración de proteína en la dieta.

Pld= Concentración de proteína lixiviada.

Entonces, las fórmulas para determinar % de digestibilidad corregida por lixiviación serán de acuerdo con Marín-Zaldivar *et al.*, (2002):

$$\%DAMSD_{Lixcorr} = 100 - 100 \times \frac{\% Cr \text{ en dieta} \times 1}{\% Cr \text{ en heces} \times (1 - \% PMS / 100)}$$

$$\%DAP_{lixcorr} = 100 - \frac{100 \times \% Cr \text{ en dieta} \times 1}{\% Cr \text{ en heces} (1 - \% PMS / 100)}$$

Digestibilidad de proteínas *in vitro* de dietas e ingredientes utilizados en la alimentación del camarón argentino *Artemesia longinaris*.

Se está trabajando en la determinación de la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de diversos ingredientes de dietas utilizadas para el engorde del camarón *A. longinaris*, tales como harinas de pescado, de hueso y carne y soja, así como de dietas que contienen dichos ingredientes.

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se utilizó la técnica de Lan y Pan, 1993 que se describe a continuación:

Se disecciona y pesa el hepatopáncreas (salvaje y luego de alimentar con dietas), se congelan a -20° C y se conservan hasta su análisis.

Cada pool de hepatopáncreas se homogeniza en 0,05 M Tris Buffer pH 7,5 (1:20 p/v) 4° C. Se centrifuga a 10.000g por 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante se toma como extracto crudo. Se determina el contenido de proteína por Lowry o Bradford.

Se tamiza la fuente de proteína (harinas o caseína) de las dietas; suspendiendo cada fuente proteica en 0,05 M Tris Buffer pH 7,5. Se toman 20 mL del sobrenadante de la suspensión de cada fuente proteica y se mezclan con 20 mL extracto crudo de hepatopáncreas. Se incuban 2 mL de la mezcla en un agitador a 30 °C durante 0,5; 1; 1,5 y 3 horas. La proteólisis se detiene por el agregado de 2 mL TCA al 20%. Se filtra y se lee en un espectrofotómetro a una absorbancia de 280 nm.

Con esta metodología se analizó la digestibilidad *in vitro* de harinas de pescado, carne y soja así como 3 dietas preparadas cuya composición se observa en la tabla 10.

Tabla 10.- Composición porcentual y proteínas totales de dietas utilizadas para la determinación de digestibilidad *in vivo* utilizando extracto de hepatopáncreas del camarón *Artemesia longinaris*.

Ingrediente	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Harina de pescado	48	27	27
Harina de Carne y hueso	-	23	-
Harina de Soja	17	17	23
Proteína de calamar	-	-	10
Almidón de mandioca	20	20	22
Harina de trigo	9,25	7,25	12,25
Otros ingredientes	5,75	5,75	5,75
% proteínas	39,30	39,8	37,20

Los resultados obtenidos muestran que las proteínas de las dietas alcanzaron el máximo de hidrólisis luego de 1,5 horas (Fernández - Giménez, *et al.*, 2008). Estos resultados implican que las enzimas proteolíticas del hepatopáncreas de *A. longinaris* degradan a igual velocidad las proteínas de las dietas estudiadas.

ANEXO 1. Técnicas analíticas

Oxido de Cromo

Este método fue originalmente utilizado en insectos y el análisis colorimétrico fue realizado por McGinnis y Karting en 1964 para insectos fitófagos y Fenucci (1981) en camarones peneidos.

El método consiste en una oxidación húmeda, de Cr_2O_3 a $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ seguida por una determinación colorimétrica del dicromato con difenilcarbazida

Reactivos Utilizados:

- 1.- Mezcla de digestión: Se disuelven 10 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (molibdato de sodio) en 150 mL de agua; se agregan 150 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se enfría a temperatura ambiente. Se agrega lentamente, mientras se agita, 200 mL de ácido perclórico al 70%
- 2.- Reactivo colorimétrico: Difenilcarbazida 0,25% (peso/volumen), en solución agua / acetona 50%. Se prepara diariamente, para evitar su deterioro, que se evidencia con la aparición de coloración en el mismo.
- 3.- Estándares: se prepara una mezcla 1% de óxido de cromo y celulosa (1 g de Cr_2O_3 en 99 g de celulosa), se mezcla por 24 horas.

Procedimiento:

Una muestra desconocida o estándar conteniendo Cr_2O_3 se pesa y se coloca en un balón para micro Kjeldahl, se agrega 10mL de la mezcla de digestión y se deja digiriendo durante 20/30 minutos.

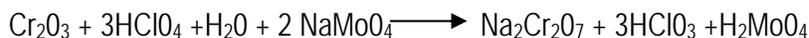
Se deja la solución enfriar a temperatura ambiente y se vuelca el contenido en un matraz aforado y se diluye a 50mL con agua destilada.

Se toma 9,5 mL y se agrega 0,5 mL del reactivo de coloración.

Se mezcla bien utilizando un Vórtex, se espera 5 minutos para el desarrollo de color y se lee en un espectrofotómetro a 540 nm.

Se deben analizar simultáneamente con las muestras 2 estándares conteniendo 5 y 10mg de Cr_2O_3 y 1 o 2 blancos.

Reacciones Químicas Involucradas:



La difenilcarbazida y el dicromato forman un complejo coloreado.

Existen algunos aspectos a tener en cuenta en cuanto a la digestión:

- El tiempo mínimo de oxidación en las condiciones descritas es de 20 minutos, por lo que 30 minutos de digestión es adecuado.

- En cuanto al reactivo de coloración no es afectado a temperatura ambiente durante por lo menos 6 horas si la dilución de la carbazida es entre 40-60% de solución de acetona.
- Se pueden diluir y realizar 30 muestras cada 2 horas por un sólo operador.

Nitrógeno orgánico total

Referencia: Barnes, 1959

Fundamento: El método micro-Kjeldahl se basa en la conversión del nitrógeno presente a sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico concentrado, en presencia de una mezcla catalítica y calor. Luego se alcaliniza con hidróxido de sodio y se destila el amoníaco producido en una solución de ácido bórico al 3%.

Para la conversión de nitrógeno a proteína se usa convencionalmente el factor 6,25; esto proviene de suponer que 100 g de proteína contienen 16 g de nitrógeno.

Reactivos:

Mezcla catalítica: sulfato de potasio y sulfato de cobre

Ácido sulfúrico concentrado

Solución de hidróxido de sodio al 30 %

Ácido clorhídrico 0,05M

Solución de ácido bórico al 3%

Mezcla indicadora: rojo de metilo y azul de metileno

- Procedimiento: En un balón se colocan 0,2 g de la muestra en presencia de 1,5 g de la mezcla catalítica, y 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calienta en digestor hasta su completa mineralización. Luego se dejan enfriar y se lleva a 100 mL en un matraz aforado con agua destilada. Se toman 20 mL, se le agregan 10 mL de hidróxido de sodio al 30 % y se destila sobre 30 mL de solución de ácido bórico al 3 %, obteniéndose un líquido color verde claro. Finalmente se titula con ácido clorhídrico hasta que vira a rosa claro.

El porcentaje de nitrógeno en las muestras se obtiene aplicando la fórmula:

$$\% N = \frac{V \cdot M \cdot 0,014 \cdot 100 \cdot 5}{P}$$

Donde:

V = volumen de la valoración

M = molaridad del ácido clorhídrico

P = peso seco de la muestra

0,014 = miliequivalentes de nitrógeno

Determinación de proteína soluble

Referencia: Bradford (1976)

Solución Bradford:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250

100 mL Acido fosfórico 85%

50 mL etanol 95%

Curva estándar

Se disponen 0; 4; 5; 10; 15 y 20 μ l de albúmina en tubos por triplicado. Agregar agua destilada hasta completar 100 μ l, agregando 1 mL de solución Bradford y agitar. Luego de 2 minutos se mide la absorbancia a 595 nm. Como blanco se utilizan 100 μ l agua destilada con 1 mL solución Bradford. Realizar la curva Absorbancia 595 vs. Concentración de proteína μ g/mL. Calcular la regresión.

Concentración de proteína soluble en el homogenado

Las concentraciones del homogenado (hepatopancreas) se evalúan por triplicado. Para la preparación de la solución stock de homogenato se mezcla hepatopáncreas homogeneizado con agua, se centrifuga y se trabajará con el sobrenadante y diluciones del mismo al 1:2; 1:5 y 1:10

Para la determinación de la curva del homogenato:

1. Disponer 5 μ L muestra en tubos (POR TRIPLICADO).
2. Agregar agua destilada hasta completar 100 μ L.
3. Adicionar 1 mL solución Bradford y agitar.
4. Luego de 2 minutos leer la absorbancia a 595 nm, Como blanco se utiliza 100 μ L agua destilada + 1 mL solución Bradford.
5. Se calcula el promedio de los triplicados y la concentración de la proteína utilizando la función lineal de la regresión estándar.

Carbohidratos

Referencia: Dubois *et al.*, (1965).

Fundamento: Los alimentos y las heces son digeridos en una solución al 5% de ácido tricloroacético. Esto precipita la fracción proteica de la muestra, quedando en solución los carbohidratos. Estos son tratados con un ácido fuerte y convertidos a furfural, hidroximetilfurfural y otros compuestos aldehídicos. El aldehído reacciona con el fenol formando un compuesto de condensación coloreado.

Reactivos

Ácido sulfúrico concentrado

Solución al 5% (28 mL de fenol 88% en 500 mL de agua destilada)

Solución de ácido benzoico (20 g de ácido en 1000 mL de agua destilada)

Solución al 5% de TCA (5g en 95 mL de agua destilada)

Solución estándar de carbohidratos (100 mg de D-glucosa por 100 mL de solución de ácido benzoico).

Procedimiento: Se pesan aproximadamente 10 mg de muestra y se transfieren a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se agregan 10 mL de una solución de TCA, dejando los tubos en un baño María por lo menos una hora. Se enfría y se lleva al volumen original con agua destilada. Se agita, se centrifuga y se toma una alícuota de 0,5 a 2 mL para el test con fenol. Si la muestra es de menos de 2 mL llevar a volumen con agua destilada.

Se agregan 1 mL de solución de fenol al 5% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado a la muestra y a la solución estándar. Se enfría a temperatura ambiente y se lee 490 nm. Para cada determinación se preparan blancos y 2 estándares por duplicado.

Lípidos totales

Fundamento: El método Soxhlet se basa en la extracción de los lípidos de una muestra seca y pulverizada, con éter etílico o éter de petróleo libre de peróxidos. El porcentaje de sustancia grasa se obtiene en base a la diferencia entre el peso seco previo y posterior a la extracción (IRAM, 1985).

Reactivos: Éter de petróleo fracción 35-60° C

Procedimiento: Se pesan en forma exacta 5 a 10 g de la muestra homogeneizada y pulverizada y se coloca en el aparato Soxhlet. En un erlenmeyer seco se vierten 100 mL de éter y luego se encienden las placas calefactoras. Se deja actuar durante 4 o 5 horas. Una vez terminado el proceso se puede recuperar el solvente por destilación simple. La muestra se seca en estufa a 60°C durante 24 horas, se deja enfriar en el desecador y luego se pesa.

Cenizas

Fundamento: El método se basa en la calcinación total de muestra seca en un horno eléctrico (mufla), el porcentaje de cenizas se obtiene calculando la diferencia de peso entre la muestra seca y la muestra calcinada.

Procedimiento: Se seca aproximadamente 1 g de muestra en estufa (60° C- 24 hs.), luego se pesa y se coloca en una mufla entre 500 y 550 °C durante 1 hora, se deja enfriar y se pesa nuevamente.

Humedad

El método consiste en calcular el porcentaje de humedad de una muestra, por la diferencia entre peso húmedo y peso seco (secado a estufa a 60 ° C hasta peso constante).

Colesterol

Referencia: Aiquel, 1977

Es un método colorimétrico. Inicialmente, valores de absorbancia a 670 nm de soluciones con concentraciones conocidas de colesterol. Posteriormente se refieren los valores de absorbancia obtenidos para dietas y hepatopáncreas a las correspondientes concentraciones de colesterol.

Fundamento: Consiste en tratar la muestra con el reactivo de Bloor (alcohol etílico-éter etílico). Una parte de este extracto se evapora y el residuo se disuelve en cloroformo y se valora el colesterol total mediante la reacción de Liebermann Bouchard.

Reactivos:

Alcohol etílico 95°
Éter etílico
Cloroformo
Anhídrido acético

Acido sulfúrico concentrado

Procedimiento:

En un tubo graduado de 25 mL se coloca la muestra y se agrega el reactivo de Bloor hasta la marca mencionada. Se tapa y se agita vigorosamente durante 1 minuto. Se deja reposar por 30 minutos en posición horizontal y luego se filtra rápidamente.

En un vaso de precipitado se colocan 5 mL del filtrado y se evapora en baño de arena caliente hasta sequedad. Se toma el residuo con pequeñas porciones de cloroformo que se transfieren a un tubo graduado de 10 mL provisto de tapa. Se completa con cloroformo hasta 5 mL y se agregan 5 mL del reactivo anhídrido acético-ácido sulfúrico-cloroformo, de reciente preparación. Se mezcla bien, se lleva a un baño de agua a 27°C durante 10 minutos y se lee en espectrofotómetro a 670 nm, poniendo como blanco agua destilada.

ANEXO 2. Trabajos Publicados sobre Digestibilidad del grupo de la Universidad Nacional de Mar del Plata

- Fenucci, J.L., A.B. Casal De Fenucci & J.L. Fenucci. 1982a. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp *Penaeus stylirostris*. Journal of the World Mariculture Society, 13: 134-145
- Fernandez Gimenez, A.V., A.C. Diaz, S.M. Velurtas & J.L. Fenucci. 2008. *In vivo* and *in vitro* protein digestibility of feeds and feed ingredients for prawn *Artemesia longinaris* (Crustacea, Penaeidae). En prensa en Brazilian Archives of Biology and Technology. Curitiba, Brazil.
- Martinez Romero, P., A.B. Casal De Fenucci & J.L. Fenucci. 1991. Dietary cholesterol influence on the growth and survival of the Argentine prawn *Artemesia longinaris* Bate. Journal of Aquaculture in the Tropics, 6: 1111-1117.
- Harán, N.S. & J.L. Fenucci. 1996. Efectos del Colesterol en la dieta del langostino argentino *Pleoticus muelleri* Bate. Revista Cubana de Investigaciones Pesquera, 20(2): 40-43.

Presentaciones a Congresos del grupo de la Universidad Nacional de Mar del Plata

- Fenucci, J.L., A.B. Casal De Fenucci, A.L. Lawrence & Z.P. Zein-Eldin. 1982b. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets by the shrimp, *Penaeus stylirostris*. World Mariculture Soc. 13th Annual Meeting. Charleston, South Carolina, USA. 28 de febrero al 4 de marzo de 1982.
- Martinez R. P, A.B. Casal De Fenucci & J.L. Fenucci. 1984. Dietary cholesterol influence on the growth and survival of the argentine prawn *Artemesia longinaris* Bate. First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps. Iloilo City, Filipinas. 4 al 7 de diciembre de 1984.
- Fenucci, J.L., A.B. Casal De Fenucci, A.L. Lawrence & Z.P. Zein-Eldin. 1986. Comparison of the assimilation of proteins and carbohydrates from compounded diets by two species of penaeid shrimp: *Penaeus setiferus* and *Penaeus vannamei*. World Mariculture Soc. 16th Annual Meeting. Reno, Nevada. Enero de 1986.
- Medina Marti, M., N.S. Haran & J.L. Fenucci. 2005. Efectos del reemplazo de harina de pescado por harina de soja en el crecimiento, supervivencia y digestibilidad del camarón *Artemesia longinaris* Bate (Crustacea, Penaeoidea). XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar. Viña del Mar, Chile, 16-20 de mayo 2005

Tesis de Doctorado y Licenciatura realizadas empleando técnicas de digestibilidad " in vivo" del grupo de la Universidad Nacional de Mar del Plata

- Fenucci, J.L. 1981. Studies on the nutrition of marine shrimp of genus *Penaeus*. A dissertation presented to the Faculty of the Department of Biology, University of Houston, pp 185.
- Bolasina, N.S. 2002. Biología y cultivo de peces comerciales del litoral bonaerense. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, pp.214.
- Martinez, P. 1983. Asimilación de colesterol por el camarón *Artemesia longinaris* en distintas etapas de su desarrollo. UNMP. Aprobada sobresaliente. Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, pp.52 2/5/83.

- Benedetti, N. Alimentación y Nutrición de la corvina rubia, *Micropogonias furnieri*. UNMP. Aprobada sobresaliente. 8/7/98. Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, pp.52.
- Medina Marti, M. 2004. Efecto del reemplazo de harina de pescado por harina de soja en el crecimiento, supervivencia y digestibilidad del camarón *Artemesia longinaris* Bate en condiciones de cultivo. Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, pp.41.

Referencias sobre temas de digestibilidad además de las propias del grupo de la Universidad Nacional de Mar del Plata

- Aiquel, F. 1977. Manual de Análisis Clínicos. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 592 pp.
- Barnes, H. 1959. Apparatus and methods of oceanography. George Allen and Unwin Limited, New York, 339 pp.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Divakaran, I. Forster & M. Velasco, 2004. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of *in vitro* protein digestibility. *Aquaculture*, 239: 323-329.
- Divakaran, S.; M. Velasco, E. Beyer, I. Forster, A.G: Tacon. 2000. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. In *Avances en Nutrición Acuicola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, Cruz Suarez, L.E.; Ricque Marie, D.; Tapia Salazar, M.; Olvera Novoa, M.A.; Civera Cerecedo, R. Eds.; Mérida, México, 2000; pp 267-276.
- Dubois, M.K., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Ezquerro, J.M., F.L: García Carreño, R. Civera, N. Haard. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 157: 251-262.
- IRAM. 1985. Método de determinación de la materia grasa por la técnica de extracción en un aparato tipo Soxhlet o Twisemann, Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, Norma IRAM15040-1: 7pp.
- Martín Zaldivar, L.F., L.E. Cruz Suárez, D, Ricque Marie, M. Tapia Salazar, C. Guajardo Barbosa, M. Nieto López & A. Miller. 2002. Estudio exploratorio del grado de digestibilidad de los alimentos comerciales para el camarón en México. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 266-281.
- Mcginnis, A.J. & R Kasting. 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide used to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. *J. Agric. Food Chem.*, 12: 259-262.
- Meyers, S.P., D.P. Butler & W.H. Hasting. 1972. Alginates as binders for crustacean rations. *Prog. Fish. Cul*, 34:9-12.
- Lan, C.C.& B.S Pan. 1993. *In vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, 109: 59-70.
- Zein-Eldin, Z.P. & S.P. Meyers. 1973. General considerations of problems in shrimp nutrition. *Proc. World Mariculture Soc.*, 4:299-317.

Método Utilizado en el CIAD para Medir la Digestibilidad *in vivo* en Camarón

Crisantema Hernández*¹, Blanca González Rodríguez¹, Isabel Abdo de la Parra¹, Leticia García Rico² y Carlos Martínez Palacios³

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán. Av. Sábalo Cerritos s/n. C.P. 82010, A.P. 711, Mazatlán, Sinaloa, México. Telefono: 01(669)9898700; E-mail: chdez@victoria.ciad.mx.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera a la Victoria, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

³Instituto de Investigaciones sobre Recursos Naturales UMSNH., Av. San Juanito Itzicuaró s/n. Col. San Juanito Itzicuaró, C.P. 58330, Morelia, Michoacán, México

Introducción

Se puede considerar que anteriormente los alimentos para organismos acuáticos únicamente eran evaluados en términos de crecimiento y de composición corporal de los animales. Actualmente, se está confiriendo significativa atención a la digestibilidad de los ingredientes o de las dietas compuestas. Esto ha permitido de cierta manera el aprovechamiento de la amplia gama de ingredientes susceptibles de ser incorporados en las dietas cuyo potencial no resulta fácil determinar debido a la inexactitud en cuanto a la precisión de los métodos convencionales para estimar la calidad proteica (Mendoza, 1993). La evaluación de la composición nutricional de los ingredientes antes y después de la elaboración de la dieta permite la formulación precisa de los alimentos con el consecuente desarrollo de dietas nutricionalmente completas. Un alimento puede estar bien balanceado y contener todos los nutrientes esenciales requeridos por el animal en una dieta, sin embargo, éste no puede generar un buen desarrollo en el organismo, debido a que sus nutrientes no se encuentran disponibles. La calidad de un alimento depende en gran medida de su digestibilidad, de su valor biológico y su utilización neta (Lee *et al.* 1997; Satoh *et al.*, 1992). La digestibilidad *in vivo*, es uno de los indicadores biológicos más precisos para evaluar la disponibilidad de un ingrediente como componente de una dieta y tiene como objetivo la búsqueda de alimentos más eficientes y amigables con el medio ambiente acuático (Akiyama *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1989; Cruz-Suárez *et al.*, 2002). No obstante, debido a la incompleta reproducibilidad de los métodos utilizados es imperante la estandarización de los múltiples métodos que permitan la reproducibilidad de los mismos. El Grupo de Nutrición de Peces y Crustáceos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, ha llevado a cabo investigaciones principalmente relacionadas con la evaluación de digestibilidad aparente de la proteína en dietas experimentales y comerciales para camarón, utilizando las metodologías a continuación descritas. Los resultados de estos estudios han sido publicados en revistas indexadas.

Procedimiento experimental

Marcador de digestibilidad

La digestibilidad aparente de los nutrientes es medida por el método indirecto, utilizando como marcador en la dieta 0.5% de óxido de cromo (Cr₂O₃). El cual es considerado el principal marcador y es uno de los más usados en estudios de utilización del alimento (Nose, 1960; 1961), su inclusión no altera las propiedades organolépticas de los alimentos. Este marcador es de color verde,

prácticamente insoluble en agua, alcohol o acetona, no es tóxico y puede ser recuperado cuantitativamente en heces.

Preparación de las dietas experimentales

Las dietas experimentales se elaboran en la Planta de Alimentos del CIAD-Unidad Mazatlán. Los ingredientes son molidos utilizando un pulverizador marca Micrón hasta obtener un tamaño de partícula de 250 µm. Cada ingrediente se coloca en recipientes por separado. En una mezcladora marca Hobart modelo AT-200 de 5 Kg. de capacidad se adicionan los ingredientes de mayor concentración para cada dieta (harina de pescado, camarón, harina de trigo pasta de soya etc.). Los ingredientes menores se mezclan por separado hasta obtener un color homogéneo y posteriormente agregarlos a la mezcla de los ingredientes mayores de la formulación, para obtener una mezcla homogénea. En este momento, se agrega el óxido de cromo, el cual sirve como marcador inerte de referencia para poder determinar posteriormente la digestibilidad aparente de los nutrientes. Posteriormente se agregan los aceites mezclados con la lecitina líquida. Por último, se agrega agua (30% del peso total de la mezcla aproximadamente) hasta obtener una masa de consistencia suave.

Posteriormente, cada dieta se peletiza en un molino para carne marca TOR-REY modelo 22, equipado con un dado de 3/32" (3mm). Los pellets son recibidos en charolas tipo cernidores y etiquetados previamente para su identificación. Todas las dietas peletizadas se colocan en un secador de aire forzado a un rango de temperatura entre (37-39° C), durante 12 horas aproximadamente. Una vez secas y frías, las dietas en pellets se transfieren a bolsas de plástico, previamente etiquetadas y son almacenadas a una temperatura de 4° C.

Marcado de los alimentos comerciales

Para la adición de óxido de cromo en los alimentos comerciales, se muele el alimento y se le adiciona 0.5% de óxido de cromo, 1.5 % de alginato de sodio como aglutinante; se le agrega una cantidad suficiente de agua hasta obtener una humedad aproximada del 30% y se peletiza de la misma forma que las dietas experimentales (Cruz-Suárez *et al.*, 2002).

Los pellets se parten manualmente a un tamaño de 4 mm para camarones de 10-12 g. Para camarones con tamaño entre 1-3 g, el alimento es triturado en un mortero, posteriormente es tamizado a un tamaño de partícula adecuada para ser consumido por el organismo. Las dietas y heces son analizadas para determinar proteína, grasa, cenizas y humedad siguiendo los métodos de la AOAC (1984). Así mismo se determinan los parámetros físicos en las dietas (ver anexo)

Diseño experimental

Se emplean organismos con un intervalo de peso de 8-12 g ó 1-3 g, provenientes de diferentes granjas camaronícolas. Los camarones son trasladados al CIAD-Unidad Mazatlán, para enseguida ser confinados en tanques de 1,600 L. Los camarones son alimentados a demanda tres veces al día con una dieta comercial. Después de una semana de aclimatación se toman al azar los camarones sujetos al estudio y se colocan en el sistema a una densidad de cinco camarones por acuario. Se utilizan tres replicas por tratamiento.

Alimentación de los organismos

Antes de empezar a recolectar las heces, los camarones son alimentados tres veces al día *ad libitum* durante siete días para aclimatarlos a las dietas. Al octavo día, los organismos son privados del alimento durante 24 horas. Al noveno día, los organismos se alimentan a saciedad dos veces al día a las 10:00 y a las 15:00 h durante todo el periodo experimental. El alimento no consumido se elimina después de 60 minutos de cada alimentación y las heces de cada cámara son recolectadas hasta reunir 1.5 g.

Sistemas experimentales utilizados en bioensayos de digestibilidad de alimentos en camarón

Sistema para la colecta de heces por sifón

Este módulo se encuentra constituido por 24 acuarios de plástico con medidas de 47.5x32x19.5 cm., con un volumen individual de 25 L, con desagües interconectados mediante tubería de PVC, lo cual permite la circulación continua de agua con un flujo de agua de 1.5 L min¹.

El agua de salida es recibida en un primer tanque que contiene una bomba sumergible de ½ HP, ésta la envía a un segundo contenedor provisto de dos filtros biológicos, del cual fluye a un tercero proveído con un filtro biológico solamente. De éste, el agua así tratada se distribuye finalmente a los acuarios experimentales.

El sistema permite controlar los niveles de concentración de oxígeno mediante burbujeo profuso con aire forzado, además de eliminar los metabolitos y los materiales disueltos o particulados no sedimentables.

Sistema Guelph modificado (SGM)

Sistema para colecta de heces por columna de sedimentación

Se construyó un módulo similar al sistema de sedimentación en columna descrito por Cho *et al.*, (1982). El sistema esta integrado por 15 acuarios de vidrio con un fondo de 32° de inclinación y con un volumen de 45 L; cada acuario presenta un dispositivo individual de colecta de heces. El agua se introduce a través de una tubería de PVC de 1.27 cm. de diámetro, provista de orificios de 0.2 cm. situada en la superficie de la parte alta del fondo inclinado con los orificios de salida de agua, orientados en dirección de este fondo para facilitar el barrido de los materiales que pudieran quedarse en el.

En la parte más baja del fondo se colocó un tubo de PVC de 1.27 cm. de diámetro, el cual, fue cortado longitudinalmente en una sección, de tal manera que sirviera de canal ó guía en donde las heces o alimentos se depositaron. Este tubo se colocó en todo lo ancho del acuario y estuvo conectado a la columna de sedimentación. Para facilitar el paso de los materiales sólidos (heces y alimento no consumido) se colocó el tubo de vidrio (medio centímetro de diámetro) dirigido hacia el fondo y en extremo opuesto de la columna de sedimentación del acuario, haciéndole un doblez de 90°. A través de este tubo se hizo pasar el agua para facilitar aún más la conducción de los sólidos hacia la columna de sedimentación (ver figura 1).

La columna de sedimentación consiste de un tubo de PVC de 10.16 cm. de diámetro y 65 cm. de longitud. En la parte baja del tubo se une otro de 25 cm. de forma cónica con una válvula hidráulica de PVC de 1.90 cm., con la cual se permite la salida de agua para la limpieza del acuario y para la colecta de heces (Martínez-Palacios *et al.*, 2001).

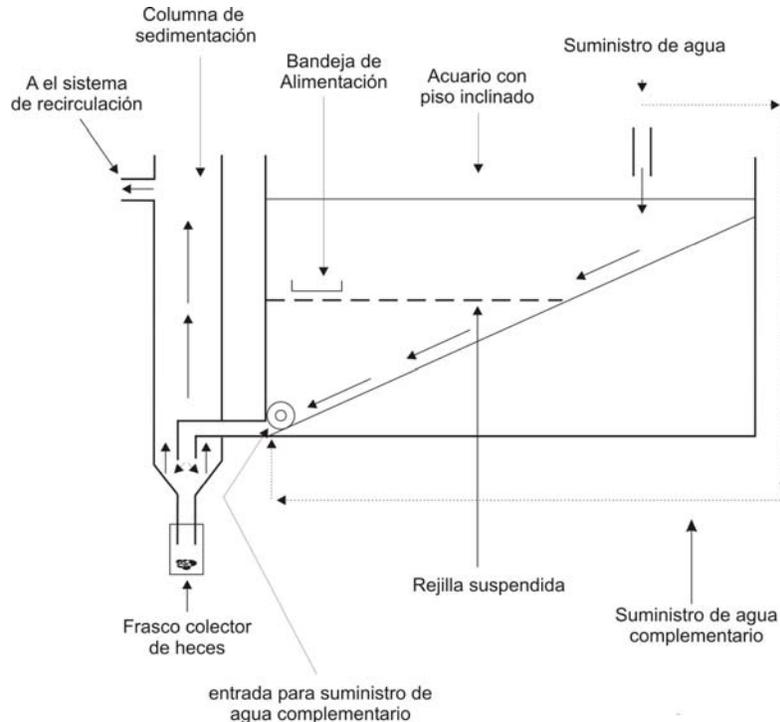


Figura 1. Sistema Guelph modificado (SGM) para recolección de heces de camarón

Colecta de las heces en el SGM

El sistema Guelph modificado es un método de colecta semi-automático de heces que permite llevar a cabo la operación con mayor control. En este sistema el alimento no consumido se elimina después de 60 minutos de cada alimentación y las heces de cada cámara se colectan en un frasco. Se realiza un drenado mediante las trampas de sedimentación de aproximadamente 1 L de agua donde se contiene a las heces. Posteriormente, estas heces son pasadas por un tamiz de 100 μm y lavadas con agua destilada para eliminar las sales. Finalmente se colocan en cajas de petri y son secadas en una estufa durante 12 horas a 105 ° C.

Colecta de las heces en el sistema de sifón

La colecta de las heces se realiza por medio de un tamiz de 100 μm y posteriormente, se lavan con agua destilada para eliminar la sal proveniente del agua del sistema. Las heces se colocan en tubos con fondo cónico por cada acuario. Los tubos se colocan en un recipiente con hielo mientras se está haciendo la recolección.

Secado de las heces

Anteriormente las muestras colectadas se llevaban a una estufa a 105 ° C durante 12 h. Posteriormente, las heces secas eran removidas de la caja cuidadosamente con la ayuda de una hoja de bisturí, se pulverizaban en un mortero y se almacenaban por tratamiento dentro de un secador en un frasco cerrado, hasta completar un mínimo de 2.5 g de muestra por tratamiento.

Actualmente, las muestras de heces recolectadas son lavadas con agua destilada y congeladas a -20° C. Posteriormente, son liofilizadas durante 72 h para después molerlas hasta obtener un polvo de consistencia fina. Las muestras ya molidas son almacenadas en un ultra congelador -70 ° C hasta su análisis.

Cuantificación de oxido de cromo en heces y alimento

La cuantificación se determina aplicando el método espectrofotométrico previa digestión ácida de Furukawa y Tsukahara (1966). En ambos casos se debe cuantificar la concentración del marcador en el alimento y heces y adicionalmente se realizan análisis químicos proximales para estimar el contenido de nutrientes en las muestras. La rutina del análisis es la sugerida en Olvera *et al.* (1993).

Referencias

- Akiyama, D., Dominy, W., Lawrence, A. L., 1993. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. En Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D. y Mendoza-Alfaro R. (Eds) Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos Para Acuicultura. F.CB.-U.A.N.L., Monterrey, N.L. México. 1993.
- AOAC, 1984. Oficial Methods for Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, 14th edition. Arlington, VA, 1141 p.
- Brown, P., Robinson, E., Clark, A., Lawrence, A. L., 1989. Apparent digestible Energy Coefficients and Associative Effects in Partial Diets for Rid Swamp Crayfish. *Journal of the World Aquaculture Society*. 20(3):122-126.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J., Bayley, H. S., 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 25-41.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Marín-Zaldivar, L. F., Guajardo-Barbosa, C., Nieto-López, M., Salinas-Miller, A., 2002. Historia y estatus actual de la digestibilidad y de algunas características fisicoquímicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 3-6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Furukawa, H., Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish* 32.
- García-Rico, L., Ramos, R. E. and Gutierrez, C.L. 1999. Application of microwave digestion and atomic absorption spectrophotometry for the determination of chromic oxide as a digestibility marker in feed, feces and ileal content. *AOAC International*. Vol.82, No.3.
- Lee, P., Lawrence, A., 1997. Digestibility. In: D'Abraham, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*, The world Aquaculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, USA, 6: 194-260.
- Mainard, L.A and Loosli J.K. 1969. *Animal Nutrition*. McGraw-Hill Book Co., New York, 613 pp.
- Manual Tecator Kjeltac Auto 1030 Analyzer. s/f. Höganäs, Sweden. 39 p.
- Mendoza R. 1993. Métodos para evaluar la digestibilidad proteínica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. En: Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura. (eds. Cruz- Suárez, L.E., Ricque Marie D. Mendoza R. Pp 155-202.
- Martínez-Palacios, C.A., Cabanillas-Beltrán, H., Ponce-Palafox, J.T., Chávez-Sánchez, Ma. C. and Ross, L.G., 2001. A modified chamber designed for estimation of digestibility in shrimp. *North American Journal of Aquaculture*, 63: 252-255.
- Nose, T., 1960. On the digestion of food protein by godfish (*Carassius auratus* L.) and rainbow trout (*Salmo irideus* g.). *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.* 10, 11-22.
- Nose, T., 1961. Determination of nutritive value of food protein on fish: On the determination of food protein utilization by carcass analysis. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.* 11, 29-42.
- Olvera, N.M.A., Martínez-Palacios y Real de León E. 1993. Cuantificación de óxido de cromo en heces y alimentos. En: manual de Técnicas para laboratorio de Nutrición de Peces y Crustáceos. FAO-Italia, pp 58-60.
- Satoh, S., Cho, C., Watanabe, T., 1992. Effect of fecal retrieval timing on digestibility of nutrients in rainbow trout diet with the Guelph and TUF feces collection systems. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(6): 1123-1127.

ANEXO 1. Técnicas Analíticas

Análisis proximal y técnicas para la determinación de óxido de cromo en alimentos y heces

Los análisis proximales se llevan a cabo mediante el uso de técnicas estándar AOAC (1984). Se analiza cada uno de los ingredientes, las dietas y las heces tomando una muestra representativa de los mismos.

Determinación de humedad

- Se llevan a peso constante los crisoles.
- Se pesa de 0.5 – 1.0 g de muestra.
- Se coloca en la estufa a 105° C por aproximadamente un tiempo de 5 horas hasta lograr un peso constante.
- Transferir los crisoles a un desecador hasta que alcance la temperatura ambiente.

Cálculos: Porcentaje de humedad = $(P2 - P1) (100) / M$

Donde:

P1 = Peso del crisol con la muestra ya seca; P2 = Peso del crisol con la muestra húmeda; M = Peso de la muestra

Determinación de cenizas

Procedimiento:

- En un crisol de porcelana a peso constante pesar de 0.5 a 1.0 g de muestra.
- Poner la muestra por 15 minutos a 100° C. Elevar la temperatura de la mufla para la calcinación a 550° C por 3 horas cuando menos.
- Enfriar la mufla poco a poco. Se puede apagar hasta que la temperatura del interior alcance los 100° C y entonces se transfiere a un desecador hasta su completo enfriamiento.
- Pesar de nuevo el crisol con la muestra ya calcinada.

Cálculos: Porcentaje de cenizas = $(P2 - P1) (100) / M$

Donde:

P1 = Peso del crisol vacío; P2 = Peso del crisol con las cenizas y M = Peso de la muestra.

Determinación de proteína cruda

Se determinará por el método Kjeldahl (nota de aplicación 1987) con el equipo KJELTEC AUTO 1030 ANALYZER Tecator.

Digestión.-

- Se pesan 200 mg (0.200g) de la muestra finamente molida (177 µm).
- Se le añaden 2 tabletas catalizadoras Tecator (No de catálogo 1527-004).
- Se añaden 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).
- En los tubos con urea se agregan 5 mL de la misma (la solución de urea se prepara con : 400 mg de urea en 100 mL de agua destilada y desionizada).
- Se utiliza una cantidad de urea como testigo para corroborar el método de análisis.

- Precalentar el digestor.
- Colocar los tubos con el manifold y el drenaje de agua.
- Subir la temperatura a 9 (según la parrilla del digestor), digerir una hora.
- Dejar enfriar los tubos, agregar 25 mL de agua destilada, agitar el tubo.

Destilar y titular

- Encender el destilador.
- Llenar los recipientes de la solución álcali (400 g de NaOH aforar a un litro, a cada litro de álcali agregar 60 g de tiosulfato de sodio; disolver primero el tiosulfato).

La solución indicadora que se prepara de la siguiente manera:

- Ácido bórico al 1%.- diluir 100 g de ácido bórico en 10 litros de agua destilada).
- Agregar 100 mL de verde de bromocresol (100 mg en 100 ml de metanol).
- Agregar 70 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 ml de metanol).
- Agregar 3ml de NaOH 1 M (4%).
- Ácido clorhídrico 0.1 N.
- Realizar cálculos con la siguiente formula:

Cálculos:

Proteína (%) = $100 ((\text{mL de HCl usado} * 1.447367233 * 6.25) / \text{mg de la muestra})$

Determinación de extracto etéreo

Las grasas de la muestra son extraídas por el método Soxhlet, se utiliza éter de petróleo como solvente.

- Pesar los matraces.
- Pesar 0.5 g de muestra en los dedales y cubrir con una porción de algodón.
- Agregar el éter en el matraz.
- Montar el equipo soxhlet y el refrigerante.
- Correr el agua fría por el refrigerante y calentar para comenzar las descargas correspondientes. El goteo debe caer directamente sobre el dedal.
- Se recomienda dejar correr de 4 a 5 horas, pero si el éter después de un tiempo sale completamente transparente puede ser suspendido el proceso.
- Para la recuperación del dedal se recomienda retirar el dedal y hacer la extracción antes que fluya ir retirando hasta que solo quede la cantidad suficiente para que la grasa no se quemé.
- Se coloca en una estufa a 105° C para que se evapore el éter.
- Colocar los matraces en el desecador a enfriar y luego pesar.

Cálculos: Porcentaje de extracto etéreo = $(P2 - P1) (100) / M$

Donde:

P1 = Peso del matraz sin grasa, P2 = Peso del matraz con grasa, M = Peso de la muestra

Parámetros físicos de los alimentos

La estabilidad de los alimentos se realiza siguiendo el método propuesto por Cruz-Suárez *et al.* (2002). Una alta estabilidad garantiza la no dispersión del alimento al medio circundante. Las

características físicas estudiadas en los alimentos comerciales o experimentales son: densidad, porcentaje de finos, capacidad de absorción y tamaño y longitud del pellet.

Densidad

1. Se llena una bureta de 100 ml con agua salada hasta la marca de 80 ml o en su caso un volumen conocido.
2. Se pesa una cantidad conocida de pellets.
3. Se sumergen los pellets en la probeta y se mide el volumen desplazado.
4. Se divide el peso de los pellets en gramos entre el volumen desplazado y el resultado es la densidad.

Porcentaje de finos

Se pesan 100 g de pellets, se ciernen de manera que nada mas quede el polvo y se pesa el mismo. Dicho valor es el % de finos en 100 g de pellets. Éste es un parámetro de calidad de los alimentos, ya que los finos constituyen un desperdicio y una fuente de contaminación en los estanques (Cruz *et al.* 2002).

Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua de la dieta se determina por diferencia de peso en proporción al inicial, después de una hora de inmersión de la misma en agua salada.

Tamaño y longitud del pellet

Se mide tanto la longitud como el diámetro de 10 pellets y se estima el promedio.

Determinación de óxido de cromo utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica por flama

A las muestras de dieta y heces se les determina: óxido de cromo por espectrofotometría de absorción atómica por flama (García-Rico *et al.*, 1999). Se pesa 0.005 g de muestra de dieta y 0.01 g de heces en crisoles de porcelana, a las cuales se les adiciona 2 mL de HNO₃ concentrado, se precalcinan en una parrilla eléctrica durante 10 min. y se llevan a la mufla por 7 h a 750° C. Las cenizas resultantes se solubilizan con 4 mL de HNO₃, 1 mL de HCl y 4 mL de HF, se transfieren a vasos de digestión y se aplica la energía de microondas en dos etapas; en la primera se utiliza de 60 a 160 psi, por 26 min., al finalizar el programa de digestión a las muestras se les adiciona 25 mL de ácido bórico y se aplica la segunda etapa de digestión de 90 a 200 psi durante 43 min. El criterio para establecer el programa de digestión es la regulación de la presión interna del vaso mediante la válvula de seguridad del horno de microondas.

Preparación de estándares. Las soluciones estándar de 100 µg/g como las de 1 µg/g, 2 µg/g y 3 µg/g se preparan a partir de un estándar inorgánico de cromo de 996 µg/g. En todos los casos se igualan matrices con las mismas soluciones empleadas durante la digestión.

Cuantificación de óxido de cromo. Las soluciones resultantes se transfieren a matraces volumétricos de 100 mL, se aforan con agua bidestilada y se procede a su cuantificación por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica. Los parámetros instrumentales utilizados son: longitud de onda 357.9 nm, ancho de ranura 0.2 nm, corriente 7 mA y flama aire-acetileno.

Determinación del coeficiente de digestibilidad aparente

Para el análisis del coeficiente de digestibilidad aparente CDA, se determina la concentración del nutriente en alimento y heces, así como de óxido de cromo tanto en el alimento como en las heces. Durante el paso del alimento por el tubo digestivo no todo lo que se ingiere y se absorbe. La porción que no digiere se excreta como heces. La porción que se absorbe se determina por diferencia entre los nutrimentos ingeridos y excretados y suele expresarse como un porcentaje de la cantidad ingerida, esto es definido como: "coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) y se utiliza la expresión propuesta por Mainard y Loosli, (1969).

$$CDA = 100 - \left[\left(\frac{\% \text{ del indicador en el Alimento}}{\% \text{ del indicador en las Heces}} \right) \left(\frac{\% \text{ de Proteina en las Heces}}{\% \text{ de Proteina en el Alimento}} \right) (100) \right]$$

Cuantificación de óxido de cromo en heces y alimentos (Furukawa y Tsukahara, 1966)

El óxido de cromo es el marcador más ampliamente utilizado durante la evaluación de la digestibilidad en dietas experimentales para peces y camarones. El método aquí presentado es una modificación del propuesto por Furukawa y Tsukahara, a fin de manejar micro muestras durante la determinación del contenido de óxido de cromo en dietas y heces (Olvera *et al.* 1993).

Reactivos

- Ácido nítrico concentrado (grado reactivo)
- Ácido perclórico (grado reactivo)

Materiales y equipo

- Espectrofotómetro
- Digestor Kjeldahl para tubos de 100 mL
- Matraces Kjeldahl de 100 mL
- Matraces volumétricos de 25 mL

Procedimiento

Muela finamente el alimento y las heces, a las cuales, se les habrá eliminado previamente escamas y cualquier otra materia extraña; se mantiene a sequedad. Pesar con precisión de 0.0001 g de 50 mg de muestra, colóquela en un matraz kjeldahl de 100 mL y pase nuevamente la charola para ajustar el peso de la muestra. Adicione 5 mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃) y ponga a digerir en ebullición suave por un mínimo de 30 minutos, hasta que desaparezcan los vapores amarillentos. En caso de que disminuya notablemente la cantidad de líquido y continúe habiendo vapores nitrosos, adicione otros 5 mL de ácido nítrico y siga digiriendo. Al término la solución debe ser clara, de color verdoso y no debe desprender vapores ocres. Deje enfriar.

Ya fría la solución, agregar cuidadosamente resbalando por las paredes del matraz 3 mL de ácido perclórico. Realizar la adición dentro de la campana de extracción y con mucho cuidado, ya que en caso de una digestión incompleta se puede presentar una reacción explosiva. Coloque nuevamente el matraz en el digestor y continúe la ebullición hasta que la solución vire de verde a amarillo limón; apague el digestor y deje enfriar.

Ya frío se debe de formar un anillo rojizo en el borde del líquido; en caso de no formarse o si el líquido se torna verde nuevamente, volver a digerir hasta que el cambio sea permanente.

Pase el líquido frío a un matraz volumétrico de 25 mL, enjuagando el matraz kjeldahl varias veces con agua destilada y afore. Ajuste a 0 el espectrofotómetro con un blanco de reactivos y leer a 350 nm. El blanco se prepara simultáneo a las muestras usando solamente los ácidos y agua destilada.

Cálculos:

- a) Calcule la cantidad de óxido de cromo (mg) presente en la muestra:

$$X = ((Y - 0.0032)/0.2089)/0.25$$

Donde:

Y = absorbancia

0.0032 y 0.2089 son constantes

- b) Calcule el % de óxido de cromo en la muestra:

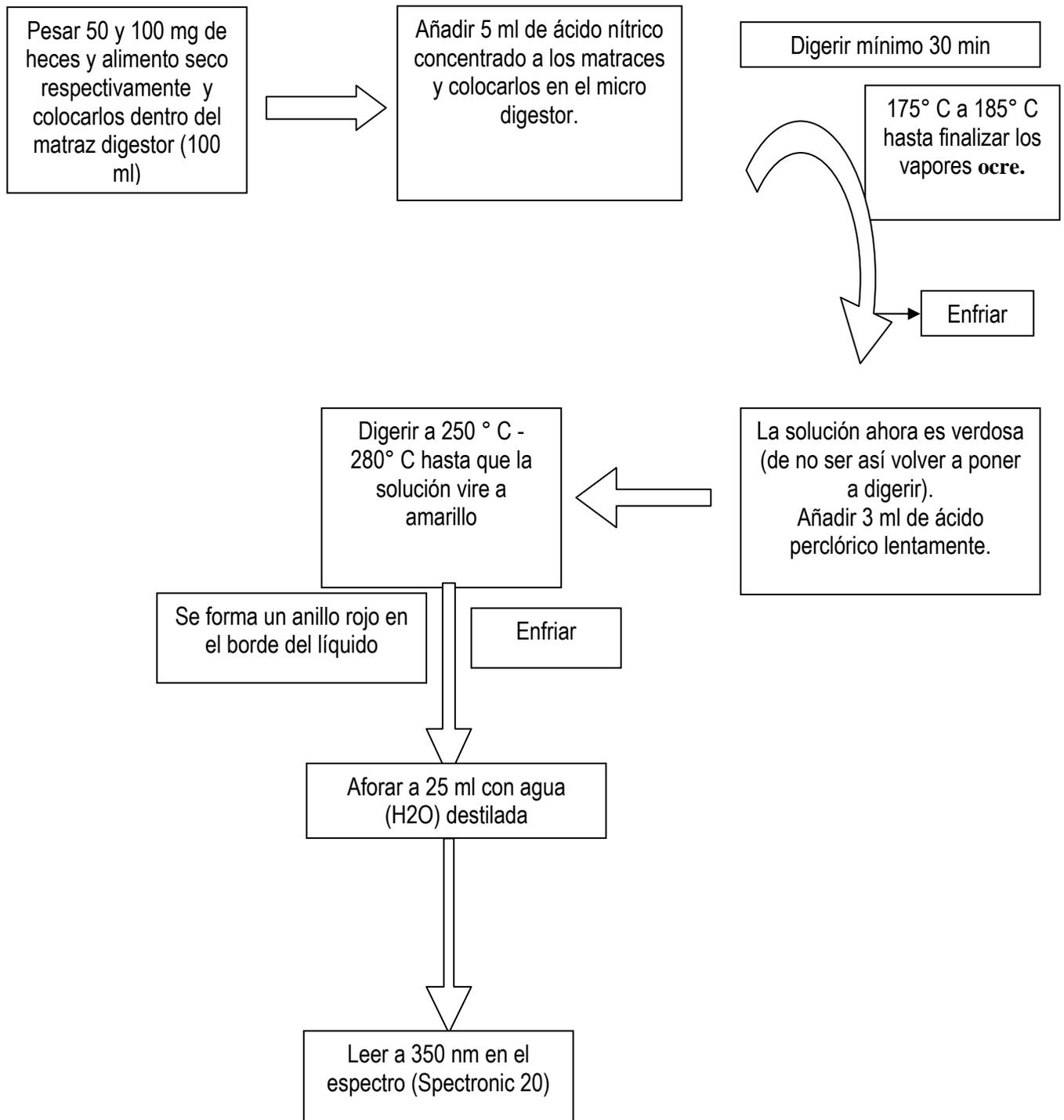
$$\text{O.C. \%} = 100(X/A)$$

Donde:

X = peso del óxido de cromo

A = peso de la muestra

Diagrama de flujo para la determinación de óxido de cromo en alimentos y heces



ANEXO 2. Publicaciones del Grupo

García-Rico, L., Ramos, R.E. and Gutierrez, C.L. 1999. Application of microwave digestion and atomic absorption spectrophotometry for the determination of chromic oxide as a digestibility marker in feed, feces and ileal content. AOAC International. Vol.82, No.3.

Martínez-Palacios, C.A., Cabanillas-Beltrán, H., Ponce-Palafox, J.T., Chávez-Sánchez, Ma. C. and Ross, L.G., 2001. A modified chamber designed for estimation of digestibility in shrimp. North American Journal of Aquaculture, 63: 252-255.

Cabanillas-Beltran H., Ponce-Palafox J.T., Martínez-Palacios C. A., Chávez-Sánchez Ma. C. and Lindsay G. Ross. 2001. Comparison of the digestibility of diets base don fish meal and soybean meal in *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, using different temperatures and salinities for culture. Ciencias Marinas. 2001, 27(4).

Olvera, N.M.A., Martínez-Palacios C. A. y Real de León E. 1993. Cuantificación de óxido de cromo en heces y alimentos. En: Manual de Técnicas para laboratorio de Nutrición de Peces y Crustáceos. FAO-Italia, pp 58-60.

Tesis de Maestría

Cabanillas-Beltrán H. 1996. Estudio de la digestibilidad de harinas de soya en dietas prácticas a diferentes temperaturas y salinidades en el camarón blanco *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C Unidad Mazatlán.

Métodos Utilizados por la Universidad Autónoma de Nuevo León para Determinar la Digestibilidad *in vivo* en Camarón

Denis Ricque-Marie, Martha Nieto-Lopez, Mireya Tapia-Salazar, Claudio Guajardo-Barbosa, David Villarreal-Cavazos, Alberto Peña-Rodríguez y Lucía Elizabeth Cruz-Suárez,
Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apdo. Post. F-56, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México. Tel. +Fax: 52 (81) 83526380.
E-mail: lucruz@fcb.uanl.mx.

Índice	Introducción
	Digestibilidad de dietas - Principios generales y primeros resultados
	Digestibilidad de ingredientes - Principios generales y primeros resultados
	Formulación de las dietas de referencia
	Preparación de dietas para estudios de digestibilidad
	Selección de una técnica de colecta de heces
	Tamaño de los organismos para la colecta de heces
	Manejo de los animales y colecta de heces
	Análisis de cromo y nutrientes en alimentos y heces
	Estabilidad del alimento en el agua y corrección de los valores de digestibilidad por lixiviación
	Conclusión

Introducción

La determinación de la digestibilidad es esencial no solo para formular dietas a bajo costo sino que además es muy útil para la investigación de requerimientos nutricionales, selección de ingredientes con valor nutritivo potencial (en relación con la calidad de la materia prima), y formulación de dietas que minimicen la contaminación del agua (Brown *et al.*, 1989; Akiyama *et al.*, 1999; Hajen *et al.*, 1993; Mendoza-Alfaro, 1993; Romero y Manríquez, 1993). El uso de los datos de digestibilidad de un ingrediente es esencial para la formulación de una dieta con un bajo índice de contaminación sin riesgo para el medioambiente (Lee y Lawrence, 1997).

En el presente artículo se detallan las metodologías que utilizamos en el Programa Maricultura de la FCB – UANL para la realización de los bioensayos de digestibilidad de alimentos e ingredientes, como se han ido modificando las dietas de referencia utilizadas en la determinación de digestibilidad de ingredientes, la corrección de los valores de digestibilidad en función de las pérdidas pre-prandiales de materia seca, proteína u otros nutrientes, y las metodologías que se tienen estandarizadas en el laboratorio para los análisis físico-químicos.

Digestibilidad de dietas - Principios generales y primeros resultados

La determinación de la digestibilidad se puede realizar por dos métodos diferentes: directos o indirectos.

Método directo

Para el método directo o cuantitativo, se requiere de la recuperación total de heces emitidas, a partir de una cantidad conocida de alimento. Smith y Tabrett (2004) lograron resultados confiables con este método. Algunos autores han utilizado el sistema de filtración descrito por Choubert *et al.* (1982), sin

embargo las heces de camarón no se recuperan en su totalidad con este sistema, ya que pueden adherirse a las rejillas del aparato de filtración (Nieto-Lopez, 1995).

Con el método directo, se calcula el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) directamente a partir de su definición:

$$\text{CDA} = (\text{Nutriente ingerido} - \text{Nutriente en heces}) / \text{Nutriente ingerido}$$

lo que equivale a:

$$\text{CDA} = (1 - \text{Nutriente en heces} / \text{Nutriente ingerido}) \quad (\text{ecuación 1}).$$

Debido a la dificultad de estimar con exactitud el consumo de alimento y de coleccionar la totalidad de las heces emitidas por el camarón, en el Programa Maricultura se ha optado por utilizar el método indirecto.

Método indirecto

En el método indirecto, se utiliza un marcador totalmente inerte y, a diferencia del método directo, no se necesita conocer la cantidad exacta de alimento ingerido, además de no ser necesaria la recolección del 100% de las heces. La digestibilidad aparente del alimento (dieta terminada) se calcula con la fórmula siguiente (Maynard *et al.*, 1981):

$$\%DAND = 100 * (1 - (\%CrD / \%CrH) * (\%NH / \%ND)) \quad (\text{ecuación 2}),$$

en donde DAND es el porcentaje de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta, CrD y CrH las concentraciones de cromo en la dieta y en heces, NH y ND las concentraciones del nutriente considerado en heces y dieta.

Esta expresión supone que las concentraciones del nutriente considerado y del óxido de cromo en una misma muestra estén expresadas sobre la misma base en cuanto a humedad, lo que deja la libertad de usar datos en base seca, o en base húmeda si se cuida que el contenido de humedad en la muestra no haya variado entre las determinaciones de óxido de cromo y del nutriente considerado en esta misma muestra. Las ventajas y desventajas de usar concentraciones en base seca se discuten en la sección sobre análisis de alimentos y heces.

Valores de digestibilidad de los alimentos comerciales en México

En la Tabla 1, se muestran algunos resultados, obtenidos por el Programa Maricultura, de alimentos comerciales balanceados en México; esta tabla es un resumen de una serie de trabajos realizados desde 1998 hasta el 2005 (Cruz-Suárez *et al.*, 2002; y otros datos no publicados). Estos resultados demuestran que durante los últimos años los alimentos balanceados de México mejoraron de 6 a 10 puntos en su digestibilidad global (de 66 a 78%), y de 8 a 13 puntos en la digestibilidad de su proteína (de 69 a 74-82%). Desafortunadamente esta mejoría no ha sido uniforme para todas las compañías y en el año 2004 todavía se comercializaron algunos alimentos con valores muy bajos de digestibilidad (66%).

Por el contrario también es evidente que algunas compañías han hecho esfuerzos por utilizar fuentes de proteína de alta calidad, mejorar su proceso de molienda y utilizar carbohidratos de mayor digestibilidad, con lo que han mejorado considerablemente la calidad de su producto,

presentando valores de 84 y 93% de DAMSD y de DAPD respectivamente en el ciclo 2003. En 2005, se vio una mayor homogeneidad entre compañías y se confirmó la tendencia general hacia mejores digestibilidades.

Tabla 1. Digestibilidad promedio de alimentos para engorda de camarón en México de 1998 a 2005 (Cruz-Suárez *et al.*, 2002)

Especie	Año de fabricación y estudio	No de compañías evaluadas	Contenido de proteína en los alimentos %	DAMSD Promedio %	Min-max %	DAPD Promedio %	Min-max %
<i>L. stylirostris</i>	1998-1999	6	36-40	66	45-86	69	46-92
<i>L. vannamei</i>	1998-1999	2	36-38	68	63-73	82	79-84
<i>L. vannamei</i>	2001	2	35-36	72	67-77	82	76-87
<i>L. vannamei</i>	2001	9	35-40	70	65-74	74	65-83
<i>L. vannamei</i>	2002	3	35	68	61-74	72	66-87
<i>L. vannamei</i>	2003	4	35	78	72-84	83	72-93
<i>L. vannamei</i>	2004	11	30-35	72	66-77	77	66-84
<i>L. vannamei</i>	2005	5	30-40	77	75-81	85	83-89

NOTA: Siempre se ha utilizado un alimento UANL de referencia con valores promedio de 78 y 88% para DAMSD y DAPD, respectivamente. En 2005, los valores del control UANL fueron 83 y 88% para DAMSD y DAPD, respectivamente; por otro lado, los valores del 2005 toman en cuenta la lixiviación pre-prandial de nutrientes en el agua.

DAPD = Digestibilidad aparente de la proteína en la dieta.

DAMSD= Digestibilidad aparente de la materia seca en la dieta

Digestibilidad de ingredientes – Principios generales y primeros resultados

Para la determinación de la digestibilidad de un ingrediente, hemos optado en utilizar el método propuesto por Cho y Slinger (1979), donde se usa una dieta de referencia (DR) en la cual el ingrediente a probar se sustituye en un 30% para constituir una dieta prueba o experimental (DE) que contiene 70% de la dieta de referencia.

La digestibilidad de los nutrientes en la dietas (DR y DE) se calcula aplicando la fórmula anterior (ecuación 2). Para determinar la digestibilidad de los nutrientes en el ingrediente, se emplea la siguiente fórmula:

$$\%DANI = (\%DANDE * NDE - 0.7 * \%DANDR * NDR) / (0.3 * NI) \quad (\text{ecuación 3})$$

en donde %DANI es el porcentaje de digestibilidad aparente del nutriente en el ingrediente a evaluar, %DANDE y %DANDR son los porcentajes de digestibilidad aparente del nutriente en la dieta experimental y en la dieta de referencia, NDE y NDR son las concentraciones de nutriente en la dieta experimental y en la dieta de referencia, y NI es la concentración de nutriente en el ingrediente.

NDE, NDR y NI se expresan en base húmeda y corresponden a muestras tomadas al momento de realizar la mezcla; para NDE y NDR, podrían ser concentraciones del nutriente analizadas en las dietas procesadas, pero normalizadas al contenido de humedad que contenían las mezclas antes de ser procesadas, en acuerdo con Smith *et al.*, (2008, en este mismo libro); otra opción es considerar para NDE el valor esperado calculado a partir de NDR y NI, como lo proponen Bureau y Hua (2006), de la siguiente manera:

$$NDE = 0.7 NDR + 0.3 NI$$

En todo caso, es preciso asegurarse de que el valor analizado de NDE sea lo más cercano posible al valor esperado $0.7NDR+0.3NI$, usando valores normalizados a la humedad que tenían la mezcla de referencia (DR), el ingrediente a probar (I) y la mezcla resultante (DE) al momento de mezclar, ya que al procesar las dietas (adición de agua, peletizado y secado), sus humedades se modifican. Si el valor de NDE analizado y normalizado a la humedad correcta no corresponde al valor esperado, hay que rehacer los análisis hasta disminuir el error analítico a un nivel aceptable. La comparación de las diferencias (NDE analizado - NDE esperado) para los diferentes ingredientes a evaluar permite detectar alguna incongruencia para un ingrediente particular. Si el promedio de estas diferencias está centrado sobre cero, es probable que el valor analítico de NDR sea muy cercano al verdadero; en este caso, una diferencia excesiva para algún ingrediente se debe atribuir a un valor erróneo de NI y/o de NDE para este ingrediente.

En la Tabla 2, se muestran resultados obtenidos por el Programa Maricultura de algunos ingredientes comúnmente usados en los alimentos para camarón.

Tabla 2. Digestibilidad aparente de la proteína en dietas (DAPD) e ingredientes (DAPI) en *Litopenaeus stylirostris* (g) (Salinas-Miller, 2000)

Ingrediente	%DAPD	%DAPI
Gluten de trigo	93.6	94.6
Harina de trigo	90	71.2
Pasta de soya	91.9	90.7
Harina de pluma	81.1	66.8
Harina de camarón	89.9	82.9
Harina de calamar	91.5	89.1
Harina de pescado A	88.4	81.8
Harina de pescado B	87.5	79.6

Formulación de las dietas de referencia

La dieta de referencia utilizada en nuestro laboratorio ha sido nutricionalmente completa y balanceada a los requerimientos del camarón (Tabla 3). Para la elaboración de la dieta experimental se llevaban todos los ingredientes a constituir el 69%, se adicionaba 1 % de cromo y el ingrediente a probar se incluía al 30%. Sin embargo al incluir el ingrediente a probar la dieta experimental quedaba desequilibrada lo cual era más grave para unos ingredientes que para otros.

Tabla 3. Ejemplo de las primeras dietas para bioensayo de digestibilidad *in vivo* de ingredientes.

INGREDIENTE (%)	DR	DE
Pasta de soya	7.67	69
Harina de trigo	68.36	
Harina de camarón	5.71	
Gluten de trigo	7.14	
Lecitina de soya	2.43	
Aceite de pescado	4.29	
Colina	0.044	
Inositol	0.109	
Vitamina C	0.036	
Mezcla vitamínica	0.314	
Monofosfato de sodio	3.57	
Cr ₂ O ₃	1.00	
H. Pescado Experimental	----	30

Por esta razón, en algunos experimentos se desarrollaron dietas de referencia específicas para cada ingrediente a evaluar que están sobradas de nutrientes. Por ejemplo en la Tabla 4, se muestra un experimento de reemplazo de harina de pescado por harina avícola en la que se evaluó la digestibilidad de cada una de las dietas y además la digestibilidad tanto de la harina de pescado como de la avícola, por lo tanto se formularon dos dietas de referencia una para cada ingrediente: la DR-1 para la harina de pescado *vs.* DE-1 y la DR-2 para la harina avícola *vs.* DE-5 en donde los micro ingredientes permanecen constantes.

Tabla 4. Ejemplo de la composición de las dietas experimentales y de referencia para bioensayos de reemplazo y digestibilidad *in vivo* de ingredientes (g base húmeda / Kg. mezcla de ingredientes) (Cruz-Suárez *et al.*, 2007)

Dieta Nivel de Reemplazo	1 0%	2 35%	3 50%	4 65%	5 80%	Referencia Dieta 1	Referencia Dieta 2
Harina de subproductos avícolas	0.00	137.23	196.05	254.86	313.67	---	---
Harina de pescado Omega	196.05	127.43	98.02	68.62	39.21	---	57.28
Harina de pescado Mexicana	196.05	127.43	98.02	68.62	39.21	---	57.28
Trigo suave	445.38	450.55	451.43	452.40	453.56	725.32	652.55
Harina de camarón	37.50	37.50	37.50	37.50	37.50	61.91	54.78
Harina de Kelp	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	59.44	52.59
Harina de Soya	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	49.53	43.82
Lecitina	35.00	29.74	29.08	28.41	27.75	57.78	40.54
Aceite de pescado	18.43	18.53	18.30	18.00	17.50	30.42	25.56
Vitaminica mezcla	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Mezcla mineral	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
ETQ (Dresquin)	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Check mold	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Vitamina C	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cr ₂ O ₃	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

En otro estudio, en donde se pretende determinar la digestibilidad de proteína, materia seca, energía y aminoácidos de los principales ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de alimentos en México, debido al número importante de dietas a fabricar y con el afán de asegurar la mayor homogeneidad de composición de las dietas de referencia usadas en bioensayos sucesivos, se decidió formular una sola dieta de referencia para todo el proyecto con un lote grande de ingredientes la cual se

mando maquilar en una empresa peletizadora de alimento comercial. Esta dieta tipo comercial no posee óxido de cromo por lo que, para la elaboración tanto de la dieta de referencia como de las experimentales, fue molida y remanufacturada incluyendo 98% de la dieta e incorporando alginato de sodio (1%) como aglutinante y óxido crómico (Cr_2O_3) (1%) como marcador (tabla 11).

Sin embargo, se presentó una alternativa para la formulación de las dietas experimentales. En un primer tiempo se formularon dietas experimentales del tipo 1, en las cuales el ingrediente de referencia (dieta comercial molida) estaba incorporado al 68%, dejando el espacio necesario para la incorporación de 1% de óxido crómico y 1% de alginato; esta fórmula tipo 1 tiene el defecto de obligar a un ajuste de las fórmulas para el cálculo de la digestibilidad del ingrediente, ya que la dieta experimental no incorpora estrictamente 70% de la dieta referencia. Por lo tanto, en un segundo tiempo, se adoptó para las dietas experimentales la fórmula tipo 2, que permite aplicar sin mayores complicaciones las ecuaciones para el cálculo de digestibilidad, ya que se mantienen las proporciones de ingrediente de referencia, alginato y cromo tales como están en la dieta de referencia (Tabla 5).

Tabla 5. Ejemplo de dietas de referencia y experimentales actuales para bioensayo de digestibilidad *in vivo* de ingredientes

INGREDIENTE (%)	Dieta comercial	D. Ref	D. Exp Tipo 1	D. Exp Tipo 2
Dieta tipo comercial (de composición conocida y con ingredientes de alta calidad manufacturada especialmente para el proyecto)	100	98	68	68.6 (=98x0.7)
Alginato de sodio	0	1	1.00	0.7
Cr_2O_3	0	1	1.00	0.7
H. Experimental	----	----	30	30

Preparación de dietas para estudios de digestibilidad

Pre-tratamiento del Oxido de cromo

En el Programa Maricultura utilizamos como marcador inerte óxido de cromo grado analítico (marca IMPEX Continental, número de catálogo 12233) previamente tratado mediante una serie de lavados como pre-tratamiento para eliminar impurezas solubles que puedan afectar la evaluación de la digestibilidad.

La técnica que utilizamos en el laboratorio para medir el contenido de cromo tanto en dietas como en heces (Bolin *et al.*, 1952) se basa en la oxidación del cromo trivalente (Cr III) presente en el óxido de cromo insoluble Cr_2O_3 , a cromo hexavalente (Cr VI) presente en el óxido de cromo soluble hexavalente CrO_3 , el cual tiene color amarillo y absorbe la luz visible azul de longitud de onda 438nm. Es posible que el reactivo Cr_2O_3 contenga cantidades traza de CrO_3 , que es soluble y potencialmente tóxico; por ello el cromo antes de ser agregado a las dietas es sometido a una serie de lavados mediante el siguiente protocolo:

1.- Se coloca el óxido de cromo (500g) en un vaso de precipitado de 3500ml y se agrega 1.5L de agua destilada, se hierve por 10 min.

2.- Se espera a que se asiente el óxido de cromo y se sifonea la solución sobre-nadante, tomando una muestra de la misma para su lectura en el espectrofotómetro.

3.- Para la lectura en el espectrofotómetro la muestra de sobre-nadante es filtrada (0.45 micras) para eliminar las partículas que pueden interferir en la lectura.

4.- La lectura en el espectrofotómetro se hace a 438nm.

Se repiten los pasos anteriores cuantas veces sea necesario hasta obtener una absorbancia igual o menor a .001 en el sobre-nadante (Tabla 6).

5.- Posteriormente, se seca el óxido de cromo en un horno de convección a 130°C entre 12 y 24hrs.

6.- Se deja enfriar y se muele para posteriormente guardarlo en el frasco correspondiente, etiquetándolo como cromo lavado.

Tabla 6. Absorbancia obtenida después de lavado del Cr₂O₃

# de lavadas	Lectura en nm	Absorbancia
1	438	0.0502
2	438	0.0130
3	438	0.0005

Reproceso de dietas comerciales

Cuando se desea determinar la digestibilidad de una dieta comercial a la que no se le ha incluido el óxido de cromo (o algún otro marcador), es necesario reprocesarla, es decir molerla para luego adicionar el marcador y peletizarla de nuevo. Sin embargo, al momento de re-peletizar, la dieta pierde estabilidad en el agua. El poder aglutinante de algunos ingredientes como los almidones se incrementa con el tratamiento de calor al peletizarla por primera vez gracias a la gelatinización del almidón (Hilton, Cho y Slinger, 1981; Murai, Sumalangky y Pascual, 1981; Hastings, 1971; Viola, Gur y Zohar, 1986), pero cuando se reprocesa, esta capacidad se pierde y se hace necesaria la adición de agentes aglutinantes.

En el Programa Maricultura utilizamos como agente aglutinante, alginato de sodio de alta viscosidad. Aunque los alginatos son muy utilizados como agentes aglutinantes en dietas para camarón su efecto sobre la digestibilidad de los nutrientes no ha sido muy estudiado (Lee y Lawrence, 1997), pero en peces hay muchos reportes que indican que el tipo de alginato que se utilice es importante. Storebakken y Austreng (1987) encontraron que al incluir 6 tipos diferentes de alginato en dietas al 5% (tres de alta viscosidad y tres de baja) todos disminuyen la digestibilidad aparente de nitrógeno, lípidos, ceniza y calcio; al aumentar el contenido de humedad de los excrementos, la digestibilidad de fósforo no se vio afectada. Sin embargo la reducción en la digestibilidad era mayor cuando se incluía alginato de baja viscosidad.

La cantidad de alginato que se ha utilizado en el reproceso de las dietas comerciales en nuestro laboratorio ha ido variando: en un principio se utilizaba 3% de alginato + 1% hexametáfosfato de sodio para asegurar la estabilidad de las dietas en el agua; esta cantidad ha ido disminuyendo sin que se de un decremento en la estabilidad de los pelets y recientemente se llevó a cabo un experimento en el cual se evaluó el efecto de la inclusión de diferentes aglutinantes (D1=1%alginato, D2=6%harina de Kelp+ 1%alginato y D3=6%gluten de trigo) sobre la pérdida de materia seca, digestibilidad de proteína, materia seca, energía y aminoácidos (Cruz Suárez *et al.*, 2002; Ricque *et al.*, 2006). Los resultados mostraron que la pérdida de materia seca fue de 7.51, 9.71 y 6.09% respectivamente, siendo todas

significativamente diferentes ($P=0.001$), pero la digestibilidad de proteína, materia seca y energía no presentaron diferencias aun después de corregir por la lixiviación (Tabla 7).

Tabla 7.- Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína, materia seca y energía (DAPD, DAMSD y DAED respectivamente) en dietas con diferentes aglutinantes, y correcciones por las pérdidas debido a la lixiviación antes de la ingestión (DAPDLIX, DAMSDLIX)
(Datos no publicados)

	Dieta	Mean	Dev.Std	ANOVA
DAPD	1	84.3	6.8	0.684
	2	86.0	3.6	
	3	87.1	1.3	
DAMSD	1	74.8	7.6	0.445
	2	74.4	4.8	
	3	79.0	3.0	
DAED	1	81.2	5.4	0.552
	2	81.9	4.0	
	3	84.4	2.9	
DAPLIX	1	79.9	8.7	0.765
	2	81.4	4.8	
	3	83.0	1.8	
DAMSLIX	1	72.8	8.2	0.352
	2	71.6	5.3	
	3	77.7	3.2	

El protocolo para la elaboración de las dietas comerciales es el siguiente (Diagrama # 1 a y b): las dietas originales son molidas con molino Pulvex (criba 1 mm), se les adiciona 1% de óxido de cromo (marca IMPEX Continental, número de catálogo 12233) y 1% de alginato de sodio (marca ICN, número de catálogo 154723, alginato de sodio de alta viscosidad) como aglutinante. Estos ingredientes junto con el alimento son mezclados durante 15-20 min, luego se adiciona de 350 a 450 ml de agua caliente y se mezcla nuevamente durante 20 min. Finalmente la masa se extruye en un molino de carne equipado con un dado que posee orificios de 1.6mm de diámetro. Los pellet son secados en una estufa de convección por 8 min a 100°C y se dejan enfriar a temperatura ambiente 24 horas. Finalmente el alimento es almacenado a 4°C.

Elaboración de dietas experimentales

Cuando se trata de dietas experimentales, el protocolo que seguimos para la elaboración es el siguiente (Diagrama # 2 a y b) (Cruz-Suarez, *et al.* 2001): Primeramente se incluye en la formulación de la misma 1% de óxido de cromo. Durante la elaboración, se muelen todos aquellos ingredientes con un tamaño de malla < 500 micras los ingredientes que lo necesiten en un molino marca Tecator modelo cyclotec (malla 35, 500 micras) y se pesan conforme a lo indicado en la fórmula (a una sensibilidad de 0.001 g para micros y 0.01 g para macros), se mezclan posteriormente en una batidora Kitchen Aid de 5 lt. Primeramente se mezclan los ingredientes de mayor proporción en la fórmula durante 10 min. hasta obtener una mezcla homogénea de la cual se toma una pequeña porción para añadir las vitaminas y el marcador, y posteriormente es re-incorporada a la mezcla total y se mezcla nuevamente por 5 min. La lecitina y el aceite de pescado, se calientan a baño maría antes de adicionarlos, se añaden lentamente a la mezcla y se mezcla por 10 min., finalmente se agrega agua caliente y se mezcla por 15 min.

La mezcla de alimento es pasada por un molino de carne Torrey con un cedazo de 1.6 mm. de diámetro. El alimento alcanza una temperatura que varía de 75-90°C al salir del barril del molino. En promedio para pasar un kilo de mezcla se requiere de 30-40 min. Los pellets son secados a 100°C por 8 min, se deja enfriar durante 24 horas a temperatura ambiente y se conservan a 4°C en recipientes herméticos.

Dietas Comerciales



Diagrama # 1a. Reproceso de dietas comerciales para estudios de digestibilidad – muestreo y molienda

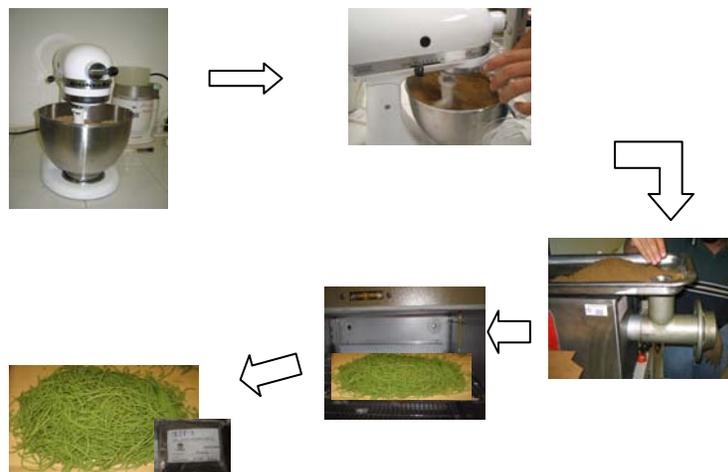


Diagrama # 1b. Reproceso de dietas comerciales para estudios de digestibilidad – mezcla y extrusión

Dietas Experimentales



Diagrama # 2a. Elaboración de dietas experimentales para estudios de digestibilidad – molienda

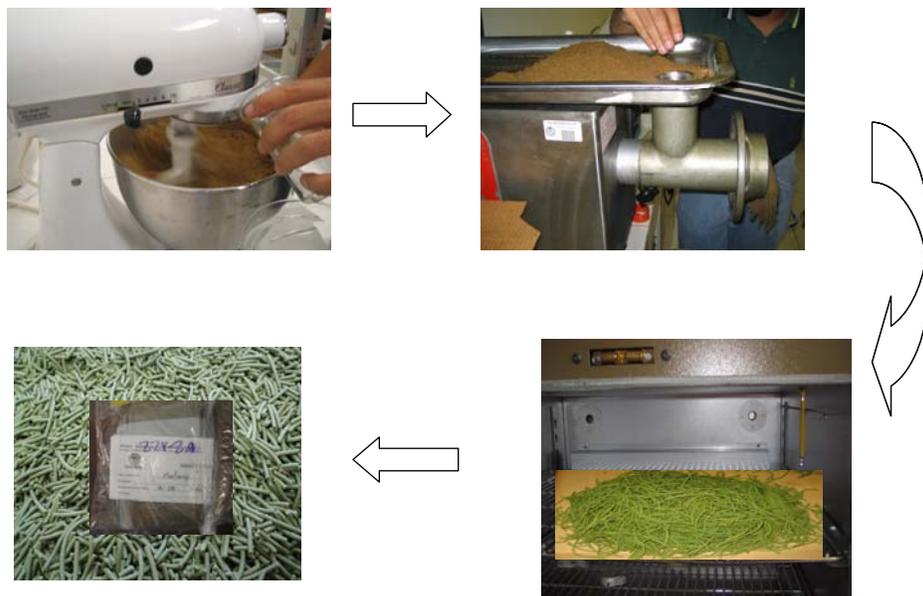


Diagrama # 2b. Elaboración de novo de dietas experimentales para estudios de digestibilidad – extrusión

Selección de una técnica de colecta de heces

La selección de un método adecuado para la colecta de heces en el agua es esencial para una óptima estimación de la digestibilidad. En peces ya han sido realizados estudios comparativos de estas metodologías las cuales son: las que recogen las heces del agua del acuario a) sifoneo (Smith *et al.*, 1985; Akiyama, 1989), b) filtración (Choubert *et al.*, 1982; Choubert, 1983) y c) columna de sedimentación o decantación (Cho, 1987); y las que extraen el contenido del último tramo del tubo digestivo a) masaje abdominal (Nose, 1964), b) disección (Windel *et al.*, 1978) y c) succión anal (Austreng, 1978).

Estos tres últimos métodos implican la manipulación del organismo, stress y la adición a las heces de fluido y epitelio intestinal, lo cual provoca una sub-estimación de la digestibilidad, por otro lado debido a que el tamaño de los camarones que son utilizados en las pruebas de digestibilidad es muy pequeño (3-5g) y la cantidad de heces que se requiere coleccionar es muy grande (8g húmedos) estas últimas metodologías son imposibles de utilizar en camarón.

En 1995, Nieto-López realizó un trabajo en el que se probaron tres diferentes métodos de colecta de heces (decantación, filtración y sifoneo) y se determinó con cada uno la digestibilidad aparente de la proteína y de la materia seca (Tabla 8) así como la cantidad de heces obtenidas (Tabla 9).

Tabla 8.- Resultados promedio de digestibilidad de proteína (DP) y materia seca (DMS) con diferentes métodos de colecta de heces. (Nieto-López, 1995).

METODO	%DP	SD	%DMS	SD
Sifoneo	90.7	7.6	79.5	9.6
Filtración	78.9	16.7	77.3	13.7
Decantación	84.9	11.0	71.9	30.5
Probabilidad (ANOVA)	0.556		0.905	
Probabilidad (BARTLETT)	0.718		0.377	

SD= Desviación estándar.

Tabla 9.- Cantidad de heces obtenidas según el método de colecta (Nieto-López, 1995)

METODO	mg heces/ Acuario/ semana
Sifoneo	158.9
Filtración	137.3
Decantación	61.53

Se observó que utilizando el método de decantación era muy difícil separar las excretas del alimento, debido a los hábitos alimenticios de los camarones: dilaceran el alimento antes de ingerirlo, lo que crea migajas finas; por otro lado, la similitud de densidad entre el alimento y las heces dificulta la separación. En contraste, por medio del método de sifoneo y filtración, se obtuvo fácil y rápidamente una buena cantidad de heces. Entre estos dos métodos se eligió el de sifoneo por las siguientes razones:

a) Se contaba con las instalaciones necesarias y adecuadas para realizar mayor cantidad de replicados (48 acuarios).

b) El tiempo de tránsito intestinal del alimento en los camarones es menor a una hora (a diferencia de los peces), y por lo tanto 24 hrs. de colecta no son necesarias, ya que si el organismo evacuó las excretas a más tardar en 1 hora, estas pueden ser almacenadas a baja temperatura (-12° C) en menor tiempo y se conservan menos alteradas.

c) Con el método de filtración, algunas heces tardaban mucho tiempo en salir del acuario, ya que se quedaban pegadas a las paredes del cono en el fondo del acuario y con ello su exposición a la corriente de agua era mayor.

Tamaño de los organismos para la colecta de heces

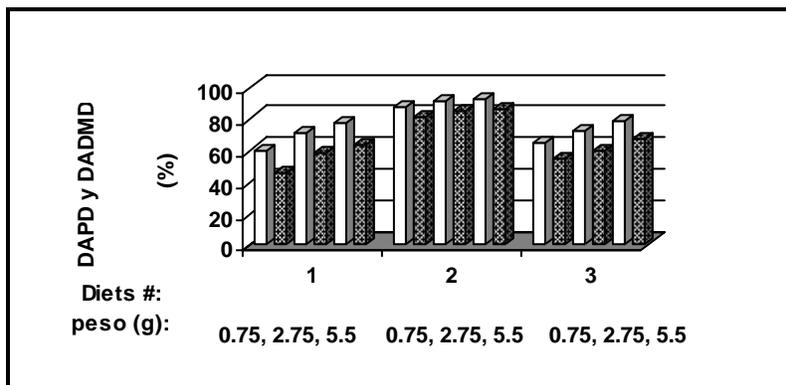
En los diferentes bioensayos que hemos realizado se han utilizado camarones de diferentes procedencias y de diferentes tamaños.

En un principio realizamos una serie de experimentos en los que se utilizaron animales de diferente talla para ver si presentaban diferencias en la digestibilidad, por ejemplo en la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la digestibilidad de proteína de dos harinas de pescado (163/94 y 539/93) que fueron producidas de la misma materia prima, pero secadas a alta y baja temperatura respectivamente (afectando la digestibilidad), y que habían sido previamente evaluadas en Mink. Observamos que la diferencia entre los valores bajos y altos de digestibilidad de proteína era más amplia en camarones jóvenes (1g, 0.4 o 1.2 g) que en camarones grandes; el experimento con camarones de 17g se realizó en IFREMER, Tahití (Cuzon y Aquacop, 1995, comunicación personal).

Tabla 10. Coeficientes de digestibilidad aparente de proteína (%) de dos harinas de pescado en camarones de diferentes tallas y diferente especie Referencia (Datos no publicados)

	Harina de pescado #163	Harina de pescado #539	Diferencia
Mink (IFOMA)	84	95	+11%
0.4g <i>P. vannamei</i> (UANL)	66	106	+40%
1g <i>P. vannamei</i> (UANL)	41	83	+42%
1.2g <i>P. stylirostris</i> (UANL)	59	95	+36%
17g <i>P. stylirostris</i> (IFREMER)	81	94	+13%

En otro experimento se evaluó la digestibilidad de proteína y materia seca de 3 alimentos comerciales (producidos en una planta comercial pero incluyendo el 1 % de óxido de cromo), y se encontró un efecto claro del tamaño de camarón en la digestibilidad *in vivo*: la digestibilidad aparente fue más alta en *P. stylirostris* más grande (Figura 1).



DAPD = Digestibilidad aparente de proteína de la dieta (blanco).
DADMD = Digestibilidad aparente de material seca de la dieta (gris).

Figura 1. Digestibilidad aparente de proteína y materia seca de 3 alimentos comerciales en 3 tallas diferentes de camarón azul del Pacífico (0.75, 2.75 y 5.5 g). (Datos no publicados).

Por otro lado, en lo que respecta a la procedencia de los organismos, realizamos un experimento en donde se corrieron dos bioensayos de digestibilidad con lotes de camarones (*L. vannamei*) de diferente procedencia: - el primer lote de 500 *L. vannamei* de 4.5 – 6g procedía de Mérida, Yucatán (Industrias Pecis), y presentaba sintomatología de una infección por bacterias lo cual suponía su estado no óptimo para el desarrollo del bioensayo;

- el otro lote de aprox 70 *L. vannamei* de 3.5-5.0g procedía del CIBNOR unidad La Paz el cual se considero como bueno y libre de patógenos para el desarrollo del bioensayo.

En este experimento se evaluó la digestibilidad de proteína, materia seca y energía de 3 diferentes alimentos, utilizando 4 acuarios replicados con 5 camarones por acuario para ambos bioensayos (con animales de Pecis o del CIB NOR) y no se encontraron diferencias significativas (Figura 2) para ninguno de los 3 parámetros evaluados.

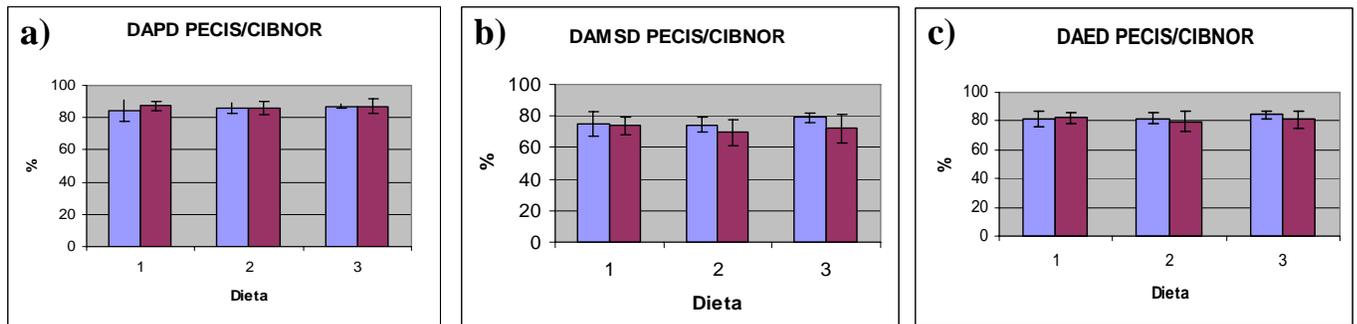


Figura 2.- Digestibilidad aparente de proteína (a), materia seca (b) y energía (c) de 3 diferentes dietas utilizando organismos de dos lotes diferentes de camarones *L. vannamei*. (Datos no publicados).

Sin embargo, en la Figura 3 se muestra la cantidad de heces colectadas (peso húmedo) por dieta durante los días en que se realizó el bioensayo, donde se observa que los camarones provenientes de Industrias Pecis tuvieron un periodo de colecta notoriamente menos prolongado (13 días) que los del CIBNOR (19 días) para completar los 2 gramos necesarios para el análisis; también podemos observar que en ambos casos para la dieta 2 se logró colectar una mayor cantidad de heces húmedas.

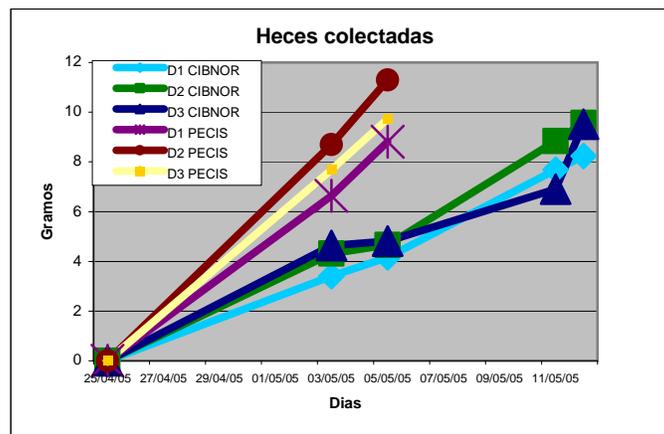


Figura 3.- Cantidades acumuladas de heces colectadas (peso fresco) de 3 diferentes dietas utilizando organismos de dos lotes diferentes. (Datos no publicados).

Manejo de los animales y colecta de heces

Protocolo para bioensayos de digestibilidad (Diagrama # 3).

Antes de iniciar una prueba para determinar la digestibilidad ya sea en dietas o ingredientes se solicita un envío de organismos de alguna granja o laboratorio de producción y al arribar a la sala de bioensayos son aclimatados a las condiciones de la sala durante cinco días antes de empezar el experimento recibiendo un alimento comercial. Durante este periodo, son separados en clases de talla, para seleccionar camarones en el rango de talla más estrecho posible alrededor de 5 g (esto puede cambiar dependiendo del objetivo del experimento). De cada clase de talla seleccionada, el mismo número de camarones es distribuido en cada acuario para obtener un patrón de distribución de pesos iniciales similar en todos los acuarios. Se trabaja con 4 replicados (4 acuarios) para evaluar cada dieta y con 7-10 camarones juveniles *L. vannamei* por acuario. Los tratamientos son asignados al azar en 4 bloques, cada uno con el número de acuarios correspondiente al número de dietas. Al siguiente día de distribuir los animales en los acuarios, los camarones muertos son reemplazados durante el lapso de 2 días (con el fin de compensar la mortalidad por manejo) y se inicia la alimentación con las dietas a ser evaluados por un período de 2 días (para aclimatarlos a las dietas experimentales) alimentándolos dos veces al día a saciedad, no en exceso. La mortalidad y los restos de alimento son registrados diariamente por la mañana.

Se emplean acuarios de fibra de vidrio de de 60 o 120 L (35cm altura de agua), cada uno con un sistema de recirculación interna ("air lift"). El sistema es monitoreado registrando diariamente la temperatura y la salinidad y semanalmente el pH, amonio, nitratos y nitritos.

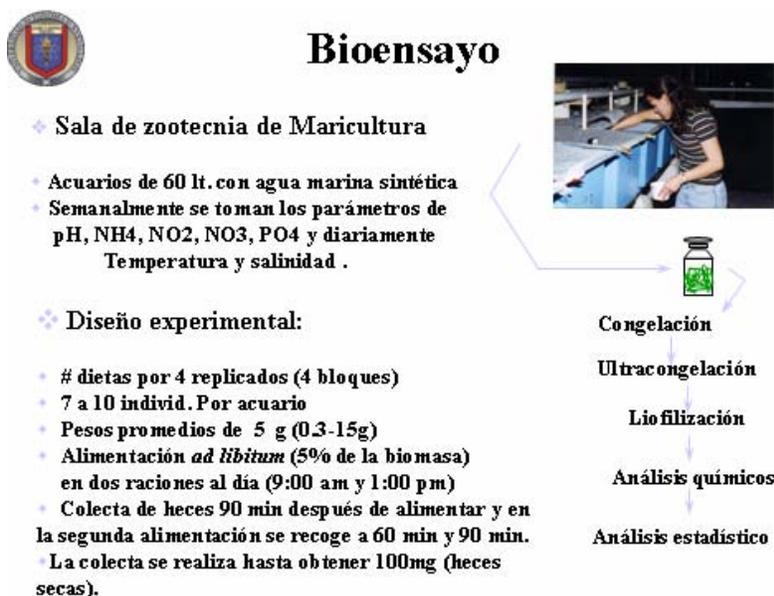


Diagrama # 3. Protocolo para bioensayo de digestibilidad

Protocolo para la colecta de heces (Diagrama # 4 a y b)

Al tercer día de aclimatación a las dietas se inicia la colecta de heces, para ello a las 8 AM se sifonean los tanques para eliminar los residuos fecales y de alimento residuales del día anterior. De existir camarones muertos son removidos y se registra en la bitácora del experimento. Se alimentan los camarones entre las 9 y 10 AM, iniciando con una cantidad de alimento igual al 5% de la biomasa presente en cada acuario. Las heces son colectadas por sifoneo con ayuda de una manguera de plástico tratando en lo posible de colectar solo las heces (en caso de ser poca la cantidad de heces se utiliza un gotero de plástico). La colecta se inicia 90 minutos después de haber distribuido el alimento; de ser necesario se hace un repaso en los acuarios para una nueva colecta de heces del mismo alimento; las heces son colocadas en recipientes de unicel para ser inmediatamente enjuagadas con agua destilada, con la finalidad de eliminar el exceso de sales, y eventualmente separar restos de alimento. Las heces son posteriormente almacenadas en frascos de vidrio individuales, previamente rotulados con el número del acuario, se conservan en congelación (-20°C). Este procedimiento se repite nuevamente distribuyendo una segunda ración de alimento entre las 1-2 PM, para su posterior recolecta a los 60 y 90 min.

El protocolo de colecta se lleva a cabo diariamente hasta juntar un mínimo de 1- 8g de heces en base húmeda (dependiendo del tipo y cantidad de análisis a realizar). Diariamente se registra en la bitácora los animales muertos, mudas, cantidad de alimento distribuido, temperatura (25-30° C) y la salinidad (28-30 ppm).

Una vez que se colectó la cantidad requerida de heces, se liofilizan y se mantienen a -20° C hasta su análisis.

Protocolo de colecta



Diagrama # 4 a. Protocolo de colecta de heces de camarón – colecta de heces

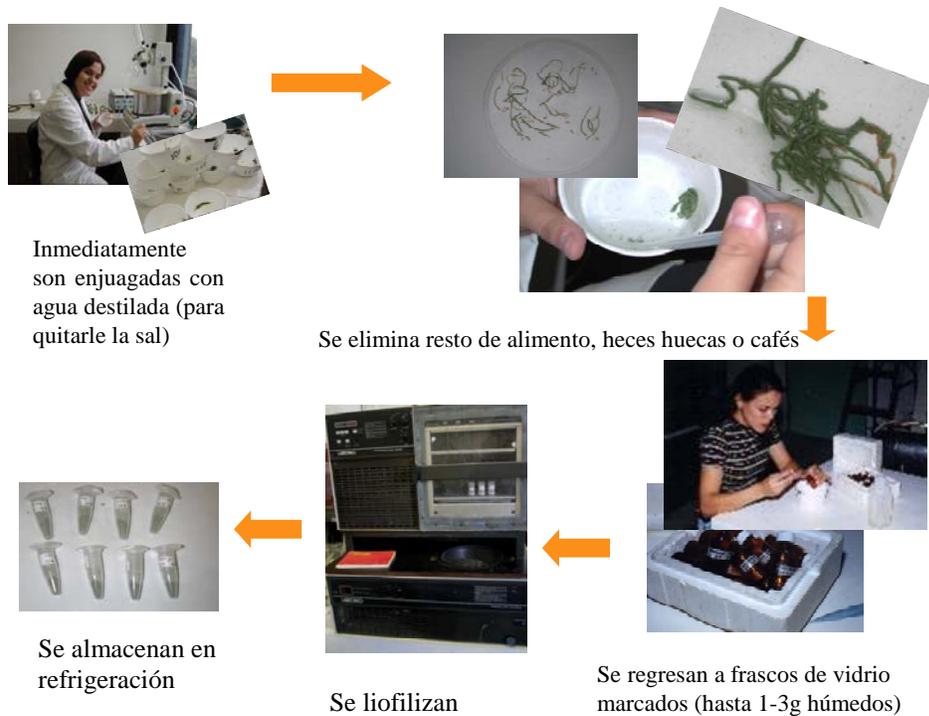


Diagrama # 4 b. Protocolo de colecta de heces de camarón – proceso de las heces

Análisis de cromo y nutrientes en alimentos y heces

Micrométodo para determinación de cromo y proteína

Como se mencionó anteriormente, determinamos el óxido de cromo con el método Bolin *et al.* (1952); el digesta obtenido con los reactivos del método Bolin se puede usar para determinar la proteína sobre la misma muestra por medio de un método micro- Kjeldhal modificado según Nieto *et al.* (1997), de tal manera que se pueden realizar las dos determinaciones con una muestra de solo 30 mg de heces secas. Esta adaptación es de mucha utilidad en caso de escasez de muestra de heces, frecuente en experimentos con camarón, sin embargo es importante realizar el análisis de cromo y proteína en las dietas e ingredientes experimentales con el mismo método para asegurar la homogeneidad y congruencia de los resultados entre ingrediente, dieta y heces.

Nuestra experiencia es que la variación analítica de la determinación de proteína en heces con este método es mucho menor que la variación biológica entre las muestras de heces obtenidas de grupos replicados de camarón mantenidos en acuarios diferentes, lo que valida su uso en cierta medida; sin embargo, la determinación de proteína por el método Dumas es más rápida, precisa y confiable, aunque necesita una muestra de 100 mg mínimo, por lo que la preferimos en caso de tener muestras de heces en cantidad suficiente.

Los otros elementos de la composición bromatológica de los alimentos se determinan utilizando los siguientes métodos: Soxhlet (Tecator, 1983) para lípidos, AOAC (942.05, 1990) para ceniza y A.O.A.C. (962.09, 1990) para fibra. El extracto libre de nitrógeno será calculado por diferencia. La energía bruta

es determinada mediante una bomba calorimétrica modelo Parr 1425, siguiendo la metodología indicada en el manual del equipo (Parr, 1992).

Concentraciones de cromo y nutrientes en base seca o húmeda para el cálculo de digestibilidad en dietas

En el Programa Maricultura, actualmente se están usando concentraciones en base seca, con las precauciones siguientes:

- en el caso de las muestras de heces, estas se liofilizan por 48 hrs y se pesan (para tener una primera aproximación de la cantidad de muestra seca disponible y de la humedad de la muestra original por diferencia con el peso húmedo original). Se muelen en un mortero, se pesan y se secan en un horno con ventilación a 100°C por 16 hrs, se dejan enfriar en un recipiente desecador por 15 minutos y se pesan de nuevo (con el objeto de determinar la humedad residual del producto liofilizado). Cabe recalcar que en la cámara de pesado de la balanza analítica se coloca un vaso con silica-gel para eliminar la humedad en el ambiente que rodea el plato de la balanza. Se almacenan en frasco de vidrio, en congelación si es por mucho tiempo. Como regla general, para asegurarse que la base seca se mantenga constante en las muestras de heces, es necesario volver a secar las muestras inmediatamente antes del análisis, usando una termo-balanza OHAUS a 130°C por 10 minutos (este aparato puede secar por sesión hasta 3 muestras de 100mg cada una), para posteriormente colocarlas en el recipiente desecador por 10 minutos y pesarlas inmediatamente.

- en el caso de las dietas, la principal precaución que se debe de tener es determinar la humedad de la muestra justo antes de efectuar el análisis. De esta manera se podrá determinar su valor real en base seca.

Sin embargo, puede resultar contraproducente:

- trabajar con muestras secadas al horno justo antes de pesarlas, cuando no se usan correctamente las precauciones necesarias (por ejemplo, cuando no se cuida regenerar a tiempo el silica-gel en el recipiente de desecación o en la balanza); en este caso, o con un operador inexperimentado, la muestra se re-hidrata antes de ser pesada, por ser su humedad demasiado inestable en el ambiente del laboratorio, y el procedimiento de pesaje se complica inútilmente

- calcular concentraciones en base seca a partir de contenidos de humedad imprecisos (sin replicación o con solo dos replicados, o con tiempos de desecación insuficientes), porque aumenta el error analítico en los resultados, y, en este caso, solo complica el procedimiento del cálculo y aumenta la probabilidad de confusiones.

Cuando no se tiene la seguridad de trabajar correctamente con muestras secas, es preferible determinar las concentraciones de cromo y nutrientes en muestras semi-secas, con las siguientes reglas:

- usar muestras de alimento o heces con humedades de 5-10%, suficiente altas para evitar una rehidratación rápida en el ambiente del laboratorio y suficiente bajas para evitar la formación de hongos.

- mantener las muestras en equilibrio térmico con el ambiente del laboratorio durante el periodo en que se analizan el cromo y los nutrientes, es decir evitar meter y sacarlas al refrigerador, para evitar condensación de humedad en las muestras frías recién salidas del refrigerador, lo que acelera su hidratación (esta precaución también es válida al trabajar con muestras secas).

- monitorear el contenido de humedad en las muestras, especialmente si el intervalo de tiempo entre las diferentes determinaciones se alarga. Solo en el caso de una variación significativa,

se modifica un solo dato, normalizando la humedad al valor que tenía originalmente, con la siguiente ecuación: $[N]_{original} = [N]_{actual} * (100 - \%H_2O_{original}) / (100 - \%H_2O_{actual})$.

- La determinación de humedad en las muestras de dietas y heces es obligatoria para poder calcular la digestibilidad aparente de materia seca en las dietas (DAMSD), porque la fórmula simplificada $\%DAMSD = (1 - \%Cr_D / \%Cr_H) * 100$ solo es válida cuando las concentraciones de cromo están en base seca, o si se comprueba que los contenidos de humedad en las muestras de alimento y heces son idénticos.

Estabilidad del alimento en el agua y corrección de los valores de digestibilidad por lixiviación

Al determinar coeficientes de digestibilidad aparente en camarón, la lixiviación pre-prandial de los nutrientes dietarios es un factor más de variación a tomar en cuenta: si los coeficientes de digestibilidad se calculan en base a la composición de la dieta tal como fue fabricada y no como fue consumida, los nutrientes perdidos en el agua serán considerados como digeridos, y por lo tanto, los coeficientes de digestibilidad serán sobre-estimados.

Las pérdidas de materia seca y proteína después de una hora de inmersión en agua marina (28°C y 35 g L⁻¹) son determinadas en las dietas (3 replicados por dieta) por un método inspirado de los usados en el CSIRO (comunicación personal del Dr. David Smith, Cleveland, Australia) o en el OI de Hawai (Tacon y Obaldo, 2001; Obaldo, 2001; Obaldo *et al.*, 2002), en el cual la muestra de pelets se pesa en un tamiz con malla relativamente fina (#40), que se fija en la boca de un frasco de 250mL conteniendo 200 mL de agua marina, de tal manera que el pelet sea bañado en el agua emergiendo a través de la malla. Después de agitar el frasco en un baño-Maria termoregulado (30 rpm, 28°C), el tamiz se escurre delicadamente y se pone a secar al horno antes de ser pesado de nuevo con la muestra lixiviada seca. La pérdida de materia seca (%PMS) y proteína (%PP) en las dietas experimentales es determinada utilizando las siguientes fórmulas (Cruz-Suarez *et al.*, 2001; Cruz-Suárez *et al.*, 2006; Ricque *et al.*, 2006):

$\% PMS = (\text{Peso alimento bseca antes lixiviar} - \text{Peso alimento bseca después lixiviar}) * 100 / \text{Peso del alimento bseca antes lixiviar}$

$\% PP = [(\% \text{proteína en alimento bseca} * 100) - (\% \text{proteína alimento lixiviado seco} * (100 - \%PMS))] / \% \text{proteína en alimento bseca}$

De igual manera se puede expresar la pérdida de cualquier nutriente (%PN) que se pueda lixiviar del alimento (amino-ácido por ejemplo):

$\% PN = [(\% \text{nutriente en alimento bs} * 100) - (\% \text{nutriente en alimento lixiviado seco} * (100 - \%PMS))] / \% \text{ nutriente en alimento bs}$

Los valores de digestibilidad aparente del nutriente (proteína, materia seca etc..) son ajustados por las pérdidas de materia seca (%PMS), proteína (%PP) u otro nutriente (%PN) después de sumergir muestras de alimentos durante una hora en agua marina sintética, utilizando las siguientes ecuaciones (Cruz - Suárez *et al.*, 2001):

$$\% DAMSD_{lix} = 100 * (1 - (\%Cr_D / \%Cr_H) * (\%MSH / \%MSD) * (1/(1-\%PMS/100)))$$

$$\% \text{DAPDlix} = 100 * (1 - (\% \text{CrD} / \% \text{CrH}) * (\% \text{PH} / \% \text{PD}) * (1 / (1 - \% \text{PP} / 100)))$$

$$\% \text{DANDlix} = 100 * (1 - (\% \text{CrD} / \% \text{CrH}) * (\% \text{NH} / \% \text{ND}) * (1 / (1 - \% \text{PN} / 100)))$$

donde %DAMSlx, %DAPDlix y %DANDlix son los porcentajes de digestibilidad aparente de la materia seca, de la proteína y del nutriente considerado en la dieta, corregidos por las pérdidas de materia seca (%PMS), proteína (%PP) o del nutriente (%PN) en el agua antes de que la dieta sea ingerida (pérdidas pre-prandiales). %CrD y %CrH son las concentraciones de cromo en la dieta y en las heces; %MSD y %MSH son las concentraciones de materia seca en la dieta y en las heces; %ND y %NH son las concentraciones del nutriente considerado en la dieta y en las heces.

La importancia de la corrección por lixiviación ha sido demostrada en presencia de diferentes aglutinantes (alginato de sodio 1%, alginato 1% + kelp 6%, o gluten de trigo 6%) gracias al experimento descrito anteriormente en la sección "Reproceso de dietas comerciales": los coeficientes de digestibilidad de proteína estimados sin considerar las pérdidas pre-prandiales fueron sobreestimados por 4 puntos porcentuales en promedio (Tabla 8), mientras la sobreestimación de los coeficientes de digestibilidad de aminoácidos puede alcanzar 6 puntos porcentuales (8% relativo) para metionina, el aminoácido esencial más afectado (Tabla 11) (Ricque *et al.*, 2006).

Tabla 11. Coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos (promedios globales de los tres tratamientos) sin corrección (estándar) o con corrección por lixiviación (%) (Ricque *et al.*, 2006)

AA	Promedio		Diferencia	% sobre-estimación
	estandar	corregido		
met	84	78	6	8
cys	83	79	3	4
met+cis	83	79	5	6
lys	88	84	4	5
thr	83	80	3	4
arg	86	82	4	5
ile	87	84	3	4
leu	88	85	3	3
val	85	82	3	4
his	84	80	4	5
phe	86	83	3	3
gly	77	70	7	11
ser	84	81	3	4
pro	86	83	4	4
ala	82	77	5	7
asp	84	80	4	4
glu	91	89	2	2

Conclusión

La determinación de coeficientes de digestibilidad en ingredientes con el método de Cho y Slinger (1979) es muy sensible a la precisión y congruencia de los resultados analíticos de humedad, cromo y del nutriente a estudiar, en los diferentes tipos de muestras: ingredientes, dietas y heces. Un cuidado particular es necesario para las determinaciones sobre muestras de la dieta de referencia, porque intervienen en el cálculo de digestibilidad de todos los ingredientes. Es esencial comprobar la aditividad exacta de los contenidos de nutrientes de la dieta de referencia y del ingrediente en la dieta prueba ($0.7 \text{ NDR} + 0.3 \text{ NI} = \text{NDE}$, ver sección "digestibilidad de ingredientes"). Otro medio de comprobar la congruencia de los resultados analíticos de las diferentes muestras es comparar los coeficientes de digestibilidad en ingrediente obtenidos a partir de los coeficientes de digestibilidad en dietas antes y después de la prueba de lixiviación.

Referencias

- Akiyama, D.M., 1989. Apparent digestibility of feedstuffs by the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Nippon Suisan Gakkaishi 55, 91-98.
- Akiyama, D.M., Dominy, W.G., Lawrence, A.L., 1999. Nutrición de los camarones peneidos para la industria de los alimentos comerciales. pp. 43-79 en: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D. y Mendoza-Alfaro R. (Eds), Memorias del Primer Simposium Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura, 22 al 24 de Febrero de 1993, Avances en Nutrición Acuícola I, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey NL 66451, Mexico, 2ª re-impresión. ISBN 968-7808-60-8, 491p.
- A.O.A.C., 1990. Official methods of analysis. 12th Ed., Ellian Horritz Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 684 p.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. Aquaculture, 13: 265-272.
- Bolin, D. W., King, R.P., Klosterman E.W., 1952. A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr₂O₃) when used as an index substance. Science, 116(3023): 634-635.
- Brown P., Robinson, E., Clark, A., Lawrence, A.L., 1989. Apparent Digestible Energy Coefficients and Associative Effects in Practical Diets For Rid Swamp Crayfish. Journal of The World Aquaculture Society Vol.20 (3):122 – 126.
- Bureau, D.P. y Hua, K., 2006. Letter to the Editor of Aquaculture. Aquaculture 252, 103-105.
- Cho, C.Y. y Slinger, S. 1979. Apparent Digestibility Measurement in Feedstuffs for Rainbow Trout. Finfish Nutrition and Fishfeed Technology, Vol. II, 239-247.
- Cho, C.Y., 1987. "La Energía en la nutrición de los peces", Nutrición en Acuicultura, Vol II CAICYT, España. 197-237.
- Choubert, G., 1983. Estimation des rejets solides chez le poisson. La Pisciculture Française 72:32-40.
- Choubert G., J., De La Noue, y P. Luquet, 1982. Digestibility in fish: Improved device for the automatic collection of feces. Aquaculture, 29:185-189.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., McCallum, I.M., Hickling D., 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Aquaculture 196, 1-2, 87-104.
- Cruz Suárez, L.E., Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Lizbeth Marín, Claudio Guajardo Barbosa, Martha Nieto López, América Salinas Miller, 2002. Historia y estatus actual de la digestibilidad y de algunas características físicas químicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. En L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Gabriela Gaxiola Cortés y Nuno Simoes (Editores), Avances en Nutrición Acuícola VI - Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 3 al 6 de Septiembre 2002, Cancún, México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México. ISBN: 970-694090-1.
- Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Tapia Salazar, M., Guajardo Barbosa, C., Obaldo, L., Velasco Ecuadero, M. and A. Crrasco. 2002. Water stability and textura of shrimp pelleted feeds formulated with natural and synthetic binders. Global Aquaculture Advocate. October, 44-45.
- Cruz-Suarez L.E., Ruiz-Díaz P.P., Cota-Cerecer E., Nieto-Lopez M.G., Guajardo-Barbosa C., Tapia-Salazar M., Villarreal-Cavazos D., y Ricque-Marie D., 2006. Revisión sobre algunas características físicas y control de calidad de alimentos comerciales para camarón en México. Págs 330-370 en Cruz-Suarez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Nieto-Lopez M.G., Villarreal-Cavazos D., Puello-Cruz A.C., García-Ortega A. (Eds), Memorias del VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 15 al 17 de Noviembre de 2006, Mazatlán, México. Avances en Nutrición Acuícola 8, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, ISBN 970-694-331-5, 567p.
- Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M. Scholz, U. and Ricque-Marie, D. Aquaculture. 2007. Replacement of Fish Meal with Poultry By-Product Meal (Pet Food Grade) in Practical Diets for *Litopenaeus vannamei*, and Digestibility of the Tested Ingredients and Diets. Aquaculture 272 (2007) 466-476.
- Hajen W., R. Beames, D. Higgs, Dosanjh, B. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water: 1.Validation of technique. Elsevier Science Publishers B.V.,Amsterdam. Aquaculture, 112: 321-332.
- Hastings, W.H., 1971. Study of Pelleted Fish Foods Stability in Water. In J-L. Gaudet (editor), Report of the 1970 Workshop on Fish Feed Technology and Nutrition, Warm-water Fish Cultural Laboratories, Stuttgart, Arkansas, USA, 7-19 September 1970. Washington.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y. , S.J. Slinger, 1981. Effect of Extrusion Processing and Steam Pelleting Diets on Pellet Durability, Pellet Water Absorption and the Physiological Response of Rainbow Trout. Aquaculture 25:185-194.

- Lee, P., Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. pp.194-259 in: D'Abraham L.R., Conklin D.E. and Akiyama D.M. (Eds), Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA 70803, USA, ISBN 1-8888-07-00-8, 587p.
- Maynard, L.A., Loosli J.K., Hintz, H.F., Warner, R.G., 1981. Nutrición animal. Cuarta edición. McGraw Hill, U.S.A. 640 pp.
- Mendoza-Alfaro, R., 1999. Métodos para evaluar la digestibilidad proteica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. In: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D. y Mendoza-Alfaro R. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola I - Memorias del Primer Simposio Internacional de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Monterrey, N.L., 22-24 Febrero, 1993, 2ª re-impresión 1999. ISBN 968-7808-60-8, pp. 155-202.
- Murai, T.A., Sumalangkai, A., Pascual, F.P., 1981. The water stability of shrimp diets with various polysaccharides as a binding agent. Quarterly Research report vol.2, SEAFDEC Aquaculture Department, Tigbauan, Philippines, pp.18-20.
- Nieto-López, M., 1995. Efecto del procesamiento de las harinas de pescado y la toxicidad de las mismas, sobre la digestibilidad aparente en el camarón blanco del pacífico (*Penaeus vannamei* Boone), en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas. Monterrey, N.L.
- Nieto-López, M.G., Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D. 1997. Implementación de un método para la determinación de óxido de cromo y proteína de micromuestras de alimento y heces de camarón. In: Proceedings of an International Conference: VI Reunión de Nutrición Animal, 22-24 Oct. 1997, Marín, NL., México. Universidad Autónoma de Nuevo León/Facultad de Agronomía, Monterrey, México, pp. 211-214.
- Nose, T., 1964. Protein Digestibility of Several Test Diet in Cray and Prawn Fish. Bull. Freshwater Fisheries research Laboratory, Tokyo, 14: 24-28.
- Obaldo, L.G., 2001. Evaluating water stability of shrimp feeds. International Aquafeed 5(2): 34-35.
- Obaldo, L.G., Divakaran, S., Tacon, A.G., 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. Aquaculture Research, 33, 369-377.
- Parr, 1992. Operating instruction manual No. 280 MM, of 1425 semi micro calorimeter pump.
- Ricque-Marie, D., Pena-Rodríguez, A., Tapia-Salazar, M., Nieto Lopez, M.G., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo Barbosa, C., Cruz Suarez, L.E., Locatelli, M.L., 2006. Effect of pre-prandial nutrient leaching in sea water and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* shrimp juveniles. International Aquafeed 9 (5) Septiembre-October 2006, p 32-33.
- Romero, J.J., Manríquez, J.A., 1993. Esfuerzos desarrollados en Chile para disminuir el impacto ecológico de la alimentación en centros de cultivo de peces. 10pp, en Seminario Internacional Acuicultura y Medio Ambiente, Santiago, 2-3 Septiembre de 1993. Fundación Chile. 189pp.
- Salinas-Miller, A., 2000. Digestibilidad de ingredientes comúnmente usados en alimentos para camarón. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Smith L., Lee P.G., Lawrence A.L., Strawn, K., 1985. Growth and digestibility by three size of *penaeus vannamei*. boone: effects of dietary protein level and protein source. Aquaculture, 46:85-96.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2004. Accurate measurement of in vivo digestibility of shrimp feeds. Aquaculture 232, 563-580.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., Irwin, S.J., 2006. Método usado en el CSIRO para medir la digestibilidad *in vivo* en camarón. En Cruz-Suárez, L.E., Villareal-Colmenares H., Ricque-Marie D., Nieto-Lopez M.G., Tapia-Salazar, M. (Eds), Manual de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de ingredientes y alimentos para camarón. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (Cyted). UANL, Monterrey, NL Mexico, en prensa.
- Storebakken, T., Austreng, E., 1987. Binders in fish feeds II. Effect of different alginates on the digestibility of macronutrients in rainbow trout. Aquaculture, 60:121-131.
- Tacon, A., Obaldo, L.G., 2001. Determining physical stability of shrimp feeds. Global Aquaculture Advocate 4(1), 30-31.
- Tecator, 1983. Fat extraction on feeds with the Soxtec System HT- The influence of sample preparation and extraction media. Application note AN 67/83 (1983.06.13). Soxtec System HT Manual Tecator., AB Sweden.
- Tecator, 1987. Determination of Kjeldahl Nitrogen Content with Kjeltex System 1026. Application note AN 86/87 (1987.02.18).
- Viola, S., Gur, N., Zohar, G., 1986. Effects of Pelleting Temperature, Binders and Basic Grains on Water-Stability of Pellets and on Growth of Tilapia. Bamidgeh, 39: 19-26.
- Windell, J., Foltz J., Sarokon, J., 1978. Methods of fecal collection and nutrient leaching in digestibility studies. Prog. Fish-Cult. 40:51-55.

ANEXO 1. Técnicas analíticas

ANÁLISIS DE LIXIVIACIÓN EN PELLETS

Referencias: Ricque-Marie et al 2006

Las Ventajas de este método comparado con el de Aquacop es que cada muestra se lixivia por separado, por lo que el agua de lixiviación de cada muestra se puede utilizar para realizar análisis de aminoácidos, carbohidratos, proteínas y demás productos lixiviados.

Material y Equipo

- Balanza semianalítica
- Agitador con baño de agua con capacidad de controlar temperatura
- Estufa con ventilación
- Espátula acanalada
- Probeta de 250 mL
- Frasco de plástico de 250 mL
- Tamices de PVC de 4.5 cm. de alto por 4 cm. de diámetro interno, con malla 40 (de acero inoxidable)
- Agua marina 35 g/L salinidad

Metodología

- 1.- Determinar el % de humedad de la muestra sin moler (Método IUPAC 130°/3 hrs)
- 2.- Tarar los tamices de PVC a 130°C / 30 min
- 3.- Enfriar en desecador y pesar
- 4.- Pesar en balanza el tamiz de PVC (anotar peso) y añadir aproximadamente 3 g de muestra (anotar peso)
- 5.- Verter en un frasco de plástico de 250 mL de boca ancha (de diámetro superior al diámetro externo del tamiz), 200 mL de agua marina.
- 6.- Colocar el tamiz de PVC en la boca del frasco y colocar ambos en el agitador con baño de agua a 28°C. Dejar así por 1 hora a 30 r.p.m.
- 7.- Sacar el tubo del frasco y dejar escurrir inclinado (por gravedad) por 5 minutos.
- 8.- Colocar en estufa a 130°C por 2 hrs.
- 9.- Sacar de la estufa y enfriar en desecador por espacio de 15 minutos
- 10.- Pesar en balanza semianalítica

11.- Cálculos:

$$\%PMS = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} 100$$

Donde:

W_i = Peso de la muestra inicial en base seca

W_f = Peso final de la muestra seca

PMS = Pérdida de materia seca

DETERMINACION DE MATERIA SECA Y/O HUMEDAD (para muestras molidas)

Referencias

AOAC (1990) 920.36

MATERIAL Y EQUIPO

- Crisoles de porcelana o cápsulas de aluminio
- Pinzas para crisol
- Espátula
- Estufa a 130°C

METODO

- colocar las cápsulas de aluminio en la estufa a 130°C por 30 min. dejarlos enfriar por 15 min. en un desecador y registrar el peso
- pesar 2 g de muestra molida en cada cápsula
- colocar las cápsulas con la muestra húmeda en la estufa y secarlas por 2 hr. a 130°C
- sacar de la estufa, dejar enfriar en un desecador por 15 min y registrar el peso del crisol mas la muestra seca.

CALCULOS

pi= peso de la cápsula mas la muestra

pf= peso final de la muestra ya seca mas la cápsula

g= gramos de muestra

$$\% \text{ humedad} = \frac{(p_i - p_f)}{g} 100$$

SEMILLA	METODO OFICIAL	PESO DE LA MUESTRA	TEMPERATURA	TIEMPO
Algodón	Aa 3-38	10 g	130± 3 0C	3 Hr.
Cártamo	Ai 2-75	10 g	130±3 0C	2 Hr
Canola	Ac 2-41	10g	130 ± 0C	3 Hr
Girasol	Ai 2-45	10 g	130 ± 0C	3 Hr
Soya	Ac 2-41	10 g	130 ± 0C	3 Hr
HARINAS				
Harinolina	Ba 2a-38	5 g	130 ±3 0C	2 Hr
Canola	Ba 2a-38	5 g	130±30C	2Hr
Cártamo	Ba 2a-38	5 g	130±30C	1.5 Hr
Girasol	Ba 2a-38	5 g	130±30C	2 Hr
Soya	Ba 2a-38	2 g	130±30C	2 Hr
Cascarillas	Aa 3a-38	10 g	130±30C	3 Hr.

DETERMINACION DE MATERIA SECA Y/O HUMEDAD (para pellet entero)

Referencias:IUPAC

MATERIAL Y EQUIPO

- Crisoles de porcelana o cápsulas de aluminio
- Pinzas para crisol
- Espátula
- Estufa a 130°C

METODO

- colocar las cápsulas de aluminio en la estufa a 130°C por 30 min. dejarlos enfriar por 15 min. en un desecador y registrar el peso
- pesar 2 g de muestra en cada cápsula
- colocar las cápsulas con la muestra (paletizada) húmeda en la estufa y secarlas por 3 hr. a 130°C
- sacar de la estufa, dejar enfriar en un desecador por 15 min y registrar el peso del crisol mas la muestra seca.

CALCULOS

pi= peso de la cápsula mas la muestra

pf= peso final de la muestra ya seca mas la cápsula

g= gramos de muestra

$$\% \text{ humedad} = \frac{(\text{pi-pf})}{\text{g}} 100$$

ANÁLISIS DE CENIZAS

Referencia

AOAC (1990) 924.05

Las cenizas se refieren a los elementos inorgánicos (minerales) en los alimentos. El contenido de ceniza de un alimento es el residuo inorgánico remanente, después que la materia orgánica ha sido destruida por la combustión en una mufla.

- 1) En un crisol de porcelana previamente tarado a 600°C/30min, pesar de 1-2g de muestra.
- 2) Carbonizar la muestra en una placa térmica hasta la desaparición de humo.
- 3) Calcinar a 600°C por 2 horas.
- 4) Depositar el crisol en un desecador de vidrio y dejar enfriar por 20 minutos.
- 5) Registrar el peso del crisol con las cenizas formadas.
- 6) Cálculos:

$$\% \text{Ceniza} = \frac{(\text{peso del crisol mas las cenizas} - \text{Tara del crisol}) * (100)}{\text{Peso de la muestra}}$$

ANÁLISIS DE NITRÓGENO TOTAL.

Referencias: -TECATOR ASN 3401, -AOAC 984.13

Preparación de la muestra

Cuartear muy bien la muestra y moler en molino Cyclotec. Pesar 0.5g-1.0g de muestra con una precisión de + 0.1 mg y depositarla en un tubo de digestión (si el análisis es micro pesar de 0.01g-0.1g)

Digestión.

Agregar una kjeltabs (o 3.5g de K₂SO₄ + 0.4g de CuSO₄ .H₂O). Agregar 12 mL. de H₂SO₄ (si es micro 6mL de ácido y media pastilla). Digerir (Digester Tecator 2006) por 1 hora a 4200C; sacar y enfriar por 15 minutos.(la muestra tomara un color verde)

Destilación:

Encender el destilador (Kjeltec System 1026), colocar un tubo vacío y en manual (steam) ponerlo a funcionar hasta calentar el generador de vapor (Hasta ebullición). Programar en el panel de control del aparato las condiciones necesarias (según la muestra sea macro o micro) y encender el automático. Destilar las muestras previamente digeridas colectando el destilado en un matraz erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de indicador mixto (ácido bórico al 4% con 10 mL de verde de

bromocresol y 7 mL de rojo de metilo). Titular con H₂SO₄ al 0.1N (si el análisis es micro titular con ácido 0.01N). Correr un blanco y realizar una validación con tirosina (7.73 %).

T= ml de H₂SO₄ al 0.1N gastados para titular la muestra

B= ml de H₂SO₄ al 0.1N gastados para titular un blanco sin muestra

N= Normalidad (exacta) del H₂SO₄ utilizado para titular.

$$\text{Cálculos: } \%N = \frac{(T-B)(14.01)(N)}{(g \text{ mta})(10)} \quad \% \text{ proteína } = (\%N)(\text{factor de la muestra})$$

REACTIVOS

-Ácido bórico al 4 %: pesar 40gr de ácido bórico y aforar a 1 litro de agua destilada

-Hidróxido de sodio al 40 %: pesar 400gr de hidróxido de sodio y aforar a 1 litro de agua destilada

-Rojo de metilo al 0.1%: pesar 0.1gr y aforar a 100ml de etanol

-Verde de bromo cresol al 0.1%: pesar 1.1gr y aforar a 100 ml de etanol

-Indicador mixto: en un litro de ácido bórico al 4% agregar 10ml de rojo de metilo y 10ml de verde de bromo cresol. Prueba de preparación correcta de indicador mixto: 25ml de indicador mixto expuesto a chorro de agua de la llave cambiara a color gris

-Ácido sulfúrico al 0.1N tomar 2.77ml de H₂SO₄ concentrado y aforar a 1 litro de agua destilada. para estandarizar el ácido secar en la estufa carbonato de sodio por 2 horas a 130°C y pesar 0.4gr, pasarlo a un matraz erlenmeyer de 250 ml y agregarle 40ml de agua destilada y agregarle 10 gotas de rojo de metilo mas 10 gotas de verde de bromocresol, el ácido preparado que se quiere estandarizar se pasa a una bureta y se titula el matraz con el carbonato de sodio y colorantes hasta obtener un color rojo o rosa fuerte se anotan los mililitros gastados, el matraz se pone a calentar en una placa térmica hasta que aparezca un color verde-amarillo y/o desaparezcan las burbujas por calentamiento del carbonato, posteriormente se enfría el matraz a chorro de agua, y se vuelve a titular con el ácido sulfúrico que se quiere estandarizar hasta un color rosa fuerte y se anota los mililitros gastados, se suman los mililitros gastados antes y despues de calentar el matraz con carbonato de sodio y colorantes, y aplicar la siguiente formula para calcular la normalidad del ácido.

$$N = \frac{(18.868 \times \text{grNaCO}_3)}{\text{ml totales gastados}}$$

ESTIMACIÓN DE ENERGÍA EN ALIMENTOS

Referencia

Semimicro. Parr mod. 1425

1. Pesar alrededor de 0.02 g de ácido benzoico, hacerlo pastilla y pesar en balanza analítica
2. Colocar la pastilla en la bomba, atar el alambre de platino (previamente pesado) y añadir a la cámara de ignición 10µL de agua destilada. Llenar la cámara con oxígeno
3. Introducir la bomba en el aparato y agregar exactamente 400 g de agua destilada
4. Poner la tapa en su posición correcta, colocar la banda en la polea y oprimir *15 enter enter
5. Esperar a que el aparato realice el preperíodo. Cuando la pantalla indique "press enter when fire" oprimir el botón de ignición y posteriormente la tecla "enter"
6. Esperar a que el equipo realice el posperíodo. Cuando suene la alarma oprimir *26 para obtener el dato de ΔT
7. Desarmar la bomba y pesar el alambre sobrante
8. Determinar energía equivalente del calorímetro (W) utilizando la siguiente fórmula:

$$W = \frac{(m)(6318) + f}{\Delta T}$$

9. Realizar el mismo procedimiento cinco veces y realizar un gráfico de control con los valores obtenidos de W. El valor de W promedio se utilizará para el cálculo de calorías en muestras de alimento para camarón.
10. Analizar las dietas o ingredientes pesando 0.02 g de muestra y empleando la misma metodología descrita anteriormente. Aplicar la siguiente fórmula:

$$Hg = \frac{(\Delta T)(W) - f}{m}$$

Hg = calor de combustión

W= energía equivalente del calorímetro (obtenida a partir de ácido benzoico)

f = corrección por combustión del alambre

m= peso de la muestra

ANÁLISIS DE ÓXIDO DE CROMO EN ALIMENTOS BALANCEADOS Y EN HECES DE CAMARÓN

Referencia
Método Bolin

Fundamento

El óxido de cromo tratado con oxidantes fuertes y aplicando calor se oxida a cromato (Cr VI+) presentando una solución de coloración amarilla cuya intensidad es directamente proporcional al contenido de cromo en la muestra.

Material, reactivos y equipo

- 1) Digestor Tecator 2006.
- 2) Espectrofotómetro Beckman DU 650.
- 3) Juego de tubos para digestión de 800 mL Tecator.
- 4) Balanza analítica con precisión de 0.01 mg.
- 5) Campana de extracción.
- 6) Espátula para muestras micro.
- 7) Dos pipetas de 10 mL.
- 8) Papel para pesar (VWR cat. No.12578-2001).
- 9) Vortex.
- 10) Mezcla oxidante (disolver 10 g de molibdato de sodio en 150 mL de agua destilada, agregar 150 mL de ácido sulfúrico concentrado y 200 mL de ácido perclórico QP. Aforar a 500 mL de agua destilada).

Metodología:

A) Elaboración de la curva:

para análisis de dietas

se preparan 4 estándares utilizando como diluyente la misma dieta pero sin óxido de cromo. cada mezcla se homogenizara en mortero y se guardará en recipientes cerrados.

ESTANDAR	DIETA BASE	Cr ₂ O ₃	CONC.
1	955 mg	5 mg	0.5 %
2	900 mg	10 mg	1.0 %
3	885 mg	15 mg	1.5 %
4	880 mg	20 mg	2.0 %

para análisis de heces de camarón:

se preparan 4 estándares, pero en este caso se utilizará como diluyente celulosa y caseína (simulando la cantidad de proteína que hay en las heces que es aprox. 20-25%)

ESTANDAR	CASEINA	CELULOSA	Cr2O3	CONC.
1	250 mg	730 mg	20 mg	2.0 %
2	250 mg	720 mg	30 mg	3.0 %
3	250 mg	700 mg	50 mg	5.0 %
4	250 mg	680 mg	70 mg	7.0 %

cada estándar se procederá por triplicado siguiendo los pasos de la metodología descrita en este método y se tomará como bueno un coeficiente de variación menor al 10 % entre replicados.

Método:

1. pesar 30 mg de muestra (+ 0.00005g) en un papel weighing paper VWR cat No. 12578-201.
2. transferir la muestra junto con el papel a un tubo de digestión Tecator previamente marcado a 50 mL.
3. agregar 5 mL de solución oxidante y 2 mL de ácido perclórico.
4. digerir en digestor Tecator 2006 a 300°C por exactamente 15 minutos.
5. dejar enfriar por 15 minutos y aforar a 50 ml con agua destilada
6. homogenizar la solución en vortex a alta velocidad.
7. leer en el espectrofotómetro Beckman DU 650 a 438 nm. para facilitar el trabajo previamente el aparato debe ser programado con la curva de calibración, obteniendo resultados inmediatos
8. regresar el contenido de la celda al tubo de digestión para análisis de proteínas.

ANEXO 2. PUBLICACIONES DEL GRUPO

PUBLICACIONES

1. Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Abdo-de la Parra, M.I., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Pike, I.H., Galleguillos, M. y Castro-Campos, E., 1996. "Índices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón". Revista "Acuicultura del Ecuador", Guayaquil, Ecuador. Enero, 1996. Vol. 12, 12-30.
2. Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D. y M.G. Nieto L. Importancia de la digestibilidad en alimentos para camarón. Panorama Acuícola. Vol. 4. No. 2 enero/febrero, 1999, 10-12.
3. Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Mccallum, I.M. and Hickling David. 2001. Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica sp.*) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). Aquaculture 196, 1-2, 87-104.
4. Cruz Suárez, L. E., Marín-Zaldívar, L.F., Ricque Marie, D., Tapia Salazar, M., Nieto López, M.G., Guajardo Barbosa, C. y Salinas-Miller, A. 2002. Digestibilidad de alimentos usados por los productores de camarón en México. Panorama Acuícola. Vol. 7 (6) septiembre/octubre, 2002, 22-23.
5. Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M.G., Ricque-Marie, D. 2003. Un nuevo método de digestibilidad proteica *in vitro* para el control de calidad de ingredientes y alimentos para camarón. Panorama Acuicola. Mzo.-Abril, 2003. 12-13.
6. Bortone, Eugenio, Cruz-Suarez, L.E., Nieto Martha, Tapia, Mireya, Ricque Denis y Guajardo Claudio. 2004. Mexico research studies digestibility in fishmeals. Panorama Acuicola. Julio/Agosto de 2004. 10-13 p.
7. Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M., Ricque-Marie, D., Guajardo-Barbosa, C. y Scholz, U. 2005. Reemplazo de harina de pescado con harina avícola grado mascota. Panorama Acuícola. Enero/Febrero de 2005. 24-27 p.
8. Martha Guadalupe Nieto López, Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie y Marina Ezquerria Brauer, 2005. Técnica de digestibilidad *in vitro* en ingredientes y alimentos para camarón. Revista CIENCIAUANL, Vol 8, No. 1, Enero-Marzo 2005. 371-378.
9. Ricque-Marie, D., Pena-Rodríguez, A., Tapia-Salazar, M., Nieto Lopez, M.G., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo Barbosa, C., Cruz Suarez, L.E. and Locatelli, M.L. 2006. Effect of pré-prandial nutrient leaching in sea water and different binders on apparent amino acid digestibility coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* shrimp juveniles. International Aquafeed. September/October, 2006. 32-33 pp. Vol. 9/5.
10. Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M.G., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., Scholz, U. and Ricque Marie, D. 2006. Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and Digestibility of the tested ingredients and diets. International Aquafeed. Vol. 9/5 September-October, 2006. 34-44 pp.

CAPITULOS DE LIBROS CON ISBN (O ARTICULOS EN EXTENSO ESPECIALES)

1. L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Lizbeth Marín, Claudio Guajardo Barbosa, Martha Nieto López, América Salinas Miller. Historia y estatus actual de la digestibilidad y de algunas características físicas químicas de los alimentos comerciales para camarón usados en México. Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre de 2002. Cancún, Quintana Roo, México. Págs. 1-22. ISBN: 970-694090-1.
2. Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Zavala-Chavez, B., Nieto-Lopez, M., Guajardo Barbosa, C., Tapia-Salazar, M., McCallum, I. Effect of a phytase product on protein and phosphorus digestibility in shrimp *litopenaeus vannamei* fed air classified pea protein flour (ppf) based diet. En: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M., Villarreal, D., Scholz, U. y González, M. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del Séptimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 16 al 19 de Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora, México. ISBN: 970-694-161-4. Universidad Autónoma de Nuevo Monterrey, Nuevo León México. p. 237.

MEMORIAS EN EXTENSO

1. Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Abdo-de la Parra, M.I., Tapia-Salazar, M. y Nieto-López, M.G. 1995. "Índices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón". Memorias del I Taller. La Bioquímica en la Biotecnología Marina. 11-16 de Diciembre. Ed. FCB/Universidad de la Habana, Cuba. 18 p.
2. Cruz-Suárez, L.E. y Ricque-Marie, D. 1997. "Impacto de la calidad de harina de pescado en dietas para camarón". Simposium Internacional. VI Reunión de Nutrición Animal. Facultad de Agronomía/UANL, Marín, N.L. 22-24 de octubre de 1997.
3. Nieto-López, M.G., Cruz-Suárez, L.E. y Ricque-Marie, D. 1997. "Implementación de un método para la determinación de óxido de cromo y proteína en micro muestras de alimento y heces de camarón". Simposium Internacional. VI Reunión de Nutrición Animal. Facultad de Agronomía/UANL, Marín, N.L. 22-24 de octubre de 1997.
4. Cruz Suárez, L. Elizabeth, Ricque Marie, Denis, Tapia Salazar, Mireya, Nieto López, Martha G. y Marín-Zaldívar, Lizbeth Fabiola. 2002. Historia y estatus actual de la digestibilidad de alimentos comerciales para camarón en México de 1998 a la fecha. Compiladores: Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Ricque- Marie, D., García-Flores, A., Peña-Ortega, L. O., Navarro-González, H. A., II Curso LANCE en Acuicultura, 13 al 17 de Mayo del 2002. Monterrey Nuevo León México.
5. Marín-Zaldívar, Lizbeth Fabiola, Tapia Salazar, Mireya, Guajardo Barbosa, Claudio, Nieto López, Martha, Salinas Millar, América, Ricque Marie, Denis y Cruz Suárez, Lucía Elizabeth. 2002. Estudio exploratorio del grado de digestibilidad de los alimentos comerciales para camarón en México. Congreso Virtual Iberoamericano de Acuicultura. CIVA2002 (<http://www.civa2002.org>), págs. 265-281. 1º. Junio-30 Septiembre, 2002.

RESUMENES

1. Cruz-Suárez, L. Elizabeth. 1995. Indices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón. Programa del III Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 27 Octubre-01 Noviembre. Ed. CENAIM, Guayaquil Ecuador.
2. Cruz-Suárez, L. Elizabeth y Ricque Marie Denis. 1995. Indices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón. Memorias del I Taller La Bioquímica en la Biotecnología Marina. 11-16 Diciembre. Ed. Universidad de la Habana, Cuba.
3. Martha Guadalupe Nieto López, L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Ian Pike, Marina Ezquerro. Digestibilidad *in vivo* de harinas de pescado de diferente calidad en alimentos para camarón y su correlación con valores de digestibilidad *in vivo* en salmónidos, e *in vitro* con enzimas de camarón. IV Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S. 16-18 noviembre, 1998. Poster.
4. Lucia Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Claudio Guajardo Barbosa, América Salinas Miller, Alfonso González Caballero y Martha G. Nieto López. Digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de tres alimentos experimentales en *P. stylirostris* de diferente talla. IV Symposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S. 16-18 noviembre, 1998. Poster.
5. Antimo-Pérez, J.S., Luna Mendoza, N.E., Cruz-Suárez, L.E. y Ricque-Marie, D. 2000. Evaluación de la digestibilidad del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, utilizando dietas con dos proporciones de proteína vegetal/animal 2:1 y 1:2. V Simposio de Ciencia y Tecnología. SEP-CONACYT. Mayo 17 y 18. Poster.
6. Luis O. Peña*, L. Elizabeth Cruz, Denis Ricque, Roberto Mercado, Carlos Rosas. 2000. Efecto de harinas de pescado de diferente digestibilidad sobre el crecimiento, consumo de oxígeno y excreción amoniacal, en camarón *Litopenaeus stylirostris*, en condiciones de laboratorio. Memorias del V Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 de Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. Póster.
7. Martha Guadalupe Nieto-López, L. Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie. 2000. Un nuevo método *in vitro* para determinar la digestibilidad proteica en harinas de pescado y alimentos para camarón. Memorias del V Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 de Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. Póster.
8. Martha Guadalupe Nieto-López, L. Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie. 2001. Un nuevo método *in vitro* para determinar la digestibilidad proteica en harinas de pescado y alimentos para camarón. III Congreso Regional de Ciencia de los Alimentos. Asociación Nacional de Tecnólogos en Alimentos de México, A.C./F.C.B.-UANL. 3-4 Septiembre, 2001. Póster.
9. Lizbeth F. Marín-Zaldivar, L. Elizabeth Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie, Mireya Tapia-Salazar, Claudio Guajardo-Barbosa, Martha Nieto-López, América Miller. Estudio exploratorio del grado de digestibilidad *in vivo* de los alimentos comerciales para camarón en México. Avances en Nutrición Acuícola VI. VI Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 3-6 Septiembre de 2002. Cancún, Quintana Roo, México. Póster.
10. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie y Martha Gpe. Nieto López. 2004. Digestibilidad de alimentos para camarón en México. XIII Simposio Brasileiro de Acuicultura. 09-13 agosto de 2004. Fortaleza, Brasil.
11. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Brenda M. Zavala Chávez, Martha Gpe. Nieto López, Claudio Guajardo Barbosa, Mireya Tapia Salazar, Ian McCallum and Rex Newkirk. 2004. Efecto de un suplemento alimenticio enzimático sobre la digestibilidad del

- nitrógeno y del fósforo de un concentrado proteico de chícharo en el camarón *Litopenaeus vannamei*. XIII Simposio Brasileiro de Acuicultura. 09-13 agosto de 2004. Fortaleza, Brasil.
12. J. Fernando Mendoza-Cano, Martha G. Nieto-López, David A. Villarreal-Cavazos, Claudio Guajardo-Barbosa, Denis Ricque-Marie, L. Elizabeth Cruz-Suárez. 2004. Digestibilidad *In vivo* de los Principales Alimentos Comerciales para Camarón Utilizados en Mexico en el Año 2004. VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora.
 13. Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Zavala-Chávez, B.L., Nieto-López, M.G., Guajardo-Barbosa, C., Tapia-Salazar, M. e Ian M. McCallum. 2004. Effect of a phytase product on protein and phosphorus digestibility in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed and air classified pea protein flour (PPF) based diet. 2003. Aquaculture 2004. March 1-5, 2004. Hawaii Convention Center, Honolulu Hawaii, U.S.A.
 14. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie y Martha Gpe. Nieto López. 2004. Digestibilidad de alimentos para camarón en México. XIII Simposio Brasileiro de Acuicultura. 09-13 agosto de 2004. Fortaleza, Brasil.
 15. Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Brenda M. Zavala Chávez, Martha Gpe. Nieto López, Claudio Guajardo Barbosa, Mireya Tapia Salazar, Ian McCallum and Rex Newkirk. 2004. Efecto de un suplemento alimenticio enzimático sobre la digestibilidad del nitrógeno y del fósforo de un concentrado proteico de chícharo en el camarón *Litopenaeus vannamei*. XIII Simposio Brasileiro de Acuicultura. 09-13 agosto de 2004. Fortaleza, Brasil.
 16. J. Fernando Mendoza-Cano, Martha G. Nieto-López, David A. Villarreal-Cavazos, Claudio Guajardo-Barbosa, Denis Ricque-Marie, L. Elizabeth Cruz-Suárez. 2004. Digestibilidad *In vivo* de los Principales Alimentos Comerciales para Camarón Utilizados en Mexico en el Año 2004. VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora.
 17. L. Elizabeth Cruz Suárez, Perla P. Ruiz-Díaz, Claudio Guajardo-Barbosa, David Villarreal-Cavazos, Martha Nieto-López, Laura Locatelli, Denis Ricque-Marie. 2004. Perfil de Aminoácidos y Lixiviación de Aminoácidos en Alimentos Comerciales para Camarón Utilizados En Mexico. VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora.
 18. Guerrero-Olazarán, M., Carreón-Treviño, J.G., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E., Galán-Wong, L.J. y Viader-Salvado, J.M. 2004. Estabilidad *in vitro* de tres fitasas a las proteasas digestivas del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora.
 19. Cruz-Suarez, L., Nieto-López, M.N, Guajardo-Barbosa, C., Scholz, U. and Ricque-Marie, D. 2005. Replacement of fish meal with poultry by product meal pet food grade in a 35% protein formula for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture America 2005. 17-21 Enero. New Orleans, USA.
 20. Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M.G., Ricque-Marie, D., Guajardo-Barbosa, C. 2006. Replacement of fish meal with poultry by-product meal pet food grade in practical diets for *L. vannamei* and digestibility of the ingredients and diets. XII International Symposium Fish Nutrition and Feeding. May 28-June 1st, 2006. Biarritz, France. Poster.
 21. Ricque-Marie, D., Peña-Rodríguez, A., Tapia-Salazar, M.G., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Cruz-Suárez, L.E. and Locatelli, M.L. 2006. Effect of pre-prandial nutrient leaching in sea water and different binders on apparent amino acid digestibility

- coefficients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei* shrimp juveniles. XII International Symposium Fish Nutrition and Feeding. May 28-June 1, 2006. Biarritz, France. Poster.
22. Cruz-Suárez, L.E.*, Peña-Rodríguez, A., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. 2006. Coeficientes de Digestibilidad Aparente de Proteína, Material Seca y Energía de 6 Productos de Reciclamiento Animal en Camarón *Litopenaeus vannamei*. Libro de Programa y Resúmenes del VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de Noviembre de 2006. Mazatlán, Sinaloa. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Martha Gpe. Nieto López, Mireya Tapia Salazar, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega.
 23. Ricque-Marie, D., Pena-Rodríguez, A., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Locatelli, M.L. and Cruz-Suárez, L.E. 2006. Efecto de la lixiviación preprandial del alimento en el agua sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de aminoácidos em camaron en presencia de diferentes aglutinantes. Libro de Programa y Resúmenes del VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de Noviembre de 2006. Mazatlán, Sinaloa. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Martha Gpe. Nieto López, Mireya Tapia Salazar, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega.
 24. Peña-Rodríguez, A., Nieto-Lopez, M.N., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. 2006. Los Valores de la Relacion Proteina/Energía Digestible y la Eficiencia Alimenticia Demuestran que los Alimentos Comerciales Para Camaron Usados en Mexico estan Sobre-formulados. Libro de Programa y Resúmenes del VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 de Noviembre de 2006. Mazatlán, Sinaloa. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Martha Gpe. Nieto López, Mireya Tapia Salazar, David A. Villarreal Cavazos, Ana C. Puello Cruz y Armando García Ortega.
 25. Peña-Rodríguez, A., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C., Ricque-Marie, D. and Cruz-Suárez, L.E. Digestible Protein/Energy Ratio and Feed Efficiency Show That Commercial Shrimp Feeds Used in Mexico are Over-Formulated. Aquaculture 2007. San Antonio Texas, U.S.A February 26-March 2.
 26. Ricque-Marie, D., Peña-Rodríguez, A., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Locatelli, M.L. and Cruz-Suárez, L.E. Effect of Pre-Prandial Nutrient Leaching in Sea Water and Different Binders on Apparent Amino Acid Digestibility Coefficients of a Practical Diet in *Litopenaeus vannamei* Shrimp Juveniles. Aquaculture 2007. San Antonio Texas, U.S.A February 26-March 2. Presentación oral.
 27. Cruz-Suárez, L.E., Peña-Rodríguez, A., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. Apparent Amino Acids, Protein, Dry Matter and Energy Digestibility Coefficients of Six Rendered Animal Products by White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 2007. San Antonio Texas, U.S.A February 26-March 2.
 28. Ricque-Marie D., Peña-Rodríguez A, Tapia-Salazar M, Nieto-López M, Villarreal-Cavazos D, Guajardo-Barbosa C, Locatelli M, Cruz-Suárez LE. Efecto de la Lixiviación Preprandial del Alimento en el Agua Sobre los Coeficientes de Digestibilidad Aparente de Aminoácidos en Camarón. XIII Congreso Bienal AMENA 2007. 23-26 Octubre, 2007. World Trade Center, Boca del Río Veracruz, México.
 29. Cruz-Suárez, L.E., Peña-Rodríguez, A., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C. y Ricque-Marie, D. Apparent amino acis, protein and dry matter digestibility coefficients of six rendered animal products by the white shrimp

- Litopenaeus vannamei*. Caribbean & Latin American Aquaculture 2007. November 6-9, 2007. San Juan Puerto Rico.
30. Cruz Suárez, L.E., León, A.A., Rodríguez Peña, A., Rodríguez-Peña G. y Rique Marie, D. 2008. Reemplazo de alimento balanceado con alga *ulva clathrata* en cultivo de camarón blanco. 3er. Foro Internacional de Acuicultura. Hermosillo, Sonora. 28-30 de Noviembre de 2007. Panoramas Comerciales, S.A. de C.V. Conferencia Magistral.
 31. Ricque-Marie, D., Peña-Rodríguez, A., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Tapia-Salazar, M, Guajardo-Barbosa, C., Cruz-Suárez, L.E. & Lemme, A. 2008. Apparent Dry Matter, Protein and Amino Acid Digestibility of Six Rendered Animal Products in *Litopenaeus vannamei* Juveniles. XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. 1-5 Junio, 2008. Florianópolis Brasil. Presentacion oral.
 32. Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Beltran-Rocha, J., Nieto-López, M., Villarreal-Cavazos, D., Guajardo-Barbosa, C., Ricque-Marie, D. & Lemme, A. 2008. Apparent Dry Matter, Energy, Protein and Amino Acid Digestibility of Four Soybean Products in *Litopenaeus vannamei* Juveniles. XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. 1-5 Junio, 2008. Florianópolis Brasil. Poster.
 33. Villarreal Cavazos, D., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Guajardo-Barbosa, C.M Nieto-López, M.G., Lemme, A. y Cruz-Suarez, L.E. 2008. Digestibilidad aparente de aminoácidos de harinas de pescado y productos de soya usados en alimentos para camarón (*L. vannamei*) en México. 1er. Foro de Camarón de Cultivo en el Pacífico Norte. 10 y 11 de Julio. Hermosillo, Sonora. INP-SAGARPA. México.

Método Utilizado en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM) Ecuador para Medir la Digestibilidad *in vivo* en Camarón

Yela Paredes ^{*1} y César Molina²

¹Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), Campus Politécnico Km. 30.5 vía Perimetral, P.O.BOX, 09-01-4519, Guayaquil, Ecuador; Teléfono: (5934) 291 6118; Fax: (5934) 2269492; E-mail: yparedes@cenaim.espol.edu.ec

² ENACA, Guasmo Norte, junto a la Ría, P.O Box 09-01-4344, Guayaquil, Ecuador,
Tel: (593-4) 2436-557 / 2493-850; Fax: (593-4) 2495-488 / 2496-550;
E-mail: cmolina@enaca.com.ec

Introducción

A partir del año 1998, se implementaron en el Laboratorio de Nutrición del CENAIM dos nuevas metodologías para micro análisis de óxido de cromo y proteína, para evaluar la calidad de un alimento y/o algún nutriente en particular, en términos de digestibilidad.

La implementación de éstas dos técnicas [óxido de cromo (McGinnis y Kasting, 1964) y proteína por micro Kjeldahl (Forster y Gabbot 1971) se realizó con el objetivo de obviar uno de los obstáculos que se presentan al momento de determinar la digestibilidad, como es el disponer de una cantidad de muestra (heces) apropiada para que el trabajo analítico tenga éxito.

Los bioensayos de digestibilidad se han realizado como una continuación de las pruebas de crecimiento y se ha analizado solo la digestibilidad de dietas y no de ingredientes por lo que no contamos con una dieta de referencia.

Desarrollando los bioensayos de digestibilidad *in vivo*, con estas técnicas analíticas nuevas y un método adicional para la determinación de carbohidratos, se procedió a evaluar fuentes de carbohidratos (residuo de la destilación de cerveza, harina de yuca, harina de plátano) con la visión de optimizar el uso de proteína para crecimiento del organismo. Utilizando los mismos principios se valoraron fuentes alternas de proteína como sustituto al tradicional ingrediente proteico como es la harina de pescado, todos estos estudios fueron realizados en juveniles *Litopenaeus vannamei*, y posteriormente se realizó un trabajo adicional con reproductores de la misma especie en donde se valoró la digestibilidad de balanceados secos, con la incorporación de aglutinantes que permitieran una texturización del mismo, semejando a un alimento fresco.

Procesado de las dietas

El proceso de elaboración de los alimentos experimentales cumple siempre el mismo esquema:

1. Pesaje de los componentes en recipientes separados.
2. Mezclado de los ingredientes secos, incorporando primero los de menor porcentaje de inclusión, aumentando progresivamente hasta el de mayor porcentaje de inclusión
3. Incorporación de los componentes lipídicos.
4. Adición del agua (40-45% de la masa elaborada).

En los diversos trabajos desarrollados, se ha trabajado con un tamaño de partícula que fluctúa entre los 150 y 300 μm sin que se supere éste último valor. Las variantes se han dado en muchas ocasiones por la naturaleza del ingrediente objeto de estudio.

El proceso que se aplica en la Planta Piloto del Centro es una extrusión en frío, la temperatura alcanzada por la masa en el proceso es de 60 grados centígrados, producto de la propia fricción.

Cuando el volumen de balanceado es grande la masa siguiendo el orden ya establecido, es aglomerada en una mezcladora (KOKUSAN) a 300 rpm por 10 minutos (ver anexo 4), hasta obtener una masa densa o pastosa. Posteriormente, la masa es adicionada a una tolva que esta adosada a un equipo que funciona con el principio de un molino de carne (ver anexo 4): un tornillo sin fin que empuja la masa hacia un plato, el cual, tiene acoplado discos que poseen orificios de diferentes diámetros y cuenta además con una cuchilla que va cortando automáticamente la pasta dándole el tamaño de un pellet. Luego los pellets así obtenidos son secados en una estufa (ver anexo 4) por espacio de 2 horas aproximadamente (humedad final, no mayor del 8%).

Cuando los experimentos no requieren grandes cantidades de balanceado, la mezcla se realiza manualmente, respetando el orden ya establecido, y posteriormente la masa es pasada de 2 a 4 veces a través de un Molino de carne (electrodoméstico casero), el cual igualmente dispone de una salida con una platina perforada a los diámetros requeridos (de 2 a 3 mm). A continuación se procede al secado en estufa. Por último, los fideos son cortados manualmente a la longitud requerida, de acuerdo al tamaño del animal a alimentar.

Marcador

En todos los trabajos realizados en el CENAIM donde se ha determinado digestibilidad, se ha utilizado óxido de cromo (Cr_2O_3), como marcador inerte. En niveles de inclusión entre el 0.5 a 1%, predominando éste último valor.

Unidades experimentales

A pesar de que algunos de los experimentos en sus etapas iniciales (periodo de evaluación de crecimiento) pudieran ser realizados en diferentes tipos de unidades experimentales (tanques de 500 L, de 2 toneladas, jaulas en piscinas), al dar inicio al ensayo de digestibilidad, se ha mantenido la uniformidad en el tipo de unidad experimental a usar.

Cada acuario de cloruro de polivinilo tiene una capacidad de 50 litros con las siguientes dimensiones 60x30x36 cm. (largo x ancho x alto y 0,18 m^2 de fondo). Para los últimos experimentos el acuario fue reemplazado por gavetas plásticas de similares dimensiones (Anexo 4). Adicionalmente son cubiertos con una malla de plástico (2mm de luz de malla) para prevenir el escape de los camarones. Se utilizan de 5 a 6 acuarios como réplicas por tratamiento.

Animales

En nuestro caso los camarones suelen ser distribuidos en una tasa de 5 a 7 unidades por acuario (aproximadamente 28 camarones por m^2).

El tamaño de los juveniles *L vannamei* usados en los diferentes experimentos ha fluctuado entre 4 y 7 g, y para estudios con reproductor se ha trabajado con un peso de 45 g.

Protocolo de alimentación

Se realizan 2 alimentaciones por día, una en la mañana y otra en la tarde, para tratar de semejar la rutina que se sigue en las granjas comerciales. La cantidad de alimento suministrado fluctúa entre un 10 al 7 % de la biomasa dependiendo del tamaño del animal y es ajustado en base a los muestreos de crecimiento quincenales que se realizan mientras dura el bioensayo.

Protocolo de recolección y tratamiento de heces

En términos generales, después de 45 a 60 días que es el tiempo que puede durar el experimento de crecimiento, se procede a cambiar las dietas por las que contienen el óxido de cromo (manteniendo la misma fórmula) y a aclimatar a los animales al alimento con el marcador por espacio de una semana.

Cumplido el periodo de acondicionamiento se procede a coleccionar las heces después de 2 horas de cada alimentación. Para realizar ésta actividad se emplea un sistema de sifoneo que consiste en una recuperación de las heces directamente desde el acuario, por medio de una manguera de vinyl, la cual descansa en su extremo terminal en una malla de nyltex de 90 µm.

Las heces separadas del alimento sobrante son lavadas con agua destilada para remover las sales del agua de mar, y son ubicadas en microtubos (Eppendorf™, USA) manteniendo las heces durante la colección en un baño de hielo para disminuir la pérdida de proteína soluble por lixiviación y la actividad bacteriana. El material fecal es centrifugado (Kokusan™ 2000B, Japón) a 13500 rpm por 5 min. a 4 ° C para descartar el exceso de agua, para luego congelarlas a -80 °C (Yamato™ CF-11, Japón). Posteriormente, las heces son secadas por liofilización en un periodo de 48 horas empleando un equipo Eyela™ (Japón).

El tiempo de colección esta directamente ligado a la cantidad de análisis a realizar y al tamaño del animal al momento de comenzar el ensayo de digestibilidad, teniendo como rangos mínimo una semana y máximo 2.

Técnicas usadas

Óxido de cromo por McGinnis y Kasting (1964)

Ver anexo 1

Su fundamento es muy similar al método de Furukawa. Una digestión ácida, cuantificación del dicromato a través de un reactivo de desarrollo de color y posterior lectura de la absorbancia a 540 nm.

Ventajas

- ✓ Permite trabajar con cantidades pequeñas de muestra 0,7 – 1,1 mg (base seca)
- ✓ Es un método rápido.

Desventajas

- ✓ Tiene algunos puntos críticos: la temperatura de digestión, el reactivo de desarrollo de color es de fácil contaminación.

Micro kjeldahl por Forster y Gabbot (1971)

Ver anexo 1

Ventajas

- ✓ Permite trabajar con cantidades pequeñas de muestra 0,7 – 1,8 mg.

Desventajas

- ✓ Proceso largo de digestión.
- ✓ Temperatura de digestión es un punto crítico de análisis.
- ✓ En general es un método complejo.

Análisis de Carbohidratos (Método Somogyi-Nelson)

Ver anexo 1

En éste método las muestras son inicialmente digeridas en ácido, luego alcalinizadas y filtradas. Posteriormente, una alícuota de este filtrado reacciona, en baño María, frente al sulfato cúprico produciendo la reducción de este compuesto. La cuantificación del agente oxidante que ha sido reducido es posible a través de la reacción colorimétrica formada, al entrar en contacto, con el ácido arsenomolibdico. La absorción de este color es medida en un espectrofotómetro a 530 nm.

CÁLCULOS APLICADOS

Digestibilidad Aparente de Materia Seca

$$DAMS = \left[1 - \left(\frac{\%Cr_2O_3 \text{ en alimento}}{\%Cr_2O_3 \text{ en las heces}} \right) \right]$$

Digestibilidad aparente de Proteína o Carbohidratos

$$DAP = 100 - \left[100 \times \left(\frac{(\% Cr_2O_3 \text{ en alimento})}{(\% Cr_2O_3 \text{ en heces})} \times \frac{(\% \text{ proteína en heces})}{(\% \text{ proteína en alimento})} \right) \right]$$

Referencias

- Dubois, M., Gilles, K. A., J. K. Reber, P. A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Foster, J. R. y Gabbot, P. A. 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 51: 943-961.
- McGinnis, A. J. and Kasting, R. 1964. Colorimetric analysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. *Agricultural and food chemistry* 12: 259-262.
- Molina, C. y Paredes, Y. 1997. Técnicas Analíticas para Nutrición Acuícola. En Manual de Técnicas para Nutrición Acuícola. Escuela Superior Politécnica del Litoral y Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas. 1-53.
- Molina, C. y Romero, D. 1999. Efecto del balance proteína/ energía en dietas para camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Pre grado. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad de Ciencias aplicadas y Ambientales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Santa fe de Bogota, Colombia.
- Molina, C. y Moreno, R. 1999. Evaluación en camarón de dietas con y sin harina de pescado en el engorde del camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Pre grado. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad de Ciencias aplicadas y Ambientales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Santa fe de Bogota, Colombia.
- Molina, C. y Orellana, P. 2000. Efecto de diferentes niveles de salinidad y balances proteína/energía en el crecimiento del *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Pre grado. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Agronomía Veterinaria y Acuicultura, Machala, Ecuador.
- Molina, C. y Gómez, M. 2002. Efecto de fuentes de carbohidratos no tradicionales en la digestibilidad de dietas para camarones *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Pre grado. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad de Colombia.
- Molina, C. y Arguello, 2003. Efecto del tipo y concentración de aglutinantes sobre la estabilidad del alimento preparado, tasa de ingestión y desarrollo gonadal de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Pre grado. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Ecuador.
- Molina, C. y Lucas, M., 2004. Evaluación de fuentes de proteína alternativa al uso de la harina de pescado en dietas para camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Pre grado. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad de Península de Santa Elena (UPSE). Escuela de Biología Marina.
- Molina, C. y Cárdenas, R. 2004. Evaluación del amaranto y quinua como reemplazantes de la harina de pescado en dietas para juveniles *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Fundación CENAIM-ESPOL. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Molina, C. and Morales, E. 2004. Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*, 2004, 35, 1158 - 1165.

ANEXO 1. Técnicas Analíticas

Determinación de Óxido de Cromo

1. RESUMEN.-

El óxido de cromo es un indicador utilizado para establecer la digestibilidad, el análisis se lo hace en dietas y heces para observar la cantidad de óxido de cromo que ha sido excretada.

El método fue descrito por McGinnis y Kasting (1964)

2. EQUIPOS.-

- 2.1 Balanza analítica
- 2.2 Espectrofotómetro
- 2.5 Baño térmico

3. MATERIALES.-

- 3.1 Pipetas automáticas
- 3.3 Tubos de ensayo
- 3.4 Cronómetro
- 3.5 Matraces aforados
- 3.6 Piceta
- 3.7 Probetas

4. REACTIVOS.-

- 4.1 Mezcla ácida de oxidación
- 4.2 Reactivo de desarrollo de color
- 4.3 Polvos estándares

5. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

5.1. MEZCLA ÁCIDA DE OXIDACIÓN

- Pesar 2g de molibdato de sodio, disolver en 30 mL de agua destilada.
- Adicionar 30 mL de ácido sulfúrico concentrado y 40 mL de ácido perclórico al 70%.

5.2. REACTIVO DE DESARROLLO DE COLOR

- Pesar 0.125 g de difenilcarbazida. Adicionar 25 mL de acetona.
- Agitar suavemente hasta completa disolución.
- Adicionar agua destilada hasta enrasar a 50 mL en matraz volumétrico.
- Esta solución es estable por un solo día.

6. PREPARACION DE LOS ESTANDARES

- Preparar una solución stock (300ug/mg), pesando 0.3 g de óxido de cromo y 0.7 g de tierra de diatomea o sílica, mezclar uniformemente hasta que se vea homogéneo.
- Pesar en tubos de ensayo 0.03, 0.05, 0.1, 0.16 y 0.17g de la solución stock y llevar hasta 1 g con tierra de diatomea o sílica, mezclar uniformemente.
- Adicionar 1 mL de mezcla ácida. Calentar a 220 ° C por 30 minutos.
- Enfriar y pasar el contenido a matraces de 50 mL, lavar con agua destilada por 3-4 ocasiones y enrasar a 50 mL.
- Tomar 10 mL de ésta solución y pasarla a matraces de 10 mL. Enrasar y adicionar 1 mL del reactivo de desarrollo de color.
- Leer en espectrofotómetro a 550 nm

7. PROCEDIMIENTO

- Trabajar por triplicado.
- Pesar de 0.7-1.1mg de dietas/heces en tubos de ensayo.
- Adicionar 1 mL de mezcla ácida
- Calentar en baño térmico a 220 ° C por 30 minutos.
- Después de la digestión ácida enfriar y pasar el contenido de los tubos a matraces de 50 mL, lavar con agua destilada por 3-4 ocasiones y enrasar a volumen.
- Tomar 10 mL de ésta solución y pasarla a matraces de 10 mL. Enrasar y adicionar 1 mL del reactivo de desarrollo de color.
- Agitar rápidamente, el color magenta aparecerá de inmediato.
- Leer en espectrofotómetro a 540 nm.

DETERMINACION DE PROTEINA (Micro Kjeldahl)

1. RESUMEN.-

Esta metodología nos permite determinar proteína en cantidades muy pequeñas de muestra (0.7-1.8 mg) aplicando un micro-kjeldahl, técnica descrita por Forster y Gabbot (1971) como una versión del método colorimétrico de fenol-hipoclorito.

3. EQUIPOS.-

- 3.1 Balanza analítica
- 3.2 Espectrofotómetro
- 3.3 Baño térmico

4. MATERIALES.-

- 4.1 Pipetas automáticas
- 4.2 Tubos de ensayo
- 4.3 Beakers
- 4.4 Matraces aforados
- 4.5 Piceta
- 4.6 Cronómetro

5. REACTIVOS.-

- 5.1 Mezcla para digestión
- 5.2 Reactivo de fenol
- 5.3 Reactivo de hipoclorito

6. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

6.1. Mezcla para digestión

Se disuelve 300 mg de dióxido de selenio en 15 mL de agua destilada, una vez disuelta se adiciona lentamente sobre ésta 85 mL de ácido sulfúrico concentrado. La solución resultante es cuidadosamente diluida a 200 mL con agua destilada

6.2. Solución Buffer fosfato

Disolver 20 mg de nitroprusiato de sodio en 5 mL de una solución acuosa de fenol al 80% y llevar a 400 mL con agua destilada.

6.3 Reactivo de hipoclorito

Se prepara adicionando 2 mL de hipoclorito de sodio (aproximadamente 1N en hidróxido de sodio 0.1N) sobre 80 mL de hidróxido de sodio 2.5%, y diluir cuidadosamente a 200 mL con agua destilada.

7. PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR

Solución stock: Preparar una solución que contenga 30 mg de sulfato de amonio por mL disolviendo 1.5 g de sulfato de amonio y llevar a 50 mL con agua destilada en matraz aforado.

A partir de ésta solución preparar soluciones que contengan 6ug/mL, 12ug/mL, 24ug/mL y 36ug/mL de sulfato de amonio.

8. PROCEDIMIENTO

- Trabajar por triplicado. Pesar entre 0.7-1.1mg para dietas y 1 a 1.8 mg para heces, en tubos de vidrio resistente al calor.
- Añadir 1 mL de la mezcla de digestión y llevar a Baño térmico a 120 °C por toda la noche.
- A la mañana siguiente elevar la temperatura del baño térmico a 320 °C por 6 horas, chequeando periódicamente que los fluidos no se hallan evaporado.
- Remover los tubos del baño térmico y dejar enfriar.
- Diluir el contenido de cada tubo a 20 mL con agua destilada en matraz volumétrico.
- Tomar 1 mL de ésta solución y llevar a un matraz volumétrico de 10 mL.
- A continuación adicionar en éste orden, 2 mL de hidróxido de sodio 2.5%, 4 mL del reactivo de fenol y 2 mL del reactivo de hipoclorito, llevar a volumen con agua destilada.
- Permitir el desarrollo del color por 20 minutos y leer inmediatamente en espectrofotómetro a 635nm.
- Preparar un blanco con 1 mL de la mezcla de digestión como si fuese 1 mL de muestra y adicionar en el mismo orden los reactivos.

9. NOTAS

La preparación del reactivo de hipoclorito debe ser en primer lugar realizada en el momento del análisis y en segundo lugar en el propio sitio donde se desarrollará la reacción y posterior lectura, ya que es un reactivo que pierde potencia química tan rápido como se lo traslade de un área a otra.

10. REFERENCIAS

Foster, J. R. y Gabbot, P. A. 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* 51: 943-961.

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS

1. ALCANCE.-

El procedimiento que se detalla a continuación sirve para determinar el porcentaje de carbohidratos en alimentos de origen vegetal y producto terminado.

2. RESUMEN.-

El óxido cuproso es formado por ebullición de una solución de sulfato cúprico en presencia de azúcar reductor, el óxido cuproso reacciona con el ácido arsenomolibdico para formar un color azul, la absorción de este color es determinado por un espectrofotómetro.

3. EQUIPOS.-

Balanza Analítica 0.0001 g
Baño de María
Centrífuga
Espectrofotómetro

4. MATERIALES.-

- 4.1 Matraces aforados de 100, 200, 1000 mL
- 4.2 Vasos de Precipitación de 500, 1000 mL
- 4.3 Pipetas Volumétricas de 1 mL
- 4.4 Tubos de ensayo 25 mL
- 4.5 Embudos de vidrio
- 4.6 Espátulas
- 4.7 Papel filtro

5. REACTIVOS.-

- 5.1 Hidróxido de sodio
- 5.2 Fenofaleína
- 5.3 Ácido clorhídrico
- 5.4 Carbonato de sodio
- 5.5 Tartrato de sodio y potasio
- 5.6 Sulfato cúprico
- 5.7 Bicarbonato de sodio
- 5.8 Sulfato de sodio
- 5.9 Molibdato de amonio tetrahidratado
- 5.10 Ácido sulfúrico
- 5.11 Arsenato dibásico de sodio heptahidratado
- 5.12 Glucosa

6. PREPARACIONES DE LAS SOLUCIONES

- 6.1 Solución clorhídrica 5%.- Se diluye 5 mL de ácido clorhídrico en 100 mL de agua destilada.
- 6.2 Fenofaleína 0.5%.- Se pesa 1 g de fenofaleína y se disuelve en 100 mL de etanol y 100 mL de agua destilada.
- 6.3 Solución de Cobre .- Disuelva 24 g de carbonato de sodio anhidro y 12 g de tartrato de sodio y potasio en 250 mL de agua en un vaso de 500 mL, añada 40 mL de una solución de sulfato cúprico al 10%, luego adicione 16 g de bicarbonato de sodio, mezcle bien y transfiera a un matraz de

1 l. En otro vaso de 1 L, disuelva 180 g de sulfato de sodio anhidro en 500 mL de agua hirviendo, caliente por un momento, enfríe y transfiera al matraz volumétrico de arriba. Incube por 2 días a 37 °C., después filtre y mantenga permanentemente la solución en un frasco ámbar a 37 °C.

6.4 Solución ácida de arseno-molibdico .-En un vaso de 500 mL disuelva 25 g de molibdato de amonio con 450 mL de agua y luego añada 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. En otro vaso de 50 mL disuelva 3 g de arsenato de sodio en 25 mL de agua y adicione ésta a la mezcla ácida de molibdato. Mantenga el vaso a 37 °C por 48 horas y almacene en una botella ámbar.

6.5 Glucosa 0.1 mg/mL .- Disolver 0.1 g de glucosa (secar a 100 °C por 1 h.) en 100 mL de agua destilada.

7. PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR.-

Tome alícuotas de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mL de la solución de glucosa de 0.1 mg/mL en tubos de ensayo de 25 mL. Tratar como en 8., empezando " Añada 1 mL de la solución de cobre, " .

8. PROCEDIMIENTO.-

Pese 0.02 - 0.025 g de dietas y 0.04 - 0.05 g de heces en un tubo de ensayo de 25 mL y adicione 6 mL de ácido clorhídrico 5% y hierva por 2 horas. Enfríe y adicione 2 gotas de fenoftaleína y neutralize con hidróxido de sodio 1 y 0.1 N hasta la aparición de color rosado tenue. Seguidamente filtre dentro de un matraz de 100 mL y lleve a volumen.

Tome 1 mL de la solución dentro de un tubo de ensayo de 25 mL y añada 1 mL de la solución de cobre, caliente en un baño de agua hirviendo por 10 minutos. Enfríe y adicione 1 mL de la solución ácida de arseno-molibdico, lleve hasta 25 mL y mezcle bien.

Después de 30 minutos, mida la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro en 530 o 540 nm.

9. CALCULOS.-

$$\%CHO = \frac{X * 100 * 0.9 * 100}{PM (g) * 1000}$$

Donde:

%CHO = Porcentaje de carbohidratos

X = mg/mL tubo de ensayo

100 = volumen del matraz

0.9 = conversión de la glucosa a glicógeno

PM = Peso de muestra (g)

10. NOTAS.-

Usar celdas de 10 mm.

REFERENCIAS.-

Crude starch determination. Somogyi-Nelson Method.

ANEXO 2. Publicaciones del grupo

Resúmenes

Efecto del balance proteínica/energía en dietas para camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*

1998

Camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*, fueron alimentados con dietas de 20 y 40% de proteína, las dietas de 20% de proteína (dietas A-D) contenían como fuente de carbohidratos almidón de yuca gelatinizado, con niveles que variaban desde 30 a 45% de inclusión de carbohidratos con incrementos de 5%. Mientras que las dietas de 40% (dietas E-G) contenían como fuente de carbohidratos almidón de yuca crudo y gelatinizado, y almidón de maíz crudo con un porcentaje de inclusión de carbohidratos de 30%. Se utilizaron dos niveles en la relación proteína energía 59 y 89 mg proteína/Kcal. energía. La duración del bioensayo fue de 60 días, se tomaron parámetros semanales de temperatura ($26.9 \pm 1.01^{\circ}\text{C}$, n=8) pH (7.9 ± 0.36 , n=8) oxígeno disuelto (5.96 ± 0.64 ppm, n=8) y salinidad (33.3 ± 1.6 μps n=8). Se manejaron periodos de luminosidad de 12 horas. Los camarones que consumieron la dieta C obtuvieron el mayor peso final el cual fue de 5.09g teniendo una ganancia semanal de peso de 0.7 g, los animales que consumieron las dietas A y B no presentaron diferencias estadísticas en cuanto a su peso final. La dieta D de 20% de proteína y las dietas de 40% de proteína en general presentaron el más bajo peso final. Si bien las dietas de 20% de proteína no obtuvieron muy buenas conversiones alimenticias, la mejor conversión alimenticia fue para la dieta B (2.87), mientras que en las dietas de 40% la obtuvo la dieta F (2.09), siendo esta la mejor del bioensayo. La supervivencia en las dietas A-D se mantuvo por encima del 95%, la dieta D obtuvo la más alta supervivencia (100%). Aunque no fue baja la supervivencia de las dietas E-G (80%), la dieta G obtuvo la más baja. En términos de ingestión de alimento en porcentaje de biomasa y eficiencia proteínica, los más bajos fueron obtenidos por las dietas de 40% de proteína, lo que indica que estos animales presentaron el más bajo consumo de alimento y la más pobre utilización de la proteína, y se reflejo en el bajo crecimiento de los animales. También se realizaron análisis sobre la utilización de la amilasa y reserva de glicógeno en hepatopáncreas. Los camarones que consumieron la dieta C mostraron que los almidones gelatinizados suministrados fueron mejor utilizados dada la alta reserva de carbohidratos encontrada en el hepatopáncreas, esto también indica que la gelatinización de almidones aumenta la eficiencia en la utilización de la amilasa para desdoblar los carbohidratos dietéticos.

Uso del residuo de cervecía como una fuente reemplazante de proteína animal marina en dietas para camarón *Litopenaeus vannamei*

1998

Residuos de la destilación de cerveza (RDC) se evaluaron como una fuente de proteína alternativa en dietas para juvenil *Litopenaeus vannamei*. Se formularon 4 dietas isocalóricas conteniendo 44% de proteína, en donde la mezcla de proteína de origen animal marino fue sustituida con 0 (A), 16 (B), 32 (C) y 48% (D) de RDC. Con estas dietas se alimentaron durante 6 semanas a camarones de peso promedio inicial de 2g. Al final del experimento, los camarones alimentados con la dieta B presentaron similar ganancia de peso que la dieta control (7,6g). Con los aumentos graduales de

RDC, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en el peso final. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las tasas de supervivencia para los diferentes tratamientos ($> 96\%$). La cantidad de alimento no consumido fue positiva y significativamente ($r^2 = 0,99$, $p < 0,001$) relacionado al nivel de inclusión de RDC en las dietas. La utilización de este subproducto reduciría el costo del balanceado para camarón y reduciría la menor dependencia de fuentes proteicas marinas como la harina de pescado.

La digestibilidad aparente de proteína y materia seca varió de 82,5 a 90,0% y de 69,1 a 78,8%, respectivamente, donde la dieta D conteniendo 48% de RDC fue estadísticamente ($p < 0,05$) la mejor. La inclusión de RDC tuvo un efecto significativamente ($r^2 = 0,75$, $p < 0,05$) positivo sobre la digestibilidad de carbohidratos. Una significativa ($p < 0,05$) estimulación también fue evidenciada conforme se incrementaba el nivel de reemplazo de proteína marina por RDC a nivel de actividad de amilasa, concentraciones de proteína soluble y glicógeno en el hepatopáncreas. El factor de conversión alimenticia y la tasa de eficiencia proteica, fueron estadísticamente ($p > 0,05$) iguales en las dietas conteniendo entre 0% y 32% de RDC, lo que podría sugerir que si el balance de aminoácidos y la palatabilidad pueden ser mejorados, el nivel dietético del RDC podría ser incrementado hasta un 32% sin que el crecimiento se vea afectado negativamente.

Efecto de diferentes niveles de salinidad y balances proteína/energía en el crecimiento del *Litopenaeus vannamei*

2000

El efecto de los diferentes niveles de salinidad (5, 15, 25, 35 y 45 unidad prácticas de salinidad "ups") en los que se habita el *Litopenaeus vannamei* fue evaluado, conjuntamente con dietas que contenían diferentes balances proteína/energía (P/E), los mismos que estaban basados en un nivel proteico ascendente. Los objetivos planteados al comienzo de esta investigación fueron los siguientes:

- Determinar si existe interacción entre los niveles de salinidad y el balance P/E.
- Lograr determinar un balance P/E adecuado para cada uno de los niveles de salinidad evaluados o uno que actué eficientemente en todos.

Para alcanzar estos objetivos se desarrollaron dos bioensayos, el primero estuvo encaminado a evaluar el crecimiento, supervivencia y biomasa obtenida, mientras que en el otro fue dirigido a determinar la digestibilidad de las dietas utilizadas. Ambos experimentos se realizaron en un sistema de recirculación cerrada, previamente diseñado y construido para mantener estables los parámetros físico-químicos del agua (salinidad, temperatura, oxígeno, pH y amonio).

Independientemente del balance P/E usado, un menor crecimiento en 45 ups fue obtenido en comparación con los niveles de salinidad inferiores (5 a 35 ups). No se encontró una interacción entre las salinidades y los balances proteína/energía. La supervivencia fue afectada negativamente por el incremento de la salinidad, ya que fue inversamente correlacionada con la misma. Por otro lado, la biomasa alcanzada fue superior en el menor nivel de salinidad (5 ups), mientras que en los niveles intermedios (15, 25 y 35 ups) no existieron diferencias, disminuyendo marcadamente en 45 ups.

En el bioensayo de digestibilidad se estableció un efecto de la salinidad y el nivel de proteína sobre la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS). La digestibilidad aparente de la proteína (DAP)

aumentó con el incremento del balance P/E en las dietas y disminuyó a medida que la salinidad se elevó. Los valores más elevados de DAP fueron encontrados a 5 y 15 ups y a 88,06 y 89,56 mg proteína/kcal.

De acuerdo con los resultados obtenidos se podría asumir que el desarrollo del *L. vannamei* está relacionado con aspectos fisiológicos que determinan un mejor desempeño de esta especie en bajas salinidades. Al tratar de determinar el balance P/E más adecuado se puede sugerir el uso de un nivel de proteína inferior al utilizado en este estudio, ya que no se encontraron mejorías al usar niveles de inclusión altos en aguas hipersalinas; en las salinidades intermedias no existieron mayores diferencias entre dietas y finalmente el alto nivel de proteína requerido en 5 ups, podría ser proporcionado por la abundante productividad primaria encontrada en aguas estuarinas.

Efecto de fuentes de carbohidratos no tradicionales en la digestibilidad de dietas para camarones *Litopenaeus vannamei*

2002

Los ingredientes ricos en carbohidratos son la fuente de energía dietética más barata de la naturaleza y su inclusión en alimentos permite que la proteína sea usada para el crecimiento y no como fuente de energía. En este trabajo se determinó la digestibilidad de almidón de yuca (Y), harinas de banana (B) y plátano (P) sin madurar, estas fuentes de carbohidratos se ensayaron en estado crudo (C) y gelatinizado (G). Además, fue evaluado el efecto del nivel de carbohidratos sobre la digestibilidad de dietas usando 2 concentraciones de proteína.

La digestibilidad de proteína no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las diferentes dietas conteniendo 35% de la fuente de carbohidratos ensayada, 30% de proteína y 7% de lípidos. Los carbohidratos gelatinizados fueron más digestibles que los crudos. La dieta que contenía banana cruda (BC) presentó la más baja digestibilidad de carbohidratos (DC). Sin embargo, esta digestibilidad se incrementó a 62%, similar a PC y YC, cuando se gelatinizó. La dieta con almidón de yuca gelatinizado (YG) mostró la mayor digestibilidad de carbohidratos, conteniendo 100% de almidón, a diferencia de las otras fuentes de carbohidratos las cuales contenían alrededor de 70%. Dado que la YG ya fue estudiada en trabajos previos, se decidió evaluar la harina de plátano sin madurar gelatinizada (PG), por ser la segunda mejor fuente en cuanto a digestibilidad.

La inclusión de 35% o más de PG en dietas que contenían 20 o 30% de proteína, resultó en un decrecimiento estadístico ($p < 0.05$) de la proteína digestible del alimento. La inclusión de niveles de 30, 40 y 45% de PG en dietas con 20% de proteína mostraron una DC significativamente menor ($p < 0.05$) con respecto a las dietas de 20 y 25% de PG.

La dieta con 35% de PG obtuvo la más baja DC (80%). Entretanto, el alimento que contenía 30% de proteína presentó una correlación inversa significativa ($p < 0.05$, $R^2 = 0.84$) entre los niveles de PG y DC. Estos resultados muestran que la gelatinización mejora la DC y que el uso de proteína por el *L. vannamei* juvenil no es afectado por niveles de PG menores a 30% (o 21% de almidón) en las dietas. Para confirmar estos resultados será conveniente evaluar los mejores niveles de inclusión bajo las condiciones del pelletizado.

Efecto del tipo y concentración de aglutinantes sobre la estabilidad del alimento preparado, tasa de ingestión y desarrollo gonadal de *Litopenaeus vannamei*

2002

Se evaluó el efecto de 6 aglutinantes (agar, alginato de sodio, almidón de yuca, gelatina, gluten de trigo y harina de kelp), en 2 concentraciones (3% y 5%) sobre la calidad física de alimentos peletizados para camarón *L. vannamei*, después de 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de inmersión en agua. Los mejores tratamientos en términos de estabilidad, hidroabsorción y lixiviación de proteínas se obtuvieron con alginato de sodio y gluten de trigo al 5%. En un segundo experimento, se determinó la tasa de ingestión de éstos dos aglutinantes individualmente y una combinación de ellos (1:1) comparando contra una dieta control que contenía harina de trigo al 5%. No existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la tasa de ingestión diaria: 2.39 – 3.33% de la biomasa. Los valores más representativos de DAP Y DAMS fueron alcanzados con las dietas que contenían como aglutinante el gluten de trigo y la combinación alginato+gluten. Mientras que los más altos índices gonadosomático y hepatosomático los registró la dieta con alginato de sodio 5%. Hembras ablacionadas no alcanzaron la maduración completa con ninguno de los tratamientos. Sin embargo, con el alginato de sodio llegaron a un estadio de maduración gonadal medio (Estadio 2). Basados en estos resultados se recomienda al gluten de trigo 5% como aglutinante en alimentos peletizados para camarón *L. vannamei*.

Evaluación de fuentes de proteína alternativa al uso de la harina de pescado en dietas para camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*

2003

El presente estudio fue diseñado para evaluar el potencial del lupin andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) y el gluten de maíz como fuente de proteína en alimentos prácticos para el camarón juvenil *Litopenaeus vannamei*.

Dos grupos de dietas experimentales conteniendo 35% de proteína y 11% de lípidos fueron preparadas, donde 0, 25, 50, 75 y 100% de la proteína proveniente de la harina de pescado fue sustituida por proteína de las harinas de lupin o gluten de maíz. Todas las dietas tuvieron 10% de harina de calamar para proveer atractabilidad a las dietas. Antes de moler las semillas de lupin, los alcaloides, la cáscara y la grasa fueron removidas por medio de tratamientos específicos. Solamente los contenidos de almidón de maíz (36.9 a 31.6%) y aceite de pescado (5.3 a 7.0%) variaron para mantener constante los niveles de proteína y lípidos en las nueve dietas experimentales. Camarones de $1,23 \pm 0,22$ g fueron sembrados a razón de 8 por acuario de 50 L, con 6 réplicas (acuarios) asignadas a cada uno de los tratamientos en un diseño completamente aleatorizado.

Al final del ensayo de alimentación de 57 días, el promedio de supervivencia de los camarones fue mayor a 80% y no varió significativamente ($p > 0,05$) cuando la harina de pescado fue reemplazada parcial o totalmente con gluten de maíz o lupin. El mayor número de mortalidades fue producto del salto de camarones hacia fuera del acuario. Las tasas de crecimiento de los camarones alimentados con lupin fueron mayores que para aquellos alimentados con gluten de maíz. El gradual incremento del gluten de maíz en las dietas produjo un significativo decrecimiento de los camarones.

Estos resultados muestran que el lupin tiene un potencial muy bueno como fuente proteína hasta el 50% de la proteína de la harina de pescado lo cual es equivalente a un tercio del total de la proteína presente en la dieta. Los valores más bajos relativos del gluten de maíz relativo a la harina de pescado podría ser debido a la pobre palatabilidad, baja digestibilidad de la proteína, imbalance de aminoácidos y/o a la presencia de factores antinutricionales. El costo-beneficio de incluir estos ingredientes necesita ser evaluado.

ANEXO 3. Tablas de Formulación de Alimentos

Tabla 1. Uso del residuo de cervecería como una fuente reemplazante de proteína animal marina en dietas para camarón *Litopenaeus vannamei*. 1998.

Ingredientes (%)	A	B	C	D
Harina de cabeza de camarón	33,40	22,40	11,40	00,00
Harina de pescado	10,00	6,70	3,40	00,00
Harina de calamar	5,00	3,35	1,70	00,00
Proteína Animal Marina	48,40	32,40	16,40	0,00
Residuo de destilación de Cerveza	0,00	16,00	32,00	48,40
Gluten de trigo	2,95	7,56	12,18	16,91
Harina de pasta de Soya	20,00	20,00	20,00	20,00
Aceite de Pescado	4,98	5,24	5,26	2,43
Lecitina de soya	1,00	1,00	1,00	1,00
Colesterol	0,50	0,50	0,50	0,50
Mezcla Vitamínica	4,50	4,50	4,50	4,50
Mezcla Mineral	2,00	2,00	2,00	2,00
Aglutinante Pegabind®	1,00	1,00	1,00	1,00
Antioxidante Etoxiquin®	0,02	0,02	0,02	0,02
Oxido de cromo (Cr ₂ O ₃)	1,00	1,00	1,00	1,00
Almidón de maíz (Maicena)	13,66	6,71	0,00	0,00
Tierra de diatomea (SiO ₂)	0,00	2,08	4,15	2,25
	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabla 2. Evaluación de fuentes de proteína alternativa al uso de la harina de pescado en dietas para camarones juveniles *Litopenaeus vannamei*.

Ingredientes	CGM					LM			
	0	25	50	75	100	25	50	75	100
Harina de pescado ¹	32.91	24.68	16.46	8.23	0.00	24.68	16.46	8.23	0.00
Harina de calamar ²	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Harina de gluten de maíz ³	0.00	8.64	17.28	25.92	34.56	-	-	-	-
Harina de chocho ⁴	-	-	-	-	-	9.12	18.25	27.37	36.50
Aceite de pescado	5.28	5.70	6.15	6.60	7.04	5.71	6.17	6.63	7.08
Lecitina líquida	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Colesterol	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Mezcla Vitaminas ⁵	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Mezcla Minerales ⁶	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Antioxidante	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021	0.0021
Antimicótico	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Carboximetil celulosa	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Astaxantina	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Gluten de trigo ⁷	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Oxido de cromo	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Almidón de maíz ⁸	35.96	35.13	34.26	33.40	33.54	34.63	33.27	31.92	30.57

¹ Producido por el método de vapor seco (69.7% proteína cruda c.p.; 6.9% de grasa). Polar, Salango, Ecuador.

² Procesado en el laboratorio por liofilización (calamar pequeño comercial *Loligo* sp de 80.4% p.c; 4.3% lípidos)

³ Industrias del Maíz S.A. Corn Products Andina, Cali, Colombia (66.4% c.p.; 1.4% grasa).

⁴ Harina de chocho sin cáscara, extracción de solventes (66.4% c.p.; 1.2% grasa)

⁵ (mg 100g⁻¹ dieta): ácido p-aminobenzoico, 10; tiamina-HCl, 12; riboflavina, 20; piridoxina-HCl, 12; cloruro de colina, 250; ácido nicotínico, 75; pantotenato de calcio, 50; Inositol, 200; Biotina, 0.5; ácido fólico, 1.5; ácido ascórbico, 10; menadiona, 4; acetato de tocoferol, 40; cianocolabamina, 0.03; colecalciferol, 0.03; l-caroteno, 1.15 10⁻³.

⁶ (mg 100g⁻¹ diet): fosfato monobásico de calcio, 272; lactato de calcio, 640.2; citrato ferrico, 60; sulfato de magnesio heptahidratado, 274; fosfato de potasio, 480; fosfato monobásico de sodio, 174; cloruro de sodio, 86; cloruro de aluminio, 0.4; yoduro de potasio, 0.3; cloruro de cobre, 0.2; sulfato mangonoso monohidratado, 1.6; cloruro de cobalto hexahidratado, 2.1; zinc sulfato de sodio heptahidratado, 7.1; selenito de sodio, 2.

⁷ Adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA

⁸ Adquirida de Sumesa S.A., Guayaquil, Ecuador

ANEXO 4

FOTOS

PLANTA PROCESO DE ALIMENTO



PLANTA PROCESO DE ALIMENTO



PLANTA PROCESO DE ALIMENTO



UNIDAD EXPERIMENTAL





UNIDAD EXPERIMENTAL





UNIDAD EXPERIMENTAL



Método Usado en el CSIRO para Medir la Digestibilidad *in vivo* en Camarón

D.M. Smith*, S.J. Tabrett, S.J. Irvin

CSIRO Marine & Atmospheric Research, PO Box 120, Cleveland Q. 4163, Australia.

Phone number +61 7 3826 7239; Facsimile: +61 7 3826 7222; E-mail: david.m.smith@csiro.au.

Traducido por: Mireya Tapia-Salazar, Denis Ricque-Marie, Lucía E. Cruz-Suárez, Martha Nieto López

Introducción

El CSIRO se ha involucrado en la investigación sobre nutrición de crustáceos, predominantemente camarón tigre, *Penaeus monodon* y más recientemente, desde finales de los años 80's, con la langosta espinosa tropical *Panulirus ornatos*. La investigación ha incluido estudios en requerimientos nutricionales, evaluación de ingredientes y el desarrollo de alimentos para estas especies. La medición de la digestibilidad de la dieta y de los ingredientes que constituyen el alimento ha sido también una parte integral de estos estudios. La formulación de alimentos nutricionalmente eficientes para el cultivo intensivo de cualquier especie requiere de la comprensión de sus requerimientos nutricionales y de la disponibilidad de los nutrientes en los ingredientes que se encuentran conformando el alimento. El estudio de la digestibilidad aparente de los nutrientes en un ingrediente o alimento proporciona una estimación muy práctica, aunque a veces sobreestimada, de la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo, la digestibilidad aparente de un nutriente puede ser medida mucho más fácilmente que la digestibilidad real de este nutriente, y por esta razón es la aproximación más ampliamente divulgada en la literatura y usada en la formulación de alimentos (Lee y Lawrence, 1997).

Las técnicas que utilizamos para determinar la digestibilidad de alimentos y de ingredientes son esencialmente idénticas. Cuando determinamos la digestibilidad de los ingredientes, aunque el ingrediente puede constituir hasta el 50% de la dieta, nos aseguramos de que la dieta de referencia sea nutricionalmente balanceada para sostener el crecimiento del camarón por largo período. En lo que respecta a esto, las dietas no son muy diferentes de las dietas usadas en pruebas de alimentación. El protocolo que adoptamos está basado en una serie de experimentos que realizamos para entender los factores que afectan la precisión de las estimaciones de la digestibilidad en camarón (Smith y Tabrett, 2004). En este documento discutiremos las ventajas relativas de usar los métodos gravimétricos y de marcadores inertes para determinar la digestibilidad y nuestras razones de elegir un marcador en especial para la digestibilidad. Por otro lado, describiremos cómo llegamos a formular la dieta de referencia para estudios de digestibilidad en ingredientes y daremos los detalles de cómo preparamos las dietas. También describiremos en detalle nuestro protocolo para desarrollar un experimento de digestibilidad, proporcionando datos que soportan nuestra aproximación, particularmente en lo que respecta a asegurarnos que la información sobre la composición del alimento ingerido es confiable, y que la colección de muestras de heces es representativa.

Método para determinar la digestibilidad: gravimétrico vs marcador inerte

La digestibilidad aparente puede ser determinada directamente midiendo la ingesta total del alimento consumido y posteriormente la totalidad de las heces producidas (método gravimétrico), o indirectamente midiendo el cambio de la concentración de un marcador no digestible entre la cantidad de este mismo marcador que se encuentra presente en el alimento y el encontrado en las

heces (método de marcador inerte). La cuantificación del alimento consumido y la cantidad de heces producidas no se requiere con el método de marcador inerte. El marcador puede estar presente de manera natural, tal como ceras de ésteres o cenizas insolubles en ácido, pero comúnmente, los marcadores inertes son agregados en el alimento con el fin de determinar digestibilidad. Frecuentemente se usa como marcador inerte el óxido de cromo (Cr_2O_3) o el acetato de iterbio. Una cuestión clave en la determinación de la digestibilidad aparente de los alimentos es saber cual de los dos métodos, gravimétrico o de marcador inerte, proporciona resultados más coherentes y más exactos. Smith y Tabrett (2004) concluyeron que es posible obtener estimaciones similares de digestibilidad aparente usando ambos métodos cuando se presta atención a los detalles durante el desarrollo del experimento. Leavitt (1985) argumenta que si todas las heces pueden ser recuperadas, el método gravimétrico debería ser usado de preferencia al método de marcador inerte, pues es más sencillo y menos propenso al error. Ambos métodos tienen fuentes potenciales de error.

Usando el método gravimétrico, la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), la digestibilidad aparente de la proteína cruda (DAPC) y la digestibilidad aparente de la energía (DAE) son calculadas en los alimentos y dietas prueba usando la siguiente ecuación:

$$DA_{A \text{ en alimento}} (\%) = \left(\frac{A_{\text{alimento ingerido (g)}} - A_{\text{heces (g)}}}{A_{\text{alimento ingerido (g)}}} \right) * 100$$

donde:

A es el analito, ya sea materia seca, proteína cruda o energía.

Con este método, particularmente con aquellos alimentos que tienen poca estabilidad en el agua, tal como los usados para determinar la digestibilidad de algunos ingredientes nuevos, la recuperación incompleta del alimento y las heces afectarán la estimación de la digestibilidad. Esto es de particular importancia, si las especies de camarones tienden a fragmentar los pellets durante su alimentación. Sin embargo, cuando se determina la digestibilidad de alimentos previamente preparados, tales como alimentos comerciales para camarón, puede ser necesario usar en estos alimentos la técnica gravimétrica, ya que estos raramente contienen marcadores inertes para digestibilidad. Para utilizar el método de marcador inerte con estos alimentos, un marcador indigestible natural, tal como un alcano de cadena larga, requeriría ser identificado en el alimento. Alternativamente, se tendría que moler los alimentos, adicionar el marcador inerte y luego reprocesarlos. No obstante, la molienda y la adición de agentes aglutinantes extras son susceptibles de modificar las características de digestibilidad del alimento.

La exactitud del método de marcador inerte para determinar digestibilidad se basa en las siguientes conjeturas: (1) las proporciones relativas de los nutrientes y de los marcadores en el alimento son las mismas que en el material efectivamente ingerido por el camarón, y (2) las pérdidas de material de las heces antes de su colección son mínimas y la proporción de componentes dentro de las heces se mantiene constante. Además, la validez del método de marcador inerte se basa en la medición exacta del marcador en alimento y heces, y en la suposición de que el marcador es fisiológicamente inerte, no es absorbido en el tracto digestivo, y pasa a través del sistema digestivo a la misma velocidad que el alimento ingerido. Los resultados del método del marcador pueden ser variables, si la mezcla del marcador en el alimento no es adecuada. Sin embargo, nuestros resultados han

demostrado que el óxido de cromo y el iterbio pueden ser considerados como marcadores inertes válidos para proporcionar estimaciones exactas de la digestibilidad.

Con el método de marcador inerte, la digestibilidad aparente de los alimentos puede ser calculada usando un número de derivaciones de la siguiente ecuación:

$$DA (\%) = 100 * \left\{ 1 - \left(\frac{M_{ai} * A_h}{M_h * A_{ai}} \right) \right\}$$

Donde:

M_{ai} y M_h son las concentraciones (en base seca) del marcador ingerido en el alimento y en las heces, respectivamente, y A_{ai} y A_h son las concentraciones (en base seca) del nutriente (o analito) en el alimento ingerido y en las heces, respectivamente.

La ecuación podría ser re-escrita como sigue:

$$DA (\%) = 100 * \frac{\text{Cociente del marcador}_{\text{alimento}} - \text{Cociente del marcador}_{\text{heces}}}{\text{Cociente del marcador}_{\text{alimento}}}$$

Donde:

$$\text{Cociente del marcador} = \frac{\text{Concentracion del nutriente (g/kg)}}{\text{Concentracion del marcador (g/kg)}}$$

Las comparaciones entre los dos métodos (gravimétrico y con marcadores), han demostrado que el método de marcador es menos susceptible al error, particularmente, si una parte de las heces es imposible de coleccionar (Smith y Tabrett, 2004). Sin embargo, el uso de marcadores inertes aumenta el costo que implica los análisis químicos, pues la concentración del marcador debe de ser determinada tanto en el alimento como en las heces. Ambos métodos (gravimétrico y con marcadores inertes), requieren un esfuerzo considerable en la colección de heces, pues una muestra razonablemente grande (cerca de 2.0 g MS) es requerida para cada replicado con el fin de proporcionar muestras representativas para los análisis químicos y las determinaciones de la energía. La desventaja principal del método gravimétrico es el esfuerzo implicado en recoger y cuantificar el alimento no consumido, y la aplicación de factores de corrección para considerar las pérdidas por lixiviación de la materia seca, proteína cruda y energía del alimento no consumido durante el tiempo que permaneció en el tanque. Cuando no hay disponibilidad de un apoyo analítico sofisticado y el trabajo provocado por la recuperación del alimento no consumido no es un obstáculo importante, la técnica gravimétrica (si es utilizada con cuidado) permite obtener una medida exacta de la digestibilidad aparente. No obstante, medir exactamente la cantidad de alimento ingerido y la cantidad de heces producidas con especies acuáticas es a menudo difícil, particularmente con los camarones, que son animales de alimentación lenta. Consecuentemente la técnica de marcador inerte se ha convertido en el método de mejor opción (Smith *et al.*, 1985; Shiau *et al.*, 1992; Lee y Lawrence, 1997; Smith y Tabrett, 2004).

Determinación de la digestibilidad en ingredientes

Al determinar la digestibilidad aparente de un ingrediente, no es práctico alimentar al camarón solamente con ese ingrediente. Generalmente se necesita mezclarlo con otros ingredientes y un marcador inerte para hacerlo estable al agua, atractivo y nutricionalmente adecuado para este crustáceo. Para calcular la digestibilidad de un ingrediente, la digestibilidad de los otros componentes debe ser conocida. Una dieta de referencia se utiliza para proporcionar los nutrientes requeridos, atrayentes, aglutinantes, así como el marcador inerte. Habitualmente, el ingrediente a evaluar (ingrediente a prueba) es mezclado con la dieta de referencia en una proporción de 1:1. Sin embargo, si esto no es práctico, o tales proporciones producen una dieta nutricionalmente desequilibrada, el nivel de inclusión puede ser reducido. No obstante, bajos niveles de inclusión del ingrediente a evaluar resultan en una mayor incertidumbre en la estimación de la digestibilidad. Cuando se quiere determinar la digestibilidad de los lípidos, se usan niveles bajos de inclusión (<10%), pero se mantiene la precisión gracias al uso de un marcador específico para digestibilidad de lípidos, tal como el colestano (Ishikawa *et al.*, 1997)

La digestibilidad aparente (DA) de la dieta de referencia es determinada separadamente, y la dieta de referencia y el ingrediente a evaluar son mezclados en proporciones específicas para formar la dieta a evaluar (dieta prueba), cuya digestibilidad también se determina. La DAMS, DAPC y DAE del ingrediente a evaluar se calculan utilizando la respectiva digestibilidad de la dieta prueba y de la dieta de referencia en la ecuación descrita por Pfeffer *et al.* (1995):

$$DA_I = \frac{1}{\alpha} [DA_{DP} - (1 - \alpha) DA_{DR}]$$

Donde DA_I , DA_{DP} y DA_{DR} son la digestibilidad aparente del nutriente en el ingrediente, en la dieta prueba y en la dieta de referencia respectivamente, y α es la proporción del nutriente en la mezcla de ingredientes (masa o pasta) de la dieta prueba que es contribuida por el ingrediente a evaluar, en base húmeda (Bureau *et al.*, 1999).

La dieta de referencia usada en estudios recientes para determinar la digestibilidad en ingredientes (lupino) en el CSIRO (Tabla 1) fue formulada para ser nutricionalmente adecuada y atrayente para el camarón, incluso, cuando se manejó una proporción de 1:1 con un ingrediente que contenía de 40% a 60% de proteína cruda y de 6% a 10% de lípidos. La formulación de la dieta de referencia es modificada según la composición nutricional y del nivel previsto de inclusión de los ingredientes a evaluar. De esta manera, la dieta de referencia está balanceada, aunque puede contener dos veces los niveles recomendados de vitaminas y de otros micronutrientes. Esto nos obliga a evaluar ingredientes de composición a *grosso modo* similar en cada experimento, a menos de que utilicemos más de una dieta de referencia. Generalmente, la formulación de la dieta de referencia será similar a la presentada en la Tabla 1 pero el contenido de la harina de pescado y el contenido de lípidos se pueden cambiar para asegurarse de que tanto la dieta de referencia como las de prueba estén nutricionalmente balanceadas.

Tabla 1. Composición de la dieta de referencia usada en el CSIRO Marine Research para estudios de digestibilidad en ingredientes.

Ingrediente	Nivel de inclusión (g Kg. ⁻¹ base húmeda)	Descripción
Harina de pescado	200	Prime 68% PC, Perú
Harina de calamar	100	66% PC, Japón,
Harina de langostino	100	35% PC Chile,
Gluten	120	Trigo 76% PC
Harina	370	Trigo, 11% PC
Aceite de hígado de bacalao	40	99.5% lípidos, Laboratorios Melrose
Lecitina	30	Soya, 70% fosfolípidos
Colesterol	10	Pureza 100%, Ajax Chemicals
Mezcla de vitaminas	20	Como lo recomienda Conklin (1990)
Vitamina C, Stay C	2	35% ácido ascórbico, Argent Labs.
Carophyllpink	1	8% Astaxantina, Roche Vitamins
Banox E	0.4	Mezcla de antioxidantes, Adisseo
Acetato de iterbio	0.5	Tetrahidratado, Aldrich Chemicals

Opciones de marcadores

Nosotros hemos comparado la DAMS y de la DAPC de la dieta de referencia utilizando el método de colección gravimétrico, y con marcadores inertes, el óxido de cromo y el acetato de iterbio (Smith y Tabrett, 2004). Las estimaciones de DAMS y de la DAPC se diferenciaron por no más de 2.2 de unidades porcentuales (rango de 71.7 a 73.9) y 0.9 de unidad porcentual (rango 91.1 a 92.0%) respectivamente.

El acetato del iterbio es usado como un marcador del flujo de la fase particulada de la digesta en nutrición de rumiantes, debido a la capacidad del ion iterbio a unirse a partículas del alimento (Siddons *et al.*, 1985). En contraste, el óxido de cromo es una partícula fina que es insoluble incluso en agua caliente y no tiende a unirse a otras partículas. Esta diferencia en las características de enlace entre los dos marcadores hace que el iterbio sea práctico como herramienta para determinar el comportamiento del óxido de cromo en el tracto digestivo de los animales (Faichney *et al.*, 1989). El iterbio ha sido utilizado extensivamente en la nutrición de rumiantes y es considerado como no tóxico (Teeter *et al.*, 1984; Siddons *et al.*, 1985). El óxido de cromo se ha utilizado ampliamente como un marcador para digestibilidad en especies acuáticas (Jones y De Silva, 1997).

La preocupación principal por el uso del óxido de cromo como un marcador de la digestibilidad en estudios en crustáceos ha sido el grado de variabilidad de la velocidad de paso a través del tracto digestivo, según lo observado por los cambios del color en las heces (Forster y Gabbott, 1971; Bordner *et al.*, 1983; Leavitt, 1985; Jones y De Silva, 1997). Nosotros examinamos heces colectadas en periodos consecutivos de tres horas y mostramos que la velocidad de paso del cromo (Cr) y como del Iterbio (Yb) a través del tracto digestivo fue similar a la de la MS y de la PC (Fig. 1) (Smith y Tabrett, 2004). La concentración del Cr en las heces fue mayor en el primer periodo de tres horas que en el segundo periodo, lo que es consistente con lo observado en otros trabajos. Nuestros resultados apoyan a los de Jones y De Silva (1997) quienes concluyeron que la distribución del óxido de cromo en las heces es heterogénea y una estimación confiable de la digestibilidad puede ser hecha solamente cuando la mayoría de las heces es colectada. Al coleccionar la producción fecal en intervalos de 3 h logramos coleccionar más del 98% del cromo e iterbio defecado dentro de un periodo

de 12 h después de la alimentación (Fig. 1). El N fecal y la MS recuperados después de este periodo inicial de 12 h probablemente provienen de pérdidas metabólicas y de la membrana peritrófica de las heces.

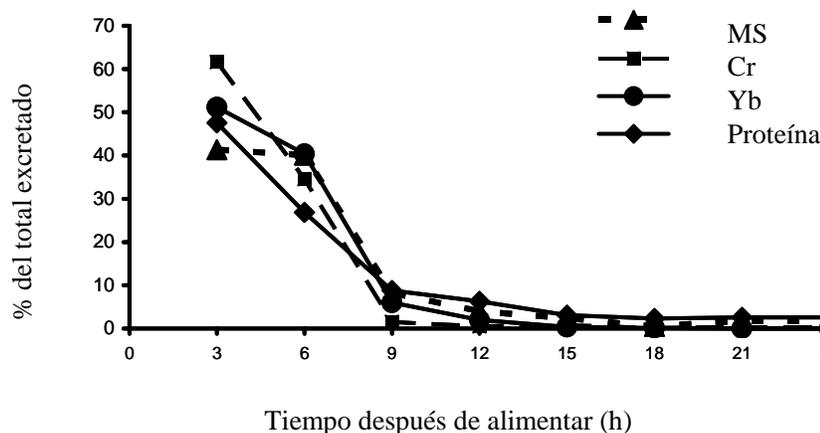


Figura 1. Porcentaje de materia seca total (MS), proteína cruda (PC), óxido de cromo (Cr) e iterbio (Yb) recuperado de heces de camarón, *Penaeus monodon*, a intervalos de 3 horas después de alimentación.

Han surgido preguntas en relación a si el óxido de cromo es realmente un compuesto inerte y si se comporta de acuerdo con los supuestos inherentes al uso de marcadores de digestibilidad (Leavitt, 1985; Brown *et al.*, 1986). Shiao y Liang (1995) encuentran que una dieta para tilapia conteniendo óxido de cromo dio una mayor ganancia en peso que en tilapias que consumieron la misma dieta pero sin el óxido de cromo, indicando que el óxido de cromo que usaron no era fisiológicamente inerte. La pureza del óxido de cromo varía entre 98 y 99.99% (Aldrich, 2003). Una menor pureza del óxido de cromo, cuando es incluido a 5 o 10 g kg⁻¹ en una dieta puede aumentar el contenido de cromo soluble de la dieta, o contener otros contaminantes, que pudieran tener un efecto fisiológico. Un contaminante potencial es el óxido crómico (CrO₃) el cual es altamente tóxico. Por lo tanto es necesario considerar la pureza del material empleado. En nuestros estudios, nosotros usamos bajos niveles de inclusión de óxido de cromo (0.5 g Kg⁻¹) y bajos niveles de iterbio (0.5 g Kg⁻¹ acetato de iterbio tetrahidratado o ~ 0.2 g Kg⁻¹ Yb³⁺) para minimizar cualquier posible efecto fisiológico del marcador o contaminantes. Sin embargo, la medición exacta de estas bajas concentraciones requiere de un método de análisis con alta sensibilidad como la espectrofotometría de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-OAS). Una consideración adicional a la selección del marcador es la facilidad y la precisión del análisis. El cromo puede ser determinado en la mayoría de los laboratorios de química, aunque la concentración en la dieta necesitaría incrementarse por lo menos a 5 g Kg⁻¹, mientras que el iterbio requiere de una instrumentación más sofisticada, como el ICP-AOS.

Preparación de la dieta

Los ingredientes secos para las dietas experimentales son molidos usando un molino micro pulverizador modelo 1-SH (Mikro-Pulverizer, NJ, E.U.A.) con una luz de malla de 0.013", que generalmente produce partículas por debajo de 500µm. Sin embargo, los componentes de algunos ingredientes resisten la molienda, particularmente aquellos con altos niveles de grasas. La molienda excesiva de un material resistente puede resultar en un daño por calor o pérdida de lípidos, lo que

podría tener un mayor efecto en la estimación de la digestibilidad que el tamaño de partícula por sí mismo. Con estos ingredientes, como un estándar mínimo, nos aseguramos de que todos los materiales pasen a través de una malla de 710 μm . Una muestra completamente representativa de cada ingrediente se utiliza en las dietas.

Al preparar las dietas, se combinan todos los ingredientes secos usando una mezcladora doméstica por 10 minutos. En caso de usar óxido de cromo, este se adiciona a una pequeña cantidad de esta mezcla y es mezclado hasta que se distribuye uniformemente. Este es entonces devuelto al resto de la mezcla mientras se sigue mezclando. El aceite de hígado de bacalao es incorporado y mezclado en la batidora por 5 minutos más. El acetato de iterbio tetrahidratado ($\text{Yb}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) se disuelve en un pequeño volumen de agua des-ionizada (25 mL para 0.5 g $\text{YbAc} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y es rociado en la mezcla con un atomizador mientras los ingredientes se siguen mezclando. La mezcla de ingredientes se homogeniza durante 10 min. más, antes de adicionar el agua necesaria para formar una pasta con una humedad de 40% a 45%. Esta pasta es entonces extruida dos veces a través de un dado de 3 milímetros de diámetro unido a una mezcladora Hobart (Hobart corporation, Troy, OH, USA), para formar espaguetis. Estos espaguetis son secados en un horno ventilado a 40° C y después pulverizado en un molino para muestra knifetec con chaqueta de agua (Tecator, modelo 1095) hasta obtener partículas que pasen a través de la malla de 710 μm . El alimento molido es entonces mezclado por 5 min. en la mezcladora y se adiciona agua para formar una pasta, la cual es entonces extruida de nueva cuenta en un molido de carne Hobart, repartida en bandejas de malla y se coce por 5 minutos en una olla de vapor atmosférica comercial para activar los aglutinantes de la dieta (gluten o sintético). Los espaguetis son de nueva cuenta secados a 40° C antes de ser cortados en pellets de 5 a 10 milímetros y almacenados a -20° C hasta su utilización.

Este método de extrusión, secado, re-molienda y re-extrusión antes de la activación de los aglutinantes, ha sido adoptada para asegurar que todos los ingredientes y marcadores se encuentren uniformemente distribuidos en la dieta (Smith y Tabrett, 2004). La re-molienda de la dieta también permite reducir el tamaño de partícula de los ingredientes más difíciles.

Estabilidad del alimento

La pérdida de materia seca (PMS), nitrógeno total y marcadores (óxido de cromo y acetato de iterbio) de los alimentos fueron evaluados después de sumergir los pellets en agua marina durante un periodo de tiempo similar al empleado en los experimentos de digestibilidad (Smith y Tabrett, 2004). La PMS de los pellets sumergidos en agua por 40 min. fue 9.5% del peso seco original. El contenido de compuestos nitrogenados de la materia seca perdida en los pellets fue mayor que en el alimento antes de inmersión; mientras que se pierde muy poca cantidad de Cr o Yb. Debido a esto después de la inmersión, se dio una disminución en la concentración del nitrógeno total y un conmensurado incremento en la concentración de Cr e Yb en el alimento pelletizado (Tabla 2). Nuestras observaciones con *P. monodon* han demostrado que cuando los camarones son alimentados a intervalos de 6 o 12 h, la alimentación se inicia generalmente dentro de dos minutos después de que el alimento es suministrado y a menudo termina a los 15 minutos. Por lo tanto, la pérdida por lixiviación en estudios de digestibilidad es significativamente menor que lo reportado con periodos de inmersión de 40 min. (Cuzon *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 2002). Sin embargo, en nuestros nuevos experimentos nosotros dejamos el alimento en el estanque por 40 min. para asegurar el máximo consumo. La DAPC en una dieta experimental calculada usando la composición del alimento antes de la inmersión fue de 94%, lo cual fue 0.6% mayor que el calculado usando la

composición analizada después de que los pellets fueran inmersos en agua por 40 min. Debido a que el consumo ocurre durante los primeros 15 min., el error debido a la lixiviación en el alimento es probablemente mucho menor. En el protocolo que se sigue actualmente, se remueve el alimento no consumido de los tanques después de 30 min. de haber alimentado. Dado el diminuto efecto sobre la digestibilidad, no se considera que el ajuste de pérdidas de nutrientes sea obligatorio. No obstante, cuando usamos el método gravimétrico, es necesario determinar la lixiviación del alimento no consumido para obtener el factor de corrección que se aplique para determinar de manera exacta el consumo de alimento. Aunque, esto no cuenta para las pérdidas ocasionadas por el comportamiento alimenticio del camarón.

Tabla 2. Media de la concentración (g Kg⁻¹, DM) de 5 muestras (\pm error estándar) de nitrógeno total (N total), cromo (Cr) e Iterbio (Yb) en alimentos peletizados antes y después de inmersión en agua marina.

Inmersión (min)	N Total	Cr	Yb
0	64.7 \pm 0.26 ^a	0.351 \pm 0.008 ^a	0.25 \pm 0.007 ^a
40	64.0 \pm 0.14 ^b	0.384 \pm 0.005 ^b	0.28 \pm 0.004 ^b

^{a,b} Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Análisis químicos

Las muestras de alimento, de heces y de ingredientes molidos se analizan en duplicado usando métodos estándares de laboratorio, esencialmente de acuerdo con las recomendaciones de la AOAC internacional (1999). La materia seca es determinada por secado en estufa a 105 ° C a peso constante, generalmente por 4 h; la ceniza por calcinado a 600 ° C por 2 h; el nitrógeno total empleando cualquiera de dos técnicas: (1) técnica de macro-Macro-Kjeldahl en un analizador automático Kjeldahl Foss 16210 (A/S N. Foss Electric, Hillerød, Dinamarca), la cual, emplea mercurio en la digestión o (2) por el método de azul de indofenol, después de una digestión Kjeldahl con ácido sulfúrico. La PC es calculada multiplicando el N total por 6.25 independientemente de la naturaleza del nitrógeno. La energía bruta (EB) es determinada con una bomba calorimétrica isotérmica automática Leco AC200 controlada por microprocesador (Leco Corp., St Joseph, MI, USA). La composición de aminoácidos es determinada por intercambio iónico usando un HPLC (Waters) después de una hidrólisis de las muestras con HCL 6M a 110°C bajo una atmósfera de N₂ por 18 h. La Cistina es medida como ácido cisteico y la metionina como sulfonato de metionina después de realizar por separado una oxidación con ácido per fórmico.

En los últimos 10 años, tres diferentes laboratorios han realizado este tipo de análisis para nosotros. Los métodos usados por cada laboratorio han variado según la preferencia del químico analítico así como las instalaciones y equipos disponibles para ellos. Inicialmente, para el análisis de cromo utilizábamos una solución de digestión de Kjeldahl basada en ácido sulfúrico, tal como se prepara para la determinación de N total, para disolver el óxido de cromo en muestras de alimento y de heces antes de analizar el cromo por espectrofotometría de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-OAS). El laboratorio de química analítica del CSIRO (Departamento de la industria ganadera) validó el uso de la solución digestiva Kjeldahl para el análisis de cromo, iterbio y titanio con ICP-OAS, dentro del rango de concentración de estos elementos en nuestras muestras (M. Ridings, comm. pers.). El análisis del titanio fue particularmente problemático debido a las interferencias de otros isótopos y compuestos presentes en las muestras.

En el segundo laboratorio, las muestras eran primeramente molidas empleando un pistilo y un mortero de ágata; las sub-muestras (0.2 g) eran mezcladas en 1 g de Na₂O₃ y la mezcla incinerada a 450° C durante toda la noche y entonces amalgamadas sobre un quemador de gas por 10 min. La mezcla fundida era disuelta en 5 mL HCL concentrado y calentada sobre una parrilla caliente a 110° C por 2 h. La solución resultante era analizada usando un espectrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES). Los límites inferiores de detección reportados para cromo e iterbio usando esta técnica fueron de 4 y 2 mg Kg.⁻¹, respectivamente.

En el método actual, el Yb en solución es determinado por ICP-AES después de la digestión con una mezcla de ácido nítrico y perclórico. La digestión ocurre en tubos de ensayo abiertos y termina a 250° C. La digestión es entonces aforada con agua de-ionizada, resultando en la solución una concentración de ácido perclórico al 5%. La digestión rompe el material orgánico y disuelve otros elementos. Una amplia gama de metales y de algunos no metales pueden ser medidos en la solución por ICP-AES. Las soluciones digeridas son aspiradas en un plasma de argón entre 8 000 y 10000 °C y emiten características de energía como resultado de transiciones electrónicas a través de niveles específicos de energía atómica. El instrumento usado es un Varian Vista Pro Axial ICP-AES axial. Los dispositivos de carga acoplados son utilizados para medir la intensidad de luz a longitudes de onda específicas. Esta intensidad es directamente proporcional a la concentración. Se pueden requerir de correcciones para compensar el traslape espectral entre los elementos.

Protocolo para estudios de digestibilidad

Nosotros preferimos utilizar juveniles de camarón, *Penaeus monodon*, de entre 15 y 18 g para los experimentos de digestibilidad. Sin embargo, camarones pequeños (entre 10 y 15 g) han sido empleados cuando no hay disponibilidad de camarones grandes y nos afecta el tiempo para esperar que los camarones pequeños crezcan a >15 g. En cambio, para la respuesta en experimentos de crecimiento utilizamos camarones con un peso que comienza alrededor de 3 g y finaliza con un peso de aproximadamente 12 g. La predilección para usar camarones grandes en experimentos de digestibilidad se debe a un sin número de factores, incluyendo: (1) un camarón grande ingiere mas alimento y produce mas heces, por lo tanto reduce la cantidad de tiempo en el experimento; (2) la mayor parte del alimento comercial es elaborado para camarones de esta talla, por lo tanto, los resultados son más relevantes para los fabricantes de alimento y las granjas camaronícolas. No obstante, el efecto de la talla del camarón en digestibilidad no ha sido estudiado completamente. Smith *et al.* (1985) reportaron que la digestibilidad de alimentos en camarones pequeños (8.4-11g), medianos (12.8-16.3g) y grandes (22.8-25.2g) de *Penaeus vannamei*. Sus resultados sugieren que la digestibilidad es similar sobre esta gama de tallas, sin embargo, no hicieron ninguna comparación directa de los valores de la digestibilidad.

Los 42 tanques usados en nuestros estudios de digestibilidad son cilíndricos (60 cm de diámetro x 45 cm de alto) de polietileno blanco, llenados con 100 L de agua. Se proporciona una aireación a bajo flujo (esto se apaga cuando se empieza a recolectar las heces), y agua marina filtrada (20 µm), con flujo de 500 mL min.⁻¹, manteniendo una temperatura alrededor de 28° C en los tanques. En cada tanque se colocan solamente dos camarones, esto reduce la incidencia del daño a las heces fecales, que ocurre cuando se manejan mayores densidades. El estadio de muda de los camarones es revisado al inicio del experimento y aquellos que han entrado en estadio de premuda son descartados. Cuando un camarón muda durante el experimento, el viejo esqueleto es inmediatamente removido y el tanque sifoneado. Las heces no son colectadas del tanque hasta la

próxima alimentación. Si algunas de los exoesqueletos han sido consumidos antes de que las heces fueran removidas estas no son colectadas y se colectan hasta la segunda alimentación después de que los organismos mudaron. Todas las heces producidas en este tiempo son removidas del tanque al mismo tiempo que a los demás, pero son desechadas.

Los camarones son aclimatados en los tanques a sus respectivas dietas por un mínimo de 7 días antes de empezar el experimento. Cada dieta es asignada aleatoriamente a los tanques con 6 replicas para cada tratamiento. Los camarones son alimentados cada 6 h con un lapso de intervalo de 30 segundos entre tanques consecutivos (Tabla 3). Después de 30 minutos, el alimento no consumido es removido de los tanques por sifoneo. Los 30 seg. de intervalo entre alimentaciones consecutivas permiten a todos los camarones tener acceso al alimento por 30 minutos.

Las heces son colectadas cada 3 h por sifoneo en una cubeta de 10 L usando una manguera de 10 mm de diámetro. Las heces se dejan en el fondo de la cubeta antes de ser transferidas a los tubos de centrifuga de 10 mL usando una pipeta de boca ancha. La mayor parte del agua de mar es descartada después de un corto periodo de tiempo de decantación, se adiciona agua destilada al tubo para tener un volumen de 10mL y el tubo es centrifugado a una velocidad mínima (2000 rpm) por 30 segundos. Una vez que esté centrifugado, el sobrenadante es descartado, y el tubo tapado es guardado en el congelador. La muestra es después transferida a un vial para muestras previamente pesado y almacenado a -20° C.

Tabla 3. Horario para las actividades de experimentos de digestibilidad.

HORA	ACTIVIDAD
0800	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos de centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
0900	Las muestras fecales congeladas que han sido colectadas en las últimas 24 h son transferidas a tubos de almacenamiento.
1030	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos de centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
1100	Se alimentan todos los tanques con intervalos de 30 segundos.
1130	Sifonear todo el alimento no consumido, teniendo cuidado de dejar todas las heces en el tanque.
1400	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
1630	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
1700	Alimentar todos los tanques con intervalos de 30 segundos
1730	Sifonear el alimento no consumido, dejando con cuidado cualquier heces en el tanque
2000	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
2230	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos de centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
2300	Alimentar todos los tanques con intervalos de 30 segundos
2330	Sifonear el alimento no consumido, dejando con cuidado cualquier heces en el tanque
0200	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos de centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
0430	Sifonear las heces de los tanques en cubetas de 10 L y transferir por pipeteo en tubos de centrifuga de 10mL. Decantar el agua marina de los tubos de centrifuga y rellenarlos con 10mL de agua de-ionizada. Centrifugar a 2000 rpm por 30 seg. Descartar el sobrenadante y dejar las heces en el fondo de los tubos, sellar y guardar en el congelador.
0500	Alimentar todos los tanques con intervalos de 30 segundos
0530	Sifonear el alimento no consumido, dejando con cuidado cualquier heces en el tanque para desechar.

La pérdida de nutrientes de las heces, sin una pérdida concomitante de marcadores durante el período entre defecación y colección, causará una sobrestimación de la digestibilidad. Nosotros investigamos este problema en un experimento con heces que fueron colectadas en un periodo de 6 h después de la alimentación en la mañana (Smith y Tabrett, 2004). Cuatro protocolos de colección de heces fueron utilizados, donde nos basamos en el tiempo máximo de duración entre la defecación y la colección: cada 1, 2, 3 o 6 h después de alimentar, con 6 tanques replicados asignados a cada protocolo. Las heces colectadas de un tanque sobre 6 h fueron combinadas para dar la muestra total para ese tanque. El contenido de la proteína cruda (PC) de las heces (mg g⁻¹)

disminuyó progresivamente ($P < 0.05$) con el incremento en el tiempo de contacto con el agua (Tabla 4).

Nosotros encontramos una diferencia de 8.4 mg de N total g^{-1} MS (o 52 mg PC g^{-1} MS) entre las heces colectadas cada hora sobre 6 h y después mezcladas, y aquellas que fueron colectadas cada 6 horas. Esta pérdida de N (o PC) representa una disminución significativa en la concentración de PC de las heces, y resulta en una significativa disminución en la relación PC: marcador y consecuentemente, una sobre estimación de la DAPC de dos a tres unidades porcentuales con las heces colectadas a las 3 horas, y 6 unidades porcentuales con las heces colectadas cada 6 horas. La PMS de las heces fue generalmente pequeña, sin efecto significativo sobre el cociente de la MS: marcador inerte o la DAMS. Cuando trabajamos con camarón, parece ser que los intervalos de colección de heces menores a 3 h podrían ser óptimos, aunque esto no siempre puede ser práctico. Por lo tanto, nosotros adoptamos un intervalo de colecta de 3 horas debido a que es lo mas practico para nuestro laboratorio.

Tabla 4. Efecto de la lixiviación de las heces sobre su contenido de proteína cruda (PC), cociente del marcador¹ (mg del nutriente/ mg del marcador), y digestibilidad aparente PC y materia seca (MS) usando óxido de cromo (Cr) o acetato de iterbio (Yb) como marcadores (promedios derivados de un análisis de regresión con 6 replicados a cada tiempo de inmersión, $n = 6 \times 4 = 24$).

Tiempo máximo de inmersión (h)	Contenido de PC en las heces ($mg\ g^{-1}$ MS)	Cociente del marcador ¹ en las heces ($mg\ mg^{-1}$)		Digestibilidad aparente calculada (%)	
		Cr	Yb	Cr	Yb
PC					
1	188 ^a	211 ^a	317 ^a	81.1 ^a	81.5 ^a
2	178 ^{ab}	193 ^{ab}	303 ^{ab}	82.7 ^{ab}	82.3 ^{ab}
3	165 ^b	179 ^b	282 ^b	84.0 ^b	83.6 ^b
6	136 ^c	146 ^c	211 ^c	87.0 ^c	87.7 ^c
± SEM	5.0	8.9	10.9	0.80	0.58
MS					
1		1115	1683 ^a	61.8	62.5 ^a
2		1085	1708 ^a	62.8	62.0 ^a
3		1085	1712 ^a	62.8	61.9 ^a
6		1077	1557 ^b	63.0	65.2 ^b
± SEM		34.3	30.7	1.19	0.68

a, b, c Letras diferentes en una columna indica diferencias significativas ($P < 0.05$).

¹ Ver ecuación en la sección de método para determinar la digestibilidad: gravimetría vs marcador inerte

Cuando se ha recogido suficiente material (generalmente después de 20 a 30 días), las muestras son liofilizadas, pesadas y molidas en un frasco usando una barra de cristal. La cantidad de material colectada dependerá de los análisis que se realizarán y de los procedimientos usados para el análisis. Con nuestros métodos analíticos actuales, nosotros colectamos 10 g de heces húmedas por cada tanque, lo que equivale a 2 g en base seca. El análisis de la materia seca y de N total (para proteína cruda) requiere 0.5 g; el análisis del iterbio requiere 0.5 g, y la cantidad óptima para la determinación de energía en la bomba calorimétrica es de 1 g de materia seca.

Conclusión

El método para medir la digestibilidad en camarón que ha sido desarrollado en el CSIRO, toma en consideración los principales factores que influyen la exactitud de las estimaciones de la digestibilidad. En particular, se incorpora nuestro conocimiento de las pérdidas de nutrientes por lixiviación de los alimentos, comportamientos de alimentación de los camarones, tiempo de tránsito

de marcadores y alimento así como la pérdida de nutrientes en las heces. Al determinar la digestibilidad de los ingredientes, optamos por modificar la formulación de la dieta de referencia y seleccionar el nivel de inclusión apropiado, de tal manera que la dieta de referencia y la dieta a probar estén razonablemente balanceadas. Esto es necesario debido a que el camarón depende de estos alimentos hasta por 12 semanas.

Un elevado nivel de homogeneidad del alimento minimizara el número de replicados por alimento que se necesita analizar, número de muestras fecales necesarias para coleccionar y la cantidad de heces (y por lo tanto el número de días de colección) requeridos para una estimación exacta de la digestibilidad del alimento. Sin embargo, la cantidad de heces secas requeridas para los análisis de cada replicado define la duración del periodo de colecta de heces.

Referencias

- Aldrich, 2003. Handbook of Fine Chemicals and Laboratory Equipment, 2003-2004, Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia.
- AOAC International, 1999. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Bordner C.E., D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., 1983. Assimilation of nutrients by cultured hybrid lobsters (*Homarus sp.*) fed experimental diets. J. World Mariculture. Soc. 14, 11-24.
- Brown, P.B., Williams, C.D., Robinson, E.H., Akiyama, D.M., Lawrence, A.L., 1986. Evaluation of methods for determining in vivo digestion coefficients for adult red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. J. World Aquaculture Soc. 17, 19-24.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 180, 345-358.
- Conklin, D. E., 1990. Vitamin requirements of juvenile penaeid shrimp. In: Barret, J. (Ed.), Advances in Tropical Aquaculture: Workshop held in Tahiti, French Polynesia, February 20 - March 4 1989, Actes Colloq. no.9, IFREMER, Brest Cedex, France, pp. 287-308.
- Cuzon, G., Hew, M., Cognie, D., Soletchnik, P., 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture 29, 33-44.
- Faichney, G.J., Poncet, C., Boston, R.C., 1989. Passage of internal and external markers of particulate matter through the rumen of sheep. Reprod. Nutr. Dev. 29, 325-337.
- Forster, J.R.M., Gabbott, P.A., 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the shrimp *Palaemon serratus* and *Pandalus platycerops*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 51, 943-961.
- Ishikawa, M; Teshima, S; Kanazawa, A; Koshio, S. 1997. Measurements of digestibilities of cholesterol and fatty acids using 5 alpha-cholestane as an inert marker in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, and the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. J. Appl. Ichthyol./Z. Angew. Ichthyology. 13, 31-35.
- Jones, P.L., De Silva, S.S., 1997. Influence of differential movement of the marker chromic oxide and nutrients on digestibility estimations in the Australian freshwater crayfish *Cherax destructor*. Aquaculture 154, 323-336.
- Leavitt, D.F., 1985. An evaluation of gravimetric and inert marker techniques to measure digestibility in the American lobster. Aquaculture 47, 131-142.
- Lee, P.G., Lawrence, A.L., 1997. Digestibility. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M. (Eds.), Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol. 6., World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, pp. 194-260.
- Pfeffer, E., Kinzinger, S., Rodehutschord, M. 1995. Influence of the proportion of poultry slaughter by-products and of untreated or hydrothermally treated legume seeds in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), on apparent digestibilities of their energy and organic compounds, Aquaculture Nutrition 1, 111-117.
- Shiau, S.Y., Liang, H.S., 1995. Carbohydrate utilization and digestibility by tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, are affected by chromic oxide in the diet. J. Nutrition. 124, 976-982.
- Shiau, S-Y., Lin, K-P., Chiou, C-L., 1992. Digestibility of different protein sources by *Penaeus monodon* raised in brackish water and seawater. J. App. Aquaculture. 1, 47-53.
- Siddons, R.C., Paradine, J., Beever, D.E., Cornell, P.R., 1985. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta flow marker. Br. J. Nutr. 54, 509-519.
- Smith, D.M., Burford, M.A., Tabrett, S.J., Irvin, S.J., Ward, L., 2002. The effect of feeding frequency on water quality and growth of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 207, 125-136.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2004. Accurate measurement of *in vivo* digestibility of shrimp feeds. Aquaculture 232, 563-580.
- Smith, L.L., Lee, P.G., Lawrence, A.L., Strawn K., 1985. Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: Effects of dietary protein level and protein source. Aquaculture 46, 85-96.
- Teeter, R.G., Owens, F.N., Mader, T.L., 1984. Ytterbium chloride as a marker for particulate matter in the rumen. J. Anim. Sci. 58, 465-473.

Metodologías Utilizadas en el Laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR para Determinar la Digestibilidad *in vivo* de Nutrientes de Alimentos e Ingredientes en Camarón y Langosta de Agua Dulce

Roberto Civera Cerecedo, Ernesto Goytortúa Bores, Sonia Rocha Meza y Dolores Rondero Astorga

Laboratorio de Nutrición Acuícola.

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR).

Mar Bermejo # 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz, B.C.S., C. P. 23090. México. Tel: (612) 123 84 84. Fax: +52 (612) 12 5 36 25. E-mail: rcivera04@cibnor.mx

Introducción

El laboratorio de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) en La Paz, ha empleado el método indirecto para determinar los Coeficientes de Utilización Digestiva Aparente *in vivo* (CUDA) desde hace varios años. Estos coeficientes, comúnmente conocidos como "Coeficientes de Digestibilidad" o simplemente "Digestibilidad", han sido calculados para diferentes alimentos experimentales y comerciales, así como para ingredientes y aditivos, como parte de los trabajos de investigación del laboratorio, dirigidos a conocer el valor nutritivo de materias primas provenientes de recursos naturales no convencionales en alimentos para organismos acuáticos, así como los requerimientos nutricios. De esta manera, se ha trabajado sobre diversas especies, tales como el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*, el acocil australiano *Cherax quadricarinatus* y el pez marino cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*.

Si bien el principio de la metodología empleada a lo largo de los años permanece siendo el mismo, es decir, medir digestibilidad aparente de nutrientes por medio de un marcador indirecto en el alimento, a medida que se han realizado los trabajos de investigación, se han hecho algunas modificaciones en función de los diseños experimentales requeridos, a fin de actualizar y optimizar la metodología y con ello obtener resultados confiables y reproducibles, y que a la vez sean más fácilmente comparables con aquellos generados por otros laboratorios.

A continuación, se describe la metodología actualmente empleada en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR y se hacen algunas acotaciones pertinentes dentro del contexto de la necesidad de uniformizar o estandarizar los métodos para medir la utilización digestiva aparente.

Digestibilidad de alimentos e ingredientes

Los coeficientes de utilización digestiva aparente *in vivo* de nutrientes de alimentos e ingredientes, se estiman por el método indirecto que requiere de la utilización de un marcador inerte en el alimento. Con ello, se evita el tener que hacer la recolecta total de las heces del organismo (método directo), mismo que se dificulta mucho por el hecho de que los animales se encuentran en el agua y por tanto es poco práctico. El método indirecto se basa en los cambios que ocurren en las proporciones del nutriente y el marcador en el alimento y en las heces, como producto de la ingestión, digestión y absorción de nutrientes en el organismo (Guillaume y Ceccaldi, 1999).

Se calcula la digestibilidad aparente de materia seca, proteínas, lípidos, carbohidratos y energía por medio de las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ DAMS} = 100 - 100 * \frac{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en alimento}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}}$$

$$\% \text{ Digestibilidad Aparente} = 100 - \left(\frac{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en alimento}}{\% \text{ Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} * \frac{\% \text{ nutriente en heces}}{\% \text{ nutriente en alimento}} * 100 \right)$$

Para medir la digestibilidad aparente de nutrimentos de un ingrediente, se utiliza el método propuesto por Cho y Slinger (1979) basado en la aditividad de la digestibilidad de los ingredientes, en cuyo caso se puede estimar la digestibilidad de un ingrediente cualquiera (problema) que ha sido incorporado en un alimento de referencia del cuál ya se conoce la digestibilidad. Es decir, conociendo la digestibilidad del alimento de referencia y del alimento que incluye el ingrediente problema, a través de un cálculo, se estima la digestibilidad propia del ingrediente problema.

Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca (CDAMSI) y de nutrimentos (CDANI) de los ingredientes se determinan con las siguientes ecuaciones y se expresan en porcentaje:

$$\text{CDAMSI} = \frac{(100 * \text{CDAMS de DP}) - ((100 - \% \text{IP}) * \text{CDAMS de DR})}{\% \text{IP}}$$

$$\text{CDANI} = \frac{(100 * \text{CDAN de DP} * \% \text{N en DP}) - ((100 - \% \text{IP}) * \text{CDAN de DR} * \% \text{N en DR})}{\% \text{IP} * \% \text{N en IP}}$$

Donde:

DR: Dieta de referencia.

DP: Dieta experimental que contiene el ingrediente a probar.

IP: Ingrediente a probar.

N: Nutrimento (proteína cruda, lípidos, carbohidratos, etc.).

El método original considera la inclusión del ingrediente a probar al 30% del alimento (en base húmeda). Sin embargo, esto puede provocar que al evaluar algunos ingredientes o aditivos el alimento quede desbalanceado y no cubra los requerimientos de los organismos a alimentar. Por ello, hemos hecho evaluaciones donde se utilizan niveles de inclusión de 15% (Ezquerro *et al.*, 1997; Gutiérrez-Leyva, 2006). Sin embargo, se han reportado diferencias en los valores de digestibilidad dependiendo del método utilizado, en particular del nivel de inclusión del ingrediente en la dieta, así como por el nivel de inclusión del marcador inerte (0.5 ó 1.0 % de óxido crómico), por lo que es recomendable hacer las determinaciones a diferentes niveles de inclusión simultáneamente y tomar esto en cuenta al momento de interpretar los resultados y compararlos con los de otros trabajos. Aunque no hay una regla para definir el nivel de inclusión más adecuado para medir la digestibilidad,

se puede tomar como criterio el incluir el ingrediente en la dieta verde (con óxido crómico) al mismo nivel en el que será utilizado en la formulación con que se quiere alimentar a los organismos (Divakaran *et al.*, 2000).

En el CIBNOR se ha trabajado con la medición de digestibilidad de ingredientes y aditivos en diversas especies, para lo cual, ha sido necesario emplear diversos alimentos de referencia dependiendo de los ingredientes o aditivos a probar. En la Tabla 1, se muestra la composición en ingredientes de algunos de los alimentos de referencia utilizados; en la Tabla 2, el alimento que más recientemente se ha utilizado para juveniles de camarón Gutiérrez-Leyva (2006).

Tabla 1. Ejemplos de alimentos de referencia utilizados en el CIBNOR para diferentes especies (g/100g de alimento).

Ingrediente	Ezquerro <i>et al.</i> (1997)	Goytortúa Bores (2000)	Campaña (2001)	Galicia González (2002)	Rivas Vega <i>et al.</i> (2005)
Harina de sardina entera	16.5	25	26.5	29.59	20
Harina de camarón	9.9	10			
Pasta de soya	17.8	26.96	25	20	25
Harina de trigo	23.7	15.5	12	22	35.93
Harina de sorgo	19.8		25	20	
Almidón de maíz		11.6			
Harina de kelp					4
Gluten de trigo					3.77
Harina de langostilla			2		
Grenetina	4.3	4	4	4	
Aceite de atún	1.5	1	0.5	1	3
Lecitina de soya	1.5	1.5	0.5	1	3
Premezcla de vitaminas	0.5	0.26	0.4	0.26	1.8
Premezcla de minerales	3.5	3.5	2.5	1.5	0.5
Vitamina C		0.12	0.1	0.09	0.09
Cloruro de colina (99%)		0.04	0.1	0.06	0.2
Carbonato de calcio			1		
Fosfato dibásico de sodio					1.2
Colesterol					0.5
BHT					0.004
Óxido crómico	1	0.5	0.5	0.5	1

Tabla 2. Composición en ingredientes de una dieta de referencia o control usada para evaluar la digestibilidad *in vivo* de ingredientes en juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

Ingrediente	Nivel de inclusión (%)
Harina integral trigo ¹ (PC 13.9%, L 0.5%)	45.6
Harina de pescado ¹ (PC 68.4%, L5.3%)	22.8
Pasta de soya ¹ (PC 50.0%, L 1.3%)	19.0
Aceite de sardina ¹ (L 99.5%)	4.0
Lecitina de soya ² (L 89.2%)	2.0
Ácido algínico ³	2.0
Premezcla de vitaminas (Tabla 2a)	1.8
Fosfato dibásico de sodio ⁴	1.2
Premezcla de minerales (Tabla 2b)	0.5
Cloruro de colina ⁵ (62% a.a.)	0.2
Vitamina C ⁶ (35% a.a.)	0.09
Antioxidante BHT ⁷	0.004
Óxido crómico ⁸	1.0

¹Promotora Industrial Acuasistemas, S.A., La Paz, B.C.S., México. ²ODONAJI, Distribuidora de Alimentos Naturales y Nutricionales, S.A. de C.V., México, D.F. ³ALDRICH # cat. 180947-500G. ⁴SIGMA # cat. S-0876. ⁵ROCHE, D.F., México. ⁷Butylated hydroxytoluene, ICN # cat. 101162., ⁸Óxido crómico (SIGMA-ALDRICH^{MR} No. de catálogo A-7128).

Tabla 2a. Composición de la premezcla de vitaminas.

Vitaminas	Número de Catálogo	g Kg ⁻¹ de premezcla
Vitamina A acetato (retinol)	160079 ^a	0.5
Vitamina D ₃ (colecalfiferol)	160107 ^a	0.001
Vitamina E (tocoferol)	100555 ^a	8.0
Vitamina K ₃ (menadiona)	102259 ^a	2.0
Tiamina (B ₁) mononitrato	T-4625 ^b	0.5
Riboflavina (B ₂)	R-4500 ^a	3.0
Piridoxina (B ₆)	102777 ^a	1.0
Ácido D-pantoténico	101228 ^a	5.0
Niacina (Ác. Nicotínico)	102446 ^a	5.0
D-Biotina	B-4501 ^b	0.05
Inositol	I-5125 ^b	5.0
Ácido fólico	101725 ^a	0.18
Cianocobalamina (B ₁₂)	103271 ^a	0.002
Celulosa (vehículo)	191499 ^a	965.27

^aICN Biomedicals Inc. Ohio, USA. ^bSigma Co. St. Louis, USA.

Tabla 2b. Composición de la premezcla de minerales.

Minerales	Número de catálogo SIGMA ^a	g 500g ⁻¹ de premezcla
Cloruro de cobalto	C-2644	0.020
Sulfato cúprico pentahidratado	C-6917	1.250
Sulfato ferroso	F-7002	20.00
Sulfato de magnesio heptahidratado	M-9697	141.990
Sulfato de manganeso monohidratado	M-3634	3.250
Yoduro de potasio	P-4286	0.335
Selenito de sodio	S-1382	0.050
Sulfato de zinc heptahidratado	Z-0501	65.965
Celulosa (vehículo)	C-8002	267.140

^aSIGMA Co. St. Louis, USA.

En ésta última formulación el alginato es empleado como aglutinante, que evita pérdidas considerables de partículas del alimento por lixiviación en el agua, pero no debe utilizarse a niveles de inclusión muy altos, ya que puede tener un efecto negativo sobre la digestibilidad del alimento Cruz-Suárez *et al.* (2000). También hemos empleado la grenetina a niveles de inclusión de 4%, pero ésta requiere que el alimento sea extruido varias veces, a fin de aumentar la temperatura en el cañón del molino de carne que se usa para extraer, ya que de otra manera no se obtiene un buen efecto sobre la textura y la hidroestabilidad del alimento. Además, la grenetina aporta nitrógeno al alimento, pero no es proteína que tenga un alto valor nutritivo para el organismo.

Preparación de alimentos comerciales

Para el caso de las mediciones de digestibilidad de alimentos comerciales, ya sean extruidos o pelletizados, éstos son re-preparados en la Planta de Alimentos del CIBNOR. Para ello, cada alimento es molido en un molino CICLOTEC^{MR} provisto de una malla 35 (500 micras). Después, se le adiciona 1% de óxido crómico (IMPEX Continental^{MR} No. de catálogo 12233) empleado como marcador inerte y 1% de alginato de sodio de alta viscosidad (SIGMA-ALDRICH^{MR} No. de catálogo A-7128) que sirve de aglutinante. Posteriormente, se coloca en una mezcladora Kitchen-Aid^{MR} de 5 L. de capacidad, se adiciona agua hirviendo a razón de 35 a 50% de peso de la masa y se mezcla por 15 min. La masa es extruida en un molino de carne Tor-Rey^{MR} (de ¼ ó de 2 ½ hp) equipado con cedazo de 2 mm de diámetro o el requerido en función del tamaño de los organismos. Los pelets obtenidos son cortados manualmente con la ayuda de una espátula metálica a medida que salen del molino de carne, a manera de obtener pelets de aproximadamente 1 cm de longitud. Los pelets se colocan en charolas de plástico con papel estrasa y se secan a 100°C por 8 min. en una estufa con circulación de aire y posteriormente a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción hasta disminuir el contenido de humedad a 8 - 10%, mismo que es monitoreado con una termobalanza. Finalmente se embolsan, etiquetan y almacenan a 4°C hasta su utilización. Se destina una muestra de 50 g de cada alimento para realizar la prueba de estabilidad en el agua y determinar su composición química y en óxido crómico.

Preparación de alimentos experimentales

La formulación se realiza con el software MIXIT-WIN^{MR}. Los alimentos experimentales se elaboran en la Planta de Alimentos del CIBNOR siguiendo el método descrito por Civera y Guillaume (1989) con algunas modificaciones.

Los macroingredientes se pulverizan previamente en un pulverizador PULVEX^{MR} modelo 300 y los microingredientes en un molino de café. Todos los ingredientes son tamizados a través de una luz de malla de 250 micras y dosificados en una balanza OHAUS^{MR} con precisión de 0.001 g.

Para iniciar el proceso se hacen 3 premezclas: una de macroingredientes, una de microingredientes y una emulsión con las fuentes de lípidos (Figura 1). Para ello, se premezclan primero los macroingredientes secos (harina de sardina, pasta de soya, harina integral de trigo, etc.) en una mezcladora Kitchen Aid^{MR} (con capacidad de 5 L y 10 velocidades de mezclado) durante 10 a 15 minutos a velocidad baja. De manera independiente, se premezclan manualmente al principio y después mecánicamente en la mezcladora, los microingredientes secos (premezclas de vitaminas y minerales, aglutinante, etc.) también a velocidad baja. Una vez que esas premezclas están listas, se adiciona una pequeña porción de la premezcla de macroingredientes a la de microingredientes, a manera de ir juntando poco a poco los ingredientes y uniformizando la mezcla seca de manera manual. Posteriormente, ésta se deja en la mezcladora por un período de 10 a 15 minutos a velocidad baja. Paralelamente, se hace una emulsión con los lípidos (aceite de pescado y lecitina de soya), misma que se agrega a la mezcla seca y se deja en la mezcladora por 10 min. a velocidad intermedia. *Nota: si la lecitina y el aceite son muy espesos o conservados normalmente en el refrigerador, es conveniente dejarlos a temperatura ambiente o en baño María a 40°C por 10 min. antes de hacer la emulsión, para que se logre obtener una emulsión uniforme.*

A la masa seca de ingredientes se le adiciona agua de la llave a temperatura ambiente a razón de 35 a 50% del peso de la masa y se deja mezclando por 10 min. a velocidad intermedia y 5 min. a velocidad más rápida. *Nota: tanto al agregar la emulsión como el agua, es recomendable que de vez en cuando se utilice una espátula de plástico (miserable) para limpiar las paredes y fondo del tazón y la pala de la mezcladora para despejar grumos que se hayan formado.*

La masa resultante es pasada a través de un molino de carne TOR-REY^{MR} (de ¼ ó de 2 ½ hp) en dos ó tres ocasiones; la primera vez en forma rápida, y la otras más lentamente, por un cedazo de 2.0 mm de diámetro o el requerido en función del tamaño de los organismos. Los pelets obtenidos son cortados manualmente con la ayuda de una espátula metálica a medida que salen del molino de carne, a manera de obtener pelets de aproximadamente 1 cm. de longitud. Los pelets se colocan en charolas de plástico con papel estrasa y se secan a 45°C por 16 hrs. en una estufa con circulación de aire hasta disminuir el contenido de humedad a 8 - 10%, mismo que es monitoreado con una termo-balanza. Finalmente se embolsan, etiquetan y almacenan a 4° C hasta su utilización. Se destina una muestra de 50 g de cada alimento para realizar la prueba de estabilidad en el agua y determinar su composición química y en óxido crómico.

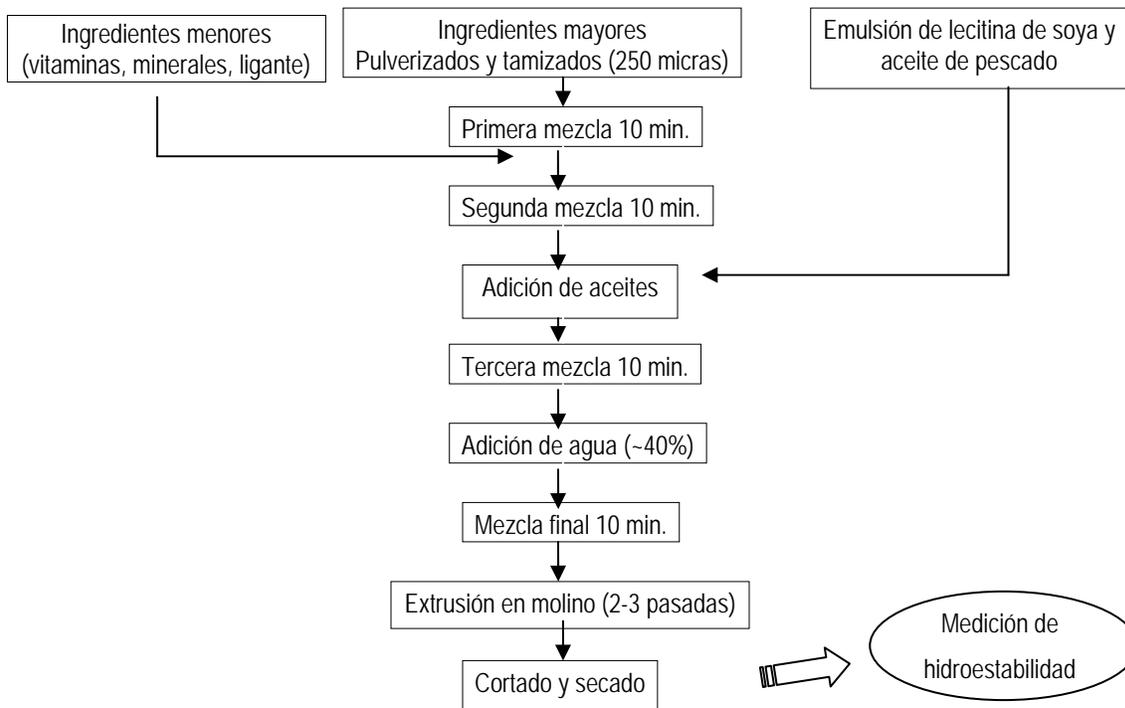


Figura 1. Diagrama de flujo para la preparación de alimentos experimentales en el CIBNOR.



1 Pulverización de ingredientes secos



2 Tamizado de ingredientes secos



3 Dosificación de microingredientes



4 Mezclado de macro y microingredientes secos



5 Dosificación de grasas y elaboración de emulsión



6 Mezclado de ingredientes secos y grasas



7 Adición de agua (25-45%) y mezclado final



8 Extrusión en molino de carne



9 Reducción de tamaño de los pellets



10 Secado en estufa



11 Ensacado y almacenado del alimento terminado

12 Análisis químicos e hidroestabilidad del alimento terminado

Figura 2. Pasos para la fabricación de alimentos experimentales en laboratorio de Nutrición Acuicola del CIBNOR.

Marcador inerte

El compuesto químico que utilizamos como marcador interno en los alimentos para medir digestibilidad aparente *in vivo* es el óxido de cromo u óxido crómico (chromic oxide), cuya fórmula química es Cr_2O_3 , que tiene granulometría muy fina (< 105 micras) y apariencia de polvo color verde botella. La mayor parte de nuestros estudios se han realizado con el Cr_2O_3 grado reactivo de la marca Aldrich^{MR} (No. de catálogo 20,216-9) aunque a partir de 2005 se ha empezado a utilizar el de la compañía IMPEX Continental^{MR} (No. de catálogo 12233), a fin de uniformizar la metodología con aquella empleada en un proyecto conjunto con la Universidad Autónoma de Nuevo León. *Nota: hemos hecho comparaciones de las determinaciones del óxido crómico con los reactivos de ambos proveedores, y no hemos detectado diferencias, al menos en la parte analítica con el método de Furukawa y Tsukahara (1966).*

La concentración de óxido crómico empleada en nuestros alimentos fue por varios años de 0.5%, aunque también se ha usado el 1%. Con ambas concentraciones se han obtenido resultados satisfactorios, aunque no se ha comparado directamente el efecto del nivel de inclusión del óxido crómico. En la actualidad, a fin de facilitar la detección del óxido crómico y no estar tan cerca del límite de sensibilidad de detección del método de determinación, se optó por mantener la concentración del 1% en nuestros alimentos experimentales, así como para los alimentos comerciales.

Metodología para estudios de digestibilidad *in vivo*

Organismos experimentales

Los organismos comúnmente utilizados son camarones de la especie *Litopenaeus vannamei*, obtenidos del Programa de Mejoramiento Genético del CIBNOR o de algún laboratorio o granja comercial en Baja California Sur. Los organismos son aclimatados a las condiciones del laboratorio (temperatura 27 ± 0.5 °C, salinidad 39 ± 1 UPS y oxígeno disuelto >5 mg/l) en tanques circulares de plástico con capacidad de 1,000 L y alimentados 3 veces al día con alimento comercial con 40% ó 35% de proteína, hasta que los organismos alcanzan el tamaño requerido para el experimento.

Una vez que se han aclimatado al laboratorio, los organismos se pesan individualmente y se seleccionan aquellos del peso requerido en función del diseño experimental, es decir, en ocasiones pueden ser camarones de 3 a 5 g, pero se han empleado también organismos de 6 a 9 g o inclusive de 15 a 20 g. Los camarones se distribuyen aleatoriamente en los acuarios a razón de 8, 6 ó 4 organismos por acuario, dependiendo del tamaño de los mismos, respectivamente:

Normalmente se usan al menos 3 réplicas (acuarios) por cada alimento a evaluar, aunque también se han utilizado 4 y hasta 5 réplicas, en función del diseño experimental.

Sistema de cultivo

Las determinaciones de digestibilidad se llevan a cabo en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, ubicado a 17 Km., de la ciudad de La Paz, Baja California Sur, México. El sistema de cultivo es de circulación de agua continua y consta de 106 acuarios de fibra de vidrio con una

capacidad de 60 l (50 x 55 x 38 cm.), que cuentan con agua de mar filtrada a través de filtro de arena (70 μ), de cartucho (10 μ) y luz ultravioleta. La temperatura del agua en los acuarios es controlada por calentadores sumergibles de 250 W. La iluminación del sistema se controla por un reloj a manera de mantener un foto periodo constante de 12h luz, 12h oscuridad. La fotofase es de 06:00 a las 18:00 hrs.



Figura 3. Vista general de acuarios de 60 L en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR.

Alimentación, monitoreo de parámetros y colecta de heces

Se realizan ensayos para determinar la digestibilidad *in vivo* de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de alimentos balanceados para camarones o peces.

Durante los experimentos se monitorea diariamente la temperatura (27 ± 0.5 °C), salinidad (39 ± 1 UPS) y oxígeno disuelto. El agua se mantiene por arriba de 5 mg/l con la ayuda de un exhaustor externo, mismo que crea un flujo de agua suave dentro del acuario para no provocar la lixiviación del alimento.

Los alimentos se asignan aleatoriamente en al menos 3 acuarios y se alimentan con los alimentos verdes (con óxido crómico) durante una semana antes de iniciar la colecta de heces.

El alimento se suministra al 10 ó 5 % de la biomasa en cada acuario, dependiendo del tamaño de los organismos (chicos o grandes, respectivamente), asegurando que siempre quede alimento sin consumir y al paso de dos horas se lleva a cabo la primera colecta de heces (Fig. 4). El alimento no consumido es sifoneado y se desecha. Después de esta primera colecta, se vuelve a proporcionar alimento, para luego de una hora ó una hora y media proceder a una segunda colecta. *Nota: Dependiendo de la naturaleza de los ingredientes y los alimentos, el tiempo para las colectas se*

tiene que ajustar. Tras la primera alimentación del día normalmente esperamos 2 horas para iniciar la colecta de heces, pero después de esto, la colecta de heces se puede realizar pasado menos tiempo, pues el tracto digestivo de los camarones ya está lleno y la excreción de las heces es más rápida.

La colecta de las heces se lleva a cabo mediante sifoneo con la ayuda de una manguera de plástico transparente con diámetro de 6 mm., que cuenta con un tubo de vidrio en la punta para evitar meter la mano en el agua y con ello estresar a los animales, lo que eventualmente provoca que las heces se agiten en el agua, y por ende aumente su lixiviación. Las heces de cada acuario se depositan en recipientes de plástico de 1 L, se escurren en los recipientes y se enjuagan con agua destilada. Posteriormente, con una espátula se depositan en tubos de plástico sumergidos en un baño a 4 °C, mientras se terminan de colectar las heces de todos los acuarios. Después de la primera recolecta, se vuelve a proporcionar alimento. Las heces recolectadas diariamente en cada acuario son congeladas a -80°C para posteriormente ser liofilizadas, homogeneizadas en un mortero y conservadas en refrigeración hasta su análisis.

Debido a que se tienen varios organismos dentro de un mismo acuario, cuando se presentan mudas, los exoesqueletos completos son extraídos y no se colectan las heces del acuario ese día para evitar que éstas contengan residuos del exoesqueleto.

La duración del período de colecta de heces es variable, en función de la cantidad de nutrimentos que serán analizados. Para hacer un estudio completo, se colectan alrededor de 15 g de heces húmedas, que al ser liofilizadas representan aproximadamente 1.5 g de heces secas, mismo que se logra al cabo de 30 a 40 días.

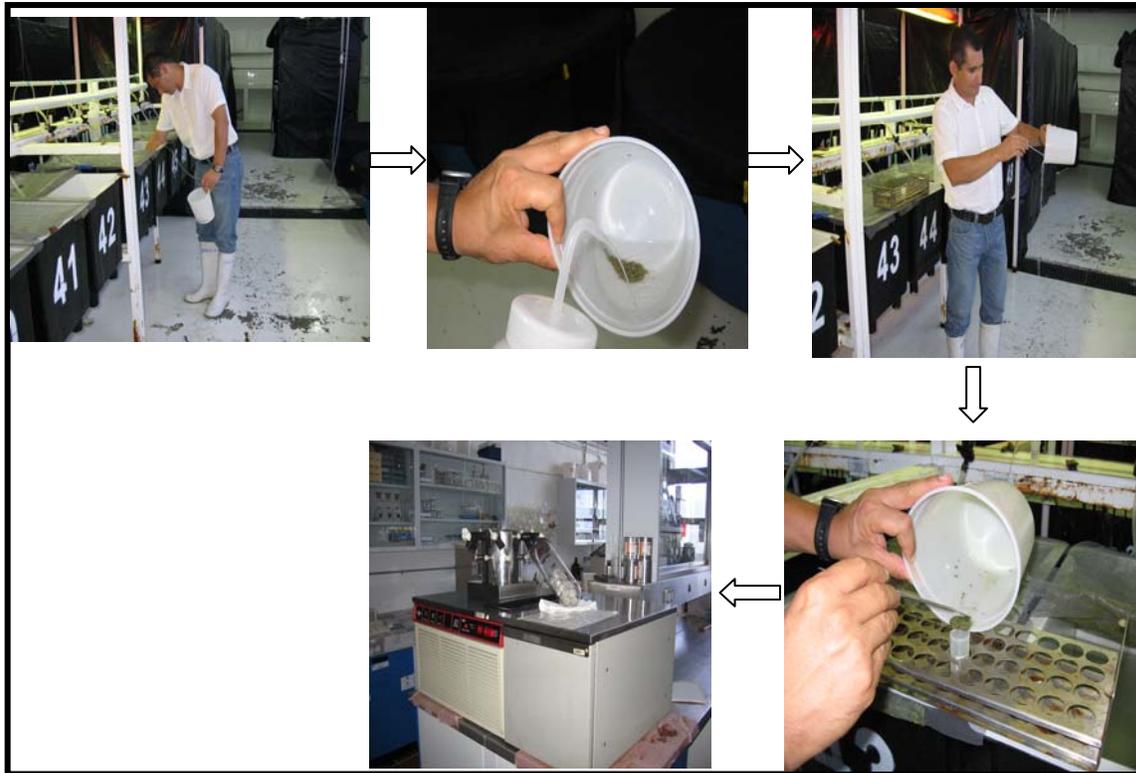


Figura 4. Colecta de heces por sifoneo en crustáceos.

Análisis químicos

Los alimentos son analizados, por triplicado, para conocer su composición química proximal y de energía: humedad, proteína cruda (digestor y destilador TECATOR^{MR}), extracto etéreo (Soxtec Avanti, TECATOR^{MR}), fibra cruda (hidrólisis ácida y básica), cenizas, carbohidratos por el método de antrona (Dreywood, 1946), óxido crómico (Furukawa y Tsukahara, 1966 descrito por Olvera-Novoa *et al.*, 1994), y energía (calorímetro adiabático PARR^{MR}). Asimismo, las heces de camarón son analizadas para conocer el contenido de proteína, lípidos totales (modificación del método de Bligh and Dyer, 1959), carbohidratos, energía y óxido crómico.

Los protocolos completos de cada método analítico se detallan en los anexos de este capítulo.

Análisis estadísticos

Para calcular los coeficientes de utilización digestiva aparente, se verifica la normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos utilizando la prueba de Lilliefors y la prueba de Bartlett. Para ver si existen diferencias significativas entre los tratamientos, se lleva a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey o en su caso la prueba de Nemenyi (para datos no paramétricos). Se consideran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos cuando $P < 0.05$ (Sokal & Rohlf, 1995).

Estabilidad en el agua de los alimentos

La estabilidad en el agua o hidroestabilidad de los alimentos se determina en base a la materia seca o nutrimentos retenidos durante un tiempo de inmersión en el agua, básicamente como medida de control de calidad en el laboratorio, pero no se utiliza para corregir por lixiviación los valores de digestibilidad de los nutrimentos, ya que el método no reproduce fidedignamente la lixiviación del alimento por efecto de la manipulación que realiza el camarón para ingerir el alimento. En el caso de los peces esta corrección no es necesaria, ya que los organismos consumen el alimento de manera casi inmediata.

Cuando la hidroestabilidad es superior al 90%, se puede considerar que el alimento fue bien fabricado. En el CIBNOR hemos manejado dos métodos distintos a lo largo del tiempo. Inicialmente usábamos un método que implicaba el uso de agua destilada para medir la hidroestabilidad, que tiene la ventaja de poder realizarse fácilmente y comparar los resultados con aquellos de otros laboratorios. No obstante, tiene la desventaja de que subestima la hidroestabilidad de los alimentos que son utilizados con especies marinas. Más recientemente hemos empezado a utilizar agua de mar a la salinidad en que se realizará la medición de la digestibilidad.

Actualmente, a las dietas usadas en los bioensayos se les determina el porcentaje de materia seca retenida según el método de Obaldo *et al.* (2002). Para esto, se pesan dos gramos de alimento, se colocan en un matraz de 250 ml con 200 ml de agua marina a 40 unidades prácticas de salinidad (UPS). Después de 1 h de inmersión a 27° C, con agitación constante a 100 r.p.m. en un agitador horizontal (Lab-line®, Melrose Park, Illinois, USA) el contenido del matraz se filtra a través de papel filtro Whatman No. 3. El papel con el alimento residual es secado en una estufa con flujo de aire a 105 °C por 24 h.

Para calcular la estabilidad en el agua del alimento se usa la siguiente fórmula:

$$\text{Materia seca retenida (\%)} = \frac{\text{Peso seco del alimento residual}}{\text{Peso seco del alimento inicial}} \times 100$$

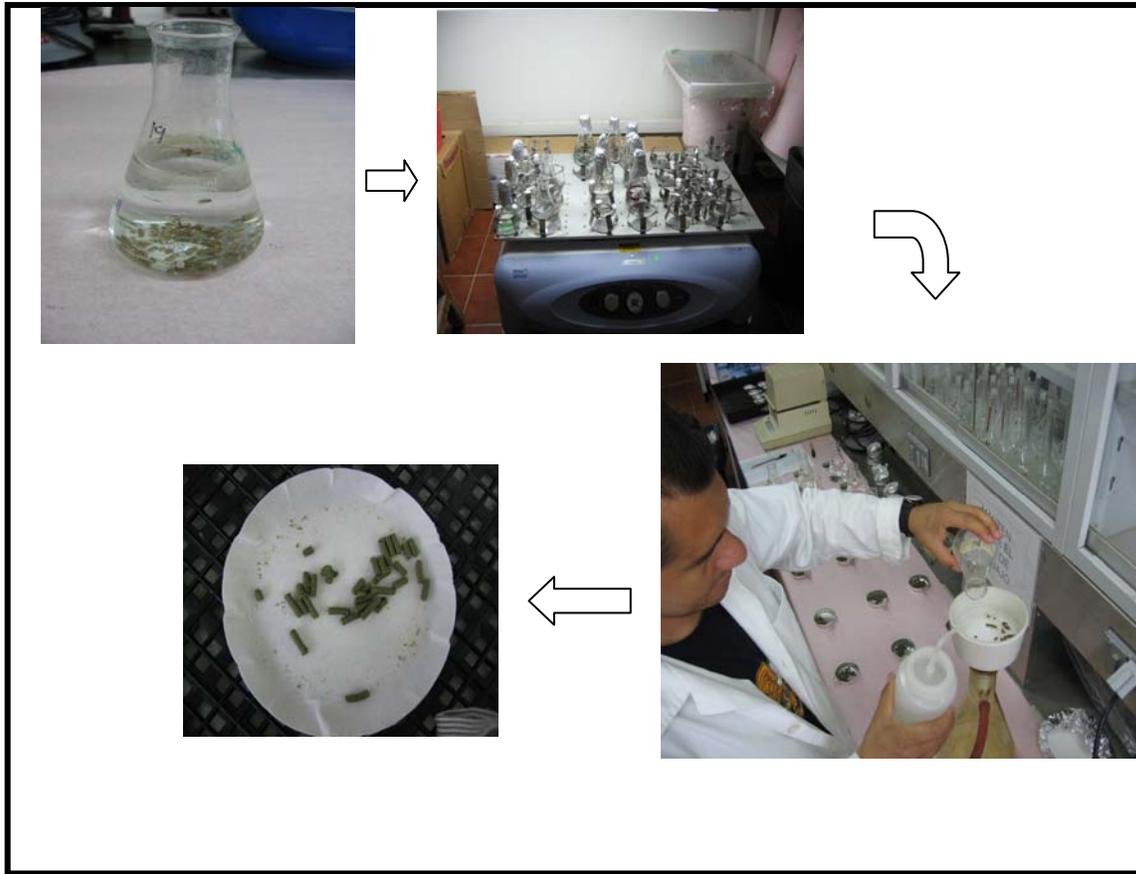


Figura 5. Pruebas de estabilidad en el agua de alimentos.

Valores de digestibilidad aparente *in vivo* de alimentos en camarón.

Tabla 3. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA %) de materia seca, proteína, carbohidratos, lípidos y energía de alimentos que contienen harina de langostilla (RCM) a diferentes niveles de inclusión (5, 10 y 15%) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* (3.32 ± 0.01 g). Inclusión de óxido de cromo 0.5%. Goytortúa Bores, *et al.* (2006).

Dieta	Materia seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Energía
Control	68.9 b ± 1.0	79.7 b ± 0.6	78.9 c ± 1.5	53.4 a ± 7.4	73.9 b ± 1.4
RCM5	73.8 a ± 0.7	82.8 a ± 1.0	80.4 bc ± 1.6	58.7 a ± 4.6	77.5 a ± 1.8
RCM10	74.2 a ± 1.2	83.6 a ± 0.3	82.7 ab ± 2.1	53.0 a ± 3.0	77.6 a ± 1.4
RCM15	74.2 a ± 3.7	84.0 a ± 2.4	84.4 a ± 1.1	46.2 b ± 3.2	77.5 a ± 2.2

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Valores con diferente letra dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 4. Digestibilidad aparente (%) de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos que contienen diferentes niveles de inclusión de hidrolizados enzimáticos (2 y 10-11 %) de langostilla (HL) y krill (HK) para juveniles de *L. vannamei* (6 – 9 g). Inclusión de óxido de cromo 0.5%. Galicia González (2003).

Dieta	Materia Seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos
Control	76.26 ab ±2.41	84.98 b ±0.72	89.15 a ±0.85	91.92 c ±0.70
HK2%-D	77.22 a ±1.06	85.64 ab ±0.17	88.11 a ±1.51	93.95 ab ±0.22
HK10%-D	79.17 a ±0.60	86.55 a ±0.42	88.92 a ±1.38	94.64 a ±0.51
HL2%-D	72.41 bc ±1.75	83.22 c ±0.42	85.29 a ±1.84	92.89 bc ±0.82
HL11%-D	72.06 c ±0.99	82.19 c ±0.27	86.96 a ±1.86	93.67 ab ±0.44

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Valores con diferente letra dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 5. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA %) de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de alimentos experimentales con diferentes niveles de proteína (HP40, HP35 y HP25%) y sustitución total de harina de pescado con harina de langostilla (HL32, HL29 y HL22) para juveniles de *Litopenaeus vannamei* (5.98 ± 0.15 g). Inclusión de óxido de cromo 0.5%. Goytortúa Bores *et al.* (2006).

Dieta	Materia Seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Energía
HP40	58.00e	70.87c	60.38b	94.40ab	80.42c
	±2.84	±3.02	±4.75	±2.14	±0.748
HL32	65.45b	80.97a	63.79ab	81.57d	79.26c
	±0.76	±0.64	±19.24	±7.22	±2.48
HP35	63.00cd	74.32bc	66.10ab	95.41a	85.34c
	±1.25	±1.50	±5.30	±0.61	±0.26
HL29	62.63d	78.88ab	65.83ab	83.36cd	80.83a
	±2.62	±1.55	±2.43	±8.28	±3.78
HP25	71.40a	80.35a	72.18a	93.15ab	88.25b
	±0.56	±2.62	±2.46	±1.72	±1.55
HL22	70.39a	80.28a	69.38ab	91.50bc	86.53ab
	±1.25	±0.91	±3.84	±2.02	±1.23

HP = dietas con harina de pescado. HL = dietas con harina de langostilla. Valores promedio de cuatro réplicas ± desviación estándar. Valores con diferente letra dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 6. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA %) de materia seca, proteína, carbohidratos, lípidos, fósforo y energía de alimentos que contienen 15% de harinas de frijol yorimón (*Vigna unguiculata*) para juveniles de *Litopenaeus vannamei* (15.4 ± 0.9 g). Inclusión de óxido de cromo 1.0 %. Rivas Vega *et al.* (2006).

Dieta	Materia seca	Proteína	Carbohidratos	Lípidos	Fósforo	Energía
	Control	70.16 ^a ±0.14	85.81 ^{ab} ±0.40	77.71 ^a ±0.56	80.94 ^{ab} ±2.62	70.65 ^{ab} ±0.42
Entero	71.11 ^{ab} ±1.20	85.88 ^{ab} ±0.27	76.70 ^a ±1.0	78.89 ^b ±2.58	69.33 ^b ±1.26	80.76 ^b ±0.83
Decorticado	68.05 ^a ±0.15	84.33 ^a ±0.28	81.28 ^b ±1.06	81.55 ^{ab} ±2.76	68.44 ^b ±1.33	82.66 ^{ab} ±1.07
Cocido	75.34 ^c ±0.37	88.26 ^c ±0.25	82.50 ^b ±0.83	84.30 ^{ab} ±0.28	73.58 ^a ±1.31	84.77 ^a ±0.02
Germinado	75.10 ^c ±1.12	87.19 ^{bc} ±1.53	81.15 ^b ±0.69	84.35 ^{ab} ±0.83	74.63 ^a ±1.86	84.68 ^a ±0.27
Extruido	74.20 ^{bc} ±0.88	87.87 ^c ±0.44	81.72 ^b ±0.27	85.01 ^a ±2.12	71.05 ^{ab} ±2.01	84.39 ^a ±0.78

Valores con letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 7. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDa %) de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de alimentos que contienen diferentes niveles (4 y 10%) de harinas de kelp (HKE) y sargaso (HS) en juveniles de *Litopenaeus vannamei* (5 - 7 g). Gutiérrez Leyva (2006).

Dieta	Materia seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos
Control	69.6 ^{ab} ± 1.1	81.4 ^a ± 0.1	83.8 ^{ab} ± 0.0	87.8 ^a ± 1.3
HKE4%	70.1 ^a ± 2.0	81.1 ^a ± 0.7	85.5 ^a ± 2.1	88.2 ^a ± 3.0
HS4%	68.9 ^{ab} ± 0.4	79.7 ^{ab} ± 0.8	82.9 ^{ab} ± 2.8	89.0 ^a ± 1.1
HKE10%	60.0 ^b ± 2.0	73.3 ^b ± 0.7	79.3 ^b ± 3.4	86.5 ^a ± 2.7
HS10%	69.1 ^{ab} ± 2.8	80.5 ^a ± 0.9	84.0 ^{ab} ± 2.1	90.5 ^a ± 1.8

Valores promedio de cuatro réplicas ± desviación estándar. Valores con diferente letra dentro de las columnas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

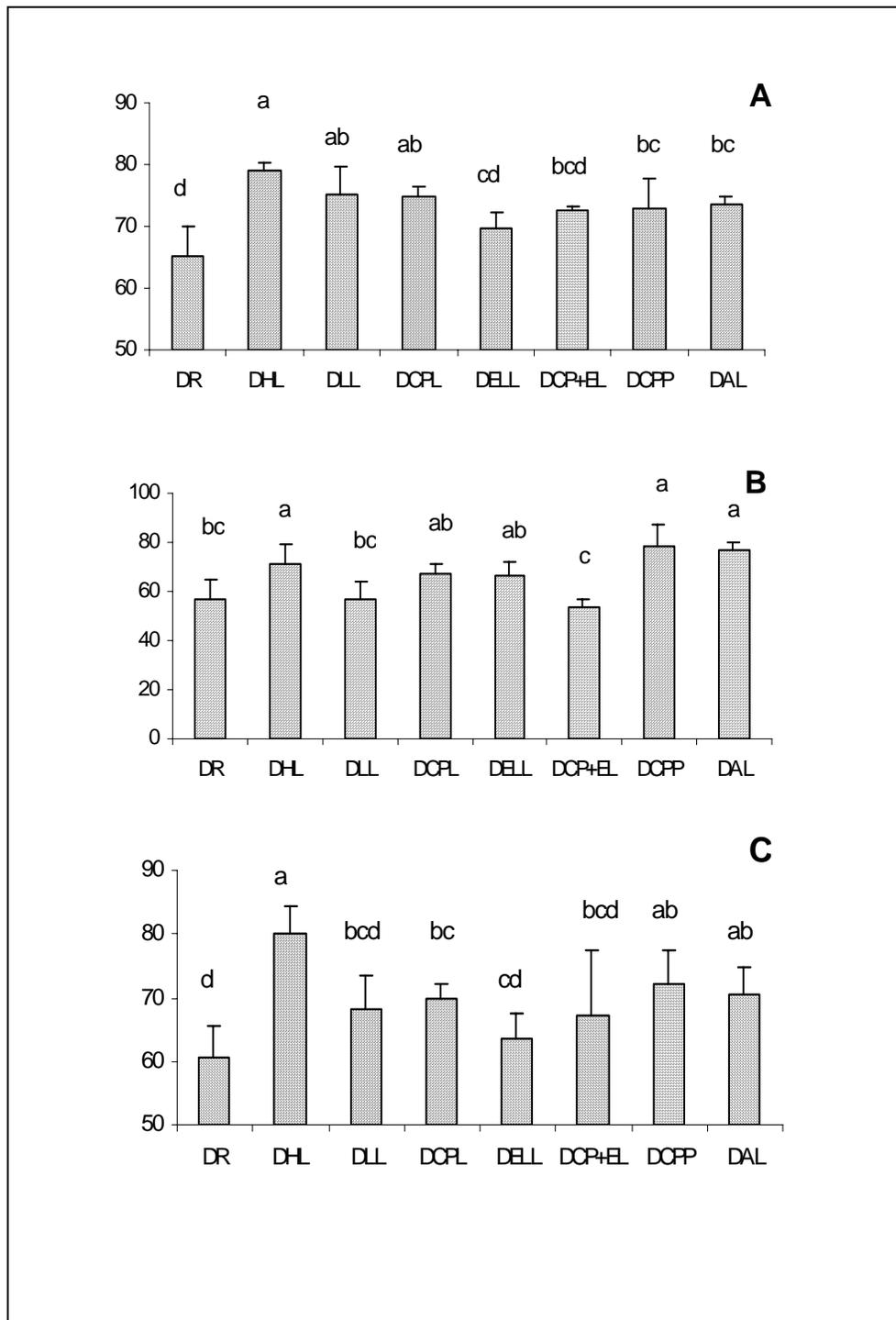


Figura 6. Digestibilidad aparente de proteínas (A), de lípidos (B), y energía digestible (C) de alimentos que contienen diferentes productos de langostilla para juveniles de *Litopenaeus vannamei* (13.9 ± 0.3 g). Inclusión de óxido de cromo 0.5%. Goytortúa-Bores (2000). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Valores de digestibilidad aparente *in vivo* de ingredientes en camarón.Tabla 8. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA %) *in vivo* de diversos ingredientes para juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

Ingrediente	Materia seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos	Energía	Fósforo
Harina de pescado, Anchoa ¹		83.6				
Harina de pescado, desperdicios de atún ¹		63.6				
Harina de pescado, Deboned white fish ¹		86.6				
Harina de pescado, Menhaden ¹		67.1				
Harina de pescado, Atlantic Menhaden ¹		67.1				
Pasta de soya ¹		90.9				
Langostilla (<i>Pleuroncodes planipes</i>) ¹		66.4				
H. frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i> Entero ²	76.5 ±8.1	86.3 ±1.8	77.2 ±2.5	71.0 ±6.7	76.7 ±5.6	57.1 ±2.6
H. frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i> Decortinado ²	56.1 ±1.1	76.0 ±1.9	74.9 ±7.8	101.6 ±7.1	89.4 ±7.2	61.0 ±2.1
H. frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i> Cocido ²	104.7 ±2.5	102.2 ±1.7	103.4 ±1.9	109.7 ±5.6	103.5 ±0.1	85.2 ±1.5
H. frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i> Germinado ²	103.1 ±7.5	100.7 ±4.2	103.7 ±5.6	100.7 ±4.6	102.9 ±1.8	90.1 ±2.5
H. frijol yorimón <i>Vigna unguiculata</i> Extruido ²	97.1 ±5.9	99.5 ±3.0	116.2 ±2.7	104.5 ±1.8	101.0 ±5.2	65.8 ±4.5
H. de Kelp (<i>Macrocystis pyrifera</i>) ³	24.3 ±6.7	35.3 ±1.2	79.3 ±12.3	85.7 ±3.0		
H. de Sargazo(<i>Sargassum spp.</i>) ³	70.1 ±6.0	76.2 ±3.1	81.4 ±9.2	106.7 ±1.7		

Valores promedio de al menos 3 réplicas ± desviación estándar.

¹Tamaño: 3.5 – 4 g. Inclusión de óxido de cromo 1.0 %. Inclusión del ingrediente 15%. Ezquerria *et al.* (1997).

²Tamaño: 15.4 ± 0.9 g. Inclusión de óxido de cromo 1.0 %. Inclusión del ingrediente 15 %. Rivas Vega (2006).

³Tamaño: 5 - 7 g. Inclusión de óxido de cromo 1.0 %. Inclusión del ingrediente 15 %. Gutiérrez Leyva (2006).

Valores de digestibilidad aparente *in vivo* de ingredientes en langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

Tabla 9. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA %) *in vivo* de diversos ingredientes para juveniles (3.6 ± 1.4 g) de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Inclusión de óxido de cromo 0.5 %. Inclusión del ingrediente 15%. Campaña Torres *et al.* (2005 y 2006).

Ingrediente	Materia seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos
Harina de pescado (sardina PC67)	83.2 ^{bc} ± 2.8	72.4 ^d ± 0.1	83.5 ^{bc} ± 0.4	28.0 ^b ± 3.1
Harina de pescado (sardina PC58)	62.6 ^a ± 2.6	47.4 ^a ± 0.7	42.0 ^a ± 0.6	18.7 ^a ± 4.1
Pasta de soya	90.8 ^d ± 3.0	91.8 ^f ± 0.7	93.6 ^f ± 0.1	88.5 ^d ± 3.1
Harina de trigo	88.9 ^{cd} ± 0.9	90.5 ^e ± 0.6	95.0 ^g ± 0.4	87.5 ^d ± 0.6
Harina de sorgo	90.8 ^d ± 2.7	89.6 ^e ± 0.6	85.6 ^d ± 0.3	94.4 ^e ± 0.1
Harina de calamar	80.1 ^b ± 2.4	70.8 ^{cd} ± 1.2	84.6 ^c ± 1.2	18.6 ^a ± 0.5
Harina de langostilla (<i>Pleuroncodes planipes</i>)	79.0 ^b ± 2.6	53.8 ^b ± 0.7	92.1 ^e ± 0.3	32.6 ^c ± 0.9

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Superíndices con letras distintas dentro de las columnas, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 10. Coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA %) *in vivo* de diversos ingredientes para preadultos (9.7 ± 4.3 g) de langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Inclusión de óxido de cromo 0.5 %. Inclusión del ingrediente 15%. Campaña Torres *et al.* (2006) y Campaña Torres (2001).

Ingrediente	Materia seca	Proteína	Lípidos	Carbohidratos
Harina de pescado (sardina PC67)	83.6 ^b ± 3.1	66.6 ^c ± 0.8	84.5 ^d ± 0.2	12.3 ^a ± 3.2
Harina de pescado (sardina PC58)	60.0 ^a ± 7.1	49.0 ^b ± 3.8	32.9 ^a ± 0.1	41.1 ^c ± 5.0
Pasta de soya	86.0 ^{bc} ± 2.2	87.0 ^e ± 1.0	95.1 ^e ± 0.6	81.6 ^d ± 1.0
Harina de trigo	90.5 ^c ± 3.1	94.7 ^f ± 0.2	96.4 ^e ± 0.5	83.9 ^d ± 1.4
Harina de sorgo	87.1 ^{bc} ± 3.6	72.6 ^d ± 2.0	77.3 ^c ± 0.2	93.6 ^e ± 0.8
Harina de calamar	84.4 ^b ± 2.5	67.2 ^{cd} ± 0.2	60.6 ^b ± 0.5	15.6 ^a ± 4.2
Harina de langostilla (<i>Pleuroncodes planipes</i>)	60.9 ^a ± 3.3	40.1 ^a ± 1.4	99.3 ^f ± 0.7	34.1 ^b ± 1.6

Valores promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Superíndices con letras distintas dentro de las columnas, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Publicaciones sobre digestibilidad

- Anguas Vélez, Benjamín. 2001. Estudio sobre los requerimientos en proteína y energía de juveniles de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Stein, 1868) (Osteichthyes: Serranidae). Tesis de Doctorado. Programa de Posgrado del CIBNOR, S.C. La Paz, Baja California Sur. México. 100 p.
- Anguas Vélez, Benjamín, R. Civera Cerecedo, M. Cadena Roa, J. Guillaume and S.F. Martínez Díaz. 2000. Studies on the nutrition of the spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). Effects of the dietary protein level on growth and protein utilization in juveniles fed semipurified diets. *Journal of the World Aquaculture Society*. Vol. 31(4): 580-591.
- Campaña Torres, Alfredo. 2001. Digestibilidad de dietas e ingredientes para juveniles y pre-adultos de langosta australiana de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (redclaw). Tesis de Maestría en Ciencias. Programa de Posgrado del CIBNOR, S. C. La Paz, Baja California Sur. México. 58 p.
- Campaña Torres Alfredo, Luis R. Martinez Cordova, Humberto Villarreal Colmenares & Roberto Civera Cerecedo, R. 2005. *In vivo* dry matter and protein digestibility of three plant-derived and four animal-derived feedstuffs and diets for juvenile Australian redclaw, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*. 250 (3-4), 748-754.
- Campaña Torres, A., L. R. Martinez Cordova, H. Villarreal Colmenares, and R. Civera Cerecedo. 2006. Apparent dry matter and protein digestibility of vegetal and animal ingredients and diets for pre-adult Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1858). *Hidrobiológica*. Vol. 16 (1) 103-106.
- Campaña-Torres, A., Martinez Cordova, L., Villarreal Colmenares, H. & Civera Cerecedo, R. (20006). Carbohydrate and lipid digestibility of animal and vegetal ingredients and diets for juvenile Australian redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*. En prensa.
- Civera, R., Villarreal, H., Goytortúa, E., Rocha, S. Vega, F., Nolasco, H., Pastén, J. y Camarillo, T. 1999. La langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como fuente de proteína en dietas experimentales para camarón. pp 325-347. En: Cruz Suárez, L. E., Ricque Marie, D. y Mendoza, R. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 11 al 13 de Noviembre de 1996. Monterrey, N. L., México. Editorial Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México.
- Civera, R, Goytortúa, E., Rocha, S., Nolasco, H., Vega-Villasante, F., Balart, E., Amador, E., Ponce, G., Colado, G., Lucero, J., Rodríguez, C., Solano, J., Flores-Tom, A, Monroy, J. Coral, G. 2000. Uso de la langostilla roja *Pleuroncodes planipes* en la nutrición de organismos acuáticos. pp. 349-365. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C. J., Ricque Marie, D y Cruz Suárez, L. E. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del Cuarto Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-18 Noviembre de 1998. La Paz, México. Editorial Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Libro electrónico en CD: ISBN-970-694-51-0.

- Ezquerria-Brauer, Josafat Marina. 1997. Tecnología enzimática en acuicultura: evaluación *in vitro* de la digestibilidad enzimática de la proteína dietaria por ph-stat para la optimización de dietas de *Penaeus vannamei* cultivado. Tesis de Doctorado. Programa de Posgrado del CIBNOR, S. C. La Paz, Baja California Sur. México.
- Ezquerria Brauer, J.M., F.L García Carreño & O. Carrillo Farnes. 1997. *In Vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp *Penaeus vannamei* (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 163:123-136.
- Galicia González, A. 2003. *Utilización de hidrolizado de langostilla (Pleuroncodes planipes) como aditivo en alimentos para juveniles del camarón Litopenaeus vannamei*. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. México. 131 p.
- Goytortúa Bores, Ernesto. 1993. Evaluación de la digestibilidad de dietas compuestas a base de harina de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) y su efecto en el crecimiento en el camarón blanco (*Penaeus vannamei*). Tesis de Licenciatura. Ingeniería en Alimentos. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. 112 p.
- Goytortúa Bores, Ernesto. 2000. Evaluación del valor nutricional de un extracto lipídico y un concentrado proteínico de langostilla *Pleuroncodes planipes* para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Colima. Colima, Colima, México. 86 p.
- Goytortúa Bores, E., R. Civera-Cerecedo, S. Rocha Meza, and A. Green Yee. 2006. Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and *in vivo* digestibility. *Aquaculture*. Vol 256 (1-4), 414-422.
- Goytortúa Bores, Ernesto, Sarai Deanda, Ranferi Gutiérrez Leyva y Roberto Civera Cerecedo. 2006. Sustitución total de harina de pescado con harina de langostilla en alimentos con diferente nivel de proteína para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre la digestibilidad *in vivo*. Programa y libro de resúmenes. Resumen # 27. pp. 68. VIII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15 – 17 de 2006. Mazatlán, Sinaloa, México.
- Gutiérrez Leyva, Ranferi. 2006. Uso de harinas de *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum* spp. en alimentos balanceados para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la digestibilidad *in vivo*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar, La Paz, B.C.S., México. 84 p.
- López-López, Silverio, Héctor Nolasco, Humberto Villarreal-Colmenares and Roberto Civera-Cerecedo. 2005. Response of digestive enzyme activity by supplemental ingredients in

practical diets in juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*. 11(2) 79-85.

Rivas Vega, Martha Elisa. 2006. Valor nutricional del frijol yorimón (*Vigna unguiculata* L. Walp) para camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Doctorado. Programa de Posgrado del CIBNOR. La Paz, B.C.S., México. 111 p.

Referencias

- A.O.A.C. 1995. (Association of Official Analytical Chemist). *Official methods of analysis*. 18th edition. Publisher by AOAC Internacional Arlington. USA. 935 p.
- Bligh, E. G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* Vol.37(8):911-917.
- Cho, C.Y. & S.J. Slinger. 1979. *Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout*. 239-247. *En: Proc. World Symposium on finfish nutrition and fish feed technology*. Vol. 2. Halver, J. E. & K. Tiews. (Eds.) Berlín. Heenemann Germany.
- Campaña Torres Alfredo, Luis R. Martínez Cordova, Humberto Villarreal Colmenares & Roberto Civera Cerecedo, R. 2005. *In vivo* dry matter and protein digestibility of three plant-derived and four animal-derived feedstuffs and diets for juvenile australian redclaw, *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture*. 250 (3-4), 748-754.
- Campaña Torres, A., L. R. Martínez Cordova, H. Villarreal Colmenares, and R. Civera Cerecedo. 2006. Apparent dry matter and protein digestibility of vegetal and animal ingredients and diets for pre-adult Australian redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1858). *Hidrobiológica*. Vol. 16 (1) 103-106.
- Civera Cerecedo, R. & J.C. Guillaume. 1989. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralisation of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Aquaculture*, 77:145-156.
- Cruz Suárez, L.E., D. Ricque Marie, M. Tapia Salazar & C. Guajardo Barbosa. 2000a. Uso de harina de kelp (*Macrocystis pyrifera*) en alimentos para camarón. 227-265. *En: Cruz -Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.A. Olvera-Novoa & R. Civera-Cerecedo. (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán. 380 p.
- Divakaran, S., Velasco, M., Beyer, E., Forster, I., Tacon, A.. 2000. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. *In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Dreywood, R. 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry (Analytical Edition)*, 18:499-505.
- Ezquerria Brauer, J.M., F.L García Carreño & O. Carrillo Farnes. 1997. *In Vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp *Penaeus vannamei* (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 163:123-136.
- Furukawa, A. and Tsukahara, H. 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bull. of the Japanese Soc. of Sci. Fisheries.*, Vol.32(6):502-506
- Guillaume, J. & C. Ceccaldi. 1999. Physiologie et alimentation des poissons et crustacés. 297-312. *En: Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot & R. Métailler (Eds.) Nutrition et alimentation des poissons et crustacés*. IFREMER. Paris, France. 489 p.
- Gutiérrez Leyva, Ranferi. Uso de harinas de *Macrocystis pyrifera* y *Sargassum* spp. en alimentos balanceados para el camarón *Litopenaeus vannamei*. Efectos sobre el crecimiento y la digestibilidad *in vivo*. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias del Mar, La Paz, B.C.S., Mexico. 84 p.
- Obaldo, L.G., S. Divakaran & G.A. Tacon. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. *Aquaculture Research*, 33:369-377.
- Olvera, N.M.A., Martínez, P.C.A. y Real, de L.E., 1993. Manual de técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos. FAO, GCP/RLA/102/ITA, Documento de campo No. 7, 104 pp.
- Sokal, R.R & F.J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W. H. Freeman, New York. 887 p.

Anexos

ANÁLISIS QUÍMICOS

- 1. HUMEDAD**
- 2. CENIZAS**
- 3. PROTEÍNA**
- 4. EXTRACTO ETÉREO**
- 5. FIBRA CRUDA**
- 6. ENERGÍA BRUTA**
- 7. ÓXIDO CRÓMICO**
- 8. LÍPIDOS TOTALES**
- 9. CARBOHIDRATOS**

1. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

MATERIALES:

- a) Crisol de porcelana
- b) Desecador Nalgene
- c) Pinzas para crisol
- d) Espátula de aluminio

REACTIVOS:

- a) Sílica-gel

EQUIPO:

- a) Horno TERLAB de regulación de temperatura digital.
- b) Balanza analítica con precisión de 0.1 mg.

PROCEDIMIENTO:

- a) Poner los crisoles a peso constante, en el horno mínimo 1 h a 105°C.
- b) Pesar con exactitud 2 g de muestra en un crisol de porcelana, previamente puesto a peso constante.
- c) Colocar el crisol y su contenido en una estufa a 105°C y desecar durante 4 hrs.
- d) Retirar el crisol de la estufa.
- e) Dejar enfriar en un desecador durante 40 minutos.
- f) Pesar el crisol en balanza analítica.

CÁLCULOS

El % de humedad se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso crisol} + \text{muestra húmeda} - \text{Peso crisol} + \text{muestra seca}}{\text{Peso muestra húmeda}} \times 100$$

REFERENCIAS:

- Procedimiento para elaborar procedimientos técnicos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
- Procedimiento Uso, Mantenimiento y Verificación de la Balanza XT 220 A MSC-33
- NMX-F-83-1986.
- A.O.A.C. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist, 18th. Edition.

2. DETERMINACIÓN DE CENIZAS

MATERIALES:

- a) Crisol de porcelana
- b) Desecador Nalgene
- c) Pinzas para crisol
- d) Espátula de aluminio

EQUIPO:

- a) Mufla Thermolyne 6000
- b) Balanza analítica Precisa XT 220

PROCEDIMIENTO:

- a) Poner los crisoles a peso constante, en el horno mínimo 1 h a 105°C, sacarlos y meterlos al desecador durante 40 minutos, transcurrido el tiempo pesarlos y registrar en la bitácora de trabajo.
- b) Pesar con exactitud de 1 a 2 g de muestra en un crisol de porcelana, previamente puesta a peso constante.
- c) Colocar el crisol y su contenido en la mufla e incrementar la temperatura gradualmente hasta alcanzar los 600° C.
- d) Dejar incinerar durante 5 h.
- e) Apagar la mufla, no abrir hasta que la temperatura baje alrededor de 200-300°C.
- f) Sacar los crisoles y pasarlos al horno a 105° C durante 1h.
- g) Sacar los crisoles y pasarlos al desecador, dejar enfriar durante 40 min.
- h) Pesar el crisol en balanza analítica.

CÁLCULOS

El porcentaje de cenizas se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas} = \frac{\text{Peso crisol con cenizas} - \text{Peso crisol vacío}}{\text{Peso muestra}} \times 100$$

REFERENCIAS:

- Procedimiento para elaborar procedimientos técnicos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
- A.O.A.C. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 18th. Edition.
- Procedimiento Uso, Mantenimiento y Verificación de la Balanza XT 220 A MSC-33.

3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROKJELDHAL

MATERIALES:

- a) Papel encerado para pesar (VWR)
- b) Espátulas
- c) Tubos de digestión Tecator
- d) Pipeta de repetición Eppendorf
- e) Punta para pipeta Eppendorf de 50 ml
- f) Vaso de precipitado 100 ml
- g) Probeta graduada de 100 ml
- h) Probeta graduada de 50 ml
- i) Matraz erlenmeyer de 6000 ml
- j) Matraz erlenmeyer de 250 ml
- k) Matraz aforado de 100 ml.
- l) Agitador magnético
- m) Gradilla para 40 tubos
- n) Termómetro bimetalico
- o) Guantes de asbesto

REACTIVOS:

- a) Ácido sulfúrico concentrado
- b) Tabletas catalizadoras K_2SO_4 y $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
- c) Ácido clorhídrico 0.1N JT BAKER
- d) Hidróxido de Sodio 40%
- e) Metanol
- f) Solución Receptora (Ácido bórico al 1% con rojo de metilo y verde de bromocresol)
- g) Agua destilada
- h) EDTA
- i) Azul de Timol
- j) Sulfato ferroso amoniacal hexahidratado

EQUIPO:

- a) Sistema de Digestión Foss Kjeltec 2040
- b) Sistema de destilación Foss Kjeltec 2300
- c) Balanza analítica con precisión de 0.1 mg.
- d) Sistema de enfriamiento con recirculación HAWS
- e) Campana de extracción de ácido perclórico
- f) Sistema Scrubber 2001 (Neutralizador de vapores)
- g) Impresora Star NX1001

PROCEDIMIENTO:

De preparación de Reactivos:

NaOH 40%

- a) Pesar aproximadamente y con precisión 2400 g de NaOH. En un matraz erlenmeyer de 6 L se pone un agitador magnético y se le agregan 5000 ml. de agua destilada. Se coloca el matraz en la parrilla de agitación y se va agregando poco a poco para que se vayan

disolviendo las perlas de NaOH. Adicionar 1000 ml de agua destilada para completar los 6000 ml de agua destilada, se deja de agitar hasta que la solución este completamente transparente, esperar a que enfríe y se vacía al deposito del Alkali que tiene el destilador Kjeltec 2300.

Solución Receptora de Ácido Bórico al 1 % con Rojo de Metilo y Verde de Bromocresol

- b) Pesar aproximadamente y con precisión 60 g de Ac. Bórico, 0.1 g de verde de bromocresol y 0.1 g de rojo de metilo.

Colocar en un matraz de 6 l 5000 ml de agua destilada y disolver los 60 g. de verde de bromocresol. Agregar 1000 ml de agua destilada y seguir agitando hasta que la solución este completamente transparente.

En un vaso de precipitado de 100 ml. disolver 0.1 g de verde de bromocresol en 50 ml de metanol. Una vez disuelto el bromocresol, colocar en un matraz aforado de 100 ml. y aforar a 100 con metanol. (Se repite lo mismo para el rojo de metilo).

Se pone el matraz con el ácido bórico en la parrilla de agitación y en una probeta se mide exactamente 60 ml de verde de bromocresol y 42 ml de rojo de metilo. Se agrega el verde de bromocresol al ácido bórico se espera a que se incorpore bien (la solución toma un color verde) y se le adiciona el rojo de metilo (la solución toma un color uva.) Agregar 25 ml. de esta solución a un matraz erlenmeyer de 250 ml y adicionarle 100 ml de agua destilada. Si la solución se torna de color rojo titular con 0.1 M de hidróxido de sodio hasta obtener un color verde grisáceo. Se calcula la cantidad de hidróxido de sodio necesaria para ajustar los 6000 ml. de ácido bórico. Con la siguiente formula:

$$\text{ml. 1.0 M alcali} = \text{ml de titulante} \times 40$$

- c) Las soluciones preparadas se etiquetan conforme a la etiqueta que se encuentra en el anexo 4.

De análisis:

Digestión

- Prender el sistema de digestión Foss Tecator (Mod. 2040) y esperar que el display de temperatura marque los 420°C.
- Pesar de 0.05 g a 0.1 g de muestra y colocarla en los tubos de digestión Kjeldahl.
- Pesar aprox. 0.1 g de EDTA cuyo contenido de nitrógeno es conocido, para usarlo como Estándar en el proceso de digestión.
- Adicionar a cada uno de los tubos una pastilla catalizadora K_2SO_4 y $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
- Añadir 3 ml de ácido sulfúrico concentrado a cada uno de los tubos.
- Una vez que el digestor alcanzó los 420°C aprox., poner la gradilla con los 40 tubos con muestra a digerir colocando la tapa de succión (exahustor) sobre la boca de los tubos y prender el scrubber.
- Tomar el tiempo de 25 minutos con el timer.
- Mantener el flujo máximo de succión por 5 min. Una vez transcurrido este tiempo ajustar la intensidad de succión de manera tal que la nube de condensación del ácido permanezca o se mantenga más o menos a 3/4 de la altura del tubo.

- i) Una vez que la muestra se torna verde cristalina indicará que la digestión ha terminado.
- j) Retirar los tubos del digestor y dejar enfriar las muestras con la tapa de succión aún puesta.

Destilación

- a) Verificar que todos los recipientes periféricos del destilador automático FossTecator^R Mod. 2300 contengan sus respectivas soluciones (agua destilada, solución receptora, álcali y ácido para titulación) en cantidad suficiente. En caso de detectar algún faltante, preparar el reactivo.
- b) Revisar que el recipiente de residuo no se encuentre lleno, en caso vaciar a los recipientes de desecho que se entregan a la unidad de manejo de residuos peligrosos.
- c) Se enciende la impresora y se pone en línea.
- d) Se enciende el destilador y aparece en pantalla Foss inmediatamente aparece el equipo en pantalla que el equipo esta realizando autoensayo sistema bombas (álcali, solución receptora, agua, y generador de vapor).
- e) Ya que realizó el autoensayo internamente aparece en pantalla elegir función. Estas se encuentran indicadas en la parte inferior y al lado derecho de la pantalla son cuatro indicaciones con señalamientos: manual (mano), Botón de arranque Automático set up (circulo), programa equipo, impresoras.
- f) Se presiona el botón de arranque y se despliega en la pantalla el programa a elegir Kjeldhal 1 es para determinación y Kjeldhal 2 para lavado del equipo, con las flechas cursor (◀ ▶) que se encuentran del panel de control que se encuentran en la parte inferior de la pantalla y al lado izquierdo se elige el programa.
- g) Se coloca el tubo se pone el cursor donde dice unidad y se elige **BLANCO**, se coloca el cursor donde dice peso y se pone **0.000**. Se baja la puerta de seguridad y el equipo inicia la destilación el lavado del equipo y determina el blanco., aquí pueden repetirse de 3 a 5 lavados con determinación de blanco hasta que la lectura del blanco sea menor a 0.2
- h) Con las flechas cursor (◀ ▶) del panel se elige el programa kjeldhali1, que es para determinación con esta flechas del cursor se elige % de recuperación y se pone el tubo que contiene el estándar (EDTA).
- i) Ya que se determino el estándar, con las flechas del panel de control se selecciona la opción del análisis a realizar: **% Nitrógeno, % Proteína, mg Proteína, mg de nitrógeno**.
- j) Se inicia con el análisis de las muestras. Se embona el tubo correctamente para evitar escurrimientos y la perdida de la muestra.
- k) Una vez que se terminan de destilar las muestras, con la flechas del cursor se regresa al programa Kjeldhal 2 para lavado del equipo. Y se repiten los pasos de los incisos el p al r.
- l) Anotarse en la bitácora y pegar la hoja de resultados del análisis realizado
- m) Elaborar el informe de resultados FSC-014

Nota: Los tubos a utilizar deberán estar previamente enjuagados con agua destilada y secar en la estufa, de no haber sucedido así, se recomienda hacerlo. Una vez que la muestra se torna verde cristalina indicará que la digestión ha terminado. El tiempo en que esto suceda dependerá de la cantidad de proteína que contenga la muestra por lo que se recomienda estar pendiente, ya que un exceso en el tiempo de digestión puede ocasionar pérdida de nitrógeno.

REFERENCIAS:

- Procedimiento para elaborar procedimientos técnicos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
- A.O.A.C. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist 18th. Edition.
- Manual de Operación del Digestor y Destilador Kjeltec
- Política de Trazabilidad de la Entidad Mexicana de Acreditación.
- Procedimiento Uso, Mantenimiento y Verificación de la Balanza XT 220 A MSC-33.

4. DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETÉREO

MATERIALES:

- p) Papel Whatman # 1
- q) Espátulas
- r) Vasos de Aluminio Tecator
- s) Probeta graduada de 100 ml.
- t) Cartuchos de celulosa 33 x 80 mm.
- u) Gradilla para cartuchos
- v) Soporte con imán

REACTIVOS:

- a) Éter de Petróleo

EQUIPO:

- a) Equipo de Extracción Soxtec Avanti Foss Tecator 2010
- b) Balanza analítica con precisión de 0.1 mg.
- c) Sistema de enfriamiento con recirculación HAWS
- d) Campana de extracción
- e) Estufa eléctrica TERLAB de regulación de temperatura digital para tener un nivel de 103 a 105 °C.

PROCEDIMIENTO:

Extracción: antes de iniciar, primeramente se abre la llave del agua.

- a) Se enciende el panel de control e inmediatamente el programador. (el equipo dará una lectura que corresponde al último programa que se utilizó, si se desea cambiar el programa oprimimos la tecla (+) o (-) según se requiera).
- b) Seleccionamos nuestro programa.
- c) Previamente se tienen a peso constante los vasos de aluminio que se requieren para la determinación.
- d) Manejando el cartucho con pinzas, se pesa la muestra utilizando balanza analítica.
- e) Tomas cada cartucho y lo colocas en la gradilla, colocándolos manualmente en el aparato.
- f) Se suben dentro del aparato oprimiendo la tecla de flechas.
- g) Utilizando pinzas o guantes se colocan los vasos de aluminio con 80 ml. de éter de petróleo.
- h) Se oprime la tecla de temperatura y cuando se iguala la temperatura de la parrilla con la del programa elegido, se oprime la tecla de inicio.
- i) En este momento se inicia el programa que tiene una duración de 70 min. Que se dividen en 15 minutos de inmersión, 40 minutos de goteo del solvente, 10 de recuperación del solvente y 5 minutos de presecado.
- j) En este momento que termina el programa la pantalla del master control vuelve a inicio.
- k) Se oprime la tecla de flechas para subir los cartuchos.
- l) Se retiran los vasos del equipo y se colocan en la campana durante 5 /10 min. (con la finalidad de que se evapore el solvente remanente).
- m) Se oprime la tecla de flechas para bajar los cartuchos y se colocan en la gradilla para

ponerlos a secar a 103° C / 2 hr.

- n) Se toman con pinzas cada uno de los vasos y se ponen en la estufa a 103 °C / 2 hrs.
- o) Utilizando pinzas se sacan los vasos de la estufa y se colocan en el desecador 30 min. para que enfríen.
- p) Se pesan.
- q) Por diferencia de peso y aplicando la fórmula encontramos el porcentaje de lípidos que tiene la muestra.

Nota: Esto en caso de que esta misma muestra se utilice también para determinar Fibra cruda, en caso de no ser así, se puede trabajar hasta con 1.0 g de muestra.

Cálculos:

$$\text{Extracto etéreo} = \frac{\text{Peso del vaso} + \text{lípidos extraídos} - \text{Peso del vaso vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

REFERENCIAS:

- Procedimiento para elaborar procedimientos técnicos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
- A.O.A.C. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist 18th. Edition.
- Manual de Operación del Equipo Soxtec Avanti 2010 Foss Tecator.
- Política de Trazabilidad de la Entidad Mexicana de Acreditación.
- Procedimiento Uso, Mantenimiento y Verificación de la Balanza XT 220 A MSC-33.

5. DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA

MATERIALES:

- a) Crisol de vidrio 30 ml Foss
- b) Desecador Nalgene
- c) Pinzas para crisol
- d) Espátula de aluminio
- e) Placa de calentamiento Cimarec
- f) Bomba de agua manual para lavados

REACTIVOS:

- a) H₂SO₄ al 1.25 % (0.255 N)
- b) Agua destilada
- c) NaOH 1.25 % (0.255 N)

EQUIPO:

- a) Fibertec M6 1020 Foss Tecator
- b) Balanza precisa
- c) Horno Terlab
- d) Mufla Thermolyne 6000

PROCEDIMIENTO:

De análisis

- a) Pesar 2 g de muestra, previamente desengrasada, en el crisol de extracción. Se puede utilizar lo que queda después de desengrasar la muestra en el Soxtec).
- b) Colocar con cuidado los crisoles en el equipo FIBERTEC bajar la palanca para embonar los crisoles con el refrigerante y colocar cada una de las palancas individuales en **CLOSED**.
- c) Calentar a ebullición el H₂SO₄ al 1.25 % (0.255 N) y agregarle con ayuda del embudo 150 ml a cada crisol y 5 gotas de octanol (antiespumante).
- d) Prender el equipo y colocar la perilla de control de temperatura en **6**. Verificar que este conectada la bomba de recirculación de agua. Cuando este hirviendo se baja la perilla de control de temperatura a **4** y dejar hervir por 30 minutos.
- e) Bajar la temperatura a cero (0) conectar la bomba de vacío y colocar la primera palanca en **Filtrado**. Inmediatamente iniciar el filtrado con el primer crisol y así continuar con el siguiente hasta completar los 6 crisoles.
- f) Enjuagar ahí mismo con agua destilada caliente, hacer 3 lavados con 50 ml de agua cada lavado, con la bomba manual se toman los 50 ml y se adicionan en cada crisol, se conecta la bomba de vacío y se filtra. Este paso se repite 3 veces hasta completar los lavados.
- g) Calentar a ebullición el NaOH 1.25 % (0.255 N) y agregarle, con ayuda del embudo, 150 ml a cada crisol y 5 gotas de octanol (antiespumante). Se repite lo señalado en los pasos 4, 5 y 6.
- h) Posteriormente a los lavados con agua destilada hirviendo, se hace un lavado con 50 ml. de alcohol, se conecta la bomba de vacío y se filtra.
- i) Se apaga el equipo las palancas se regresan a **REST**. Se coloca la base de crisoles y se levanta la palanca para separar los crisoles del equipo.
- j) Se ponen los crisoles a secar en la estufa a 130° C por 2 horas
- k) Se dejan enfriar 20 min. en el desecador, y se pesan los crisoles

- l) Se ponen los crisoles en la mufla a 520° C por 30 min.
- m) Se pasan los crisoles a la estufa a 130° C por 20 min.
- n) Se dejan enfriar 20 min. en el desecador, y se pesan los crisoles.

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra Cruda} = \frac{(\text{Pcs} - \text{Pcc})}{m} \times 100$$

% Fibra cruda = a

Pcs = Peso en gramos del crisol a 120°C / 2 hr.

Pcc = Peso en gramos del crisol más cenizas

M = Peso en gramos de la muestra

Nota: Para conocer el valor real del % de fibra cruda en la muestra es necesario conocer:

% lípidos de la muestra

% humedad de la muestra.

REFERENCIAS:

- Procedimiento para elaborar procedimientos técnicos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
- A.O.A.C. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 18th. Edition.
- Procedimiento Uso, Mantenimiento y Verificación de la Balanza XT 220 A MSC-33.

6. DETERMINACIÓN DE ENERGÍA BRUTA

MATERIALES:

- e) Alambre de fusión PARR (No. 45C10
- f) Capsula de acero Párr.
- g) pinzas
- h) Espátula de aluminio
- i) Soporte universal
- j) Charolas de aluminio

REACTIVOS:

- a) Agua destilada
- b) rojo de metilo
- c) metanol
- d) Carbonato de sodio 0.0725N

EQUIPO:

- c) Calorímetro adiabático Párr.
- d) Balanza precisa
- e) Pastillador
- f) Tanque de oxígeno
- g) Mufla Thermolyne 6000

PROCEDIMIENTO:

De análisis

- a) Al iniciar el trabajo con el calorímetro hay que cerciorarse de que al conectarlo a la corriente, se conecten también la bomba de recirculación y el enfriador. Inmediatamente el calorímetro ya encendido muestra la temperatura en ese momento; hay que pulsar la tecla F1, se escucha un sonido de cambio, y aparece ON. En este momento hay que esperar aproximadamente ½ hr. Para empezar a trabajar con él. En este tiempo se puede colocar la cubeta con los 2 litros de agua destilada dentro de la chaqueta del calorímetro.
- b) La muestra pastillada y seca se pesa sobre el crisol de acero inoxidable. Tanto la muestra como el crisol deberán manejarse con pinzas, cuidando de no tocar con los dedos estos objetos. Es importante mencionar que los crisoles nuevos deberán meterse a la mufla durante 4 horas a 480°C para que se les forme una ligera capa de óxido, el cual cataliza la combustión de la muestra. Este procedimiento deberá repetirse cuando llegue a tocarse el crisol con los dedos ó cuando pierda su capa de óxido debido a que se hubiera tallado para su limpieza. El peso de la muestra deberá de ser de alrededor de 1 gramo, aunque se obtienen buenos resultados con muestras de hasta 0.25 gramos (coeficiente de variación en 10 muestras igual a $\pm 0.5\%$), pero con muestras de 0.1 gramo, que es la cantidad mínima que puede ser quemada en la bomba calorimétrica, la exactitud no disminuye demasiado (coeficiente de variación = 2.0 % en 10 muestras). Jamás deberán colocarse muestras de más de 1.5 gramos y en materiales desconocidos se recomienda hacer las pesadas no muy por encima de 1 gramo.
- c) Se atan las puntas de un trozo de alambre de níquel-cromo de 10cm. de longitud a los extremos horadados de los electrodos de la cabeza de la bomba calorimétrica. Enseguida se coloca con mucho cuidado el crisol con la pastilla de muestra sobre el soporte que forman los propios

- electrodos, procurando que este quede ligeramente inclinado; después se acomoda el alambre, ayudándose con unas pinzas, de tal modo que este (alambre) toque ligeramente a la muestra. Cuidadosamente se coloca la cabeza de la bomba sobre el cilindro de la misma, al que se le han puesto 0.5 ml de agua destilada en su interior (secuestrante de los productos de la combustión); se desliza suavemente la cabeza al interior del cilindro hasta que tope; a continuación se coloca el empaque de hule, el aro metálico y la tapa, la cual se atornilla firmemente con la mano.
- d) Cuidadosamente se coloca la bomba sobre las pinzas sujetadoras de mesa, y se cierra la válvula de escape de la misma. Se conecta el cople terminal de la manguera del tanque de oxígeno a la válvula admisoras de oxígeno de la bomba. Se abre la llave del tanque de oxígeno tan solo un cuarto de vuelta con lo que el manómetro chico del tanque (el que tiene el letrero de **OXYGEN**) indicará la presión que hay en tanque; en este momento se presiona la tecla **FILL O2**. Muy lentamente se abre la llave de paso negra con lo que la aguja del manómetro grande (el que tiene el letrero **ATMOSPHERES**) comenzará a moverse; con la llave de paso se controla la velocidad de llenado de la bomba calorimétrica de tal modo que este sea muy lento y tarde al menos 1 minuto hasta llegar a 30 - 35 atmósferas (jamás deberá excederse la presión de 40 atmósferas). Al momento que se haya llenado la bomba calorimétrica con la cantidad de oxígeno, el calorímetro avisa mediante un sonido. Se cierra la llave de paso **negra** firmemente y luego la del tanque de oxígeno; se libera la presión residual en la manguera empujando hacia abajo la palanca negra colocada justo abajo de la llave de paso del mismo color. A continuación se separa el cople de la válvula de llenado de oxígeno. Se toma la bomba calorimétrica con las pinzas sujetadoras y se coloca dentro de la cubeta, con la ayuda de estas.
- e) Llenado de la cubeta y colocación dentro del calorímetro. La cubeta de la bomba calorimétrica se llena con exactamente $2,000 \pm 0.5$ gramos de agua destilada (preferentemente deberá usarse siempre el mismo instrumento de medida) y se coloca dentro de la "chaqueta" del calorímetro.
- f) Después se sumerge, dentro del agua de la cubeta, la bomba calorimétrica usando las pinzas especiales y escurriéndolas bien después de quitarlas para no extraer agua. A continuación se conectan los electrodos del calorímetro en la cabeza de la bomba ayudándose con unas pinzas.
- g) Cerrado del calorímetro. Se cierra el calorímetro y en el teclado se presiona la tecla **START**, en este momento el calorímetro automáticamente te va a solicitar los datos de tu muestra y va aparecer en la pantalla **CAL ID** se le presiona la tecla 1 (este número se refiere al número de cubeta) se da **ENTER** y te aparecerá el número que le corresponde a tu muestra, le vuelves a presionar la tecla **ENTER** y te pedirá el peso de tu pastilla; le vuelves a presionar la tecla **ENTER** y el calorímetro inmediatamente iniciará poniéndose en pantalla un aviso de preperiodo, aproximadamente en 5 minutos el calorímetro avisará mediante un sonido de "bip, bip, bip" el momento de la ignición y pasará al posperiodo, donde tardará aproximadamente 5 a 10 min. en volver a sonar, dando fin a la determinación y apareciendo en pantalla la cantidad de cal/g de la muestra.
- h) Se abre el calorímetro, se desconectan los electrodos, y con las pinzas sujetadoras se saca la bomba calorimétrica. Se escurre el agua de la bomba y se quita con papel absorbente que se encuentra en los orificios de las válvulas de la cabeza. Muy lentamente se abre la válvula de escape de la cabeza para liberar la presión residual del interior de la bomba, de tal modo que no tome menos de 1 minuto la salida de los gases.
- i) Después de haber liberado toda la presión, se desatornilla y quita la tapa, el anillo metálico y el empaque de hule. Se jala suavemente hacia afuera la cabeza de la bomba hasta poco más arriba de la mitad de los electrodos y con unas pinzas se quita el crisol metálico, en el cual solo deberá haber cenizas, si la combustión fue completa. Con una piseta de agua destilada se enjuaga el

interior de la cabeza de la bomba y los electrodos, recogiendo los líquidos dentro del propio cilindro, para posteriormente transferirlos a un vaso de precipitado, enjuagando 3 veces el cilindro con agua destilada.

- j) Se coloca la cabeza de la bomba sobre el soporte y se le quitan los pedazos de alambre de níquel-cromo que quedaron después de la combustión; cuidadosamente se estiran y se mide su longitud la cual se resta de la longitud total de alambre que se puso al principio (10 cm.), lo que nos dará la cantidad de alambre quemado (c3).
- k) Los líquidos de lavado de las partes de la bomba calorimétrica se titulan (los cuales tienen ácido) con solución carbonato de sodio 0.725 N usando naranja de metilo como indicador. Se toma la lectura.
- l) En el calorímetro se presiona las teclas **DONE REPET** y solicita el número de la muestra. Se le da **ENTER** y pide la cantidad de alambre quemado; nuevamente **ENTER** para la cantidad de álcali gastado se le vuelve a presionar la tecla de **ENTER**, aparece el número de muestra y presionando la tecla **DONE** hasta que aparece en pantalla **FINAL**. En este momento la cantidad que aparece son las calorías corregidas ya con el valor de del alambre quemado en la combustión y lo que se gastó de álcali, y este es el valor que se reporta.

REFERENCIAS:

- Procedimiento para elaborar procedimientos técnicos. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.
- Manual del calorímetro Párr.
- Procedimiento Uso, Mantenimiento y Verificación de la Balanza XT 220 A MSC-33.

7. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO CRÓMICO

Furukawa, H. and Tsukahara, H., 1966. On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish fed. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 32(6):502-508.

Reactivos

Acido nítrico al 90%

Acido perclórico

Agua destilada

Materiales y equipo

Tubos de digestión aforados a 100 ml

Celdas para espectrofotómetro

Digestor A.I. Scientific

Sistema de extracción de gases

Campana de extracción de humos

Espectrofotómetro

Papel filtro Whatman # 1

Procedimiento

1. Pesar 50 mg de muestra finamente molida. Utilizar un papel filtro Whatman # 1. Colocarla en un tubo Kjeldhal aforado (100 ml).

NOTA: El papel filtro debido a su tamaño tendrá que ser recortado a manera que la muestra su pueda envolver. Esto tiene como función el evitar que la muestra se quede pegada en las paredes del tubo

NOTA: En cada corrida se tiene que incluir un blanco con agua destilada sin muestra y un estándar con contenido de cromo conocido

2. Adicionar 5 ml de ácido nítrico al 90% (HNO₃).

NOTA: Para el manejo de estos reactivos se tiene que utilizar guantes de nitrilo y mascarilla y trabajarlos bajo campana de extracción.

3. Encender el digestor A.I. Scientific y correr el programa 1 siguiendo los siguientes pasos:

- a) Presione la tecla RUN.
- b) Presione la tecla 1.
- c) Presione la tecla E.

4. Una vez que el digestor alcance los 120° C coloque los tubos en el digestor y deje digerir el tiempo programado (90 minutos).

NOTA: El término de la reacción lo indicará un color verde claro de la solución digerida. Tener cuidado de asegurar el buen funcionamiento de la campana de extracción.

5. Sacar los tubos del digestor y dejarlos enfriar a temperatura ambiente en la campana de extracción.

6. Una vez fría la solución, agregar 3 ml de ácido perclórico.

NOTA: Para el manejo de estos reactivos se tiene que utilizar guantes de nitrilo, mascarilla y trabajarlos bajo campana de extracción.

7. Corra el programa 2 del digestor siguiendo los siguientes pasos:

- d) Presione la tecla RUN.
- e) Presione la tecla 2.
- f) Presione la tecla E.

8. Una vez que el digestor alcance los 203° C coloque los tubos de digestión y deje digerir el tiempo programado (120 minutos).

NOTA: El final de la reacción lo determinará el viraje de color de la solución de verde a amarillo limón.

9. Dejar enfriar los tubos, bajo campana de extracción y esperar la formación de un color rojo el cual indicará el final del proceso de digestión. Aquellas soluciones que no se colorean de rojo, indican que la digestión aún no termina por lo que deberán someterse nuevamente hasta que dicho color aparezca.

NOTA: Verificar que no existan partículas de cromo precipitadas (puntos verdes en el fondo del tubo de digestión). De presentarse dichas partículas habrá que volver a digerir hasta que dichas partículas no aparezcan. Esta verificación se tiene que hacer a los pocos minutos (alrededor de 3 min.) después de finalizada la digestión ya que después se forma una solución o precipitado rojo que no permitirá observar la presencia o no de partículas precipitadas.

10. Afore los tubos a 100 ml con agua destilada.

11. Agitar los tubos y deje reposar por 5 minutos.

NOTA: Tener cuidado que el tiempo de reposo sea el mismo entre todas las muestras. Para esto se recomienda agitar de manera escalonada.

12. Transferir la muestra a una cubeta para espectrofotómetro y registrar la absorbancia de la solución a 350 nm.

13. Calcular el valor de óxido crómico de la muestra utilizando las siguientes fórmulas:

$$X = (Y - 0.0032) / 0.2089$$

Donde:

X = cantidad de óxido de cromo presente en la muestra; Y = absorbancia; 0.0032, 0.2089 son constantes.

NOTA: Estas constantes son las obtenidas y utilizadas por Furukawa y Tsukahara, por lo que es necesario elaborar una curva estándar propia.

12. Calcular el porcentaje de óxido crómico en la muestra.

$$\% \text{ Oxido crómico} = 100 \times (X / A),$$

Donde:

A = Peso de la muestra

8. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS TOTALES (Bligh and Dyer, 1959 modificado)

Bligh, E. G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* Vol.37(8):911-917.

Reactivos

Metanol
Cloroformo
BHT
Agua destilada
Nitrógeno

Preparación de mezcla extractora

Mezclar volúmenes de metanol + cloroformo + agua destilada a una proporción de 2:1:0.8 respectivamente.

Equipo y materiales

Centrifuga refrigerada
Tubos de rosca
Balanza de calibración
Pipetas pasteur
Pipeta de repetición
Puntas para pipeta
Rotavapor
Campana de extracción de humos
Agitador Vortex

Procedimiento

1. Pesar aproximadamente 100 mg de muestra y colocarla en un tubo de ensayo con rosca (No. 99447).
NOTA: El contenido de humedad de la muestra debe de ser conocido.
2. Agregar 6.3 ml de la mezcla extractora. Agitar en vortex. Dejar en reposo por 1 h. NOTA: El trabajo con solventes debe llevarse a cabo bajo campana de extracción.
3. Mezclar en vortex y centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos a 5° C.
4. Separar, con la ayuda de una pipeta Pasteur, la solución extractora. Esta solución colocarla en un tubo de ensayo con rosca (No. 99447) y guardar.
NOTA: Utilizar una pipeta Pasteur por muestra.
5. A la fracción residual sólida se le agrega 2 ml de una mezcla metanol:cloroformo (2:1) y agitar en vortex.
6. Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos a 5°C.
7. Separar la solución y almacenarla junto con la obtenida en el punto 4.
8. Agregar a la fracción sólida 3 ml de la mezcla metanol: cloroformo (2:1) y agitar en vortex.

9. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min a 5°C.
10. Separar la solución y reunirla con las obtenidas en los puntos 4 y 7. La fracción sólida guardarla bajo refrigeración en caso de que vaya a ser utilizada para otros análisis.
11. Al tubo que contiene la solución extractora con los lípidos extraídos se le agrega agua destilada en aproximadamente 1/3 de su volumen (equivale a aproximadamente 2 ml). Agitar en vortex.
12. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.
13. Separar la fracción de cloroformo-lípidos (capa inferior) con la ayuda de una pipeta Pasteur y colocarla en un tubo de ensayo con rosca (No. 99447).
NOTA: Utilizar una pipeta Pasteur por muestra y diferente a la utilizada en los pasos anteriores.
NOTA: Tener mucho cuidado de no co-extraer solución metanol-agua. Esto se logra introduciendo la pipeta y a la vez expulsando aire de la misma lo que ocasiona un pequeño burbujeo en la solución.
14. A la solución superior (metanol-agua) se le añade 2 ml de cloroformo y se agita en vortex.
15. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.
16. Separar la capa inferior (cloroformo-lípidos) y reunir esta solución con la extraída en el punto 13.
NOTA: Utilizar una pipeta Pasteur por muestra y diferente a la utilizada en los pasos anteriores.
17. Agregar 3 ml de cloroformo a la solución residual. Agitar en vortex.
18. Centrifugar a 2500 rpm por 10 min.
19. Separar capa inferior y reunirla con las obtenidas en los puntos 13 y 16.
20. Colocar la solución total de cloroformo-lípidos en un matraz balón de rotavapor y evaporar al máximo el cloroformo.
21. Una vez concentrados los lípidos, recuperarlos con un poco de cloroformo y colocarlos en viales.
NOTA: Los viales deben de estar previamente secos y pesados.
22. Evaporar el cloroformo restante con una corriente de nitrógeno.
NOTA: Tener cuidado que la corriente de nitrógeno no produzca un burbujeo que provoque la pérdida de muestra.
23. Secar en estufa a 70° C por 12 h.
24. Estabilizar a temperatura ambiente en desecador por 1 h.
25. Pesar y por diferencia de peso calcular el porcentaje de lípidos totales de la muestra seca.

$$\text{Lípidos totales (LT)} = \frac{\text{Peso lípidos recuperados (g)}}{\text{Peso de muestra antes de extracción (g)}} * 100$$

9. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS TOTALES (Dreywood, R., 1946)

Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry (Analytical Edition)*, 18:499-505.

La mayoría de los carbohidratos reaccionan, pero en las condiciones más estudiadas la reacción es casi exclusiva para hexosas. Todos los polisacáridos pueden reaccionar dada la fuerza del ácido usado. Al igual que los otros métodos de condensación, las condiciones de calentamiento y enfriamiento deben ser perfectamente controladas y se deben preparar blancos y estándares en la misma "corrida".

Reactivos:

Reactivo de antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno):
Acido sulfúrico concentrado
HCl 2N
Glucosa
Agua destilada

Preparación de soluciones

Pesar 0.050 g del reactivo de antrona y diluir en 25 ml de ácido sulfúrico concentrado. Trabajar bajo campana de extracción.

Materiales y equipo

Tubos de ensaye con rosca (No. 99447)
Baño María
Celdas para espectrofotómetro
Espectrofotómetro
Agitador Vortex
Micropipetas
Campana de extracción

Hidrólisis de muestra

0.1 g muestra
3 ml HCl 2N durante 60 min. a 100°C en baño maría

Dilución de muestras

Se recomienda el siguiente procedimiento, pero la dilución de estas muestras, esta en función de su contenido en carbohidratos.

- Tomar 6 µl de la muestra hidrolizada
- Agregar 994 µl de agua destilada

Procedimiento

1. Tomar 1 ml de muestra diluida y colocarla en tubos de ensaye con tapón de rosca.

NOTA: Por cada corrida se tiene que incluir un blanco de agua destilada sin muestra.

2. Añadir 2 ml de la solución de Antrona. Tapar los tubos y agitar.

NOTA: Trabajar bajo campana de extracción y utilizando guantes de nitrilo.

3. Enfriar los tubos en hielo.

4. Calentar los tubos a baño María a 80° C por 15 minutos.

5. Enfriar los tubos en baño con hielo.

6. Leer absorbancia a 630 nm utilizando agua destilada como blanco.

NOTA: Colocar la solución residual (reactivos) en su contenedor respectivo.

Preparación de solución estándar

a) Pesar 15 mg de glucosa.

b) Diluir en 80 ml de agua destilada, una vez disuelta aforar a 100 ml en un matraz aforado. La concentración de glucosa en la solución es de 150 µg/ml.

c) Utilizando la tabla A, preparar las soluciones de concentración conocida de la siguiente manera:

- Con una micropipeta, agregar el volumen indicado de agua destilada y de la solución estándar de glucosa en un tubo de ensaye de tapón de rosca.

d) Una vez preparadas las soluciones de diferente concentración, seguir el procedimiento indicado.

Tabla A. Preparación de solución estándar

Solución estándar de glucosa (ml)	Agua Destilada (ml)	Concentración (µg/ml)
0	1	0
0.1	0.9	15
0.2	0.8	30
0.3	0.7	45
0.4	0.6	60
0.5	0.5	75
0.6	0.4	90
0.7	0.3	105
0.8	0.2	120
0.9	0.1	135
1	0	150

Graficar en el eje de las X la concentración utilizada, y en el eje de las Y la absorbancia registrada. Ajustar la curva por la técnica de mínimos cuadrados y calcular la pendiente (a), la ordenada al

origen (b) y el coeficiente de correlación (r). Sustituir estos valores en la fórmula de la recta ($Y = a + bX$) y calcular para cada valor dado de la absorbancia, su concentración correspondiente.

Método Desarrollado por el CSIRO para Medir la Digestibilidad en langosta *P. ornatus*

S.J. Tabrett*, S.J. Irvin, D.M. Smith, K.C. Williams

CSIRO Marine & Atmospheric Research, PO Box 120, Cleveland Q. 4163, Australia. Phone number +61 7 3826 7240, Facsimile +61 7 3826 7222. E-mail: Simon.Tabrett@csiro.au

Traducido por: Mireya Tapia-Salazar, Denis Ricque-Marie, Lucia E. Cruz-Suárez, Martha Nieto López.

Introducción

En todas las variedades de acuicultura intensiva, el alimento y la alimentación constituyen generalmente los mayores costos de operación del manejo de la granja. El tipo de ingredientes usados en la formulación y la especificación de los nutrientes del alimento tienen un efecto significativo en su costo final. Igualmente importante, sin embargo, es la necesidad de formular en términos de nutrientes digestibles en lugar de brutos y de considerar ingredientes alternativos sobre la base de su costo comparativo en el suministro de nutrientes digestibles (Wee, 1992; Kaushik, 1995; Allan *et al.*, 2000). La determinación de la digestibilidad aparente de un ingrediente es un requisito crítico cuando se requiere formular alimentos rentables.

El comportamiento alimenticio de la langosta espinosa tropical (o langosta tropical de roca) *Panulirus ornatus* es muy diferente del camarón, y esto ha influenciado la formulación del alimento y del método que utilizamos para determinar digestibilidad. También se ha encontrado que es impráctico coleccionar muestras fecales de estas langostas usando métodos clásicos de sedimentación y por eso Irvin y Tabret (2005) desarrollaron un nuevo método para eliminar este problema. En este documento describiremos los protocolos que utilizamos para superar el problema de las langostas para ingerir alimento peletizado y los métodos empleados en la colecta de heces para la determinación de la digestibilidad. Finalmente, describiremos los detalles del protocolo empleado para medir la digestibilidad en *P. ornatus*.

Comportamiento alimenticio de *P. ornatus*

El comportamiento alimenticio de *P. ornatus*, en tanques, tiene un impacto considerable en el protocolo desarrollado para medir la digestibilidad con esta especie. La langosta requiere de un alimento rico en atractantes y otros estimulantes alimenticios. Sin estos estimulantes, el consumo de alimento es muy bajo y por lo tanto, tales alimentos poseen poco valor práctico en experimentos de alimentación o de digestibilidad (Smith *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2005). Incluso con alimentos que contienen altos niveles de inclusión de atractantes, puede requerirse de varias semanas antes de que las langostas, recientemente capturadas del medio natural o alimentada previamente con alimentos naturales frescos, se adapten y acepten cantidades suficientes de alimentos secos para permitir determinaciones de digestibilidad. Este proceso de adaptación, implica el alimentar las langostas inicialmente con una combinación de mejillón fresco y de un alimento peletizado con un alto valor nutricional, formulado para camarón japonés (*Penaeus japonicus*). Durante 1 a 2 semanas, la cantidad de alimento peletizado proporcionado se incrementa en sustitución del mejillón fresco. Una vez acondicionadas al alimento para camarón japonés, las langostas pueden ser alimentadas con las dietas experimentales, aunque la ingestión del alimento inicialmente puede ser baja. *P. ornatus* son también consumidores inconsistentes: en algunas ocasiones tomarán el alimento tan pronto como este es colocado en el tanque, mientras que en otras ocasiones no consumirán el alimento por un periodo de tiempo de 24 horas o más. Sin embargo, hemos observado que las

langostas producen heces aunque no hayan ingerido alimento durante 12 h previas. Otro rasgo del comportamiento es que las langostas rompen a veces el alimento sin consumirlo aparentemente. Esto impide la cuantificación exacta del alimento consumido y, por lo tanto, impide el uso del método gravimétrico para determinar digestibilidad aparente.

Colecta de las heces

La determinación exacta de la digestibilidad aparente se basa en la colección de las heces antes de que ocurran cambios en la composición de los nutrientes debido a la pérdida por lixiviación o fragmentación. En la mayoría de los crustáceos decápodos, el material fecal sale del animal empacado en una membrana peritrófica y en forma de filamentos fecales (Dall y Moriarty, 1983). Esta característica ha permitido determinar la digestibilidad aparente en camarón usando los métodos de sedimentación para la colecta de heces (Smith y Tabrett, 2004). Sin embargo, los métodos de sedimentación no son efectivos para colectar heces de *P. ornatus*. Esta especie tiene una membrana peritrófica frágil y poco desarrollada, y consecuentemente, las heces son dispersadas en el agua tan pronto como son expulsadas por la langosta. Este problema fue superado con el desarrollo de un nuevo método de colecta de heces con un globo (Irvin y Tabrett, 2005).

En este método, un anillo de plástico es pegado alrededor del ano de la langosta y colocando un globo pequeño en el anillo para proporcionar un recipiente hermético de colección para las heces emitidas. El anillo es fabricado perforando un agujero de 10 milímetros a través del centro de la tapa de un tubo de plástico Eppendorf de 2 ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El anillo es pegado sobre el integumento suave alrededor del orificio anal de la langosta usando pegamento cianocrilato (Foto 1. La tapa es posicionada de tal manera que permite colocar el agujero perforado en la abertura anal (Foto 2). Un globo pequeño de látex (longitud 50 milímetros) es colocado sobre el anillo, proporcionando un sello hermético al agua (Foto 3), para contener las heces emitidas.

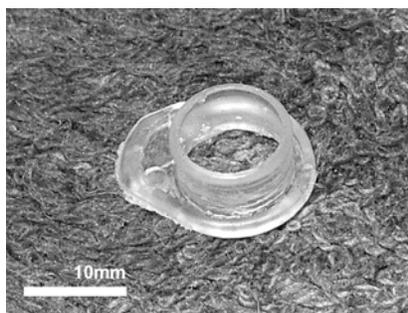


Foto 1. Anillo fabricado a partir de la tapa de un tubo Eppendorf de 2 ml.

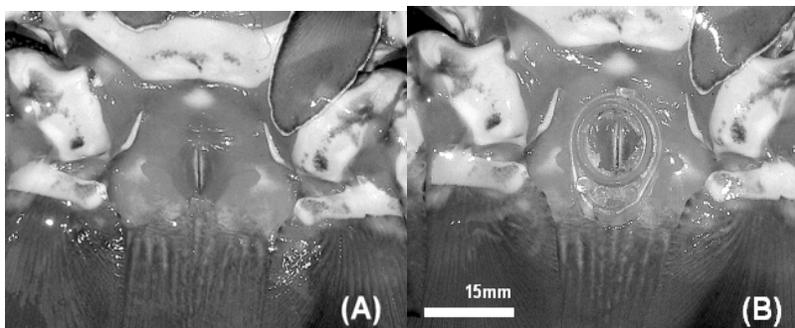


Foto 2. Orificio anal de la langosta sin (A) o con el anillo instalado (B).

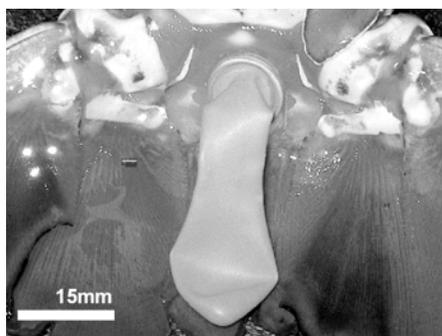


Foto 3. Langosta con el globo de látex colocado para la colección de heces.

Al momento de instalar el anillo, la langosta es removida del tanque y cubierta con una toalla húmeda. La langosta es inmovilizada con su superficie dorsal contra un tablero con una correa de Velcro® de 70 milímetros de ancho. Las patas y las antenuelas de la langosta son empujadas hacia delante y sujetadas con una mano sobre el cefalotórax. El abdomen se estira hacia fuera y se asegura firmemente con la correa de Velcro®, reduciendo el movimiento y el riesgo de daño tanto para el animal como para la persona. La toalla es reposicionada para asegurar que el cefalotórax esta completamente cubierto eliminando la luz y dejando los últimos segmentos abdominales y la cola expuestos a un ventilador. Esto ayuda a mantener la langosta tranquila durante el resto de la manipulación. Con el animal sujetado por una persona, una segunda persona puede secar el área anal, pegar el anillo en su lugar y colocar el globo.

Para recoger las heces, la langosta se captura justo después la alimentación. Es sujeta como se menciona anteriormente y el globo se quita del anillo. Se usa una espátula para transferir cualquier hece que permaneciera dentro del anillo a un frasco de cristal. El material fecal que se encuentra dentro del globo se exprime para transferirlo directamente al frasco de cristal. Después se coloca un nuevo globo en el anillo y la langosta es devuelta al tanque. Este globo se deja en el lugar hasta después de la siguiente alimentación.

Para mantener la integridad de la muestra fecal, cualquier colección que se contamine con agua es desechada. Esto puede ocurrir cuando el anillo o el globo se despegan o cuando se presenta una fuga entre el integumento y el anillo. Un número pequeño de animales se vuelven expertos en removerse el anillo y/o el globo, por medio de golpes esporádicos, tallado o masticación. Estas langostas son sustituidas por otros animales más tolerantes.

Si el período de la colección se prolonga por más de un mes, existe un riesgo de necrosis, lesiones de melanización alrededor del ano, del telson y de los urópodos de algunos animales. Esto es particularmente evidente con aquellas langostas que frecuentemente se remueven el anillo de

plástico, la cual, se les repega varias veces sobre el exoesqueleto. Cuando las langostas presentan daños se les deja recuperarse, todos los rastros de estas lesiones desaparecen después de la segunda o tercera muda.

Método para determinar digestibilidad

Las técnicas que empleamos cuando determinamos digestibilidad en el alimento entero o en ingredientes son exactamente iguales (Smith *et al.*, 2005). Utilizamos el método indirecto del marcador para medir la digestibilidad aparente y el acetato de iterbio (o el óxido crómico) como marcador inerte. El protocolo adoptado es el resultado de una serie de experimentos que realizamos para comprender los factores que influyen la exactitud de las estimaciones de digestibilidad en el camarón (Smith y Tabrett, 2004).

En experimentos de digestibilidad utilizamos langostas sub-adultas de alrededor de 600 g de peso. En cada experimento, 25 langostas que han sido entrenadas para aceptar alimento peletizado son colocadas individualmente en tanques circulares de polietileno de 100 L (600 mm de ancho × 450 mm de alto). Esto nos permite determinar la digestibilidad aparente de 5 dietas, cada una con cinco replicados. Cada tanque es provisto de agua marina filtrada (20 µm) a 29 ° C a una tasa de 0.5 L/min. Los tanques son equipados con aireadores individuales con el fin de mantener la aireación.

Las langostas son aclimatadas a las condiciones experimentales y a las dietas experimentales por un periodo mínimo de 7 días. Durante los periodos de aclimatación y de colecta, las langostas son alimentadas por 30 minutos, dos veces al día (0800 y 1500 h), iniciando la alimentación en los diferentes tanques secuencialmente a intervalos de un minuto. Después de cada periodo de alimentación, cualquier alimento no consumido es removido por sifoneo. Las heces son colectadas dos veces al día para reducir el manejo de los animales. Esto es realizado casi inmediatamente después de alimentar. Esto ha demostrado reducir el impacto del manejo sobre el consumo de alimento, ya que permite un tiempo de recuperación suficiente antes de que el alimento sea ofrecido de nueva cuenta. En nuestros experimentos con esta especie, el manejo frecuente de las langostas necesario para la colecta de heces parece no afectar el consumo de alimento. Además, el alimentar más de dos veces, parece no incrementar de manera significativa el consumo de alimento por las langostas. Si la langosta muda durante el experimento, el viejo exoesqueleto (exuvia) es removido y el tanque limpiado. Las heces no son colectadas de este tanque por 48 a 72 horas, permitiendo que el exoesqueleto se endurezca y que la actividad de alimentación vuelva a la normalidad. Las heces son colectadas de esta manera durante 15 a 25 días, es decir hasta obtener de cada langosta la cantidad de material necesario para los análisis químicos previstos (generalmente 2 g en base seca). Entre colectas, las heces son congeladas y almacenadas a -20 °C, antes de ser liofilizadas y molidas finamente para los análisis químicos.

Dietas para langosta

La formulación de las dietas para la langosta espinosa tropical todavía se está desarrollando (Smith *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha encontrado que el proporcionar un amplio rango de atractantes eficaces y estimulantes alimenticios en la formulación es crítico para que las langostas acepten fácilmente el alimento peletizado. Las dietas usadas en estudios anteriores han incluido hidrolizados de krill, homogenizados de: gusanos rojos *Marphysa sanguinea* y harina de krill. Estos ingredientes son costosos y el gusano rojo no es un ingrediente práctico para alimentos comerciales. Por lo tanto, estamos constantemente refinando la mezcla de ingredientes atractantes que se incluyen en las

dietas, para utilizar solamente aquellos ingredientes que estén disponibles comercialmente, pero que no disminuyen la aceptación de las dietas por la langosta.

Cuando determinamos la digestibilidad de un ingrediente, el ingrediente a probar es generalmente sustituido a una cierta proporción de la dieta de referencia la cual proporciona una fuente adecuada de vitaminas y de micronutrientes. En general, se emplea una sustitución del 50% para ingredientes proteicos de alta calidad, pero puede reducirse hasta un 30% para ingredientes de baja calidad o cuando los niveles de incorporación dan como resultado una gran alteración del perfil de nutrientes en la dieta substituida. La formulación de nuestra dieta de referencia para la langosta espinosa es dinámica a medida que experimentamos con diversas combinaciones de ingredientes para hacerla más atractiva para las langostas y que comprendamos mejor los requerimientos nutricionales de esta especie. Sin embargo, la dieta de referencia que se utiliza actualmente se formula para proporcionar nuestras mejores estimaciones de los requerimientos de la langosta para micronutrientes, incluso cuando es diluida por una inclusión del 50% del ingrediente a prueba (Tabla 1). Debido a que las langostas tienen que ser alimentadas con la dieta de referencia y las dietas experimentales por un largo período en un experimento de digestibilidad, nos aseguramos que las dietas estén adecuadas nutricionalmente y gracias a una ligera sobre-dosificación en la dieta de referencia, considerando la composición nutricional y la tasa de sustitución planeada del ingrediente a probar.

Tabla 1 Dieta de referencia empleada en experimentos de digestibilidad para ingredientes en *Panulirus ornatus*

Ingredientes	Nivel de inclusión (g/kg ⁻¹ base húmeda)
Harina de pescado (Prime, 68% PC)	240
Harina de krill	240
Harina de calamar	90
Harina de mejillon (Nueva Zelanda)	90
Hidrolizado de krill	60
Harina de trigo	120
Gluten (trigo)	100
Lecitina (soya, 70%)	18
Colesterol	5
Astaxantina (Carophyll pink, 8%)	10
Cloruro de colina (50%)	2
Vitamina C (Stay-C)	2
Premezcla de vitaminas ¹	14
Premezcla de minerales ²	6
Anti-oxidante (Banox E)	2.5
Acetato de iterbio tetrahidratado	0.5

¹Proporcionado en la dieta final (mg kg⁻¹): Retinol (A), 2.5; ácido ascórbico (C), como ascorbil-2-polifosfato, 140; colecalciferol (D₃), 0.04; menadiona (K₃), 14.0; d/l α-tocoferol (E), 280; colina, 700; inositol, 140; tiamina (B₁), 21; riboflavina (B₂), 28; piridoxina (B₆), 21; ácido pantoténico, 70; ácido nicotínico, 105; biotina, 0.7; cianocobalamina (B₁₂), 0.07; ácido fólico, 7; y etoxiquin, 210.

²Proporcionado en la dieta final (mg kg⁻¹): Co (as CoCl₂·6H₂O), 0.6; Cu (as CuSO₄·5H₂O), 6; Fe (as FeSO₄·7H₂O), 48; I (as KI), 4; Cr (as KCr₂SO₄), 0.6; Mg (as MgSO₄·7H₂O), 180; Mn (as MnSO₄·H₂O), 30; Se (as NaSeO₃), 0.12; y Zn (as ZnSO₄·7H₂O), 120.

Ahora utilizamos el acetato del iterbio como marcador de digestibilidad para todos los ingredientes con excepción de fuentes puras de lípidos donde empleamos el colestano liposoluble como la mejor opción de marcador. El acetato de iterbio y el colestano son usados a un nivel de inclusión del 0.05%. Esta opción del marcador se basa en la eficacia del iterbio como marcador (Smith y Tabrett, 2004), y la facilidad y el costo de su análisis. El óxido de cromo da resultados similares al acetato del iterbio y aparece ser igualmente eficaz como marcador de digestibilidad (CSIRO, datos inéditos). Sin

embargo, con nuestro método de análisis, la señal dada por uno o más compuestos coincide con la del cromo, haciendo difícil una cuantificación exacta.

Preparación de la dieta

Los ingredientes secos para las dietas experimentales son molidos empleando un molino micro pulverizador (modelo 1-SH, Mikro-Pulverizer, NJ, USA) con una abertura de malla de 0.013", que produce generalmente partículas menor a 500 μm . Sin embargo, algunos ingredientes son difíciles de moler, particularmente, aquellos con una alta proporción de grasas. El molido excesivo de un material resistente puede dar lugar a daño por calor o pérdida de grasa, lo cual, podría tener un mayor efecto en la estimación de la digestibilidad en vez del tamaño de la partícula *per se*. Con este tipo de ingredientes, como un mínimo estándar, nos aseguramos que todos los materiales pasen a través de una malla de 710 μm . Una muestra representativa de cada ingrediente es empleada en las dietas.

Al preparar las dietas, todos los ingredientes secos se mezclan juntos por 10 minutos usando una batidora doméstica. El aceite puede ser agregado en esta etapa y mezclado por cinco minutos más. El acetato de iterbio tetrahidratado ($\text{YbAc}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) es disuelto en un volumen pequeño de agua destilada (alrededor de 25 mL para 0.5g $\text{YbAc}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y rociada en la mezcla con un atomizador mientras que se mezcla.

La mezcla de ingredientes es mezclada por 10 minutos más, antes de adicionar suficiente agua para formar una pasta que contenga una humedad de 40 a 45%. Esta pasta es extruida dos veces a través de un molino de carne Hobart (Hobart Corporation, Troy, OH, USA) con un dado de 3 mm de abertura, para formar espaguetis. Los espaguetis son secados en una estufa ventilada a 40° C, y después remolidos usando un molino con chaqueta de agua (Knifetec simple mill Tecator, modelo 1095) a un tamaño de malla de 710 μm . El alimento molido se mezcla por 5 minutos en la mezcladora antes de adicionar agua para formar una pasta. La pasta es otra vez extruida dos veces a través del molino de carne Hobart, repartido en charolas de malla y cocido a vapor por 5 minutos en una vaporera comercial. El vapor activa el gluten del trigo y gelatiniza el almidón para aglutinar la dieta. Los espaguetis son otra vez secados a 40 ° C antes de ser cortados en pellets de 5 a 10 mm y almacenados a -20° C hasta su utilización.

Este método se ha adoptado para asegurarse de que todos los ingredientes y marcadores están distribuidos uniformemente en la dieta (Smith y Tabrett, 2004). El remoler la dieta sin aglutinar ayuda a reducir el tamaño de partícula de los ingredientes más difíciles de moler.

Cálculos

La digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), digestibilidad aparente de la proteína cruda (DAPC) y digestibilidad aparente de la energía (DAE) son calculadas para los alimentos, dietas de referencia y dietas prueba empleando la ecuación:

$$\text{DA (\%)} = 100 * \left\{ 1 - \left(\frac{\text{M}_{\text{ai}} * \text{A}_{\text{h}}}{\text{M}_{\text{h}} * \text{A}_{\text{ai}}} \right) \right\}$$

Donde:

Mai y Mh es la concentración (en base seca) del marcador en el alimento ingerido y en las heces, respectivamente.

A_{ai} y A_h son las concentraciones (en base seca) del nutriente (o analito) en el alimento ingerido y en las heces, respectivamente.

La DAMS, DAPC y DAE de los ingredientes a evaluar es calculada usando la digestibilidad respectiva de la dieta a probar y de la dieta de referencia en la ecuación descrita por Pfeffer *et al.* (1995):

$$DA_{NI} = \frac{1}{\alpha} [DA_{NDP} - (1 - \alpha) DA_{NDR}]$$

Donde:

DA_{NI} , DA_{NDP} y DA_{NDR} : Digestibilidad aparente del nutriente en el ingrediente, en la dieta a prueba y en la dieta de referencia, respectivamente.

α : Proporción del nutriente en la dieta a prueba que es suministrada por el ingrediente a prueba.

Análisis químicos

Las muestras de alimentos, heces e ingredientes finalmente molidos son analizadas por duplicado empleando métodos estándares de laboratorio esencialmente de acuerdo con las recomendaciones de la AOAC Internacional (1999). La materia seca es determinada por secado en horno a 105 °C a peso constante, generalmente por 4 h; la ceniza por ignición a 600 °C por 2 h; el nitrógeno total (N total) usando cualquiera de las dos técnicas: (1) por la técnica de macro-Kjeldahl en un analizador automático Kjell Foss modelo 16210 (A/S N; Foss Electric, Hillerød, Dinamarca) usando el mercurio en la digestión; (2) por el método de azul de indofenol, siguiendo una digestión Kjeldahl a base de ácido sulfúrico. La proteína cruda es calculada multiplicando el N total por 6.25, independientemente de la naturaleza del nitrógeno. La energía gruesa (EG) es determinada con una bomba calorimétrica isotérmica Leco AC 200 controlada por un microprocesador (Leco Corp., St Joseph, MI, USA). La composición de aminoácidos es determinada por cromatografía de intercambio iónico usando una HPLC Waters, siguiendo una hidrólisis de las muestras con HCl 6M a 110 °C bajo una atmósfera de N₂ por 18 horas. La cisteína es medida como ácido cisteico y la metionina como metionin sulfona después de realizar una oxidación en ácido per fórmico por separado.

El iterbio (Yb) es analizado por espectrofotometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES). Las dietas y heces son digeridas en una mezcla de ácidos nítrico y perclórico. Esta digestión es realizada en tubos de ensayo abiertos y terminada a 250 °C. Esto da como resultado la ruptura del material orgánico y la disolución del Yb, y otros elementos. Después de enfriar, la muestra digerida es aforada con agua de-ionizada, resultando una concentración de ácido perclórico en la solución de 5%. La concentración de Yb en la solución resultante es determinada usando un ICP-AES modelo Vista Pro Axial de la marca Varian.

Conclusión

El método que se utiliza para medir digestibilidad con *P. ornatus* ha sido adaptado a su comportamiento alimenticio y a la inestabilidad natural de sus heces. El método del globo para la colección de heces proporciona una muestra excelente que no está contaminada con agua marina y que no sufre pérdida de nutrientes por lixiviación. Las principales desventajas del método es el trabajo invertido en el implante del globo y la recuperación de las heces así como la aparición de necrosis en el exoesqueleto después de un período prolongado de implante del anillo de plástico. Sin

embargo, éstas no son problemas serios y el método desarrollado es tolerado por la mayoría de las langostas y ha dado excelentes resultados de digestibilidad.

Referencias

- Allan, G.L., Parkinson, S., Booth, M.A., Stone, D.A.J., Rowland, S.J., Frances, J., Warner-Smith, R., 2000. Replacement of fishmeal in diets for Australian silver perch, *Bidyanus bidyanus*: I. Digestibility of alternative ingredients. *Aquaculture* 186, 293-310.
- AOAC International (1999) Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Dall, W., Moriarty, D.J.W., 1983. Nutrition and digestion. In *The Biology of Crustacea*, Vol. 8, Internal anatomy and Physiological Regulation (ed. D. E. Bliss), pp.215-261. New York: Academic Press.
- Irvin, S. J., Tabrett, S.J., 2005. A novel method of collecting fecal samples from spiny lobsters. *Aquaculture* 243, 269-273.
- Kaushik, S.J., 1995. Nutrient requirements, supply and utilization in the context of carp culture. *Aquaculture* 129, 225-241.
- Pfeffer, E., Kinzinger, S., Rodehutscord, M., 1995. Influence of the proportion of poultry slaughter by-products and of untreated or hydrothermally treated legume seeds in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), on apparent digestibilities of their energy and organic compounds, *Aquacult. Nutr.* 1, 111-117.
- Smith, D.M., Tabrett, S.J., 2004. Accurate measurement of *in vivo* digestibility of shrimp feeds. *Aquaculture* 232, 563-580.
- Smith, D.M., Williams, K.C., Irvin, S.J., 2005. Response of the tropical spiny lobster *Panulirus ornatus* to the protein content of pelleted feed and to a diet of mussel flesh. *Aquacult. Nutr.* 11, 209-217.
- Smith, D.M., Williams, K.C., Irvin, S., Barclay, M. and Tabrett, S., 2003. Development of a pelleted feed for juvenile tropical spiny lobster (*P. ornatus*): response to dietary protein and lipid. *Aquacult. Nutr.* 9, 231-237.
- Wee, K.L., Maguire, G.B., Hindrum, S.M., 1992. Methodology or digestibility studies with abalone. 1. Preliminary studies on the feeding and defaecatory behaviour of blacklip abalone, *Haliotis rubra*, fed natural and artificial diets. *Proc. Aquaculture Nutrition Workshop, Salamander Bay, 15-17 April 1991*. NSW Fisheries, Brackish Water Fish culture Research station, Salamander Bay, Australia, pp192-196.
- Williams, K.C., Smith, D.M., Irvin, S.J., Barclay M.C., Tabrett, S.J. 2005. Water immersion time reduces the preference of juvenile tropical spiny lobster *Panulirus ornatus* for pelleted dry feeds and fresh mussel. *Aquacult. Nutr.* In Press.

Camarón (*Litopenaeus vannamei*): Méritos de Estudios *in vitro* para Diseñar Métodos de Digestibilidad *in vivo*

Subramanian Divakaran, D.V.M., Ph.D.

¹Retired. Current address, 113 Wooddale, Euless, TX 76039, USA

E-mail: gramatophylum@comcast.net

Traducido por: Mireya Tapia-Salazar, Denis Ricque-Marie, Lucia E. Cruz-Suárez
y Martha G. Nieto-López

El objetivo de este estudio, es analizar las limitaciones de las mediciones de digestibilidad *in vivo* y discutir cómo los estudios de digestibilidad *in vivo* pueden mejorarse con conocimientos adquiridos a partir de estudios *in vitro*.

Los estudios de digestibilidad *in vivo* presentan varias limitaciones tales como: a) dificultad para medir el consumo exacto de alimento, b) dificultad para coleccionar heces no contaminadas, c) poca cantidad de heces para el análisis, d) cierta influencia de los marcadores tales como óxido crómico, e) problemática de la membrana peritrofica en el análisis de la proteína e f) incertidumbre sobre interacciones substrato-enzima.

Esta presentación examinará el trabajo publicado principalmente por el autor sobre la incertidumbre de las interacciones substrato-enzima y sobre cómo estudios de digestibilidad *in vitro* resaltan tales limitaciones. Aunque lo más importante de la discusión está centrado en el camarón *Litopenaeus vannamei* en particular, ejemplos en peces permiten ampliar la discusión sobre el rol de las enzimas en la digestión y cómo las enzimas definen el tipo de dieta que debieran ser dadas a los animales para una digestibilidad óptima.

La medición exacta del óxido crómico, el marcador inerte más comúnmente empleado en estudios de digestibilidad, es un paso importante para determinar la diferencia del contenido de óxido crómico en el alimento y en las heces. La ceniza del alimento o de la muestra fecal es empleada en un método colorimétrico usando difenilcarbazida como el cromógeno, después de oxidar dicha ceniza con ácido perclórico, lo que permite convertir el óxido crómico en un ion dicromato hexavalente. Este procedimiento ha sido reportado como muy preciso cuando se compara con otros métodos tal como la oxidación con molibdato o la cuantificación directa del ion dicromato hexavalente por espectrofotometría de absorción (Divakaran *et al.*, 2002). Un estudio discriminatorio, sobre la digestibilidad aparente de la pasta de soya empleando dos niveles de pasta de soya y 0.5 y 1.0% de óxido crómico, mostró que los coeficientes de digestibilidad aparente fueron generalmente más elevados para las dietas que contenían óxido crómico al 1% que para 0.5%, pero la magnitud de la diferencia fue diferente para los dos niveles de sustitución de la pasta de soya (Divakaran *et al.*, 2000).

Volviendo al papel de las enzimas en la determinación de digestibilidad *in vivo*, los estudios del equipo enzimático *in vitro* permiten indicar el alimento que podría de ser ideal para el organismo. Por ejemplo, en el dorado *Coryphaena hippurus* (Mahimahi) considerado como altamente carnívoro, se encontró, a través de análisis *in vitro* de sus enzimas pancreáticas, que esta especie cuenta con una gran variedad de enzimas amilolíticas y por lo tanto puede adaptarse a una variedad de ingredientes que contengan carbohidratos (Divakaran y Ostrowski, 1990). En un segundo estudio de digestibilidad enzimática *in vitro*, en juveniles de *Polydactylus sexfilis* (Pacific threadfin) y *Carnax melamphygus*

(Pacific threadfin), se demostró, en base a los perfiles de enzimas digestivas, que *P. sexfilis* podría requerir un mayor contenido proteínico en la dieta, mientras que *C. melamphygus* puede tolerar dietas bajas en proteína, con grasas y carbohidratos como fuente de energía (Divakaran *et al.*, 1999). Continuando con el estudio de digestibilidad *in vitro* en larvas de estas dos especies, se observó que la utilización de carbohidratos puede jugar un papel importante en las etapas larvales marinas, con un cambio posterior hacia la utilización de proteínas y grasas (Kim *et al.*, 2001).

Extensos estudios se han llevado a cabo para examinar las ventajas de la adición de enzimas a las dietas con el fin de promover la digestión. La inclusión de fitasas a los alimentos como una alternativa rentable a la inclusión de fósforo inorgánico en producciones intensivas de ganado ha sido investigada y se ha encontrado algunos beneficios para estas especies (Campbell y Bedford, 1992). No obstante, investigando la interacción de la fitasa en extractos de hepatopáncreas de camarón (*L. vannamei*) en estudios *in vitro*, se demostró, que la adición de fitasa causó una inhibición de la actividad de la enzima amilasa, aunque un efecto aditivo fue observado con las enzimas proteolíticas sobre la liberación de fósforo a partir de los fitatos (Divakaran y Ostrowski, 1998). En un estudio *in vivo*, la adición de enzimas proteolíticas termoestables a dietas para camarón no mejoró la digestibilidad de la proteína, muy probablemente debido al poco tiempo de residencia del alimento en el intestino del camarón (Divakaran y Velasco, 1999).

Los estudios de digestibilidad *in vitro* podrían ser mucho más complejos si se considerara la capacidad del camarón en producir enzimas digestivas en respuesta a la dieta consumida y al medio ambiente en que esta cultivado. En un estudio se encontró que el camarón produce laminarinasa, una enzima que digiere carbohidratos, con una actividad específica casi seis veces más alta cuando es cultivado bajo condiciones eutróficas en estanques sobrecargados con algas, en comparación con camarones cultivados bajo condiciones oligotróficas con agua clara (Divakaran y Moss, 2004). Esto es una indicación clara de que las mediciones de digestibilidad en camarón varían forzosamente con las condiciones bajo las cuales el camarón es cultivado.

Los estudios *in vivo* podrían ser mucho más completos, si se considerara la adaptación de la actividad específica de las enzimas secretadas por el hepatopáncreas. Al alimentar camarones *L. vannamei* con seis diferentes dietas de composición proximal similar, pero variando la composición de los ingredientes se demostró claramente que la actividad específica de las enzimas se adaptaba a los constituyentes de la dieta con una inspección *in vitro* de la actividad específica de las enzimas del hepatopáncreas (Divakaran *et al.*, 2004). Esto significa que se le debe dar al camarón el tiempo suficiente para adaptarse a la dieta antes de comenzar una prueba de digestibilidad *in vivo*.

En resumen, en base a los estudios *in vitro* mencionados, se identificaron las siguientes limitaciones para las pruebas de digestibilidad *in vivo*: a) una clara comprensión del tipo de ingredientes que el animal puede digerir dependiendo de su etapa de desarrollo, b) interferencia de los inhibidores, c) condiciones de cultivo tales como ambientes oligotróficos o eutróficas pueden alterar la actividad específica de la enzima y d) la adaptación a los ingredientes de la dieta, lo que podría alterar el tiempo de aclimatación necesario a los ingredientes antes de iniciar un estudio *in vivo*. Otros factores, tales como el valor de pKa (pH) de la dieta, así como temperatura y salinidad, podrían ser también considerados.

La mayoría de los cultivos de camarón alrededor del mundo se hacen bajo condiciones eutróficas y por lo tanto es importante que los estudios de digestibilidad estén hechos bajo tales condiciones de

cultivo. Tal estudio es prácticamente imposible bajo métodos actuales utilizados para estudios de digestibilidad. Los métodos que emplean isótopos de ^{13}C merecen atención. Se requiere más investigación para desarrollar métodos alternativos que empleen equipo menos sofisticado para hacer análisis de isótopos de ^{13}C .

Referencias

- Campbell, G.G.L., Bedford, M. R., 1992. Enzyme application in monogastric feeds. A review. *Can. J. Animal Sci.* 7,449-466.
- Divakaran, S., Ostrowski, A.C., 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. *J. W. A. S.* 21,35-40.
- Divakaran, S., Ostrowski, A.C., 1998. *In vitro* studies on the interaction of phytase with trypsin and amylase extracted from shrimp (*Penaeus vannamei*) hepatopancreas. *J. Agric. Food Chem.* 46,4973-4976.
- Divakaran, S., Kim, B.G., Ostrowski, A.C., 1999. Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* (Bloch and Schneider 1801) and bluefin trevally *Carnax melamphygus* (Cuvier 1833). *Aquaculture Research* 30,781-787.
- Divakaran, S., Velasco, M., 1999. Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 30, 335-339.
- Divakaran, S., Velasco, M., Beyer, E., Foster, I.P., Tacon G.J., 2000. Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei* including a critique of methodology. In Cruz-Suarez, L.E. Ricque-Marie, D. Tapia-Salazar, M. Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo., (Eds) *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Symposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 19-22. Noviembre, 2000, Mérida, Yucatán, México. UANL editorial, Monterrey NL ISBN#970-694-52-9.
- Divakaran, S., Obaldo, L.G., Foster, I.P., 2002. Note on the methods for the determination of chromic oxide in shrimp feeds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 464-467.
- Divakaran, S., Moss, S.M., 2004. *In vitro* evidence of laminarinase activity in the digestive gland of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. W.A.S.* 35, 546-550.
- Divakaran, S., Forster, I. P., Velasco, M., 2004. Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of *in vitro* protein digestibility. *Aquaculture* 239, 323-329.
- Kim, B.G., Divakaran, S., Brown, C.L., Ostrowski, A.C., 2001. Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Carnax melamphygus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 225-241

Integración y Análisis Global de las Metodologías de Digestibilidad *in vivo* presentadas en este Libro

L. E. Cruz-Suárez, D. Ricque y M. Tapia-Salazar

Introducción

En este capítulo se presenta una integración y discusión de las metodologías de digestibilidad *in vivo* utilizadas o desarrolladas por los ocho grupos de Investigación. Los participantes en este libro son investigadores que provienen de diferentes países e instituciones del mundo CIBNor, CIAD, UANL (México), CENAIM (Ecuador), la UNMP (Argentina), CSIRO (Australia), TAMU y un investigador retirado (Estados Unidos) que están o que han trabajado sobre el tema de digestibilidad *in vivo* en crustáceos especialmente en *Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* y langosta.

Algunos grupos de investigación como el CSIRO han realizado investigaciones para desarrollar una metodología justificada y validada para asegurar la precisión de sus estimaciones de digestibilidad, buscando ante todo un método capaz de generar una cantidad de heces suficiente para realizar análisis químicos macros. Otros grupos han implementado metodologías considerando puntos críticos pero sin demostrar explícita y experimentalmente la definición de sus estrategias y sobre todo preocupándose en la adecuación de algunos análisis químicos a las micromuestras fecales colectadas en tiempos de experimentación cortos. Los ocho grupos de investigación han realizado estudios sobre digestibilidad de dietas experimentales formuladas con diferentes fines, usando el método indirecto con óxido de cromo y aglutinantes diferentes, en tanto que solo los grupos UANL y CIBNor mencionan haber determinado digestibilidad de alimentos comerciales reprocesándolos para incluir el óxido de cromo y el aglutinante. Por otro lado, cuatro instituciones (CSIRO, TAMU, CIBNor y UANL) reportan haber determinado digestibilidad de ingredientes combinando una dieta de referencia (sobre formulada o no) con el ingrediente prueba a diferentes niveles de inclusión (15, 30 y 50%) y diferentes niveles de óxido de cromo (0.05-1%). Los nutrientes comúnmente analizados en las ocho Instituciones son materia seca, proteína y energía. Solo algunos grupos de manera puntual han evaluado digestibilidad de lípidos y carbohidratos, colesterol y minerales, especialmente fósforo. Solo dos grupos mencionaron contar con estudios incipientes sobre digestibilidad de aminoácidos en ingredientes en esos momentos. Se encontró que el tamaño de los camarones usado en las ocho instituciones es muy variable (0.3 hasta 18g) así como las condiciones de cultivo manejadas en los bioensayos: 2 a 10 camarones por tanque, 3 a 6 replicados por tratamiento, 2 a 7 días de aclimatación al alimento, 2 a 8 colectas de heces por día por medio de un sifón, frecuencias y tiempo de colecta de heces muy variables (7 a 30 días). El número de ingredientes a los cuales estos grupos les han determinado digestibilidad varía según la institución, pero dominan los estudios en ingredientes proteicos de origen animal y vegetal. Aunque no se presenta una tabla resumen de estos resultados, cada institución menciona algunos al describir su metodología y/o adicionalmente enlista al final de su capítulo las publicaciones o proyectos desarrollados sobre el tema hasta la fecha del Taller. Cabe mencionar que después de esta reunión, en estos últimos 2 años, la mayoría de los grupos ha generado información nueva inclusive a nivel de digestibilidad de aminoácidos que recientemente ha sido publicada o que está en transcurso de publicación.

Aspectos relevantes sobre la elaboración de dietas experimentales

El proceso de fabricación de alimentos utilizada por los diferentes grupos de investigación es la extrusión húmeda usando un molino de carne, sin embargo existen puntos del proceso que son diferentes y que se podrían homogenizar.

Tamaño de partícula. Todos los grupos muelen los ingredientes antes de preparar los alimentos experimentales pero se usan partículas en un rango de 140 a 500 micras. Considerando que a menor tamaño de partícula es mejor la digestibilidad y el grado de gelatinización de los almidones, es importante que ese parámetro se estandarice. La mayoría de las plantas de alimentos muelen a 500 micras sus ingredientes, por lo tanto esta podría ser la medida adecuada para estandarizar. (Tabla 1)

Nivel y tipo de aglutinante. Los aglutinantes utilizados por los diferentes grupos de investigación son aglutinantes que funcionan bien con la extrusión húmeda en molino de carne (Tabla 2): gluten de trigo (6-12%), alginato (1-3%), grenetina (4-4.7%), almidón y harina de algas cafés. Existen pocos trabajos sobre el efecto de estos aglutinantes en la digestibilidad de los alimentos en camarón. Cruz-Suárez *et al.* (2006) reportan diferencias en un rango de 1 a 3% en la digestibilidad de alimentos aglutinados con 1% de alginato, 1 % de alginato+ 6% de harina de kelp y con 6% de gluten de trigo y también reportan un efecto negativo con el uso de alginato a niveles altos. El CIBNor reporta que al usar grenetina es necesario extrudir varias veces el alimento para que quede estable. Considerando lo anterior, desde el punto de vista comparativo podría generalizarse el uso del alginato al 1 o 1.5% como aglutinante en este tipo de estudios.

Marcador. Todos los grupos utilizan el método indirecto para determinar digestibilidad, usando óxido de cromo como marcador (Tabla 2). El CSIRO también a logrado aplicar correctamente el método directo (gravimétrico) y también ha usado iterbio (0.05%). El CSIRO y la UNMP dan elementos que muestran que el oxido de cromo es un marcador adecuado en camarón, el CSIRO demuestra que la distribución del oxido de cromo en las heces es heterogénea y que una estimación confiable de digestibilidad usando este marcador solo puede ser hecha cuando la mayoría de las heces es colectada. La mayoría de los grupos incluye el oxido de cromo en un 0.5 o en un 1%. El CSIRO es el único que usa un nivel de oxido de cromo muy bajo (0.05%) y por ello se preocupó en evaluar la distribución homogénea y uniforme del marcador en el alimento llegando a la conclusión de que tenían que reprocesar 2 veces su mezcla de ingredientes en el molino de carne para obtener una distribución uniforme en el alimento. Divakaran (2000) evaluó el efecto de inclusión de 0.5 o 1% de cromo sobre los valores de digestibilidad de pasta de soya y reporta una mayor digestibilidad con la mayor concentración de cromo, mientras que la UNMP reporta exactamente lo opuesto al evaluar la digestibilidad de alimentos con niveles crecientes de soya con niveles de 0.25 y 1% de oxido de cromo (Medina Martí *et al.*, 2005) El CIBNor y el CENAIM también reportan doble extrusión pero el objetivo es diferente, ya que ellos lo hacen para aumentar la estabilidad del alimento en el agua. Los otros grupos solo extruden una vez el alimento y aparentemente con niveles de inclusión de cromo usados (0.25 a 1%) no han contemplado la posibilidad de una mala homogenización.

Debido a la importancia que tiene la distribución homogénea del cromo en el alimento para obtener una buena determinación de digestibilidad, una condicionante para obtener resultados replicables debería ser el demostrar que se cumple con la condición de uniformidad en la distribución del oxido

de cromo en los alimentos. Por ello es recomendable que cada laboratorio realice pruebas de eficiencia de mezclado evaluando la concentración de óxido de cromo en diferentes submuestras de la mezcla de ingredientes y de producto terminado y que en base a ello defina las condiciones de mezclado, de procesado y la concentración de óxido de cromo que debe usar.

Pureza del cromo. A este respecto el CISRO cita una investigación en tilapia que menciona que las impurezas del óxido de cromo tienen efectos sobre los patrones de crecimiento, indicando que el óxido de cromo que usaron no era fisiológicamente inerte, por lo que recomienda el uso de óxido de cromo grado reactivo. Por otro lado, para poder usar cromo que no sea grado reactivo, la UANL propone un lavado del óxido de cromo para eliminar formas de cromo que generan color y que interfieren en el análisis colorimétrico usado para su cuantificación.

Medición exacta del contenido de óxido de cromo en alimentos y en heces

Existen varios métodos para analizar el óxido de cromo. El método usado por casi todos es el colorimétrico en sus diferentes versiones: Bolin (1952) modificado por Nieto, Furukawa y Tsukahara modificado por Olvera (1966), Maginnis y Karting (1964). Divakaran *et al.*, (2002) publicaron un artículo en donde comparan diferentes tipos de digestión y oxidación de la muestra para poder determinar el cromo en un método colorimétrico usando difenilcarbazida como cromógeno; la etapa preliminar de digestión permite convertir el óxido crómico (Cr_2O_3 inerte e insoluble en donde el cromo se encuentra en el grado de oxidación III) a ion dicromato soluble (cromo con grado de oxidación VI), el cual puede ser cuantificado con el método colorimétrico; concluyen que lo mejor es digerir la muestra a cenizas y después oxidar con ácido perclórico antes de la determinación colorimétrica. El CSIRO por su parte subcontrata determinaciones de óxido de cromo con el método de espectrofotometría de masas con plasma acoplado por inducción. El CIAD usa una digestión por microondas y espectrofotometría de absorción atómica por plasma. Se concluyó que todos los métodos son adecuados siempre y cuando estén perfectamente estandarizados y validados ya que el análisis químico del óxido de cromo es clave y determinante en los cálculos de la digestibilidad. También se remarco que el uso de micro métodos conlleva un riesgo de imprecisión que en lo posible debe evitarse. Divakaran resalta la necesidad de implementar técnicas con otros marcadores (isótopos) que permitan determinar la digestibilidad en estanques en presencia de producción natural para obtener valores con aplicaciones prácticas.

Métodos de Análisis químicos de nutrientes

Al respecto se concluyó que se debían usar métodos bien estandarizados y validados y que en la medida de lo posible habría que utilizar macro métodos, aunque esto obligue a coleccionar más heces.

Condiciones de cultivo y colecta de heces

Se encontró que el tamaño de los camarones usado en las instituciones participantes es muy variable (0.3 hasta 18g) así como las condiciones de cultivo manejadas en bioensayos: tamaño de acuarios, 2 a 10 camarones por tanque, 3 a 6 replicados por tratamiento, 2 a 7 días de aclimatación al alimento, 2 a 8 colectas de heces por día por medio de un sifón y tiempos y frecuencias de colecta de heces muy variables (7 a 30 días) (Tablas 3, 4 y 5). Aquí se discutió sobre la necesidad de implementar protocolos y métodos de colecta que permitieran disminuir al máximo la lixiviación de nutrientes en el alimento y en las heces, que eviten la contaminación de las heces con los alimentos

así como la colecta de heces producidas por camarones que hayan consumido mudas, o que hayan realizado coprofagia o canibalismo. Sobre el tiempo de aclimatación de los alimentos la UNMP reporta resultados en *L. stylirostris* que muestran incrementos significativos en la digestibilidad de carbohidratos al cabo de 7 días de adaptación a las dietas. Considerando que las colectas de heces diarias se acumulan hasta obtener la cantidad adecuada para análisis, la magnitud del tiempo de adaptación debería ser mayor mientras menos sea el tiempo de colecta acumulada, para que el resultado obtenido sea el promedio de valores donde ya se dio la adaptación. Sin embargo, podría ser interesante determinar el tiempo de mínimo de adaptación realizando cinéticas de composición de las heces al menos para la dieta de referencia.

El método de colecta de heces empleado por la mayoría de las Instituciones es el de sifoneo, y las muestras son lavadas con agua destilada después de su colecta (Tabla 5). Solo el CENAIM y el CSIRO centrifugan las muestras de heces para eliminar el exceso de agua. El CIBNor es la única Institución que menciona que seca en estufa en lugar de liofilizar las muestras de heces antes de su análisis (Tabla 6).

El peso de la muestra de heces a analizar varía de laboratorio a laboratorio así como el tipo de análisis (Tabla 7). Se hizo hincapié de que el tamaño de muestra a analizar no debe ser muy pequeño debido a que los errores analíticos podrían estar afectando ampliamente los resultados obtenidos y que antes de seleccionar el tamaño de muestra se deberá analizar la metodología empleada, así como los ajustes necesarios para poder minimizar los errores analíticos.

Lixiviación de nutrientes en heces

Mientras que la UNMP reporta que las concentraciones del óxido de cromo y de los nutrientes en las heces no se modifican con la estancia en el agua (15 min, 1 y 6h) gracias a la membrana peritrófica, el CSIRO muestra lo contrario (aumento en la concentración de cromo y disminución en la concentración de los nutrientes) y establece en su metodología que las heces no deben permanecer más de 3 horas en el agua para no sobreestimar las estimaciones de digestibilidad. La controversia en estos resultados se puede deber a la fórmula o la matriz usada en cada laboratorio, ya que es bien conocido que las propiedades fisicoquímicas de las heces cambian en función de las propiedades del alimento (Cruz-Suárez, 2006) y la inclusión de un ingrediente en un 50 o 30% a su vez puede modificar mucho las propiedades fisicoquímicas de un alimento, de tal manera que probablemente para cada dieta de referencia y para cada dieta con ingrediente prueba, habría que medir su estabilidad en el agua así como la estabilidad de las heces y en base a ello definir los tiempos máximos de colecta y de permanencia de heces en el agua, aunque lo ideal sería encontrar el mecanismo que elimine el contacto de las heces con el agua como lo logra el CSIRO con el método desarrollado para coleccionar heces en la langosta.

Estabilidad de los alimentos en el agua

El impacto de la lixiviación de nutrientes sobre la digestibilidad de la dieta ha sido estudiado por la UANL, el CIBNor y el CSIRO, siendo la UANL el único grupo que propone una corrección en el cálculo de la digestibilidad para considerar este factor. Los otros grupos piensan que el impacto no es muy fuerte porque el consumo del alimento es muy rápido (CSIRO) o que la corrección no vale la pena ya que consideran que el método para medir la estabilidad del alimento no reproduce fidedignamente a la lixiviación real causada por la manipulación de los animales (CIBNor) y por ello

no aplican ninguna corrección, no obstante, establecen como regla remover el alimento no consumido de los tanques después de 30 min (CSIRO) o solo medir la digestibilidad de alimentos que tenga una hidroestabilidad superior al 90% (CIBNor).

Con todo, el hecho de que en varias publicaciones se estén reportando coeficientes de digestibilidad aparente de algunas dietas, nutrientes o ingredientes superiores a 100% o cercanos a 100% (lo cual es erróneo) posiblemente podría explicarse por este fenómeno, tanto en el alimento como en las heces.

Digestibilidad de ingredientes

El CSIRO, TAMU, CIBNor y la UANL para determinar la digestibilidad de ingredientes, emplean el método de Cho y Slinger (1979) donde se mezcla o combina el ingrediente prueba con una dieta de referencia para calcular la digestibilidad del ingrediente a partir de la diferencia de digestibilidad entre las dos dietas.

Dietas de referencia y dietas prueba.

El CSIRO menciona que una dieta referencia debe cumplir con todos los requerimientos nutricionales y que no debe ser muy diferente de los alimentos comerciales y debe ser atrayente y que debe reformularse con el doble de los niveles recomendados de vitaminas y otros micronutrientes, para que al incluir el ingrediente a probar (50%) las dietas de prueba no queden deficientes en vitaminas y minerales. En base a esto el CSIRO ha usado diferentes dietas de referencia en función del ingrediente evaluado. Cabe mencionar que esta sobre formulación es especialmente justificada porque el alimento prueba se diluye en un 50% al incluir el ingrediente prueba y por el tiempo de colecta de heces que puede durar hasta 30 días, que es caso específico del CSIRO.

En la UANL se han usado dietas de referencia específicas para evaluar harina de pescado, harina de subproducto de pollo, harina de peces y de canola, donde los niveles de inclusión de los ingredientes prueba han sido crecientes (pruebas de sustitución de harina de pescado) o del 30%. Adicionalmente para determinar la digestibilidad, en un mismo proyecto, de un grupo heterogéneo de ingredientes (ingredientes animales, vegetales y cereales) se ha utilizado como dieta de referencia, un lote de alimento peletizado comercial (34% proteína). Esto con la idea de disminuir la variabilidad generada por la fabricación de una dieta de referencia cada vez que se evalúa un grupo de ingredientes y permite realizar una comparación de los resultados para los diferentes ingredientes al usar la misma dieta de referencia en diferentes experimentos. Este alimento es reprocesado agregando 1% de alginato y 1 % de óxido de cromo, y en las dietas prueba es usado al 70% (incluyendo al cromo y al alginato) con un 30% del ingrediente a evaluar. Evidentemente aquí las dietas de referencia no son reformuladas pero el tiempo de bioensayo y colecta de heces es mucho menor (7 -14 días) que en el CSIRO. Una posible desventaja de ésta estrategia es el efecto negativo del reproceso sobre la estabilidad de las dietas.

En CIBNor también ha usado dietas de referencia específicas para cada ingrediente o aditivo a prueba o una dieta de referencia única (con el mismo lote de ingredientes, pero diferentes fabricaciones) para evaluar la digestibilidad de grupo heterogéneo de ingredientes, siendo esta

última estrategia la misma empleada en TAMU, pero la sobre formulación no ha sido propiamente considerada.

El nivel de inclusión del ingrediente a evaluar en dietas prueba es del 50 % en el CSIRO, del 30% en TAMU, UANL y 15% y 30 % en el CIBNor y el tiempo de experimentación necesario para colectar las heces (que difiere en función del tamaño, número de organismos, la digestibilidad de ingredientes a evaluar) es de 20 días en el CSIRO, 21 a 30 días en el CIBNor y de 7 a 14 días en la UANL. En base a esto, es posible que el CSIRO y el CIBNor justifiquen la necesidad de un alimento sobreformulado (Tabla 8).

El CSIRO menciona que mientras mayor sea el nivel de inclusión del ingrediente en la dieta prueba mayor será la precisión en la determinación de la digestibilidad del ingrediente (menor será el error) porque la diferencia con la dieta de referencia se vuelve más clara o más neta; por eso usa 50% de inclusión. Sin embargo, con este nivel se diluye o se modifica mucho el valor nutricional de las dietas prueba, y por eso tiene que sobre formular en vitaminas y minerales la dieta referencia. Sin embargo, Divakaran (2002) reporta un estudio crítico sobre de digestibilidad de productos de soya con 2 niveles de inclusión (15 y 30%) y 2 niveles de cromo (0.5 y 1%) en *L. vannamei* y encuentra que a mayor contenido de cromo mayor es la digestibilidad y que la interacción entre los dos factores es significativa, concluyendo una posible interacción física entre el óxido de cromo y la pasta de soya en las dietas marcando una limitante para este tipo de análisis.

Otro aspecto que el CSIRO considera muy importante es que en las dietas prueba se mantenga, de manera estricta, la proporcionalidad entre la dieta de referencia y el ingrediente prueba, considerando el óxido de cromo, las vitaminas y los minerales dentro de la composición de la dieta de referencia, esto lo remarca ya que algunos grupos como la UANL y el CIBNor han publicado resultados modificando la proporcionalidad, al dejar el cromo y las vitaminas constantes, en la dieta de referencia y las dietas prueba (para evitar dilución por el ingrediente) y aunque aparentemente eso no cambia mucho la digestibilidad del ingrediente, porque los niveles de inclusión de estos componentes son bajos, habría que demostrarlo matemáticamente o experimentalmente.

Podría recomendarse entonces para las dietas de referencia sobre formular, si se considera necesario, pero nunca perder la proporcionalidad de la dieta de referencia y el ingrediente prueba y de ser posible evaluar los ingredientes con varios niveles de inclusión. Si es necesario evaluar niveles de inclusión muy bajos (casos especiales de lípidos y aditivos), quizá lo adecuado sería aumentar el número de repeticiones para compensar la incertidumbre generada por la menor diferencia esperada entre las dietas de prueba y de referencia.

El nivel de proteína en la dieta de referencia depende de la especie del camarón. CSIRO que trabaja con *P. monodon* usa 40%, UANL 30-35%, TAMU 35% y CIBNor 35% todos estos últimos trabajan con *L. vannamei*, sin embargo es evidente que al agregar el ingrediente prueba, el contenido de proteína y otros nutrientes será diferente, por ello es importante no prolongar mucho los tiempos de colecta de heces.

Cálculos, fórmulas y correcciones

Todos los grupos usan la fórmula clásica para determinar la digestibilidad de materia seca y de nutrientes de las dietas, en donde C es la concentración de cromo u otro marcador y N la

concentración del nutriente del cual se mide la digestibilidad aunque cada grupo la cita de diferente manera.

$$ADC = 1 - (C_{dieta}/N_{dieta})(N_{heces}/C_{heces})$$

En el caso de digestibilidad de ingredientes los grupos de investigación están usando diferentes fórmulas corregidas o no por lixiviación, pero todas son modificadas con respecto a la fórmula original de Cho y Slinger, para tomar en cuenta las diferentes concentraciones del nutriente estudiado en las dietas de referencia y de prueba, y en el ingrediente estudiado. Estas formulas modificadas fueron publicadas por Forster (1999) y Bureau et al. (1999), en formas diferentes pero equivalentes. Bureau y Hua (2006) hacen hincapié en la importancia de considerar concentraciones del nutriente estudiado en base húmeda en el ingrediente $N_{ingrediente}$ y en la mezcla de referencia N_{ref} , tales como eran al momento de mezclar los dos componentes en la proporción anunciada. En el caso de una mezcla 70% mezcla de referencia (incluye el marcador) con 30% del ingrediente, Bureau y Hua proponen la siguiente fórmula:

$$ADC_{ingrediente} = ADC_{dieta\ prueba} + [(ADC_{dieta\ prueba} - ADC_{dieta\ ref}) \times (0.7N_{ref}/0.3N_{ingrediente})]$$

Digestibilidad aparente vs. digestibilidad real

En este aspecto solo la UANL comento haber realizado algunos esfuerzos incipientes usando alimentos sin nutrientes. Pero hay una necesidad de realizar investigación para medir el aporte endógeno de nutrientes en las heces para poder reportar valores de digestibilidad real en lugar de aparente. Por el momento todos los datos publicados se refieren a digestibilidad aparente.

Problemas de aplicación de los resultados de investigación a plantas de alimentos y sistemas prácticos de cultivo

Es evidente que los resultados obtenidos por los laboratorios aun no tienen una aplicación directa en la Industria. Divakaran menciona que la capacidad digestiva de los camarones cambia en presencia de diferentes sustratos, por ejemplo encuentra que los camarones producen la enzima laminarinasa solo cuando el sustrato (algas) está presente, de tal manera que, en el desarrollo de pruebas en agua clara en condiciones controladas, las determinaciones de digestibilidad podrían ser subestimadas al no estar presente ese sustrato natural.

Así mismo las condiciones de proceso de los alimentos y los niveles de inclusión de los ingredientes y aglutinantes que se usan a nivel experimental son muy diferentes a los que utiliza la industria y aunque algunos grupos de investigación como la UANL han determinado la digestibilidad de alimentos comerciales, solo en 2 casos las compañías de alimentos agregaron el óxido de cromo en la planta al producir el alimento y el resto de las veces el alimento tuvo que ser molido y reprocesado para incluir el óxido de cromo y un aglutinante, lo cual ciertamente modifica de cierta manera los resultados. Al respecto el CSIRO comenta la necesidad de utilizar un marcador indigestible natural, como un alcano de cadena larga, que pudiera ser identificado en el alimento y que permita determinar la digestibilidad del alimento tal como es producido sin tener que reprocesarlo y también menciona la alternativa del uso del método gravimétrico directo que cuantifica el alimento consumido

y toda la materia fecal liberada, pero reconoce que esta metodología es difícil de realizar adecuadamente.

En base a lo anterior, es claro que a pesar de los importantes avances en el estado del arte de las metodologías desarrolladas, (que permiten contar con una buena aproximación de la disponibilidad de los nutrientes en ingredientes y en alimentos para camarones pendidos), aun queda mucho por hacer.

Tabla 1. Condiciones de elaboración de alimento

Centro de Investigación	Tamaño de partícula (μ) en ingredientes	Inclusión de agua (%)	Numero de veces que se extruye en molino de carne el alimento	Diámetro de pellet (mm)	Secado
CIBNor	250	\approx 40	2 a 3	2	40°C/16 hr Temperatura ambiente
CIAD	250	\approx 40	1	3	37-39°C/12 hr Aire forzado caliente
CENAIM	150 – 300	40-45	2-3	2-3	60°C/2hr
UNMP	140	50%	1-2	3-3.5	60°C/24hr
CSIRO Camarón	<500 μ m	40-45%	2 90°C vapor	3	40 °C / 16 hrs Aire forzado caliente
CSIRO Langosta australiana	<500	40-45%	2 90°C vapor	3	40 °C / 16 hrs Aire forzado caliente
UANL	250	30-40%	1 75-90°C	1.6	100°C por 8min

Tabla 2. Tipo de marcador inerte y aglutinantes empleados en la elaboración de dietas para estudios de digestibilidad

Centro de Investigación	Experiencia en determinar Digestibilidad de	Nutrientes evaluados	Tipo y Nivel de marcador usado (%)	Agglutinante usado en las dietas y Nivel de inclusión (%)
CIBNor	Ingredientes Dietas comerciales experimentales	Proteína Materia seca Energía	Cr ₂ O ₃ 0.5 y 1%	Gelatina 4-4.7
CIAD	Dietas	Materia seca Proteína	Cr ₂ O ₃ 0.5 y 1%	Alginato 1.5-2.0
CENAIM	Dietas	Materia seca Proteína	Cr ₂ O ₃ 0.5 y 1%	Gluten de trigo 5
UNMP	Dietas	Proteína Carbohidratos Colesterol	Cr ₂ O ₃ 0.25 y 1%	Alginato 2
CSIRO Camarón	Dietas exp. Ingredientes	Proteína Carbohidrato Energía Amino ácidos Lípidos	Cr ₂ O ₃ 0.05-0.025% Iterbio 0.05%	Almidón Gluten 6-12
CSIRO Langosta Australiana	Dietas exp. Ingredientes		Antes 0.05-0.025% Ahora Iterbio 0.05%	Gluten 6-12
UANL	Dietas exp. Dietas comerciales Ingredientes	Materia seca Proteína Energía Aminoácidos Fósforo Polisacáridos no almidonosos	Cr ₂ O ₃ 1%	Gluten 4-6 Alginatos 1-3 Harina Kelp 2-4

Tabla 3. Tamaño de organismos, densidad, no. de replicados, días de aclimatación y frecuencia de alimentación en estudios de digestibilidad

Centro de Investigación	Tamaño camarones (g)	Densidad (No./tanque)	Replicado /tratamiento	Aclimatación (días)	Frecuencia alimentación	No. de colectas por día
CIBNor	3-15	Pequeño 10 Grande 5	3-5	7	3	3
CIAD	10-12	5	3-4	4	2 Ad libitum	2
CENAIM	4-7	5-7	5-6	5-7	2 7-10% biomasa	2
UNMP	variable	20-28/m ²	3	5-7	Alimentación 6-12 hr	1
CSIRO Camarón	15-18	2	6	7	4	8
CSIRO Langosta australiana	600	1	5	Destete por 4 semanas 7-10	2	2
UANL	0.3- 15g	7-10	3-4	2	2 5% biomasa total	3

Tabla 4. Condiciones de cultivos en estudios de digestibilidad en camarón

Centro de Investigación	Tanques (L)	Foto periodo	T°C	Salinidad	Oxígeno mg/L
CIBNor	60	12:12	27±1	39±2	> 5
CIAD	45 Sistema Guelph	Natural	27-29	34	>5
CENAIM	50	Natural	25-28	35	>6
UNMP	150/500	12:12	20-23	Variable	7-8
CSIRO Camarón	120	12:12	28	34	>6
CSIRO Langosta australiana	25X100	12:12	28	34	>6
UANL	60	Natural	30	30-35	>5

Tabla 5. Método de colecta de heces, proceso de lavado y tiempo de colecta

Centro de Investigación	Método de colecta heces	Lavado heces	Proceso de centrifugación de heces	Tiempo de Colecta heces (días)
CIBNor	Sifoneo	Agua destilada	NO	21-30
CIAD	Sifoneo Sistema Guelph	Agua destilada	NO	7-10
CENAIM	Sifoneo	Agua destilada	13500 rpm X 5 min at 4°C	7-10
UNMP	Sifoneo	Agua destilada	NO	14
CSIRO Camarón	Sifoneo	Agua destilada	2000 rpm X 30S	20
CSIRO Langosta australiana	Método Globo	NO	NO	15-20
UANL	Sifoneo	Agua destilada	NO	14

Tabla 6. Proceso de secado de heces de camarón

Centro de Investigación	Proceso de secado de heces Antes de análisis	Mezcla de muestras de replicados
CIBNor	Secado 105°C- 12 h	Algunas veces heces de 2 replicados
CIAD	Liofilizado X 72h	NO
CENAIM	Liofilizado X 48h y secado por 12-24 h at 60°C	NO
UNMP	Liofilizado	NO
CSIRO Camarón	Liofilizado	NO
CSIRO Langosta australiana	Liofilizado	NO
UANL	Liofilizado X24h	NO

Tabla 7. Tamaño de muestra utilizada para el análisis de nutrientes en heces

Centro de Investigación	Humedad (g)	Cr ₂ O ₃ (mg)	Proteína (mg)	Lípidos (mg)	Colesterol (mg)	Carb. (mg)	Energía (mg)
CIBNor		300	300	100		300	?
CIAD		5	200				
CENAIM		2	2			40	
UNMP		10-30	200		30	10	
CSIRO Camarón	500		500				1000
CSIRO Langosta australiana	500		500				1000
UANL			30				30

Tabla 8. Nivel de inclusión del ingrediente a evaluar en estudios de digestibilidad

Centro de Investigación	Dieta de referencia	Nivel de inclusión del ingrediente Probado (%)
CIBNor	En función del ingrediente a prueba	15
CIAD	-----	---
CENAIM		
UNMP	-----	variable 0-3% (Colesterol)
CSIRO camarón	En función del ingrediente a prueba	30-50
CSIRO Langosta australiana	En función del ingrediente a prueba	50
UANL	En función del ingrediente a prueba	30 variable en función del ingrediente

Métodos Utilizados en la Universidad Autónoma de Nuevo León para la Medición de Digestibilidad *in vitro* para Camarón

Martha G. Nieto-López, Denis Ricque-Marie, Mireya Tapia-Salazar, Claudio Guajardo-Barbosa y L. Elizabeth Cruz-Suárez.

* Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Apdo. Post. F-56, San Nicolás de los Garza, Nuevo León 66450, México.
Tel+Fax: 52 (81) 83526380 E-mail: lucruz@fcb.uanl.mx

Introducción

La determinación de la digestibilidad es esencial no solo para formular dietas a bajo costo sino que además es muy útil para la investigación de requerimientos nutricionales, selección de ingredientes con valor nutritivo potencial (en relación con la calidad de la materia prima), y formulación de dietas que minimicen la contaminación del agua (Brown *et al.*, 1989; Akiyama *et al.*, 1991; Hajen *et al.*, 1993; Mendoza, 1994; Romero y Manríquez, 1993). El uso de los datos de digestibilidad de un ingrediente es esencial para la formulación de una dieta con un bajo índice de contaminación sin riesgo para el medioambiente (Lee y Lawrence, 1997).

Los experimentos de alimentación o determinación de la digestibilidad aparente *in vivo* han sido los métodos mas utilizados para determinar el valor nutritivo de los ingredientes o las dietas. Aunque estos métodos son buenos, son métodos muy laboriosos y costosos que además requieren de mucho tiempo para la obtención de resultados (Lan y Pan, 1993).

Ante la necesidad de contar con técnicas rápidas y económicas para la determinación de la digestibilidad proteica, se han desarrollado un cierto número de métodos *in vitro*, que permiten llevar a cabo en menor tiempo y de manera eficaz la selección de diferentes lotes de materia prima y el monitoreo de diferentes procesos de transformación de los alimentos (Moughan *et al.*, 1989).

Aunque existen metodologías oficiales, como la reportada por la AOAC (1990), donde la enzima usada es la pepsina y la determinación se fundamenta en el grado de solubilización de la proteína expuesta a esta enzima, no hay evidencias de que esta metodología presente una buena correlación con la digestibilidad *in vivo* en camarones (para todos los tipos de ingredientes y/o para dietas terminadas), especialmente considerando que estos organismos no presentan esta enzima en su tracto digestivo. Por otro lado, existen publicaciones de diversos autores (Carrillo, 1994; Lazo, 1994; Ezquerro, 1997b), que han desarrollado nuevas metodologías *in vitro* con enzimas de los propios camarones, pero ninguna de ellas se ha oficializado ya que presentan algunos problemas por ejemplo en algunos casos no se ha determinado su correlación con los resultados *in vivo* o se requiere adquirir equipo especializado para aplicar la técnica, o por que solo se pueden aplicar para determinar digestibilidad proteica de ingredientes y no de alimentos compuestos por una mezcla de los mismos.

Así pues, considerando la importancia de contar con un método de digestibilidad de proteínas *in vitro* que permita hacer una selección adecuada de ingredientes y de alimentos para camarón, pero que además permita seleccionar entre calidades de un mismo ingrediente proteico, en el Programa Maricultura se han realizado una serie de trabajos para evaluar la correlación de la digestibilidad *in*

vivo con la digestibilidad *in vitro* utilizando como sustrato harinas de pescado de diferente digestibilidad, ingredientes de diferente origen y dietas completas mediante la metodología del AOAC, la metodología de pH-stat y una metodología desarrollada por el Programa Maricultura UANL.

Métodos para determinar digestibilidad *in vitro*.

Método con pepsina diluida (A.O.A.C., Torry modificado)

Este método es utilizado por el Programa Maricultura solo para evaluar la digestibilidad proteica en harinas de pescado.

La digestibilidad con pepsina de las muestras es determinada por el método de la A.O.A.C. siguiendo las recomendaciones de la estación de investigación Torry utilizando una solución de pepsina al 0.0002% (Sigma P-7000, actividad 1:10 0000) como lo describe Olley y Pirie (1966) y Olsen (1969) (ver anexo 1), con pequeñas modificaciones (las muestras son molidas en un molino Cyclotec a 35 mallas en lugar de malla 30; papel filtro Watman #2 (retención de partículas de 8µm) es utilizado en lugar de papel filtro Schleider and Schull 589² 180 mm y el método Kjeldahl se lleva a cabo en un sistema kjeltec Tecator).

Para evaluar calidad de las harinas se determina la digestibilidad con pepsina corregida por el ácido (Formula A), como lo indica el método oficial del A.O.A.C. Torry modificado para poder comparar con los resultados de las plantas de alimentos, pero si los resultados se quieren utilizar para correlacionarlos con la digestibilidad *in vivo* en camarón la digestibilidad de la proteína es calculada con la fórmula del método oficial tomando en cuenta el total de la proteína contenida en la muestra (Formula B):

Formula A:

$$\% \text{ dig corregida por el ácido} = \frac{\text{NRI en ácido} - \text{NRI en solución con pepsina}}{\text{NRI en ácido}} * 100$$

Formula B:

$$\% \text{ digestibilidad (no corregida)} = \frac{\text{N total en muestra} - \text{NRI en solución con pepsina}}{\text{N. total en muestra}} * 100$$

Donde:

NRI= Nitrógeno Residual Insoluble

N total= Nitrógeno Total

Método con enzimas de camarón (tipo A.O.A.C., Torry modificado)

Obtención del homogeneizado enzimático

La colecta de hepatopáncreas de camarones *Litopenaeus vannamei* se lleva a cabo en granja. La colecta de las glándulas se lleva a cabo con la ayuda de pinzas y tijeras para ser colocados en hielo por un período corto, de 15 a 20 min. (o hasta juntar un número de 30 - 40 ejemplares), para posteriormente ser colocados en un tanque con nitrógeno líquido y trasladados a Monterrey, donde son liofilizados, empacados al vacío y colocados en un ultracongelador a una temperatura de -70 a -80°C.

Preparación del extracto enzimático

Se realiza el extracto a partir de glándulas digestivas liofilizadas previamente se sacan del ultracongelador, se molidas y se pesan a temperatura ambiente (0.307g en 100 mL.), son en seguida trituradas en 100 mL de buffer TRIS HCl 10mM pH 7.5 a 4°C con la ayuda de un ultratritrador. El triturado es centrifugado durante 30 min. a 10,000 *g* a -2°C. Los lípidos sobrenadantes son separados y eliminados con la ayuda de una espátula. El extracto se almacena en alícuotas a -80°C.

Medición de la actividad enzimática del homogeneizado

Tripsina: La actividad enzimática de la tripsina es medida por la hidrólisis del sustrato L-Benzoin-Arginina P-Nitro Anidina (BAPNA) 1mM en un buffer TRIS 0.1M, pH 8 (Erlanger *et al.*, 1961). Esto se registra mediante el cambio de absorbancia durante 10 min. a 405 nm para dicho sustrato y la actividad es expresada como unidades enzima (U) por miligramo de proteína en el extracto, siendo equivalente una unidad enzima a un cambio de 0.001 en absorbancia.

Proteasas totales: La actividad de las proteasas totales se estima conforme a la hidrólisis de la caseína amarilla (1% en un buffer fosfato 10 mM, pH 7) a 37 °C por 10 min (Kunitz, 1947; modificado por Clark *et al.*, 1986). La reacción es bloqueada por 2 mL de ácido Tricloroacético (TCA) frío al 5% mantenida a 2°C durante 30 min. El bloqueo es causado por la precipitación de las proteínas solubles. Después se centrifuga 2,000*g* durante 10 min. y la absorbancia de la solución sobrenadante es determinada a 280 nm Un blanco es preparado en las mismas condiciones de la muestra pero con la diferencia de que en éste el TCA es agregado antes de iniciar la incubación. La tirosina es utilizada como estándar y la actividad enzimática es expresada como µg de tirosina liberada por min./g de proteína.

Proteínas: Las proteínas solubles son medidas utilizando albúmina bovina como estándar por el método de Bradford (1976); cuyo principio es la unión de las proteínas con un colorante, el azul brillante de coomassie G 250. La sensibilidad de esta técnica es de 0.1 µg/mL.

Condiciones de Digestión (Ver diagrama en Anexo 2).

La digestibilidad de las harinas y dietas es determinada, utilizando 3 replicados por cada muestra y un blanco.

- 1.- Las muestras son molidas muy finamente con un molino Cyclotec, y pasadas a través de tamiz de malla 35 (en lugar de malla 30) y a diferencia del método oficial en donde se utiliza 1g de harina en 150 mL de ácido independientemente del contenido de proteína, se utiliza para todas las muestras (dietas y harinas), la misma concentración proteica 6.25mg/mL Para ello, una cantidad apropiada de cada harina o dieta es homogeneizada con 50 mL. de buffer tris 50mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8 en un ultra-homogenizador.
- 2.- Las suspensiones de las muestras (muestra + 50mL de buffer) se llevan a los vasos de reacción para la hidrólisis y el pH se ajusta a 8 con NaOH 0.1M y se mezclan con aproximadamente 0.84 mL de extracto enzimático crudo (actividad proteolítica de 1484.1 U/g de proteína) dependiendo de la actividad que presente.
- 3.- La muestra es incubada con agitación constante a 30°C (ya que es la misma temperatura a la que se llevan a cabo los bioensayos de digestibilidad *in vivo*) por 24 horas para las harinas y 6 horas para las dietas. Al final del período de incubación, las muestras son filtradas en un papel Watman #2, se secan los filtros con el residuo (30 min. a 100°C) y la proteína residual es determinada con el método Kjeldhal en un sistema kjeltec Tecator.

Determinación de la digestibilidad *in vitro* para las diferentes muestras

La digestibilidad de la proteína es entonces calculada mediante la fórmula del método oficial de determinación de digestibilidad *in vitro* (A.O.A.C., 1990) tomando el total de proteína presente (Formula A)

Formula A:

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{\text{N total en la muestra} - \text{NRI en homogeneizado}}{\text{N total en la muestra}} * 100$$

Por otro lado, se determina la digestibilidad corregida de las harinas de pescado (Formula B), mediante la utilización de un blanco en el que no se adicione enzima (para determinar en nitrógeno residual insoluble).

Formula B:

$$\% \text{ dig corregida} = \frac{\text{NRI en buffer} - \text{NRI en homogenizado}}{\text{NRI en buffer}} * 100$$

Donde:

NRI= Nitrógeno residual insoluble

NT= Nitrógeno total

Medición con enzimas de camarón (tipo pH-Stat).

Para la determinación del grado de hidrólisis por el método de pH-Stat se utiliza como enzima un homogeneizado del hepatopáncreas de *L. vannamei* preparado en agua destilada. La colecta de hepatopáncreas de camarones *Litopenaeus vannamei* se lleva a cabo igual que en el método anteriormente mencionado

Preparación del extracto enzimático y Medición de la actividad enzimática del homogeneizado

El extracto se realiza a partir de glándulas digestivas previamente liofilizadas bajo las mismas condiciones mencionadas en el método anterior pero en lugar del Buffer se utiliza agua destilada. El triturado se centrifuga durante 30 min a 10,000g a -2°C . Los lípidos sobrenadantes son separados y eliminados con la ayuda de una espátula. El extracto se almacena en alícuotas a -80°C .

Se determina la actividad proteolítica total y específica (Kunitz, 1947, modificado por Clark *et al.*, 1986), la actividad tripsica (Erlanger *et al.*, 1961) y la determinación de proteínas totales por el método de Bradford (1976).

Condiciones de Digestión

El grado de hidrólisis se determina por triplicado, tanto para las harinas como para las dietas; las muestras son molidas a 35 mallas y homogeneizadas en agua destilada con un ultratriturador (8mg de proteína/ml) y 10 ml de la suspensión se colocan dentro del recipiente de hidrólisis; el pH es ajustado a ocho con NaOH al 0.1M. La reacción se inicia con la adición de 2 ml del homogeneizado enzimático (con una actividad proteolítica de 6.21 u/mg de proteína). El pH se mantiene en ocho y se mide la cantidad de NaOH 0.1N utilizado para mantener dicho pH durante 30 min. a 25°C .

El grado de hidrólisis de la proteína se determina con la siguiente fórmula (Dimes y Haard 1994):

$$\text{DH}\% = [(B \cdot N_b \cdot 1.5 / M \cdot (S\% / 100)) / 8] \cdot 100$$

Donde: B = ml de NaOH 0.1N utilizados para mantener el pH en 8, N_b = Normalidad del NaOH, 1.5 factor de calibración a pH de 8 y 25°C , M = gramos de la mezcla, S = concentración de proteína en la mezcla (%) y 8 es el contenido total de enlaces peptídicos (meq/g) para la proteína de trigo o caseína (Adler- Nissen, 1986).

Como una modificación adicional al método propuesto por Ezquerro *et al.*, (1997^a), el grado de autohidrólisis de las muestras se determina mediante la incubación de éstas en las mismas condiciones de prueba, sin la adición del homogeneizado enzimático. Esto nos permite estimar el grado de hidrólisis corregidos por la adición del extracto:

$$\text{DH}\% \text{ corr.} = [(B - B') \cdot N_b \cdot 1.5 / M \cdot (S\% / 100)) / 8] \cdot 100$$

Donde B' son los ml de NaOH 0.1N utilizados para mantener el pH en 8.0 durante 30 min. 25°C .

Correlación de los métodos de digestibilidad *in vitro* con digestibilidad *in vivo*

Con la finalidad de determinar si estos métodos son eficientes para ser utilizados como técnicas de referencia en camarón, en la Facultad de Ciencias Biológicas se han llevado a cabo diferentes experimentos de digestibilidad *in vivo* y los resultados de estos se han correlacionado con las 3 técnicas *in vitro* antes mencionadas.

En el primero de ellos se evaluó la calidad nutricional de harinas de pescado y para ello se determinó la digestibilidad proteica *in vivo* de estas y de las dietas a las cuales fueron integradas, así como la digestibilidad *in vitro* con las tres metodologías indicadas anteriormente (Nieto *et al.*, 2005). Se evaluaron 12 harinas de pescado y un concentrado proteico que fueron elaboradas bajo diferentes procesos de secado y tres harinas elaboradas con materias primas de diferente frescura (Nieto et al 1998).

a).- Correlación entre digestibilidad *in vitro* con pepsina e *in vivo*.

Los resultados muestran que la digestibilidad *in vitro* con pepsina corregida (Dpep corr) da valores bajos (de 91.7 a 25.5), y no se obtiene una buena correlación con la digestibilidad *in vivo*; sin embargo, al utilizar los valores sin corregir (Dpep los valores van de 91.14 a 62.67 para las dietas y de 98.91 a 42.69 para las harinas), se encontró que la correlación con el estudio *in vivo* era mucho mejor ($r^2= 0.67$, $p= 0.00008$, $n= 16$) (figura 1) Esto puede ser explicado por que, en ambos casos, la proteína soluble da una sobreestimación de la digestión, sobre todo para las HP con un alto contenido de proteína soluble. La correlación entre la digestibilidad *in vitro* con pepsina y la digestibilidad aparente de proteína de la harina de pescado *in vivo* (DAPHP) no se modificó al excluir las HP con bajo contenido de proteína/alta ceniza de la base de datos.

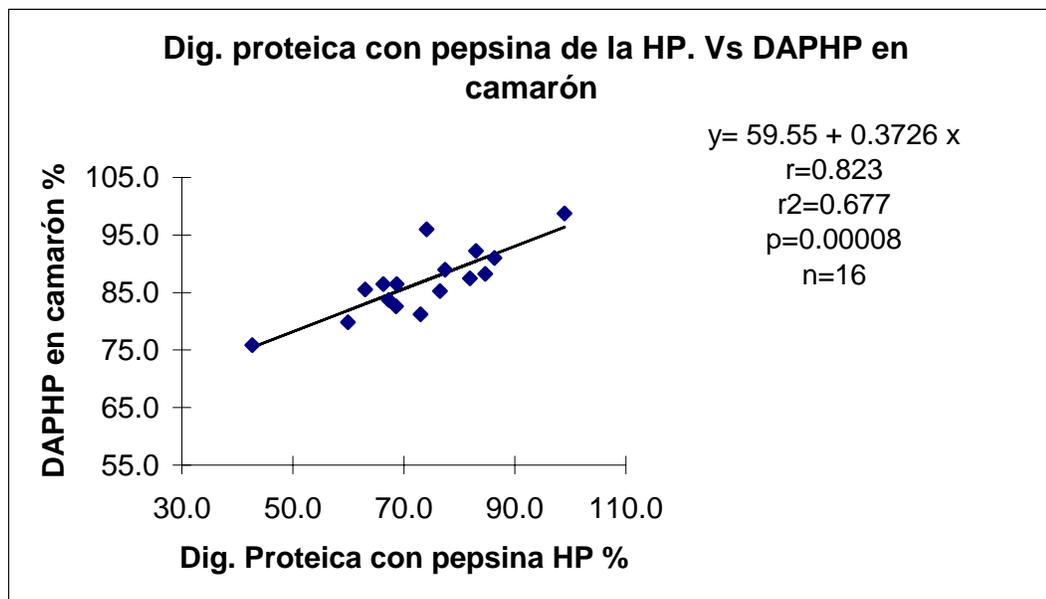


Figura 1.- Regresión lineal entre la digestibilidad *in vitro* con pepsina diluida (sin corrección por proteína soluble) y la digestibilidad *in vivo* (DAPHP) (Nieto-López 2003)

La digestibilidad *in vitro* con pepsina no fue buena para predecir la digestibilidad de las dietas para camarón, ya que no se correlacionó significativamente con los valores de la digestibilidad *in vivo* de la dieta

b).- Correlación entre digestibilidad *in vivo* e *in vitro* con enzimas de camarón (tipo AOAC).

La digestibilidad proteica *in vitro*, determinada a seis horas de hidrólisis para las dietas (DPD-6h) y para las harinas de pescado (FMPD-6h), muestra un rango que va de 36.8 a 64.16 y de 24.16 a 92.25, respectivamente; para las HP a 24 horas (FMPD- 24h), el rango de digestibilidad va de 42.7 a 94.4. Cuando se considera el contenido de proteína soluble de las harinas de pescado, la digestibilidad corregida (FMPDc-24h) va de 9.5 a 65.71.

Se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) entre las digestibilidades proteicas de las dietas *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.77$, $r^2 = 0.6$, $p = 0.0005$, $n = 16$), así como entre las digestibilidades proteicas de la harina a seis y 24 horas de hidrólisis ($r = 0.74$, $r^2 = 0.54$, $p = 0.001$, $n = 16$ y $r = 0.89$, $r^2 = 0.8$, $p = 0.000003$, $n = 16$, respectivamente), mejorando para las harinas cuando no se consideran las harinas de pescado de más de 14.5% de ceniza (figura 2) ($r = 0.8$, $r^2 = 0.64$, $p = 0.0017$, $n = 12$ y $r = 0.93$, $r^2 = 0.86$, $p = 0.00001$, $n = 12$, respectivamente).

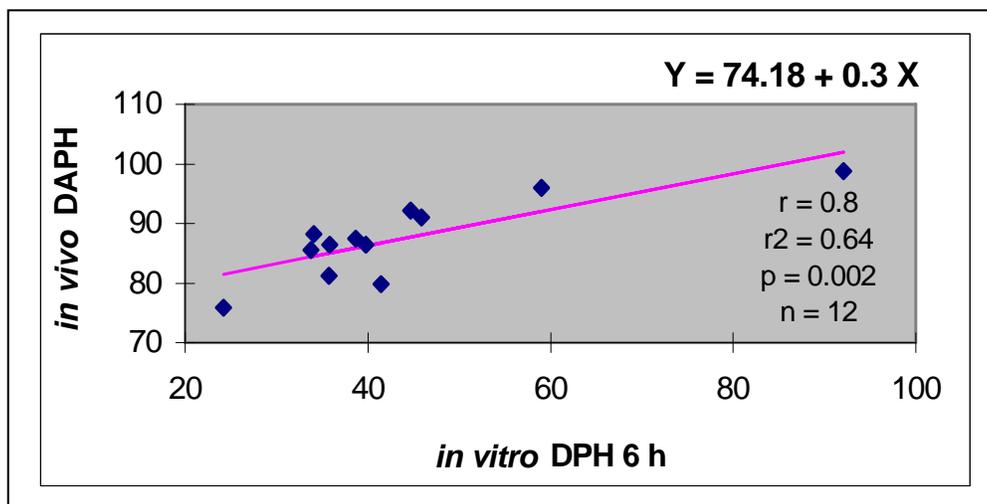


Figura 2a.- Correlación entre la digestibilidad *in vitro* de las harinas de pescado a 6 horas de hidrólisis y la digestibilidad *in vivo*, eliminando las harinas con más de 14.5% de ceniza (Nieto-López 2003).

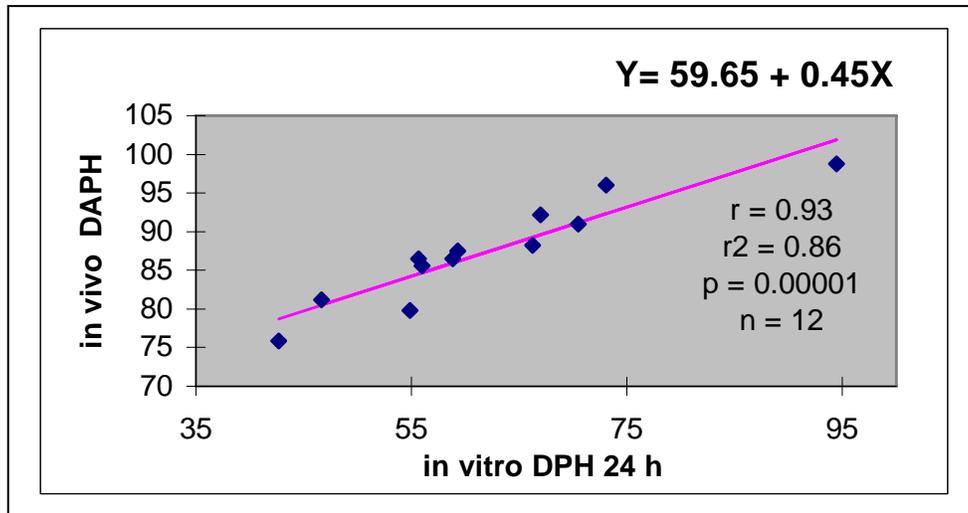


Figura 2b.- Correlación entre la digestibilidad *in vitro* de las harinas de pescado a 24 horas de hidrólisis y la digestibilidad *in vivo*, eliminando las harinas con más de 14.5% de ceniza (Nieto-López 2003).

c).- Correlación entre digestibilidad *in vivo* e *in vitro* con enzimas de camarón (tipo pH-Stat).

Los resultados obtenidos del grado de hidrólisis (DH) de las harinas de pescado y dietas fueron significativamente diferentes entre sí ($P=0.00001$) y presentaron un rango de 21.61 a 39.6 y 13.20 a 29.51, respectivamente.

Los valores de autohidrólisis de las harinas de pescado fueron de 4.55 a 1.42%. Estos valores presentaron una correlación con el contenido de ceniza de las HP ($r=0.58$), con el contenido de proteína de la HP (-0.51) y con la proteína soluble en ácido (-0.50), debido probablemente a que las harinas de pescado con poca proteína y alta ceniza sean elaboradas a partir de subproductos de pescado, y poseen mayor concentración de enzimas; por otro lado, la proteína insoluble puede ser hidrolizada y causar cambio en el pH

El DH corr., en las HP y dietas, presentó un amplio rango (13.6 a 35.4 y de 10.2 a 29.4%). La correlación de la digestibilidad en camarón (DAPHP) fue mejor con la Dhcorr que con la no corregida ($r = 0.51$ vs $r = 0.38$, respectivamente, $n=16$), pero esta correlación mostró una mejoría cuando las 2 HP con alto contenido de ceniza y bajo de proteína fueron omitidas, obteniendo una alta significancia ($r=0.80$, $P=0.0006$, $n=14$)(figura 3a), con la siguiente regresión:

$$\% \text{ DAPHP en el camarón} = \% \text{ DHcorHP} * 1.2965 + 0.919.$$

La correlación entre la digestibilidad de la HP *in vivo* y el DHcorHP se determinó, posteriormente ($r=0.88$, $p = 0.0097$), utilizando sólo las HP con más de 72% de proteína y menos del 12% de ceniza (figura 3b)

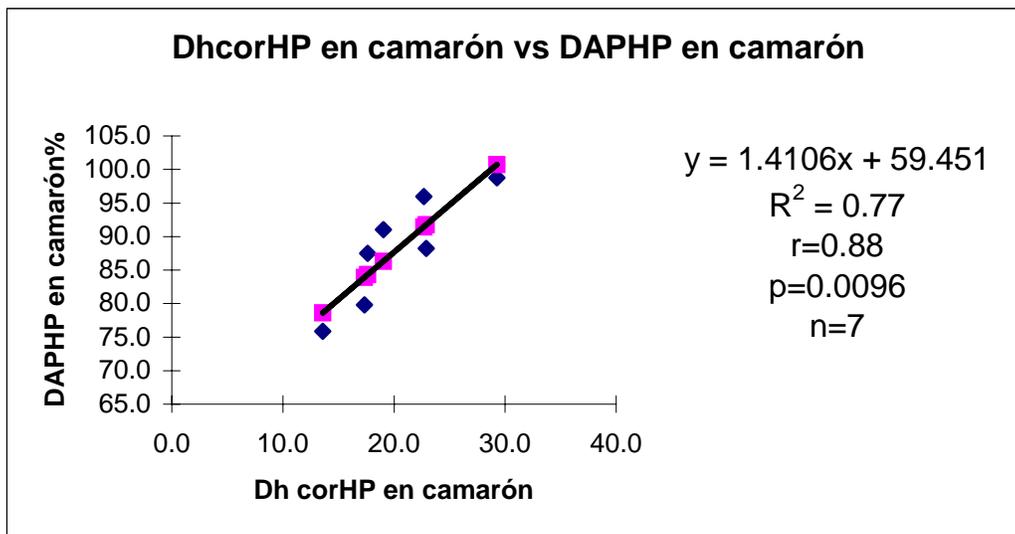
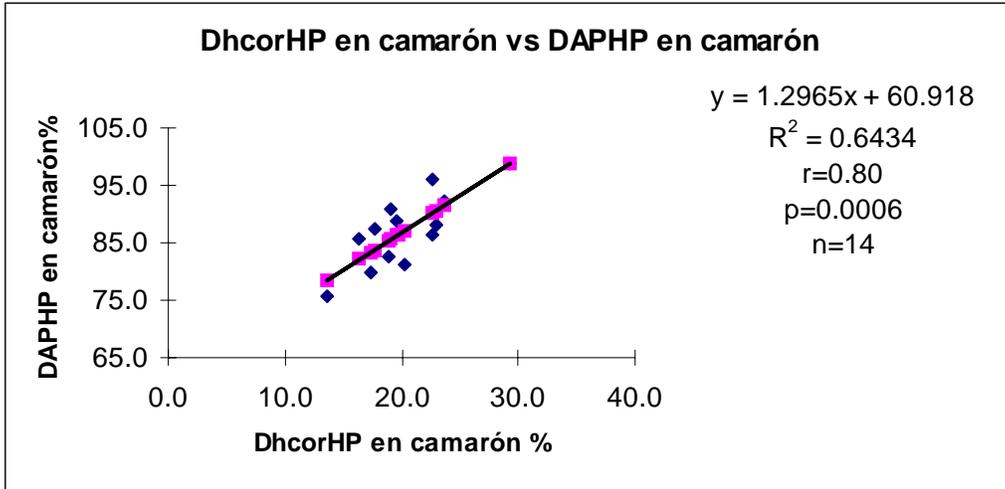


Figura 3.- Regresión lineal entre digestibilidad *in vivo* (DAPHP) y DhcorHP a) sin harinas altas en ceniza/baja proteína b) sin harinas con proteína < 70% (Nieto-López 2003).

El DH no fue bueno para predecir la digestibilidad de las dietas para camarón, ya que no se correlacionó significativamente con los valores de la digestibilidad *in vivo* de la dieta.

Determinación de digestibilidad *in vitro* en otros ingredientes.

Una vez que se estableció que el método de digestibilidad con enzimas de camarón (tipo AOAC torry modificado) era el más adecuado ya que fue capaz de distinguir diferencias de digestibilidad en un mismo ingrediente (harinas de pescado) con diferente calidad (diferente digestibilidad *in vivo*) y para determinar la digestibilidad de dietas, se llevó a cabo otro experimento en el que se evaluó si esta técnica era capaz de distinguir entre la digestibilidad de diferentes ingredientes comúnmente utilizados en dietas para camarón.

Para ello se evaluó la digestibilidad *in vivo* en *L.vannamei* y en *L.stylyrostris* de diferentes fuentes proteicas, así como de dietas preparadas con estas mediante un bioensayo (Salinas-Miller, datos no publicados) donde se utilizaron como ingredientes: Gluten de trigo, Harina de trigo, Pasta de soya, Harina de pluma, Harina de Camarón, Harina de Calamar y 2 diferentes harinas de pescado llamadas A y B.

La digestibilidad proteica *in vitro* para los ingredientes (DPI-24h) y las dietas (DPD-24h) con un homogeneizado de *L. vannamei* mostró un rango que va de 19.99 a 85.09 y de 34.51 a 48.98 respectivamente, y con el homogeneizado enzimático de *L. stylyrostris* el rango de digestibilidad fue de 9.52 a 80.61 y de 31.31 a 47.91.

Al utilizar el homogeneizado enzimático de *L. stylyrostris*, se encontró una correlación significativa ($p < 0.05$) entre la digestibilidad proteica de las dietas *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.76$, $r^2 = 0.57$, $p = 0.03$, $n = 8$), pero no entre la digestibilidad proteica los ingredientes *in vivo* e *in vitro* ($r = 0.46$, $r^2 = 0.21$, $p = 0.25$, $n = 8$). Sin embargo al eliminar la harina de trigo la correlación se mejora significativamente ($r = 0.87$, $r^2 = 0.75$, $p = 0.012$, $n = 7$).

Las correlaciones entre la digestibilidad proteica *in vivo* e *in vitro* para dietas y harinas con el homogeneizado enzimático de *L. vannamei*, no fueron significativas. Esto puede ser debido a que los valores encontrados para la digestibilidad *in vivo* no corresponden a lo encontrado en literatura, (Akiyama 1993).

Determinación de digestibilidad *in vitro* en dietas comerciales.

En el 2003, se evaluó la digestibilidad proteica *in vivo* de 9 alimentos comerciales producidos en México y se correlacionaron estos resultados con los de digestibilidad in Vitro obtenidos con el método del AOAC con pepsina diluida o con enzimas de camarón (Cruz-Suárez *et al* 2003). Los resultados mostraron que solo la digestibilidad in Vitro obtenida con enzimas de camarón tiene una buena correlación con la digestibilidad in vitro ($r=0.68$ $P=0.037<0.05$) con la siguiente ecuación de regresión $DAP=0.658*DCAM+61.9$. Al contrario la digestibilidad in Vitro medida con pepsina no tiene correlación con los valores obtenidos in vivo ($r=0.13$ $P=0.742>0.05$).

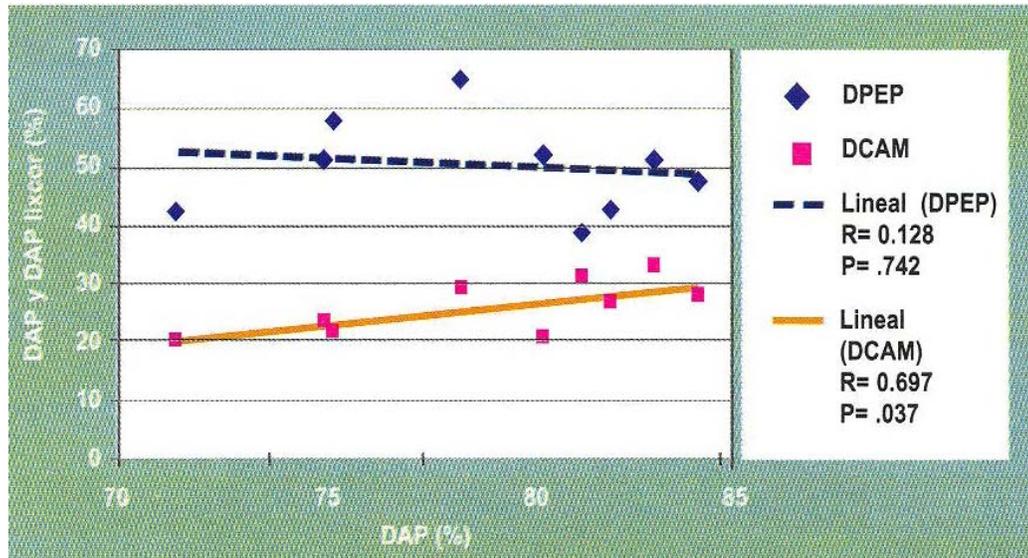


Figura 4.- correlación entre digestibilidad aparente in vivo (DAP) y digestibilidad *in vitro* con pepsina (DPEP) o digestibilidad in Vitro con enzimas de camarón (DCAM) (Cruz-Suárez *et al.*, 2003)

Referencias

- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier, London, 427 pp.
- A.O.A.C. 1990. Official Methods Analysis. 12th. Ed. Association of Official Analytical Chemists. E. L. Horwitz Ed. Washington, D.C.
- Akiyama, D., W. Dominy and A.L. Lawrence (1991) "Penaeid Shrimp Nutrition for the Commercial Feed Industry: REVISED" Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop" American Soybean Association. 80-98.
- Bradford, M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem., 72:248-254.
- Brown P., E. Robinson, A. Clark and A.L. Lawrence. (1989) "Apparent Digestible Energy Coefficients and Associative Effects in Practical Diets For Rid Swamp Crayfish", Journal of The World Aquaculture Society Vol.20 (3):122 - 126
- Carrillo O. F., (1994). "Producto multienzimático del hepatopáncreas de camarón: reactivo y suplemento dietético". Memorias del Segundo simposium internacional de nutrición acuícola. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León del 7 al 9 de Noviembre.
- Clark J., K.R. Murray, and J.R. Stark. (1986). "Protease development in dover sole [*Solea solea* (L)]". Aquaculture, 53:253-262.
- Cruz-Suárez, L.E., Nieto-López, M.G., Ricque-Marie, D. 2003. Un nuevo método de digestibilidad proteica *in vitro* para el control de calidad de ingredientes y alimentos para camarón. Panorama Acuicola. Mzo.-Abril, 2003. 12-13.
- Dimes L. and N. Haard (1994). "Estimation of protein digestibility. I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*)". Comp. Biochem. Physiol. 108A:349-362.
- Erlanger B.F., N. Kokowsky and W.Cohen (1961). "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin". Archives of Biochemistry and Biophysics 95:271-278.
- Ezquerro M., F. García-Carreño, and O. Carrillo (1997b). " *In vitro* digestibility of dietary protein source for white shrimp (*Penaeus vannamei*)". Aquaculture. In press.
- Ezquerro M., F. García-Carreño, R. Civera, and N. Haard (1997a). " pH-stat method to predict digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*)". Aquaculture 157:249-260.
- Hajen W., R. Beames, D. Higgs and B. Dosanjh. (1993) "Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 1. Validation of technique", Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. Aquaculture, 112: 321-332.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol., 30:219-310.
- Lan C. and B. Pan, 1993. *In vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture, 109:59-70.
- Lazo, J. P. (1994) "Evaluation of several *in vitro* enzyme assays for estimating *in vivo* apparent protein digestibility by the pacific white shrimp *Penaeus vannamei*." Thesis Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College 62 p.
- Lee P. and A.L. Lawrence, (1997) Digestibility. Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, Vol. 6 (World Aquaculture society. Baton Rouge, Louisiana 70803, USA. ISBN: 1-8888-07-00-8. Pp 194-259
- Mendoza, A. R. (1994). "Metodos para evaluar la digestibilidad proteica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos." Memorias del primer simposium internacional de nutrición y tecnología de alimentos para acuicultura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Moughan P. J., J. Schrama, G.A. Skilton and W.C. Smith (1989) "*In vitro* determination of Nitrogen digestibility and lysine availability in meat and bone meals and comparison with *in vivo* ileal digestibility estimates. J. Sci. Food Agric. 47:281-292.
- Nieto-López M. G., Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D., Pike I. y Ezquerro B. M., 1998. Digestibilidad *in vivo* de harinas de pescado de diferente calidad en alimentos para camarón y su correlación con valores de digestibilidad *in vivo* en salmónidos, e *in vitro* con enzimas de camarón. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, La Paz, B.C.S. México, del 15 al 18 de Noviembre.
- Nieto López Martha Guadalupe, 2003. Desarrollo de una técnica de digestibilidad *in vitro* para el control de calidad de harinas de pescado y alimentos para camarón. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas
- Nieto-López M. G., Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D. y Ezquerro B. M., 2005. Técnica de digestibilidad *in vitro* en ingredientes y alimentos para camarón. Revista CIENCIA-UANL, Vol 8, No. 1, Enero-Marzo 2005. 371-378.
- Olley, J. and Pirie R. 1966. The pepsin digestibility method at low pepsin strengths. Int. Fisch. News, 5:27-29.

- Olsen (1969) "Pepsin Digestibility Test (Torry Modificado)." Memorias seminario internacional sobre Calidad de harinas de pescado en nutrición animal acuícola y pecuaria. Vol II, Compilado de técnicas de análisis. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad autónoma de Nuevo León. 16-17 Noviembre.
- Romero J.J. & J.A. Manríquez, (1993). "Esfuerzos Desarrollados en Chile para Disminuir el Impacto Ecológico de la Alimentación en Centros de Cultivo de Peses. 10pp. Seminario Internacional Acuicultura y Medio Ambiente. Santiago, 2-3 Septiembre de 1993. Fundaión Chile. 189pp.
- Salinas Miller América. Digestibilidad *in vivo* de materia seca, proteína y energía de ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de dietas para camarón *L. vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Recursos Alimenticios y Producción Acuícola. Datos sin publicar.
- Digestibilidad *in vivo* de materia seca y proteína de ingredientes comúnmente utilizados en la formulación de dietas para camarón *Litopenaeus stylirostris*. Tesis de licenciatura en Biología. América Salinas Miller. Septiembre, 2000.
- Tecator, 1987. Determination of Kjeldahl Nitrogen Content with Kjeltac System 1026. Application note AN 86/87 (1987.02.18).

Anexo 1

Método de digestibilidad con pepsina

El método de digestibilidad con pepsina es llevado a cabo de acuerdo con las recomendaciones de la estación de investigación Torry.

1. Se utiliza un agitador con movimiento horizontal
2. Se muele todo el material y se tamiza a través de una malla 30. Esto es esencial para poder obtener resultados reproducibles.

Aparatos y materiales a suministrar.

1. Incubador a 45°C con agitación.
2. Embudo Buchner de 150mm.
3. Papel filtro Schleider and Schull 589² 180 mm.
4. Frasco de vidrio con la tapa de rosca de 200 cc para poner la muestra.

Reactivos

1. Pepsina 1:10,000 (almacenada en refrigeración y seca) Merck Catálogo No. 7190.
2. 0.075N HCL (6.3cc cone HCL liter)
3. Solución de pepsina al 0.0002% /HCL preparada el mismo día del análisis(pepsina 1:10,000 disuelta en HCL 0.075N)

Procedimiento

1. Moler y pesar con precisión 1 g. de harinas de pescado dentro de un frasco de vidrio con tapa de rosca de 200 cc. Adicionar 150 cc de la solución al 0.0002% de pepsina-HCL (reactivo 3) y calentarlo a 42- 45°C.
2. El frasco es cerrado y colocado en una incubadora con agitación a 45°C.
3. la muestra es incubada durante 16 horas con agitación constante.
4. Se filtra en un embudo Buchner a través de un papel filtro Schleider and Schull 589². Lava adecuadamente con agua caliente
5. El filtro con el residuo es transferido a un matraz Kjeldhal de 500 cc y digerido a corde al método Kjeldhal ordinario.

Calcular como % de nitrógeno residual A

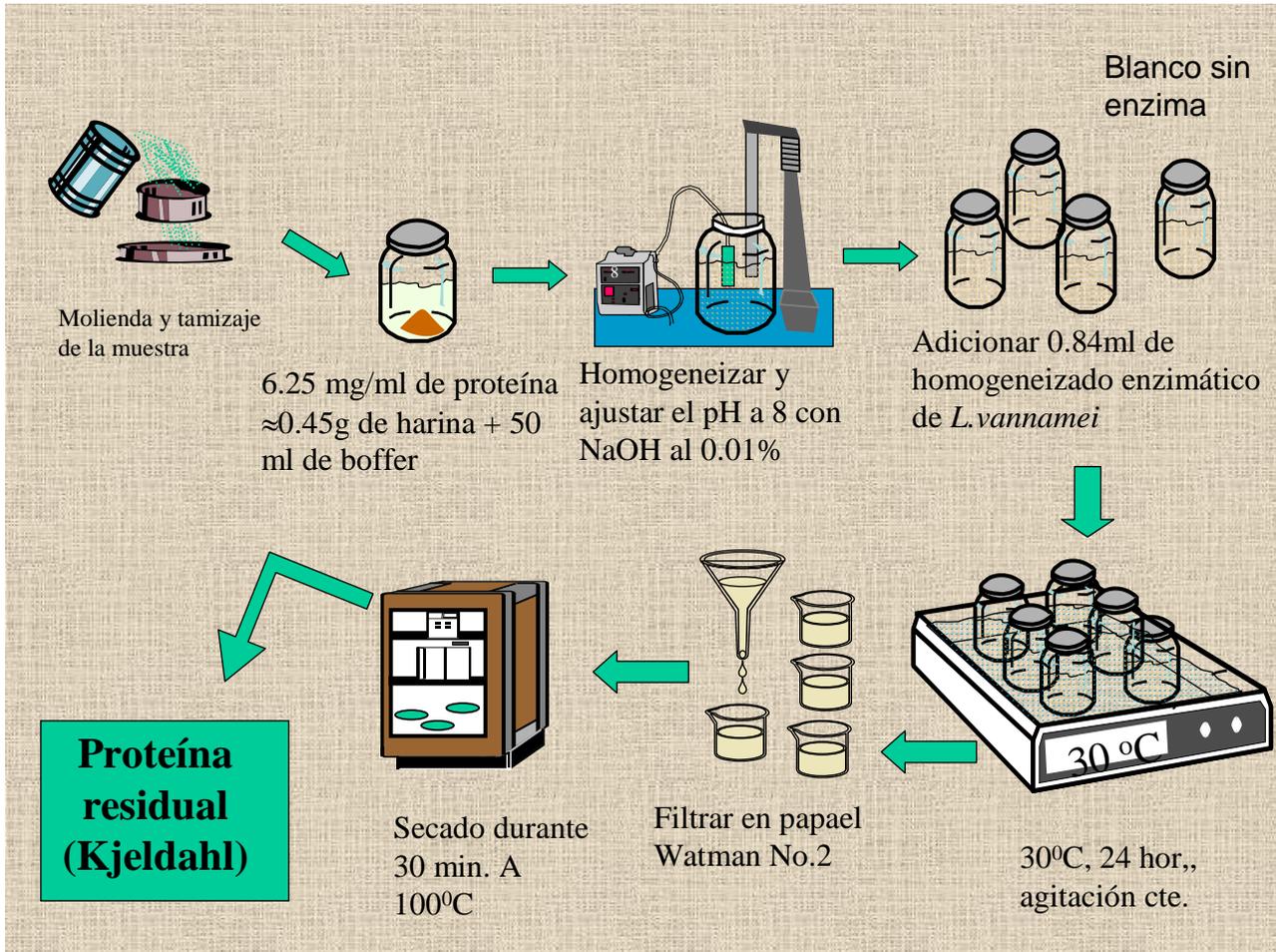
6. Preparar y conducir simultáneamente una determinación de nitrógeno insoluble en ácido idéntica en todos los aspectos pero sin la adición de pepsina (150cc reactivo 2).

Calcular como % de nitrógeno residual B

7. digestibilidad con pepsina=
$$\frac{\% \text{ de nitrógeno residual B} - \% \text{ de nitrógeno residual A}}{\% \text{ de nitrógeno residual B}}$$

Anexo 2

(Nieto-López, 2003)



**Métodos Utilizados por el Centro de Investigaciones Marinas y Facultad de Biología
Universidad de La Habana, Cuba para la Medición de Digestibilidad *in vitro* para Camarón**

Olimpia Carrillo F. *, A.B. Forrellat, L.T. Estévez
Laboratorio de Genética, Nutrición y Sistemática Molecular
Centro de Investigaciones Marinas y Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.
Teléfono: (537) 8309821 E-mail: olimpia@fbio.uh.cu

Introducción

En este método se emplea un producto multienzimático obtenido del hepatopáncreas de camarón (Hepatopancreatina). Se sustituye el sistema multienzimático descrito por Hsu *et al.* (1977) por la hepatopancreatina a una concentración de 6 mg/mL, el tiempo de hidrólisis de 10 minutos y la temperatura se ajusta a 37 °C.

Obtención de "Hepatopancreatina" (HP)

La HP es obtenida de acuerdo al procedimiento descrito en la Patente de Invención (Carrillo *et al.* 1994). Se utilizan animales adultos a los cuales se les extrae el hepatopáncreas. El conjunto de hepatopáncreas se homogeneiza en frío durante 15 segundos en tampón fosfato 10 mmol/L, pH 7.5. Posteriormente, se centrifugan 14,000 g a 4°C durante 20 minutos. La fase lipídica y los restos celulares se eliminan, la fase acuosa se filtra por lana de vidrio y se liofiliza.

El liofilizado resultante se resuspende y dializa a 4°C durante 48 horas. El liofilizado se concentra con polietilenglicol y se liofiliza de nuevo. Cada una de las etapas se controla mediante la determinación de actividad proteolítica por el método de Anson en 1938.

Técnicas empleadas para el control de la actividad enzimática de la Hepatopancreatina y su estabilidad en el tiempo

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas para expresar la actividad enzimática como actividad específica se realizó por el método de Bradford (1976).

Determinación de actividad proteolítica total

Se determinó por los métodos de Anson (1938) y García-Carreño y Haard (1993).

Para la técnica de Anson se utilizó como sustrato hemoglobina al 2%, pH 8 previamente desnaturalizada con urea y se incubó a 35 °C con las soluciones de enzima durante 30 minutos. La reacción se detuvo por adición de ácido tricloroacético al 5%. Los productos de la reacción se determinaron mediante la absorbancia a 650 nm después de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de transformar un micromol de tirosina en un minuto, en las condiciones del ensayo.

Para la técnica de García-Carreño y Haard se empleó azocaseína al 1% en Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.5. La mezcla de reacción consistió en 500 µl del tampón, un volumen de la solución de enzima equivalente a 30 µg de proteína y 500 µl del sustrato. La mezcla de reacción se incubó durante 10 minutos a 25 °C y se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 20%. La liberación del grupo azo se determinó por la absorbancia a 366 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como el cambio de absorbancia por minuto, por mg de enzima.

Determinación de la actividad enzimática tipo tripsina

La determinación de la actividad enzimática tipo tripsina (E.C.3.4.21.4) se realizó por el método descrito por Erlange *et al.* (1961). El sustrato sintético empleado fue α -N-benil-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) 1 mmol/l preparado en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y tampón Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.5 conteniendo 20 mmol/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se incubó a 37 °C. La mezcla de reacción consistió en 1.25 ml de sustrato y 10 µl de la solución de tripsina (1 mg/ml), como control o hepatopancreatina a 0.21 mg/ml, que se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo con ácido acético al 30%. La cantidad de p-nitroanilida liberada durante la reacción, se determinó por la medición de la absorbancia a 410 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µmol de p-nitroanilida producida por minuto.

Determinación de la actividad enzimática tipo quimotripsina

La actividad tipo quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) se determinó por el método continuo descrito por Delmer *et al.* (1979). El sustrato sintético empleado fue succinil-alanina-prolina-fenilalanina-nitroanilida (SAAPNA) 0.02 mmol/l, preparado en tampón Tris-HCl 50 mmol/l, pH 7.5 conteniendo 20 mmol/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La mezcla de reacción consistió en 700 µl de la solución de sustrato y 10 µl de la solución de quimotripsina (1 mg/ml) como control o 70 µl de Hepatopancreatina a 0.21 mg/ml. Se empleó espectrofotómetro Beckman computarizado con programa cinético y se registraron los incrementos de absorbancia a 410 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como 1 µmol de p-nitroanilida producido en un minuto.

Efecto de la capacidad de tamponamiento sobre la digestibilidad proteica

Se determinó la capacidad de tamponamiento de 6 ingredientes (harina de atún mexicana, harina de pescado (Kri, Sea Lac y Zapata), harina de langostilla y harina de soya, empleados en la elaboración de dietas para camarones mediante la cuantificación de la cantidad de HCl 0.01 mol/L consumido para disminuir el pH de 50 ml de una suspensión proteica (6.25 mg/ml) desde 8 hasta 6.45 durante 10 minutos. El volumen de ácido consumido es una medida de la capacidad de tamponamiento de la solución (Hsu *et al.* 1977).

Procedimiento:

Preparación de las muestras: Todas las muestras de ingredientes y dietas se pulverizan y se pasan por un tamiz de 80 mallas (180 µm).

Sustrato: Se preparan 15 ml de una suspensión de la muestra con una concentración de 6.25 mg/mL de proteína ajustada a pH 8.0 con agitación constante y a 37 °C en un baño termostático. Para el ajuste de pH se utiliza HCl 0.1 N o OHNa 0.1 N según se requiera.

Preparación de Enzimas: Se prepara una solución del producto multienzimático a una concentración de 6 mg/mL debe prepararse fresca cada día.

Desarrollo del método:

A los 15 mL de la suspensión de la muestra, se le añaden 5 mL de la solución enzimática con agitación constante y temperatura controlada a 37 °C. La disminución de pH se registra cada minuto hasta completar 10 minutos.

El método se fundamenta en la variación de pH a 37 °C, que experimenta una solución que contiene proteínas en los 10 minutos siguientes a la adición del sistema enzimático y el valor de pH se correlaciona con la digestibilidad *in vivo* mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$y = 299.30 - 30.30 x$$

Donde:

x = pH a los 10 minutos

También pueden expresarse los resultados relativos a la caseína, considerando la caseína como un 100% de digestibilidad, lo que elimina las diferencias inherentes a cambios en la actividad proteolítica del producto multienzimático.

Parámetros de control de calidad del método analítico:

La confiabilidad de la técnica bajo las condiciones antes mencionadas, se comprobó mediante la precisión de la misma a través de la determinación en el día y día a día que se expresaron en términos de coeficiente de variación (Burtis y Ashwood, 1996). Los resultados mostraron valores de coeficientes de variación inferiores al 5% por lo que se considera que tiene una buena precisión (Tabla 1).

Tabla 1. Precisión del método de digestibilidad *in vitro* (Hsu *et al.*, 1977 modificado por Forrellat, (1998).

Precisión	Valores de pH a los 10 minutos				F. calculada
	Método original 1		Método modificado 2		
	X±DS	CV (%)	X±DS	CV (%)	
En el día	6.59±0.17	2.57	6.50±0.07	1.07	5.89*
Día a día	6.63±0.18	2.76	6.63±0.16	2.52	1.27 n.s.

1 Sistema enzimático empleado: tripsina, quimotripsina, peptidasa

2 Sistema enzimático empleado: Hepatopancreatina

CV-coeficiente de variación expresado en porcentaje

*La prueba F se aplicó para comprobar si la precisión del método de digestibilidad *in vitro* se afectaba por el empleo de un sistema enzimático diferente al que emplea el método original. La F se refiere a la comparación de las varianzas en el día.

La precisión del método no varió cuando se utilizó Hepatopancreatina como sistema enzimático en sustitución de la mezcla de enzimas puras informadas por Hsu *et al.* (1977).

Correlación con digestibilidad *in vivo* y con otros parámetros de rendimiento

Para la determinación de digestibilidad *in vivo*, se prepararon las dietas experimentales de acuerdo a lo informado por Ezquerro *et al.* (1997). Las dietas elaboradas contenían un 40% de proteínas y en cada una se sustituyó un 15% de la harina de pescado por el ingrediente a evaluar según lo descrito por Cho y Slinger (1979) y 1% de óxido de cromo (Tacon y Rodríguez, 1984). Se trabajó con juveniles de *L. vannamei* de 3.5 - 4.0 g. En cada unidad experimental se colocaron 10 camarones (3 réplicas por tratamiento) que fueron alimentados a voluntad 2 veces al día durante 30 días después de un período de aclimatación de 3 días (Tabla 2). Como puede observarse los métodos *in vitro* empleados en ocasiones sobrestimaron el valor de digestibilidad, como en la harina de atún mexicana, y las harinas de pescado Sea Lac y Zapata, mientras que en el caso de la harina de soya, los métodos *in vitro* subestimaron la digestibilidad. La subestimación de los valores de digestibilidad en las fuentes proteicas de origen animal, pudiera deberse en este caso a la concentración de minerales y al tipo de mineral que pueden ejercer un efecto de tamponeamiento o amortiguamiento que afecte la variación de pH.

Tabla 2. Comparación entre los porcentajes de digestibilidad *in vivo* (método del óxido crómico) e *in vitro* (método de Hsu *et al.* modificado por Forrellat, (1998).

Ingredientes	Digestibilidad <i>in vivo</i>	Digestibilidad <i>in vitro</i>	
		A	B
Harina de atún chilena	83.56b	80.23b	80.31b
Harina de atún mexicana	63.57c	73.56b	73.60b
Harina de pescado	86.61b	81.14b	81.20b
Harina de pescado (Sea Lac)	67.08c	72.96b	72.10b
Harina de pescado (Zapata)	67.13c	75.08b	75.15b
Harina de langostilla	66.39c	59.02c	59.10c
Harina de soya	90.93a	82.65b	82.73b
Caseína	99.00a	99.93 ^a	100 ^a
Sx	0.02164**	0.03533**	0.02257**

Los valores representan la media de tres determinaciones.

A- porcentajes de digestibilidad *in vitro* calculados según la ecuación ($y=299.3-30.3X$) determinada por el análisis de regresión entre el valor de pH a los 10 minutos y los porcentajes de digestibilidad *in vivo* ($r^2 = 0.73$).

x= valor de pH a los 10 minutos.

Sx= error estándar de la media.

B- porcentajes de digestibilidad *in vitro* relativa a la caseína (Hsu *et al.*, 1977).

Los datos de digestibilidad de ingredientes y dietas comerciales corresponden a trabajos realizados en colaboración con el Centro de Investigaciones Pesqueras de Cuba (Galindo *et al.*, 2001; Fraga *et al.*, 1996; Forrellat *et al.*, 1988) y el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Baja California Sur, México (Vega-Villasante *et al.*, 2002).

Se han realizado también evaluaciones a otras instancias del Ministerio de la Industria Pesquera de Cuba y el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana (Bilbao *et al.*, 2000).

En la tabla 3, se resumen las que a nuestro juicio, constituyen las principales ventajas y desventajas del método de Hsu *et al.* (1977) modificado por Forrellat *et al.* Ezquerro *et al.*, (1998) compararon técnicas de digestibilidad *in vitro* que se basan en variaciones en el pH durante el ensayo, si bien los

resultados alcanzados fueron superiores con la técnica de pH stat, ésta requiere de un equipamiento relativamente costoso y de personal calificado por lo que la técnica que se presenta en esta ficha puede considerarse una alternativa cuando se requiere evaluar las afectaciones en la digestibilidad producidas por modificaciones en un proceso tecnológico de elaboración de alimentos o evaluar grandes volúmenes de muestras.

Tabla 3. Ventajas y desventajas del método de Hsu *et al.* (1977) modificado por Forrellat *et al.*

Ventajas	Desventajas
Alta correlación con los métodos <i>in vivo</i>	Las sustancias con alta capacidad "bufferante" o amortiguadora de pH pueden alterar los resultados
Es sensible, repetible y reproducible	El producto multienzimático utilizado (Hepatopancreatina) varía de un lote a otro ya que aun no es un producto comercial.
Capaz de detectar la presencia de inhibidores de proteasas	En ocasiones sobreestima el valor digestibilidad de las fuentes de proteína de baja digestibilidad.
Capaz de detectar cambios en la digestibilidad debidos a los tratamientos tecnológicos	
Consume muy poco tiempo	
Posible su utilización para el control de calidad de alimentos	

Recomendaciones para ejecutar el método.

1. En el desarrollo de este método es importante mantener las condiciones de agitación continua y temperatura constante durante la determinación de pH.
2. El producto multienzimático utilizado debe controlarse mediante la determinación de actividad proteolítica cada vez que se cambia de lote.

Referencias

- Bilbao, T., Fuertes, S., Abreu, M., González, N., Ledesma, L y Carrillo O. 2000. Cambios en la calidad proteica del frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*) y del chícharo (*Pisum sativum*). Efecto del almacenamiento y los tratamientos caseros. *Alimentaria* 134: 151-156.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dy binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Burtis, C.A.y Ashwood, E.R.1996. Tiez fundamentals of Clinical Chemistry. 4th Ed. 766 pp. Cap13, pag.182.
- Carrillo, O., Forrellat, A. y González, R. Procedimiento de obtención de hepatopancreatina de camarón. Patente de Invención C12N9/94. 1994.
- Cho, C. y Slinger, S. 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs of rainbow trout. In: Proc. World. Symp. On Finfish. Nutrition and Fish feed Technology, Hambur 20-23 June 1978, vol. II, Berlin pp 241-247.
- Delmer, E.G., Largman, C., Bodrick, J.W. Geokas, M.C. 1979. A sensitive new substrate for chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 99:316-320.
- Ezquerro, J.M. y García Carreño, F. 1997. Evaluation of pH stat methods for estimating *in vivo* protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 5:36-40.
- Ezquerro, J.M., García Carreño, F. y Carrillo, O.1998. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 163: 123-136.
- Forrellat, A. El hepatopáncreas de camarón como fuente de enzimas para la camaronicultura 1998. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana, Cuba.
- Forrellat, A. Gonzalez, R. y Carrillo, O. 1988. Evaluación de la Calidad Proteica de Alimentos para Camarones. *Revista de Investigaciones Marinas*.9: 71-80.
- Forrellat, A., González, R., Carrillo, O., Collazo, T. y Gallardo N. 1990. Caracterización y estabilidad de la hepatopancreatina de *Penaeus schmitti* para ser utilizada como reactivo biológico. *Rev. Inv. Marinas* 11(1): 81-86.
- Fraga, I., Galindo, J., Reyes, R., Álvarez, S., Gallardo, N., Forrellat, A. y González, R. 1996. Evaluación de diferentes fuentes proteicas para la alimentación de camarón blanco *P. schmitti* Rev. Cubana Investigaciones Pesqueras 20(1): 6-9.
- Galindo, J., Fraga, I., De Arazosa, M., Fajer, E., González, R., Forrellat, A. 2001. Evaluación de diferentes niveles de proteína en el crecimiento de juveniles de camarón rosado *P. notialis*. *Rev. Inv. Marinas* 22(1): 39-44.
- García-Carreño, F.L. y Haard, F. (1993). Characterization of protease classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and drayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Bochim.* 17: 97-113.
- Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D., y Miller, G.A. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*42:1269-1273.
- Tacon, A.G. y Rodríguez, A.M.P. (1984). Comparison of chromic oxide, crude fibre, polyethylene and acid-insoluble ash as dietary markers for the estimation apparent digestibility coefficients in rainbow trout. *Aquaculture* 43:391-399.
- Vega-Villasante, F., Nolasco, H., Adyary Fallarero, Carrillo-Farnés, O. Biochemical characterization of crude extract from *Pleuroncodes planipes* (Crustacea: Galatheididae) as potential feed additive, considerations for a new fishery along the Mexico Pacific Coast. *Hidrobiológica*, Vol. 12 (2): 119-128, 2002.

ANEXO 1. Publicaciones del grupo

Artículos, tesis o proyectos del grupo en los que se utiliza esta técnica

Tesis de doctorado defendidas en el tema del subproyecto

Forrellat, A. El hepatopáncreas de camarón como fuente de enzimas para la camaronicultura (1998)
González, R. "Enzimas digestivas del camarón blanco *Penaeus schmitti*" (1998)

Publicaciones en las que se utilizó esta técnica

- Bilbao, T., Fuertes, S., Abreu, M., González, N., Ledesma, L and Carrillo O. Cambios en la calidad proteica del frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*) y del chícharo (*Pisum sativum*). Efecto del almacenamiento y los tratamientos caseros. Alimentaria 134: 151-156 2000.
- Ezquerro, J.M., F. García Carreño y O. Carrillo. *In vitro* digestibility of dietary protein sources for white shrimp (*Penaeus vannamei*). Aquaculture 163: 123-136 1998.
- Carrillo, O. Regulación de la Digestión en Camarones. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola (1998), México.
- Forrellat, A., González, R., Carrillo, O. Collazo T. y Gallardo N. Caracterización y estabilidad de la hepatopancreatina de *Penaeus schmitti* para ser utilizada como reactivo biológico. Rev. Inv. Marinas 11(1) : 81-86 1990.
- Forrellat, A. González, R. y Carrillo, O. Evaluación de la Calidad Proteica de Alimentos para Camarones. Revista de Investigaciones Marinas. IX:71 1988.
- Peniche, C., Howland, I., Carrillo, O., Zaldívar, C. y Arguelles-Monat, W. "Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules". Food Hydrocolloids 18:865-871 2004.

Proyectos del grupo en que se ha utilizado esta técnica

Titulo del Proyecto: Estudio del manejo de la alimentación de *Penaeus schmitti* en la etapa de engorde utilizando marcadores bioquímicos del estado nutricional
Entidad Financiadora: Fondos de Investigación Universitaria (Proyecto Alma Mater)
Duración desde: Septiembre de 1996 Hasta: Septiembre de 1998
Investigador Principal: Olimpia Carrillo Farnés

Titulo del proyecto: Obtención de un preparado multienzimático a partir de hepatopáncreas de camarón blanco *Penaeus schmitti*
Entidad Financiadora: Programa de Cultivo Intensivo de Camarón, Academia de Ciencias de Cuba
Duración Desde: Enero de 1990 Hasta: Enero de 1994
Investigador Principal: Olimpia Carrillo Farnés

Titulo del Proyecto: Caracterización bioquímica y utilización de extractos crudos para la preparación de suplementos enzimáticos a base de la langostilla roja *Pleuoncodes planipes*, como aditivo alimentario en dietas para camarón:

Entidad financiadora: CONACYT, México

Duración: Abril de 1998 Hasta: 2000

Investigador Principal: Olimpia Carrillo Farnés

'Aislamiento de péptidos bioactivos de la langostilla roja (*Pleuoncodes planipes*) y su efecto como aditivo alimentario en el crecimiento de postlarvas de camarón.

Entidad Financiadora: SIMAC (MÉXICO)

Duración: Enero 2000 Hasta: Enero 2002

Investigador Principal: Fernando Vega Villasante

Métodos Utilizados por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) para la Medición de Digestibilidad *in vitro* para Camarón

Héctor Nolasco

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Mar Bermejo # 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La Paz, 23090, B.C.S., Teléfono: 01 612-123-84-84; E-mail: hnolasco04@cibnor.mx

Introducción

Los principales polímeros presentes en los alimentos para camarón son proteínas, carbohidratos y lípidos, los cuales representan también el mayor porcentaje en peso de la formulación (Akiyama *et al.*, 1991). La digestión que ocurre en el tracto digestivo del camarón permite la obtención de los monómeros alimentarios tales como los aminoácidos, azúcares y ácidos grasos (Nolasco *et al.*, 2000). Estos monómeros, además de los que ya vienen libres en la dieta, representan la principal fracción que potencialmente será asimilada y metabolizada a partir del alimento formulado y del alimento natural disponible (Akiyama *et al.*, 1991; Shiau, 1997).

Se han desarrollado métodos de digestibilidad *in vitro* de proteína para tratar de sustituir a los métodos de digestibilidad *in vivo* (Marleta, *et al.*, 1992; Forrellat, 1998), sin embargo, estos hasta ahora han sido de mayor utilidad como herramientas complementarias para la predicción de la digestibilidad, así como la obtención de la correlación con la digestibilidad *in vivo*, de los alimentos y de los nutrientes utilizados para su formulación.

La tendencia de modificación en los métodos de digestibilidad de proteína *in vitro* es sustituir la enzima (Despamde, 1987) o el sistema multienzimático (Hsu, *et al.*, 1977) de origen de mamíferos o de microorganismos, por enzimas del propio organismo en estudio (Forrellat, 1998), de tal manera que los resultados de digestibilidad de la proteína de un ingrediente o de un alimento sean obtenidos con sus propias enzimas.

En virtud de que la principal especie cultivada en México y en América es el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Cuzon *et al.*, 2004), la preparación enzimática a utilizarse para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se propone sea obtenida de esta especie de camarón. Si el método quiere aplicarse para otra especie es indispensable o recomendable cambiar al correspondiente sistema enzimático; así mismo, se recomienda conocer la fisiología digestiva del organismo.

La digestibilidad de lípidos en alimentos para organismos acuáticos, y en particular para el camarón ha recibido poca atención, y hasta donde sabemos, no se cuenta actualmente con un método oficial para hacer este tipo de determinaciones, lo cual sería de utilidad para seleccionar las fuentes lipídicas a utilizar en los alimentos balanceados. El presente estudio describe el método desarrollado en el Grupo de Nutrición del CIBNOR para medir la digestibilidad *in vitro* de lípidos, para lo cual, se realizó previamente la caracterización de las enzimas del organismo, a fin de poder establecer las condiciones necesarias en el protocolo de digestibilidad *in vitro*.

Fuente de enzimas para los estudios de digestibilidad *in vitro*

Las enzimas digestivas utilizadas para técnicas de digestibilidad *in vitro* para camarón, son obtenidas a partir de organismos juveniles o pre adultos de (10-17 gr), en estadio C de intermuda (Vega-Villasante *et al.*, 1999, 2000; Fernández *et al.*, 1999) y sacrificados por congelación, a una misma hora establecida en función del ritmo circadiano de enzimas digestivas (Nolasco y Vega-Villasante, 2000; López-López *et al.*, 2003), que corresponda a un pico de actividad enzimática.

Diseño del Método de Digestibilidad *in vitro*

Preparación de la mezcla enzimática de camarón

Los camarones son pesados de manera individual utilizando una balanza analítica OHAUS, para calcular su peso promedio. La glándula digestiva (o hepatopáncreas, HP) es extirpada y pesada para calcular el Índice Hepatosomático. El conjunto de HP se pesa y se liofiliza. Para la preparación de la solución enzimática, el liofilizado se homogeniza (en licuadora o mortero) y se rehidrata con agua destilada. Después de la rehidratación y re-homogenización en el Potter, el extracto se clarifica por centrifugación (23,000 x *g*, 10 min.): la fracción lipídica es removida, el sobrenadante es recuperado y almacenado a -20°C hasta su uso. Esta fracción es considerada como el extracto crudo (EC). El micrométodo de Bradford (1976) se utiliza para determinar la cantidad de proteína, utilizando albúmina bovina con estándar.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática en el EC se determinó a fin de conocer las unidades de enzima presentes por unidad de volumen y por mg de proteína.

La actividad de proteasa es determinada de acuerdo con Divakaran y Ostrowski (1990) usando azocaseína (1% en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La actividad de proteasa se expresa como el número de unidades de proteasa por mg de proteína (una unidad de proteasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar por minuto 0.01 unidades de D.O a 440 nm).

La actividad de lipasa es determinada de acuerdo con Versaw *et al.* (1989) usando β -Nafthil caprilato (100 mM en DMSO) como sustrato. La actividad lipasa se expresa como el número de unidades de lipasa por mg de proteína (una unidad de lipasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar por minuto 0.01 unidades de D.O a 540 nm).

La actividad de amilasa es determinada de acuerdo con Vega-Villasante *et al.* (1993) usando almidón soluble (1% en Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5) como sustrato. La actividad amilasa se expresa como el número de unidades de amilasa por mg de proteína (una unidad de amilasa se definió como la cantidad de la enzima requerida para incrementar por minuto 0.01 unidades de D.O a 550 nm).

Caracterización de las enzimas

A fin de determinar las propiedades de las enzimas del EC, se realizaron ensayos para determinar la temperatura óptima y estabilidad térmica, pH óptimo, efecto de salinidad, efecto de iones divalentes, efecto de inhibidores y activadores.

Relación enzima-sustrato y tiempo de reacción

A fin de establecer la relación adecuada de enzima y sustrato, se realizaron pruebas para establecer el número de unidades de enzima requeridos para la cantidad de sustrato utilizado, de tal manera de garantizar un exceso de sustrato durante las determinaciones de digestibilidad. Así mismo, se hicieron ensayos para establecer el tiempo de digestión para cada prueba, tratando de llegar a un tiempo de ensayo que fuera práctico.

Digestibilidad *in vitro* de proteína (Hsu *et al.*, 1977, modificado)

El método de Hsu (pH shift, caída de pH) fue modificado substituyendo el sistema multienzimático (tripsina porcina 1.6 mg/mL, quimotripsina 3. mg/mL y peptidasa 0.502 mg/mL), por 210 U de proteasa de camarón. Así mismo, la digestibilidad es determinada mediante el uso de la velocidad de cambio de pH (-delta de pH/min), en lugar de considerar únicamente el cambio de pH obtenido después de los 10 minutos de incubación (unidades de pH en 10 minutos).

Procedimiento:

- Moler los ingredientes o alimentos y tamizarlos a 250 μ m.
- Colocar 6.25 mg de proteína /mL (volumen de reacción, 50 mL).
- Ajustar el pH a 8.0.
- Agregar 3 mL de EC (210 U proteasa de camarón).
- Incubar a 25 °C, en agitación.
- Registrar el cambio de pH cada 30 s.
- Construir la curva de cambio de pH por unidad de tiempo.
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (cambio de pH/min.).
- Se puede utilizar a la caseína como proteína de referencia (u otra harina o alimento de referencia).
- Expresar la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$D = (\text{Cambio de pH/min. por la hidrólisis de la muestra problema} \div \text{Cambio de pH/min. por la hidrólisis de la referencia}) \times 100$

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de cambio de pH, en lugar de cambio total de pH. Las desventajas del método son que la digestibilidad de proteína se calcula a partir del cambio de pH, producto de la liberación de protones que pueden ser de diferente origen. El método solo considera la velocidad inicial de hidrólisis y no la capacidad de digestión de la proteína total de la muestra. El cambio de pH pudiera tener un ligero efecto en la actividad de las enzimas.

El método de Hsu fue también modificado por el grupo de la Universidad de La Habana (Forrellat, 1998) quienes lo han aplicado, con una buena correlación respecto a la digestibilidad *in vivo*. La metodología propuesta aquí incluye modificaciones a los protocolos antes señalados.

Digestibilidad *in vitro* de proteína (Ezquerria *et al.* 1998, modificado)

La modificación del método de Ezquerria (pH stat) incluye el uso de 210 U de proteasa de camarón. Así mismo, la digestibilidad es determinada mediante el uso de la velocidad de consumo de NaOH 0.1 M. Se utiliza a la caseína como proteína de referencia (o una harina o alimento de referencia).

Procedimiento:

- Moler los ingredientes o alimentos y tamizarlos a 250 μm .
- Colocar 6.25 mg de proteína /mL (volumen de reacción, 50 mL)
- Ajustar el pH a 8.0.
- Agregar 210 U de proteasa de camarón.
- Incubar 5000 segundos, a 25 °C, en agitación.
- Registrar el consumo de NaOH.
- Construir la curva de consumo de NaOH por unidad de tiempo.
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (consumo de NaOH/seg) y calcular el consumo de NaOH/min.
- Utilizar a la caseína como proteína de referencia (o la harina o alimento de referencia).
- Expresar la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$D = (\text{Consumo de NaOH/minuto por la hidrólisis de la muestra problema} \div \text{Consumo de NaOH /min por la hidrólisis de la referencia}) \times 100$

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de consumo de NaOH para mantener el pH a 8.0. Las desventajas del método la digestibilidad de proteína se calcula a partir del consumo de NaOH, producto de la liberación de protones que pueden ser de diferente origen. El método solo considera la velocidad inicial de hidrólisis y no la capacidad de digestión del total de la proteína de la muestra.

El método de Ezquerria ha sido utilizado en el CIBNOR y la Universidad de Sonora quienes lo han aplicado, con una buena correlación respecto a la digestibilidad *in vivo*. La metodología propuesta aquí incluye modificaciones al protocolo antes señalado.

Digestibilidad *in vitro* de almidón

El método (pH constante, amortiguado) consiste en la digestión de almidón (o glucógeno), por la acción de las amilasas del camarón. El método está diseñado para medir la digestibilidad de almidones presente en ingredientes vegetales o el glucógeno de ingredientes animales o de los alimentos que los contengan. El principal componente polisacárido en los alimentos comerciales para camarón es el almidón, debido a la incorporación de harinas de trigo, sorgo, maíz, etc. Así mismo, harinas de pescado, calamar, etc., contienen polímeros de glucógeno en su composición.

Sin embargo, la inclusión de harinas de crustáceos en los alimentos, además de aportar glucógeno, aportan polisacáridos quitinosos de su exoesqueleto.

La actividad amilasa en camarón es considerablemente alta, respecto a la capacidad de hidrólisis de otros polisacáridos como la quitina o la celulosa. Lamentablemente, pocos trabajos comparativos se han desarrollado para determinar la capacidad de hidrólisis de polisacáridos y disacáridos respecto a la actividad amilasa.

Se propone como referencia el uso de almidón soluble de maíz, por su alta digestibilidad por las amilasas de camarón, cuando el sustrato es solubilizado por tratamiento térmico. Por lo tanto, el método puede utilizarse para medir la digestibilidad de almidón (y glucógeno) en ingredientes y alimentos que contengan este tipo de polímeros. Sin embargo, si el camarón posee la capacidad de hidrolizar otros polisacáridos, además del almidón y el glucógeno, la digestibilidad que se obtendrá, al aplicar este método, será la suma de las digestibilidades de todos los polisacáridos y disacáridos (presentes en la muestra) hidrolizables por las enzimas del camarón. Si se requiere conocer la digestibilidad *in vitro* de cada componente polisacárido, se requiere la separación de éstos de los ingredientes y los alimentos para determinar la digestibilidad por separado.

Una alternativa para evitar la separación de los polisacáridos para medir su digestibilidad por separado, es utilizar la(s) enzimas(s) semi-puras o puras del camarón como sistema enzimático.

Para el estudio comparativo de ingredientes o alimentos, sometidos a tratamientos térmicos similares durante su preparación, se puede dar un tratamiento en la autoclave (15 libras/pulg², 15 min) a las suspensiones antes de agregar la mezcla de enzimas (EC) para la prueba de digestibilidad.

Procedimiento:

- Moler los ingredientes o alimentos y tamizarlos a 250 µm.
- Colocar 1.2 g del ingrediente o alimento (2.4% p/v).
- 50 mL de buffer de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5).
- 1 hr de hidratación a 4 °C.
- Ajustar el pH a 8.0.
- Agregar 1.0 mL de EC (2000 U de amilasa).
- Incubar a 25 °C, con agitación rotatoria (Tumbling).
- Tomar muestras de 1 mL de la mezcla de reacción al tiempo cero (t₀) y cada 15 minutos durante 2 horas.
- Determinar azúcares reductores en la muestras por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).

Nota: si se utilizan muestras tratadas en autoclave, la velocidad de hidrólisis será mayor. Por lo que se puede disminuir a 250 U de amilasa en la mezcla de reacción, así como la toma de muestras cada 5 minutos durante 30 minutos.

Determinación de azúcares reductores (método de DNS) (Vega-Villasante *et al.*, 1993).

- 200 µl de carbonato de sodio (2 N).
- 1.5 mL del reactivo de DNS.
- 1mL de la muestra del vaso de digestión.

- 15 min de tratamiento en baño María en ebullición.
- 7.3 mL de agua destilada.
- 10 min de sedimentación.
- Abs 550 nm.

Cálculo de la digestibilidad

- Construir la curva de liberación de azúcares reductores por unidad de tiempo.
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (azúcares reductores/min.).
- Utilizar al almidón soluble de maíz como referencia (o la harina o alimento de referencia seleccionado).
- Expresar la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$D = (\text{Liberación de azúcares reductores/minuto por la hidrólisis de la muestra problema} \div \text{liberación de azúcares reductores/min. por la hidrólisis de la referencia}) \times 100$

En el caso de utilizar diferentes cantidades de enzima (U de amilasa), entre el insumo de referencia y el insumo problema, la fórmula debe incluir el incremento de azúcares reductores/unidades de enzima.

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de liberación de azúcares reductores, por acción de las enzimas del camarón sobre los polisacáridos y disacáridos (digeribles) presentes en la muestra. Las desventajas del método incluyen que la digestibilidad de carbohidratos representa la suma de digestibilidades de los polisacáridos presentes en la muestra. El método solo considera la velocidad inicial de hidrólisis y no la capacidad de digestión del total de los carbohidratos del ingrediente o alimento.

El método está siendo utilizado en el CIBNOR. No hay datos aún de correlación entre digestibilidad *in vitro* e *in vivo*.

Digestibilidad *in vitro* de lípidos

El método (pH stat) consiste en la digestión de lípidos, emulsificados, por la acción de las lipasas del camarón (Del Monte *et al.*, 2002, 2003). El método está diseñado para medir la digestibilidad de lípidos (aceites). Por lo tanto, su aplicación para medir la digestibilidad de la fracción lipídica de ingredientes y alimentos requiere la previa extracción de los lípidos totales para la preparación de la emulsión como sustrato.

Se propone como referencia el uso de tributirina, por su alta digestibilidad por las lipasas del camarón. Sin embargo, se puede buscar un triglicérido con ácidos grasos poli-insaturados y de cadena larga o un aceite de origen marino (aceite de pescado) como referencia, para pruebas de digestibilidad de insumos por organismos marinos. Para la digestibilidad de fosfolípidos se puede usar como referencia a la fosfatidilcolina.

Una alternativa para evitar la extracción de los lípidos, de los ingredientes y alimentos, es utilizar la metodología de la sección anterior (propuesta para la digestión de proteína) utilizando la(s) lipasa(s) semi-puras o puras del camarón como sistema enzimático.

Procedimiento:

Preparación de la emulsión

- 95 mL de agua destilada.
- 5 g de goma arábica.
- 4 g de aceite.
- Homogenización en licuadora por 10 min (o ultrasonicador, 2 min., 3 veces).
- Autoclave 15 lb/pulg², 15 min (opcional, para incrementar vida de anaquel del sustrato).

Digestibilidad

- 7 mL de tauracolato de sodio (20 mM, conc.final).
- 5 mL de la emulsión de aceite.
- 2 mL de NaCl (1 mM, conc. final).
- 1 mL de CaCl₂ (20 mM, conc. final).
- Mezclar.
- Ajustar el pH a 8.0.
- Agregar 500 µl de EC (50 Unidades de lipasa de camarón, medidas por el método de Versaw *et al.*, 1989).
- Incubar 1800 segundos, a 25 °C, en agitación.
- Registrar el consumo de NaOH.
- Construir la curva de consumo de NaOH por unidad de tiempo.
- Calcular la ecuación de la curva y encontrar el valor de la pendiente (consumo de NaOH/seg.) y calcular el consumo de NaOH/min.
- Utilizar a la tributirina como lípido de referencia (u otro lípido de referencia seleccionado).
- Calcular la velocidad de hidrólisis y la digestibilidad de acuerdo a la siguiente fórmula:

Velocidad de hidrólisis (Digestibilidad):

$$VH = \frac{(P-T) \times [NaOH]}{\text{Vol. Enzima} \times \text{Conc. de proteína}} \times 1000$$

Donde:

P = Consumo de NaOH por hidrólisis del sustrato (mL/min).

T = Consumo de NaOH del testigo (mL/min).

[NaOH] = concentración de NaOH (Molaridad).

Vol. enzima = volumen de la enzima (mL).

Conc. Proteína = Conc. de proteína de la solución enzimática (mg/mL).

1000: Factor de conversión a µmoles de NaOH.

El testigo se realiza de igual forma que el problema únicamente que se reemplaza la enzima por el mismo volumen de agua destilada. También puede utilizarse la misma solución enzimática pero inactivada previamente por tratamiento térmico (baño María a 100 ° C, 5 min.).

El equipo utilizado es un pH stat Metrohm (modelo 736 GP Titrino), con NaOH 0.1M. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo durante 1800 segundos a un pH constante (8 +/- 0.02 unidades de pH), tomando lecturas de NaOH consumido cada 300 seg.

Este método puede utilizarse también para expresar la actividad lipasa de extractos enzimáticos de diferente origen, utilizando uno o diferentes substratos en forma de emulsión.

Ahora para medir la digestibilidad relativa de un insumo lipídico respecto a otro utilizado como referencia, se utiliza la siguiente fórmula:

Digestibilidad relativa:

$$\text{Digestibilidad relativa} = \frac{\text{VH lípido problema}}{\text{VH lípido referencia}} \times 100$$

Este método tiene la ventaja de ser rápido y se basa en la velocidad de consumo de NaOH para mantener el pH a 8.0 (o al pH de trabajo seleccionado). El consumo de NaOH se considera como la velocidad de hidrólisis del lípido y esta como su digestibilidad.

Aplicación del método de digestibilidad *in vitro* de lípidos

Utilizando el procedimiento anterior se obtuvieron los resultados de velocidad de hidrólisis y digestibilidad relativa para el camarón blanco *Litopenaeus vannamei* de diferentes insumos lipídicos.

La Fig. 1 muestra el tipo de gráfico que se genera, el cual, permite calcular la ecuación de la recta y obtener el consumo de hidróxido por unidad de tiempo.

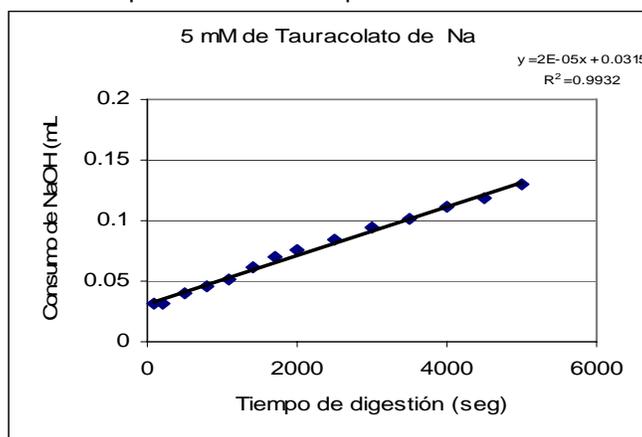


Figura 1. Digestibilidad de tributirina. (La pendiente de la recta indica el consumo de NaOH por unidad de tiempo)

El método *in vitro* para medir la digestibilidad de lípidos, tiene al menos 4 aplicaciones básicas: 1. Conocer la actividad lipasa utilizando substratos naturales, como triglicéridos y fosfolípidos. 2. Conocer la velocidad de digestión de diferentes insumos lipídicos por la especie, en función de su origen, composición, longitud de ácidos grasos asociados, calidad de los lípidos, etc. 3. Conocer la digestibilidad relativa respecto a un lípido de referencia y 4. Hacer correlaciones con de digestibilidad *in vivo* e *in vitro*. Esta información complementaria puede ser útil para la selección de insumos para la formulación de alimentos para acuicultura. Esta prueba de digestibilidad *in vitro* de lípidos será mas útil si se acompaña con el análisis de la calidad de ácidos grasos que contienen los

triglicéridos presentes en el insumo. Finalmente, se debe garantizar que la fracción lipídica del alimento suministrado sea digestible y que aporte la cantidad y calidad de los ácidos grasos que requiere la especie en cultivo.

Agradecimientos:

El trabajo fue realizado con apoyo de los proyectos: SAGARPA-2003-C02-149 “Determinación de la digestibilidad de alimentos comerciales y de ingredientes utilizados en la formulación de alimentos balanceados para *Litopenaeus vannamei*”; SAGARPA 2003-C01-33 “Efecto de la incorporación del extracto total de langostilla roja (*Pleuroncodes planipes*) en la digestibilidad de dietas para camarones”, y del proyecto CONACYT México-Cuba 2002 “Aislamiento, purificación y caracterización de lipasas de origen marino con potencial aplicación industrial”. El autor agradece el apoyo técnico de Patricia Hinojosa Oliva, Dulce Rocío Flores y de Alejandro Amador. Así mismo se agradece el apoyo del Dr. Alberto del Monte Martínez (Universidad de La Habana), Dr. Roberto Civera-Cerecedo (CIBNOR) y del Dr. Fernando Vega-Villasante (Universidad de Guadalajara).

Referencias

- Akiyama, D.M. Dominy, W.G., and Addison L.L. 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. *In* DM Akiyama and Tan R.K. (Eds). Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop. September 19-25. American Soybean Association. pp 80-98.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cuzon, G., A. Brito, L., Jiménez-Yan, R. Brito, G. García-Tomas, and G. Gaxiola. 2004. The effect of animal or plant based diets on energy partitioning in selected ontogenetic stages of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque Marie. M.G. Nieto, D. Villarreal, U. Scholz y M. González. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 16-19 Noviembre de 2004. Hermosillo, Sonora, México.
- Del Monte A., A. Forrellat, H. Nolasco, T. Estevez, B. Boburg, J. Díaz, O. Carrillo. 2003. Aislamiento y caracterización de lipasas en el hepatopáncreas de *Litopenaeus vannamei*. CIVA 2003. P. 755-767.
- Despamde, S.S. and Nielsen, S.S. 1987. *In vitro* digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) proteins. The role of heat stable protease inhibitors. *J Food Sci.* 52: 1330-1334.
- Divakaran, S., Ostrowski, C. A., 1990. Enzymes present in pancreatic extracts of the dolphin *Coryphaena hippurus*. *J. World Aquacult. Soc.* 1, 35-40.
- Ezquerro, M., García-Carreño, F., and Carrillo, O. (1998). *In vitro* digestibility of dietary protein source for white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*, 163: 123-136.
- Fernandez-Luna, M. Oliva, H. Nolasco, R.M. Chavez, M. Preciado y and F. Vega-Villasante. 1999. Contribution to the knowledge on the growth and molting cycle of the crab *Callinectes arcuatus* Ordway (1863) IN Nayarit Mexico. *Revista de Investigaciones Marinas (Cuba)* No. 20 (1-3) 94-100.
- Flaschel, E. and Renken, A. (1991) "The Behaviour of the *Candida rugosa* lipase in the presence of soluble substrates" in *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 349-352.
- Forrellat, A. 1998. El hepatopáncreas de camarón: Fuente de enzimas digestivas para la camaronicultura. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana. 109pp.
- Hoyle, J.R., 1973. Digestive enzyme secretion after dietary variation in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.* 30, 1647-1653.
- Hsu, H.W., D.L. Savak, I.D. Satterlee, and G.A. Millar. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.* 42 (5): 1269-1273.
- López-López, S., H. Nolasco and Vega-Villasante, F. Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of *Cherax quadricarinatus* juveniles. 2003. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 337-347.
- Kordel, M. and Schmid, R.D. (1991) . Inhibition of the lipase from *Pseudomonas* spec. ATCC 21808 by diethyl p-nitrophenylphosphate. Hints for one buried active site for lipolytic and esterolytic activity". en *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, Vol. 16. Alberghina, L.; Schmid, R.D. and Verger, R. Eds, GBF Monographs, VCH, Weinheim, p. 385-387.
- López-López, S., H. Nolasco and Vega-Villasante, F. (2003). Characterization of digestive gland esterase-lipase activity of *Cherax quadricarinatus* juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 337-347.
- Marletta, L. Carbonado, M., and Carnavale, E. 1992. *In vitro* protein and sulfur amino acid availability as a measure of bean protein quality. *J.Sci. Food Agric.* 59: 497-504.
- Nolasco-Soria, H. y F., Vega-Villasante. 2000. Actividad enzimática digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación del camarón. pp 149-165 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México. Libro electrónico: ISBN-970-694-51-0.
- Nolasco, H., Flores, D., Vega-Villasante, F., Del Monte, A., and Carrillo-Farnés, O. 2004. *Australasian Aquaculture*. Sydney, Australia, Sep 26-29, 2004. pp 222.
- Mingarro, I.; Abad, C. and Braco, L. (1995). Interfacial activation based molecular bioimprinting of lipolytic enzymes. *Proc. Natt. Acad. Sci. USA.* 92, p. 3308-3312.
- Shiau, S.Y. 1997. Nutrient requirements of Penaeid shrimps. *Aquaculture*. 164, 77-93
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco and R. Civera. 1993. The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*. I. Properties of the amylase activity in the digestive tract. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106B (3): 547-550.

- Vega-Villasante, F., I. Fernández, R.M. Preciado, M. Oliva, D. Tovar and H. Nolasco. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages of the arched swimming *Callinectes arcuatus* Ordway 1863 (*Crustaceae: Decapoda: Portunidae*), *Bulletin of Marine Science*, 65 (1): 1-9.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco, R. Civera-Cerecedo, E. Goitortua-Bores y C. Cota-Ruiz. 2000. La muda del camarón en el cultivo. *Panorama Acuicola* Vol. 5(No.5): 58-60.
- Versaw, K. W., Cuppet, L.S., Winters, D. D., Williams E. L., 1989. An improved colorimetric assay for bacterial lipase in nonfat dry milk. *J. Food Sci.* 54, 6, 1557-1568.
- Vogt, G., 2002. Functional anatomy. In: David M. Holdrich (Ed.) *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, pp. 87-100.

Métodos Utilizados por la Universidad de Sonora para la Medición de Digestibilidad *in vitro* para Camarón

J.M. Ezquerro* y J.L. Cárdenas

Laboratorio de Procesamiento de Productos Marinos, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Teléfono y Fax : +52 (662)2592208;
E-mail: ezquerro@guayacan.uson.mx

Introducción

El crecimiento del cultivo de organismos acuáticos en las últimas décadas ha inducido a la búsqueda de sistemas de evaluación rápidos y sencillos, en los cuales, los productores puedan tener respuestas en tiempos cortos a sus demandas. Siendo una de las necesidades más apremiantes, el de la evaluación de insumos para la elaboración de alimentos o de los alimentos en sí.

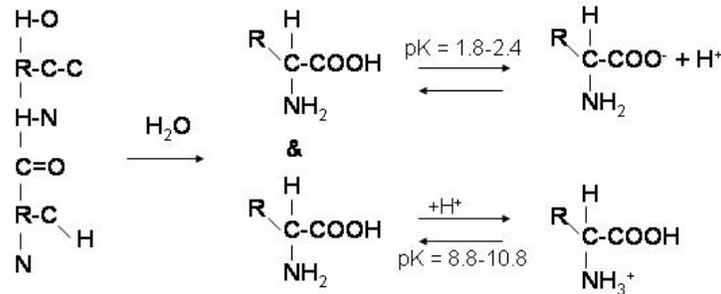
En forma tradicional, la manera más adecuada de llevar a cabo la valoración ya sea de insumos o alimentos potenciales para la acuicultura ha sido y sigue siendo los sistemas de evaluación *in vivo*, los cuáles, difícilmente podrán ser reemplazados; sin embargo, es bien sabido que éstos métodos de análisis son costosos y se requiere de bastante tiempo para obtener resultados. En base a ello, se han desarrollado una serie de métodos de evaluación *in vitro*, con los cuáles se puede llegar a obtener resultados confiables en corto tiempo.

El desarrollo de métodos *in vitro* para evaluar la calidad de insumos o alimentos para camarón, es una demanda a nivel mundial, sin embargo, antes de aplicar los métodos estos deben ser validados comparándolos con estudios *in vivo* (Lee y Lawrence, 1997).

Los sistemas de evaluación *in vitro* en organismos acuáticos, tienen su base en estudios para predecir la digestibilidad de proteínas en ratas. Posteriormente, fueron adaptados y adecuados para ser aplicados en organismo acuáticos (Haard, 1995). En un principio los métodos se basaron en el uso de una sola enzima digestiva, sin embargo, posteriormente se probó que el uso de una combinación de enzimas digestivas arrojaba mejores correlaciones con los resultados de digestibilidad *in vivo* (Hsu *et al.*, 1977; Saterlee *et al.*, 1981).

Como ya se mencionó, los estudios de digestibilidad *in vitro* parten de trabajos realizados en animales de sangre caliente, y dentro de las modificaciones que se han realizado a estos para adaptarlos y utilizarlos en organismos acuáticos esta la de utilizar extractos enzimáticos de los organismos a evaluar (camarones o peces), comparando los resultados con el uso de enzimas comerciales, siendo las correlaciones más altas al usar extractos enzimáticos de las especies acuáticas donde se probaron las técnicas de evaluación *in vitro* (Grabner, 1985; Lan y Pan, 1993; Dimes *et al.*, 1994; Carrillo, 1994; Ezquerro *et al.*, 1997).

El principio fundamental de los métodos de digestibilidad *in vitro*, se basa en que las enzimas atacan los enlaces peptídicos de las proteínas, liberándose los grupos α -amino (alfa-amino) y α -carboxilo (alfa-carboxilo):



La evaluación del grado de hidrólisis puede realizarse mediante la caída de pH, la cual, se debe a la liberación de los iones hidrógeno, principio del pH-drop, mediante el control de la caída de pH adicionando una solución alcalina, principio del pH-stat, o bien cuantificando los péptidos hidrolizados espectrofotométricamente, a través de reacciones colorimétricas, principio del método del orto-oftaldehído (OPA).

Varios métodos de evaluación *in vitro* para insumos y/o alimentos para camarón han sido probados por investigadores pertenecientes a diferentes instituciones. Algunos de ellos han sido probados en más de un laboratorio con resultados satisfactorios. A continuación se describen dos de los métodos que están siendo utilizados como sistemas de predicción de calidad: el pH-stat y el método de OPA.

Cada método es descrito en detalle, con sus ventajas y desventajas, incluyéndose algunos de los resultados obtenidos al aplicar la técnica analítica, así como un listado de referencias básicas sobre evaluación *in vitro*.

Método de pH-STAT

En el método del pH-stat, la tasa o la cantidad de álcali consumida para mantener el pH constante, es utilizada para calcular el número de enlaces peptídicos hidrolizados. La proteína hidrolizada se calcula mediante el equivalente de hidrólisis, a partir del volumen de la solución estándar de álcali (NaOH 0.1 N) requerido para mantener en 8.0 el pH de la mezcla de reacción.

Las ventajas del método de pH-stat son:

- Mantiene constante el pH durante el proceso de hidrólisis.
- La tasa de hidrólisis de la proteína puede ser estimada rápidamente durante el proceso de la digestión, evaluando automáticamente la curva de titulación obtenida (Pedersen y Eggum, 1983).

La desventaja del método:

- Posee limitación en el pH que puede ser usado durante el ensayo (Haard, 1995).

Metodología para determinar digestibilidad *in vitro* mediante pH-Stat.

Materiales

Tomar nota del material proteico:

- Tipo
- Origen
- Factor de conversión (Kjeldahl)
- Contenido de proteína (w/w) = PR%
- Contenido de materia seca (w/w) =HR%
- N es igual a 6.25 si no se establece lo contrario.

Manejo del equipo automatizado para pH-stat

1. La temperatura del baño debe ajustarse a 1.5°C - 2.0°C arriba de la temperatura recomendada.
2. Verificar que la bureta este vacía y que al llenarse no presente espacios vacíos.
3. Debe revisarse el electrodo del equipo y calibrarse.
4. El titulador, la bureta, el equipo donde se grabará y graficará, deben ser revisados y calibrados al pH que se correrá la reacción, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (manuales de operación).
5. La normalidad de la base se deber verificar por cuadruplicado empleando 20 ml de HCl 1N.

Preparación del sustrato:

1. El sustrato a evaluar debe ser homogeneizado empleando, ya sea una licuadora o bien un homogenizador antes de llevar a cabo el proceso de hidrólisis.
2. El sustrato debe prepararse considerando un 10% de exceso en base a la siguiente ecuación:

- Pesar MR' gramos del material proteico:

$$\text{MR}' = 1.1 \text{ MR} = 1.10 \times \frac{\text{M} \times \text{S}\%}{\text{PR}\%}$$

Donde:

MR = Masa del material crudo en la mezcla de reacción (gramos).

MR' = Masa del material crudo (incluyendo un 10% de exceso) para ser usado en la preparación de la mezcla de reacción (gramos).

M = Masa de la mezcla de reacción (mezcla a hidrolizar).

MW= Masa de agua.

S% = Concentración del sustrato, definida como la concentración de proteína en la mezcla de reacción durante la hidrólisis.

PR% = Contenido de proteína de la materia cruda (peso %) definida como N x factor.

- Adicionar MW' g de agua desionizada (si el pH de la materia cruda se desvía mucho del pH de hidrólisis, algo del agua puede ser reemplazada por NaOH o HCl, hasta que el pH este de 0.2 a 1 unidades abajo del pH de la hidrólisis). Para ahorrar tiempo, calentar el agua 2-5° C arriba de la temperatura de la reacción.

- $MW' = 1.1 \times MW = 1.1 \times (M-50-MR)$ o
- $MW' = 1.1 \times (M-50)-MR'$

3. La cantidad de proteína cruda (sustrato) de las harinas debe de ser de 10 mgN. Diez gramos del sustrato en suspensión son colocados en el vaso de hidrólisis y el pH es ajustado a 8.0 con 0.1 M NaOH.

Hidrólisis

1. Tan pronto como la mezcla de hidrólisis tenga la temperatura equilibrada, se procede.
2. Verificar que no haya burbujas de aire en la bureta.
3. La reacción se inicia adicionando 1 mL del extracto enzimático obtenido del hepatopáncreas del camarón (10mg/mL, ajustando el pH 8.0 con NaOH 0.1N) (Lan y Pan, 1993) o 0.3 mL de un sistema enzimático (1.6 mg/mL de tripsina, 3.1 mg/mL de quimotripsina, 1.3 mg/mL de aminopeptidasa y 7.96 mg/mL de proteasas, disueltas en agua, ajustando el pH a 8.0 con NaOH 0.1 N) (Satterlee *et al.*, 1979).

Cálculos

El grado de hidrólisis (DH%) de la proteína se calcula a partir del siguiente algoritmo (Adler-Nisse, 1986):

$$DH\% = [(B \cdot N_b \cdot 1.5 / M) / (S\% / 100)] \cdot 100$$

Donde:

B = mL del estándar (0.1 N NaOH) requeridos para mantener el pH,

N_b = Normalidad del titulante,

M = masa (gr) de la mezcla de reacción,

S = concentración de proteína en la mezcla de reacción,

Ensayo de digestibilidad *in vitro* de alimentos proteicos utilizando enzimas de camarón

Un método *in vitro* basado en el DH% utilizando el pH-stat, fue desarrollado para evaluar algunas fuentes de proteínas para elaborar alimentos para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Ezquerro *et al.*, 1997). Se utilizó como enzima un extracto proteico obtenido del hepatopáncreas del camarón. A 10 mL de la muestra (8mg/mL de proteína) en agua destilada se le adicionaron 1 mL del extracto enzimático del hepatopáncreas del camarón. El grado de hidrólisis de la proteína fue calculada de la cantidad de alcali requerido para mantener el pH a 8.0. (Ejemplos de las curvas de hidrólisis se muestran en la Figura 1).

El método del pH-stat fue utilizado para evaluar la calidad proteica en harinas elaboradas a partir de menhaden, anchoveta, pescado blanco, desechos de atún, proteína de soya y langostilla. En este estudio se encontró una correlación significativa ($P < 0.05$) entre el DH y la digestibilidad aparente de la proteína con un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.77$ (Figura 2).

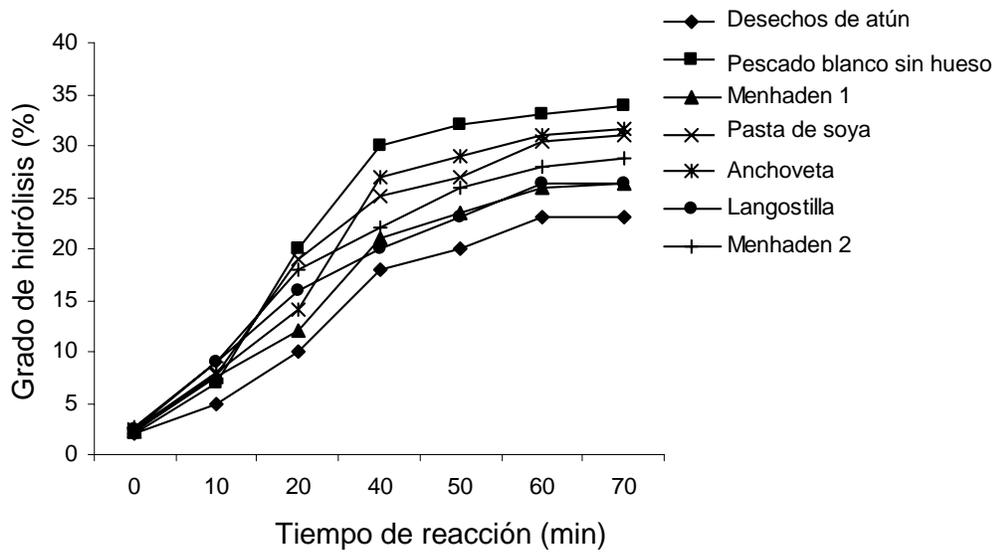


Figura 1. Grado de hidrólisis de la fuente proteínica utilizando un extracto enzimático obtenido del hepatopáncreas del camarón (Ezquerro *et al.*, 1997).

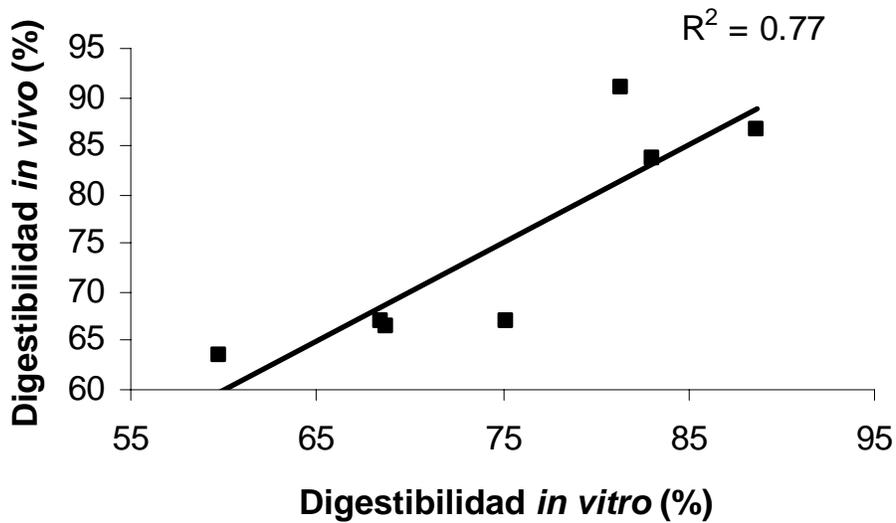


Figura 2. Digestibilidad *in vitro* vs *in vivo* de varias fuentes de proteína para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Ezquerro *et al.*, 1997).

Método de OPA

Este es un método espectrofotométrico rápido y sencillo, que permite determinar la digestibilidad de proteínas tanto en alimentos terminados como en ingredientes. La determinación se basa en la reacción del o-ftaldehído (OPA) y 2-mercatotanol con los grupos amino producidos durante la proteólisis de las proteínas. La reacción es específica para grupos aminos primarios, aminoácidos y proteínas. Una desventaja de éste método es que solo se puede calcular el punto final de la reacción, pero posee la ventaja de que hay menos limitaciones en el pH en cual puede llevarse a cabo el ensayo.

Metodología para determinar digestibilidad *in vitro* mediante el método OPA

Hidrólisis y Digestión de la Muestra

1. Muestras conteniendo 10 mg de N + 10 mL de buffer pH 8.0 en vasos de precipitado de 50 mL (por triplicado y otro triplicado de la muestra a la cual no se le agregará enzima, para medir los grupos amino presentes en la muestra). Total 6 vasos por cada muestra.
2. Homogenizar por 1 h a 5°C.
3. Ajustar el pH 8.0 con NaOH (0.1 N), registrar el pH antes del ajuste.
4. Añadir 1 mL del cóctel enzimático o del extracto enzimático.
5. Incubar a 37°C por 1 h.
6. Ajustar el volumen a 25 mL con agua destilada.
7. Tomar una alícuota de 2.5 mL y transferirla aun vaso de precipitado de 50 mL conteniendo 10 mL de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% taparlo con vidrio de reloj.
8. Colocarlo en un baño a 75° C por 45 min.
9. Transferirlo a un matraz volumétrico de 25 mL y ajustar el volumen con SDS 1%.
10. Tomar una alícuota de 125 µl (microlitros) en un tubo de 10 x 100 (Triplicado por cada vaso de precipitado).

Ensayo Enzimático

1. Los 125 µl (microlitros) de la muestra se colocan en un tubo conteniendo 2 mL de la solución OPA, mezclar perfectamente.
2. Incubar por 2 min. a temperatura ambiente.
3. Leer absorbancia a 340 nm (contra blanco de agua).

Curva Estándar

1. Graficar la absorbancia a 340 nm contra concentración de leucina. Usando 0, 50, 75 y 125 µl (microlitros) de estándar de leucina (1.5 mM): 0, 0.075, 0.1125 y 0.185 amoles respectivamente.

Reactivos

1. Estándar de leucina 1.5 mM: Disolver 0.198 g de L –leucina en 1 L de agua destilada, mantener en refrigeración en recipiente cerrado.
2. SDS 1 %: 10 g de SDS en 1 L de agua deionizada y destilada

3. SDS al 20%: 200 g de SDS en 1 L de agua deionizada y destilada. Añadir lentamente el SDS al agua, o será difícil de disolver. Si se dificulta se puede usar 10% y duplicar la cantidad en el reactivo OPA.
4. Buffer Tricina 500 mM, pH 8.0; 8.959 de tricina base en 900 mL de agua deionizada y destilada, llevar el pH a 8.26 con HCl, aforar a 1 L.
5. Tetraborato de sodio 100 mM: 38.14 g de borax en 1 L de agua deionizada y destilada, calentar para disolver.
6. NaOH 0.1 N; 4 g en 1 L de agua destilada.
7. Solución de OPA (preparar en fresco cada día)
 - 25 mL de tetraborato de sodio 100 mM + 2.5 mL de SDS al 20% + 40 mg de OPA disuelto en 1 mL de metanol + 100 mL de B-mercaptonetanol. Ajustar a 50 mL con agua (suficiente para aproximadamente 24 tubos de ensayo, 18 tubos por muestra original).
8. Solución de enzimas
 - 1 mL de sistema de 4 enzimas: 1.6 mg/mL de tripsina, 3.1 mg/mL de quimotripsina, 1.3 mg/mL de aminopeptidasa y 7.95 mg/mL de pronase, en agua ajustando el pH a 8.0 con 0.1 M NaOH (Satterlee *et al.*, 1981), o del extracto crudo de hepatopáncreas de camarón.

Otra aplicación del método OPA

Efecto de la fumonisina FB1 adicionada a alimentos sobre el sistema inmune de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*)

En este estudio no se evaluó la capacidad del método OPA para evaluar la digestibilidad *in vitro* en ingredientes para camarón, sin embargo, se estableció su potencial aplicación para evaluar algunos compuestos tóxicos presentes en alimentos para camarón. El estudio *in vitro* basado en el DH% utilizando el método de OPA fue utilizado para evaluar el efecto de la fumonisina FB1 adicionada a alimentos sobre el sistema inmune de camarón blanco. Se obtuvo una preparación enzimática a partir del hepatopáncreas de camarones ayunados por 24 h. El grado de hidrólisis se calculó espectrofotométricamente utilizando como standard leucina, la fórmula que se aplicó es similar a la reportada para el de sulfato de trinitrobenceno (TNBS) por Adler-Nissen (1986). Se encontró una correlación significativa entre la actividad de la fenoloxidasa y DH% de cuatro dietas (control, alimento con 0.5 mg/g de FB1, 0.75 mg/g FB1 y 1.0 mg/g FB1) (Figura 3). También se detectó una correlación significativa entre la entalpía de desnaturalización del tejido conectivo y el DH% estimado ($p < 0.05$, $r = 0.97$) (Figura 4).

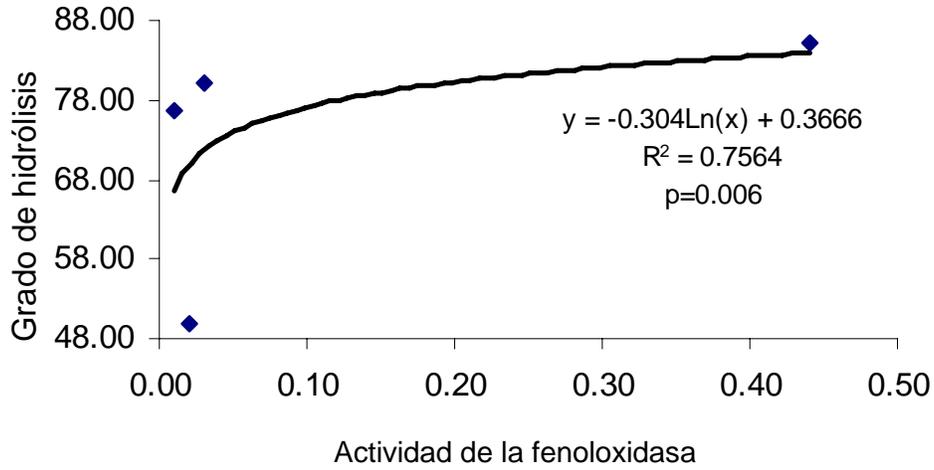


Figura 3. Relación de la actividad de la fenoloxidasa de la hemolinfa del camarón blanco alimentado con dietas conteniendo 3 niveles de fumonisina FB1 y el grado de hidrólisis por el método de OPA (Mexía-Salazar, 2005).

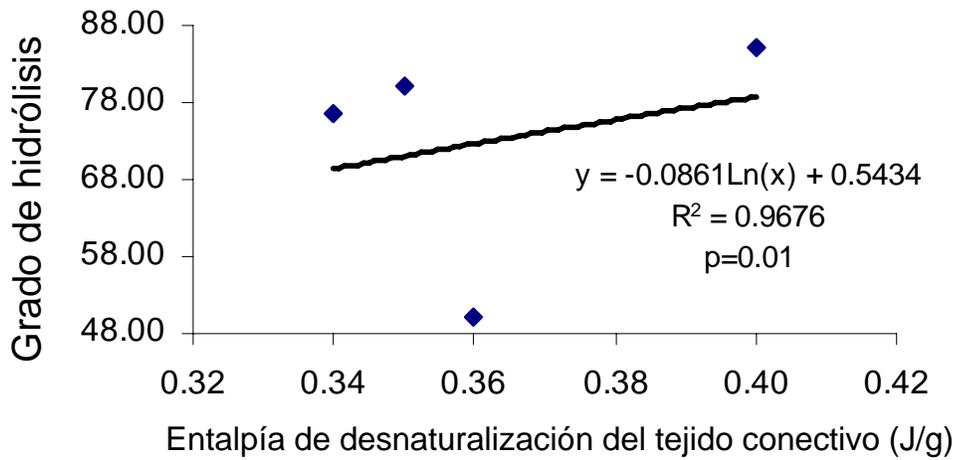


Figura 4. Relación entre la entalpía de desnaturalización del tejido conectivo del camarón blanco alimentado con dietas conteniendo 3 niveles de fumonisina FB1 y el grado de hidrólisis obtenido por el método de OPA (Mexía-Salazar, 2005).

Referencias

- Adler-nissen J. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. Elsevier, London, 427 pp.
- Dimes L.E. and Haard N.F. 1994. Estimation of protein digestibility-I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdner*). Comp. Biochem. Physiol. 180A(2/3): 349-362.
- Dimes L.E., García-Carreño F.L. and Haard N.F. 1994. Estimation of protein digestibility-III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout salmon. Comp. Biochem. Physiol. 109A(2):349-360.
- Ezquerria J.M., García-Carreño F.L., Civera R., Haard N.F. 1997. pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*).
- Haard N.F. 1995. Digestibility and *in vitro* evaluation of plant protein for salmonid feed. In: Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture. Lim Ch. And Sessa D (eds). AOACS Press. Champaign, Illinois. pp. 199-219.
- Lan C.C. and Pan B.S. 1993. *In vitro* digestibility simulating the proteolysis of feed protein in the midgut gland of grass shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 109:59-79.
- Mexía-Salazar A.L. 2005. Efecto del alimento contaminado artificialmente con fumonisina B1 sobre el sistema inmune, el hepatopáncreas y las proteínas del músculo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado.
- Nielsen PM, Petersen D. and Dambmann C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J. Food Sci. 66(5): 642-646.
- Pedersen B., and Eggum B.O. 1983. Prediction of protein digestibility-an *in vitro* enzymatic pH-stat procedure. Tierphysiol, Tieternahrg u Futtermittelkde 49:277-286.
- Satterlee L.D., Kendrick J.G., Jewell D.K. and Brown W.D. 1981. Estimating apparent protein digestibility from *in vitro* assays. Wesport, AVI Publishers.

Integración y Análisis Global de las Metodologías de Digestibilidad *in vitro* presentadas en este Libro

M. G. Nieto-López

En el presente capítulo se muestra una integración y una discusión de las diferentes metodologías para la determinación de la digestibilidad *in vitro* para camarón, que han sido desarrolladas o modificadas por los cuatro grupos de investigación presentados en este libro. De los cuatro grupos participantes tres son mexicanos (CIBNor, UNISON y UANL) y el cuarto grupo es cubano (U. de la Habana), todos han trabajado en el establecimiento de metodologías adecuadas para determinar la digestibilidad de nutrientes *in vitro* para *Litopenaeus vannamei*.

Debido a que la proteína es uno de los componentes más importantes de las dietas para camarón y debido al costo de los ingredientes proteicos y al alto requerimiento nutricional de estos organismos (30 - 60 %), todos los grupos han desarrollado o modificado metodologías para determinar la digestibilidad *in vitro* de proteínas principalmente. Adicionalmente el CIBNor presenta una metodología para almidones y otra para lípidos, así mismo los cuatro grupos indican que han determinado con sus metodologías la digestibilidad *in vitro* de proteína en ingredientes y solo la U. de la Habana y UANL han utilizado sus metodologías para la obtención de resultados de digestibilidad en dietas tanto experimentales como comerciales; aunque la U de la Habana no indica resultados en dietas, menciona los artículos y trabajos en donde se pueden encontrar.

Métodos utilizados

Tres de los grupos (UNISON, UANL y CIBNor) utilizan para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de proteína el método de pH-stat con ligeras modificaciones, el cual consiste en controlar la caída del pH (ocasionada por la liberación de iones hidrógeno durante la hidrólisis) adicionando una solución alcalina. Adicionalmente, el grupo de la U de la Habana y el CIBNor utilizan el método conocido como pH-shift o pH- Drop el cual mide el grado de hidrólisis mediante la caída del pH. La UNISON utiliza además del método de pH-stat un método al que ellos han denominado método OPA en el cual se cuantifican por espectrofotometría los peptidos hidrolizados; por su parte la UANL utiliza también el método de filtración descrito por la AOAC ya sea utilizando pepsina diluida o modificándolo para la utilización de un homogeneizado enzimático. Hsu *et al.* (1977) indican que, al seleccionar el método más adecuado para la determinación de la digestibilidad *in vitro*, se debe de tener en cuenta las siguientes características: el método debe ser simple y rápido, arrojar resultados reproducibles, poseer una alta correlación con algún método *in vivo*, y ser lo suficientemente sensible para detectar los efectos debido al procesamiento. En general todos los métodos propuestos cumplen con las primeras dos características, pero para las últimas dos solo la UANL y la U. de la Habana reportan resultados en donde se demuestra que sus métodos cumplen con estas condiciones.

Fuente de enzimas para los estudios de digestibilidad *in vitro*

En general todos los grupos de investigación utilizan sistemas multienzimáticos en donde las enzimas para la digestión son cócteles enzimáticos ya sea de enzimas comerciales que provienen

de mamíferos o de microorganismos como los propuestos por Hsu *et al.* (1977) o Satterlee *et al.* (1981) o extractos de homogeneizados de hepatopáncreas de camarón por lo general de organismos adultos en estado de intermuda; solo la UANL utiliza en uno de sus métodos (AOAC Torry modificado) una sola enzima la pepsina porcina. Sin embargo, como ya se ha probado en estudios para predecir la digestibilidad proteica en ratas, los mejores resultados se obtienen al utilizar combinaciones de enzimas digestivas y por lo tanto no es de extrañar que este grupo de investigación no haya obtenido buenos resultados al utilizar esta enzima. Por otro lado al utilizar esa misma técnica pero sustituyendo la enzima por un extracto de homogeneizado de hepatopáncreas los resultados que obtienen son mejores.

Preparación de los extractos enzimáticos

Aunque en el capítulo de la UNISON no se menciona como se lleva a cabo la preparación del extracto enzimático, indican como referencia el artículo publicado por Lan y Pan en 1993, por lo que podemos mencionar que la preparación de dichos homogeneizados varía mucho en cada laboratorio; la mayoría congela y liofiliza los hepatopáncreas para luego homogeneizarlos en frío en diferentes buffers o en agua destilada dependiendo de la técnica en la que se vayan a utilizar; posteriormente los homogeneizados son centrifugados (5,000 - 23,000g) en frío (-2 a 4 °C) por un tiempo que varía de 10 a 30 min. En todos los casos, la fase lipídica y los restos celulares se eliminan y se recupera el sobrenadante; la U. de la Habana, es el único grupo que filtra, liofiliza, resuspende, dializa y concentra el sobrenadante con propilenglicol y finalmente lo liofiliza de nuevo; los demás grupos solo toman el extracto crudo y lo congelan o lo liofilizan y lo almacenan en temperaturas que van de -20 a -80°C hasta su posterior uso.

Así mismo, la forma de medición de la actividad de dichos homogeneizados es muy diferente en cada laboratorio, todos determinan el contenido de proteína ya sea por el método de Bradford (1976) o por el de Lowry *et al.* (1951) y la actividad proteolítica total por diversos métodos, lo importante es que en todos se trata de evaluar de alguna manera la actividad de cada uno de los homogeneizados que preparan antes de utilizarlos para poder uniformizar la misma cantidad de unidades enzimáticas en cada replicado.

Preparación de la muestra

En este punto los cuatro grupos mencionan que los ingredientes deben ser molidos antes de preparar las suspensiones para la digestión, sin embargo el tamaño de partícula al que muelen cada uno varía desde 180 μ m a 500 μ m, además las muestras son suspendidas en agua destilada o en buffer de pH 7.5-8 según se requiera para la técnica y posteriormente homogeneizadas ya sea en un mortero, en una licuadora o en un ultra triturador por periodos de tiempo diferente que en la mayoría de los casos no se menciona, con lo cual, las muestras son molidas a un menor tamaño que puede variar dependiendo del tipo de muestra y seguramente inicia el proceso de hidrólisis de la muestra antes incluso de que se lleve a los vasos de reacción. Es muy importante estandarizar el tamaño de partícula que se utilizará que aunque es constante en cada uno de los laboratorios es muy diferente entre ellos ya que a menor tamaño de partícula la digestibilidad será mayor así como la auto-hidrólisis de la muestra.

Por otro lado, en lo que respecta a el contenido de proteína en las suspensiones de muestra, para la mayoría de los métodos se indica que debe ser de 6.5 mg/ml; el grupo de la UNISON menciona que

es importante que exista un 10% de exceso de sustrato por lo que proponen en su capítulo una fórmula para poder calcularlo; ellos utilizan 8 mg/ml en la metodología de pH-Stat y para esta misma técnica el grupo de la UANL también utiliza la misma concentración. La única técnica en la cual no se uniformiza para todas las muestras la misma cantidad de proteína en el sustrato es la de digestibilidad con pepsina (AOAC) propuesta por el grupo de la UANL; ellos indican que se utiliza 1g de muestra independientemente del contenido de proteína sin embargo mencionan que es una técnica que se utiliza solo para harinas de pescado que por lo general contiene entre 65 y 75% de proteína, pero si se utiliza para comparar ingredientes con muy diferente contenido de proteína la técnica no funciona. Por lo tanto es muy importante que el contenido de proteína de las suspensiones sea el mismo para todas las muestras para que así se puedan hacer comparaciones válidas.

El grupo del CIBNor menciona que realizaron pruebas para determinar una relación enzima-sustrato adecuada, que permita garantizar un exceso de sustrato durante las determinaciones y ellos proponen colocar 6.25 mg de proteína/ml para sus técnicas.

Unidades enzimáticas utilizadas para la reacción

Cuando se utilizan enzimas comerciales, basta con mencionar la cantidad de enzima por ml que se adicionara ya que por lo general las enzimas comerciales utilizadas son grado analítico por lo que son constantes en su actividad enzimática. Pero en el caso de que se utilicen extractos, semi-puros o crudos, es muy importante que la cantidad de extracto enzimático que se va a agregar este en relación a la actividad proteolítica total del mismo, pero en la mayoría de los casos esto no se menciona y solo se indica la cantidad de extracto o enzimas comerciales a adicionar lo cual hace difícil la aplicación de los métodos. Sin embargo, todos los grupos indican técnicas de determinación de la actividad proteolítica total de sus extractos como parte importante de la metodología por lo que es de esperarse que todos tomen en cuenta esta consideración aunque no lo indiquen. En el caso del CIBNor se menciona que para la determinación de la digestibilidad utilizando tanto el método de Hsu *et al.* (1977) (pH shift) como el de Ezquerro *et al.* (1998), hay que adicionar 210 U de proteasas de camarón; por su parte el grupo de la UANL menciona que al utilizar un extracto enzimático en sus metodologías de pH-stat y AOAC, adicionan 0.84 ml con una actividad proteolítica total de 1484.1U/g de proteína. En el caso de la U de la Habana habría que leer el artículo de Forrellat *et al.* (1990) para verificar las unidades de enzima que utilizan y en el caso de la UNISON, en el artículo de Ezquerro *et al.* (1997) mencionan que la actividad de su extracto es de 1.7 U/mg de proteína y de 7.2 U/mg de proteína para la mezcla de 4 enzimas.

Temperatura y tiempo de hidrólisis

La temperatura de reacción que se utiliza en las diferentes técnicas mencionadas en este libro varía de 25 a 37°C y el tiempo de reacción va de 10 minutos a 24 horas.

Obtención de correlación con resultados *in vivo*

La mayoría de los grupos (U. de la Habana, UNISON y UANL) presentan resultados obtenidos por ellos donde se demuestra el grado de correlación que tienen los datos de digestibilidad *in vitro* obtenidos con sus diferentes metodologías y los resultados de digestibilidad *in vivo* realizados sobre las mismas muestras; en el caso de el CIBNor, se menciona que los métodos que ellos utilizan para

determinar la digestibilidad de proteínas, han sido utilizados por ellos mismos o por la Universidad de Sonora con buenas correlaciones con la digestibilidad *in vivo*, sin embargo también mencionan que ellos han realizado modificaciones a la técnica original y para el caso de las técnicas de determinación de digestibilidad de almidón o lípidos señalan que no tienen aun datos de correlación con la digestibilidad *in vivo*. Como se menciona anteriormente, es muy importante que los métodos de determinación de la digestibilidad *in vitro* posean una alta correlación con algún método *in vivo*, y que además sean lo suficientemente sensibles para detectar cambios en la digestibilidad ocasionados en los ingredientes por efectos de procesamiento.

Aplicación de los resultados

El poder utilizar los resultado obtenido de un análisis de digestibilidad *in vitro* en granja es muy poco probable en primer lugar debido a que los datos obtenidos *in vitro* no son exactamente iguales a los que se obtienen *in vivo*, por ejemplo: un dato de digestibilidad *in vitro* de 50% o un grado de hidrólisis de 6 puede ser equivalente a un 80% de digestibilidad *in vivo*, por lo que se tendría que determinar el grado de correlación para cada granja, para cada estanque y en cada ciclo de cultivo.

En segundo lugar debemos de considerar que *in vivo* se presentan una serie de factores que son muy difíciles de simular en los métodos *in vitro*, por ejemplo: el pH exacto al que ocurre la digestión, la actividad microbiana existente en el tracto, los movimientos mecánicos del estómago e intestino, factores medioambientales, estado fisiológico y edad del organismo en el cual se efectúa el estudio etc. por lo que los resultados de los métodos *in vitro* pueden estar sub o sobre estimados.

En tercer lugar hay que considerar que incluso los resultados de los análisis de digestibilidad *in vivo* que se llevan a cabo en condiciones controladas no son directamente aplicables a la industria ya que se realizan utilizando un solo nivel de inclusión del ingrediente a prueba o debido a que las dietas se preparan con aglutinantes o procesos diferentes a los que utiliza la industria, por lo que es aun mas difícil que los resultados obtenidos de los diferentes métodos *in vitro* puedan ser aplicados.

Sin embargo, los métodos *in vitro*, pueden utilizarse como una herramienta muy útil en los diferentes laboratorios de investigación para la selección de ingredientes potencialmente útiles o en la industria para la optimización del control de calidad en la producción de alimentos comerciales y en la selección de ingredientes, por lo que la técnica seleccionada debe ser simple, reproducible, precisa y rápida.

Así mismo hay que considerar que los ensayos *in vitro* han sido ampliamente utilizados en estudios de nutrición para animales terrestres por lo que la evaluación de los ingredientes utilizados en la formulación de alimentos acuícolas pueden beneficiarse de los avances producidos en la últimos años en las diferentes técnicas aplicadas para la medición de la digestibilidad *in vitro* en alimentos para animales terrestres.

Teniendo en cuenta que hay una gran variedad de técnicas *in vitro* un paso preliminar para su aplicación en organismos acuáticos, debe ser la evaluación comparativa de algunas de ellas bajo condiciones controladas en el mismo laboratorio en el que se van a aplicar para poder seleccionar de una mejor manera la técnica mas adecuada para las condiciones (equipo, reactivos, etc.) de cada centro de investigación o cada industria.