

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**“Efecto de dietas formuladas con diferentes niveles de harina y aceite de soya sobre la actividad de enzimas digestivas, parámetros productivos y hematológicos en juveniles de *Totoaba macdonaldi*”**

**TESIS**

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**MA DE LA LUZ PAOLA PÉREZ ARVIZU**

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO, 2015.

**“EFECTO DE DIETAS FORMULADAS CON DIFERENTES NIVELES DE  
HARINA Y ACEITE DE SOYA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS  
DIGESTIVAS, PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y HEMATOLÓGICOS EN  
JUVENILES DE TOTOABA MACDONALDI”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**


**PRESENTA:**

**MA DE LA LUZ PAOLA PÉREZ ARVIZU**


**APROBADA POR:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Lus Mercedes López Acuña**  
Directora de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza**  
Co-Director de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Maricela Flores Ibarra**  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Ivone Giffard Mena**  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Jorge Olmos Soto**  
Sinodal

*A mi familia.....*

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Baja California** por permitir mi desarrollo profesional dentro de sus unidades académicas.

A la **Facultad de Ciencias Marinas** por el uso de sus instalaciones y por dejarme ser un miembro más de su comunidad.

Al **CONACYT** por la beca otorgada para el logro de éste objetivo.

A la **Dra. Lus Mercedes López Acuña** y **Dr. Mario Galaviz Espinoza** por su apoyo y confianza en la realización de éste proyecto.

A los miembros del comité de tesis **Dra. Ivone Giffard Mena, Dra. Maricela Flores Ibarra** y **Dr. Jorge Olmos Soto** por su confianza y valiosas aportaciones para la realización de ésta investigación.

Al **Dr. Luis Antonio Cupul Magaña** por darme la oportunidad de continuar en la búsqueda de mi sueño.

Al **Dr. Conal David True** por su apoyo y sus consejos en todos los aspectos.

Al **Lic. Aaron Kaoru Zapien Kanemoto** por su enorme y valioso apoyo en la realización del bioensayo experimental de ésta investigación.

A mis compañeros de laboratorio **Rosa, Idaly, Isaura, Miguel, Tony, Samantha** y **Heracio** por su ayuda y por los buenos momentos que vivimos dentro del laboratorio.

## ÍNDICE

<b>CAPITULO I: MARCO TEÓRICO</b>	10
Introducción	11
Antecedentes	27
Justificación	30
Hipótesis	31
Objetivos: general y particulares	31
<b>CAPITULO II: EVALUACIÓN DE DIETAS FORMULADAS CON ACEITE DE SOYA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS, PARÁMETROS PRODUCTIVOS, HEMATOLÓGICOS Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE <i>TOTOABA MACDONALDI</i></b>	35
2.1. Materiales y métodos	35
2.1.1. Formulación de las dietas	35
2.1.2. Manejo de animales	37
2.1.3. Biometrías y obtención de muestras	37
2.1.4. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia	38
2.1.5. Retención de nutrientes	39
2.2. Métodos analíticos	41
2.2.1. Análisis químicos proximales	41

2.2.2.	Perfil de ácidos grasos	42
2.2.3.	Análisis hematológico	45
2.2.4.	Análisis estadístico	46
2.3.	Resultados	47
2.3.1.	Crecimiento y eficiencias alimenticias	47
2.3.2.	Composición proximal (peso húmedo)	50
2.3.3.	Perfil de ácidos grasos	52
2.3.4.	Retención de nutrientes	55
2.3.5.	Parámetros hematológicos	57
2.3.6.	Análisis enzimático	59
2.4.	Discusión	60
2.5.	Conclusión	68
2.6.	Recomendaciones	68
<b>CAPITULO III: EVALUACIÓN DE DIETAS FORMULADAS CON HARINA DE SOYA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS, PARÁMETROS PRODUCTIVOS, HEMATOLÓGICOS Y PERFIL DE AMINOÁCIDOS DE <i>TOTOABA MACDONALDI</i></b>		71
3.1.	Materiales y métodos	71
3.1.1.	Formulación de las dietas	71
3.1.2.	Manejo de animales	73
3.1.3.	Biometrías y obtención de muestras	73
3.1.4.	Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia	73
3.1.5.	Retención de nutrientes	73

3.2.	Métodos analíticos	74
3.2.1.	Análisis químicos proximales	74
3.2.2.	Perfil de ácidos grasos	74
3.2.3.	Análisis hematológico	75
3.2.4.	Actividad enzimática digestiva	75
3.2.5.	Análisis estadístico	78
3.3.	Resultados	78
3.3.1.	Crecimiento y eficiencias alimenticias	78
3.3.2.	Composición proximal (peso húmedo)	82
3.3.3.	Perfil de ácidos grasos	83
3.3.5.	Retención de nutrientes	87
3.3.6.	Parámetros hematológicos	89
3.3.7.	Actividad enzimática	91
3.4.	Discusión	92
3.5.	Conclusión	97
3.6.	Recomendaciones	97
	Bibliografía	101
	Anexos	122

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Crecimiento en peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días 47
- Figura 2. Regresión polinomial entre la índice de crecimiento diario (ICD) y el porcentaje de reemplazo de aceite de soya en las dietas experimentales suministradas a juveniles de *Totoaba macdonaldi*. 47
- Figura 3. Crecimiento en peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días 73
- Figura 4. Regresión polinomial entre la índice de crecimiento diario (ICD) y el porcentaje de reemplazo de harina de soya en las dietas experimentales suministradas a juveniles de *Totoaba macdonaldi*. 73



## LISTA DE TABLAS

### Análisis Lipídico

Tabla 1. Composición de ingredientes (g 100g <sup>-1</sup> , base en peso seco), porcentaje de reemplazo y composición proximal de las dietas experimentales formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	35
Tabla 2. Composición de ácidos grasos (g 100 g dieta <sup>-1</sup> , base peso seco) de las dietas experimentales.	42
Tabla 3. Composición de aminoácidos (g/100 mg de proteína) de las dietas experimentales.	43
Tabla 4. Crecimiento y rendimiento alimenticio de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las dietas experimentales durante 60 días.	48
Tabla 5. Composición proximal (g 100 g dieta <sup>-1</sup> , peso base húmedo) de pez entero, músculo e hígado de <i>Totoaba macdonaldi</i> por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=9).	50
Tabla 6. Composición de ácidos grasos (g 100 g músculo <sup>-1</sup> , en base seca) de músculo de juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales (n= 6).	52
Tabla 7. Perfil de aminoácidos de músculo de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con aceite de soya	53
Tabla 8. Retención de nutrientes en pez entero (g 100 g dieta <sup>-1</sup> , en base húmeda) en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=9)	55
Tabla 9. Parámetros bioquímicos sanguíneos en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=24).	57
Tabla 10. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes niveles de aceite de soya (n=3).	58

### Análisis Protéico

Tabla 11. Composición de ingredientes (g 100g <sup>-1</sup> , base en peso seco), porcentaje de reemplazo y composición proximal de las dietas experimentales conteniendo diferentes concentraciones de harina de soya en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> .	66
Tabla 12. Composición de ácidos grasos (g 100 g dieta <sup>-1</sup> , base peso seco) de las dietas experimentales.	69
Tabla 13. Composición de aminoácidos (g/100 mg de proteína) de las dietas experimentales.	70
Tabla 14. Crecimiento y rendimiento alimenticio de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con las dietas experimentales durante 60 días	75
Tabla 15. Composición proximal (g 100 g dieta <sup>-1</sup> , peso base húmedo) de pez entero, músculo e hígado de <i>Totoaba macdonaldi</i> por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=9)	77
Tabla 16. Composición de ácidos grasos (g 100 g músculo <sup>-1</sup> , en base seca) de músculo de juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales (n= 3).	79
Tabla 17. Perfil de aminoácidos de músculo de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con harina de soya (n=2)	80
Tabla 18. Retención de nutrientes en pez entero (g 100 g dieta <sup>-1</sup> , en base húmeda) en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=3)	82
Tabla 19. Parámetros bioquímicos sanguíneos en juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=8)	84
Tabla 20. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de <i>Totoaba macdonaldi</i> alimentados con diferentes niveles de harina de soya.	85

## LISTA DE ANEXOS

ANALISIS QUIMICOS PROXIMALES	123
Humedad	123
Cenizas	124
Proteínas	125
Lípidos	127
Almidón	128
Glucógeno	130
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS	132
Desengrasado de muestras (Método modificado de Folch)	132
Hidrólisis	132
Filtrado	133
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	134
Desengrasado de muestras (Método modificado de Folch)	134
Saponificación	135
Metilación	135
PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	137
Conteo de Eritrocitos	137
Hematocrito	138
Hemoglobina	139

Glucosa	140
Proteína	141
Albumina	142
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DIGESTIVA	143
Homogenizados	143
Leucina aminopeptidasa	144
Tripsina sustrato BAPNA	146
Quimotripsina con sustrato SAPNA	148
Proteasa alcalina	149
$\alpha$ -Amilasa	151

# **CAPÍTULO I**

## **MARCO TEÓRICO**

## INTRODUCCIÓN

Los océanos han sido considerados como una fuente inagotable de recursos, los cuales son capaces de alimentar a la población mundial; sin embargo, la demanda alimentaria se ha incrementado a tal grado que supera significativamente el aporte natural de los mares afectando considerablemente a sus poblaciones (Avilés y Vázquez, 2005; Tacon et al., 2011; FAO, 2012).

Durante años se ha monitoreado la actividad pesquera y acuícola con el objetivo de encontrar un equilibrio adecuado entre las oportunidades y las amenazas a las que se enfrentan los ecosistemas naturales. Debido a esto, en los últimos años la industria pesquera ha mantenido una producción estable y la industria acuícola un crecimiento constante (FAO, 2012). En el año 2011, la producción mundial total de pesca y acuicultura fue de 154 millones de toneladas (MT), de las cuales 90 MT provienen de la pesca, mientras que 64 MT fueron generadas a través de la acuicultura. El 86% de éste total, se destinó para consumo humano, el restante 14%, que equivale a 22 MT, se utilizó para usos no alimenticios directos. De estas 22 MT el 75% se destinó a la producción de harina y aceite de pescado, empleados principalmente para la elaboración de alimentos destinados al cultivo de peces (Tacon et al., 2011; FAO, 2012), Tabla 1.

Según la Fundación para la Vida Silvestre (WWF, 2002, por sus siglas en inglés) ha calculado que es necesario procesar cinco kilogramo de pescado para producir un

kilogramo de harina, y alrededor de 10 kg de pescado para producir un kilogramo de aceite para alimentar y obtener tan solo un kilogramo de peces cultivados (Tacon y Forster, 2000, Tacon y Metian, 2008).

Tabla 1. Producción y utilización de pesca y acuicultura en el mundo (FAO, 2012).

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<b>PRODUCCIÓN (millones de toneladas)</b>						
<i>Pesca de captura</i>						
Continental	9.8	10.0	10.2	10.4	11.2	11.5
Marítima	80.2	80.4	79.5	79.2	77.4	78.9
Pesca de captura total	90.0	90.3	89.7	89.6	88.6	90.4
<i>Acuicultura</i>						
Continental	31.3	33.4	36	38.1	41.7	44.3
Marítima	16	16.6	16.9	17.6	18.1	19.3
Acuicultura total	47.3	49.9	52.9	55.7	59.9	63.6
Producción pesquera mundial total	137.3	140.2	142.6	145.3	148.5	154
<b>UTILIZACIÓN (millones de toneladas)</b>						
Consumo humano	114.3	117.3	119.7	123.6	128.3	130.8
Usos no alimentarios	23	23	22.9	21.8	20.2	23.2
Población ( <i>miles de millones</i> )	6.6	6.7	6.7	6.8	6.9	7
Suministro de peces comestibles per cápita (kg)	17.4	17.6	17.8	18.1	18.6	18.8

Debido al inminente impacto de las pesquerías, la industria de alimentos para acuicultura ha buscado alternativas adecuadas para el reemplazo de harina y aceite de pescado por productos de origen vegetal (Aragão et al., 2003; Regost et al., 2003; Izquierdo et al., 2005; Richard et al., 2006; Tibaldi et al., 2006; Hernández et al., 2007; Montero et al. 2008; Peng et al., 2008; Øverland et al., 2009; Murray et al., 2010; Barnes et al., 2012; Jahan et al., 2012; Wing-Keon et al., 2013).

Los ingredientes provenientes de fuentes vegetales tienen un gran potencial en la industria acuícola debido a que algunos granos, como la soya, contienen elevadas concentraciones de proteína, un buen perfil de aminoácidos, buena biodisponibilidad, y son económicamente accesibles en comparación con la proteína y aceite de pescado. No obstante, existen ciertas restricciones en el uso de éstos productos vegetales debido a la palatabilidad, a la carencia de algunos aminoácidos esenciales (lisina, aminoácidos sulfurados, cisteína y metionina), y a la presencia de factores antinutricionales tales como inhibidores de proteasas, glucosinolatos, ácido fítico, saponinas, anti vitaminas liposolubles, entre otros (Fagbenro y Davies, 2001; Francis et al., 2001; Tidwell y Allan, 2001; Forster, 2002; Pereira y Oliva-Teles, 2003; Chou et al., 2004; Lunger et al., 2007).

Los factores antinutricionales presentes en la harina y aceite de soya impiden la utilización de nutrientes esenciales (por ejemplo los aminoácidos lisina y metionina) (Makkar, 1993; Heikkinen et al., 2006; Ruyter et al., 2006; Montero et al., 2010; Ganga et al., 2011), por medio de la actividad de factores antitripsicos o inhibidores de proteasas los cuales son compuestos termolábiles de naturaleza proteica que inhiben o



modifican las moléculas de tripsina o quimotripsina alterando la digestibilidad de la proteína e incrementando las secreciones digestivas del páncreas (acetilcolina, gastrina e histamina) (Norton, 1991; Francis et al., 2001; Pérez et al., 2003; Ostaszewska et al., 2005; Merrifield et al., 2011; Rodiles et al., 2012).

En los últimos 20 años se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el propósito de estudiar el potencial de la proteína y aceite de soya, las concentraciones máximas permitidas en las dietas de los peces carnívoros, el efecto causado en relación a los factores antinutricionales y la toxicidad que producen (Higgs et al., 1995; Storebakken et al., 2000; Murray et al., 2010), dando como resultado que la soya es un ingrediente adecuado para la sustitución de harina de pescado en las dietas suministradas a los peces de cultivo (Alexis y Nengas, 2001; Yamamoto et al., 2007).

La soya es un ingrediente empleado de manera importante en la industria acuícola debido a la composición de las proteínas que la conforman ya que la estructura de sus aminoácidos es muy similar a las proteínas de origen animal (Watanabe, 2002), sin embargo, es un producto que posee elementos desfavorables como 22% de oligosacáridos, inhibidores de proteasas que genera cambios morfológicos en el intestino (vacuolización supra nuclear de las células de absorción, acortamiento del plegamiento de la mucosa y presencia de células inflamatorias), lo que afecta la digestión de la proteína y la asimilación de aminoácidos (Norton, 1991; Refstie et al., 1999; Burrels et al., 1999; Refstie et al., 2000; Dersjant-Li, 2002; Heikkinen et al., 2006, Murray et al., 2010). No obstante dichos elementos pueden ser desactivados durante el

proceso de manufactura por medio de temperaturas elevadas (Aragão et al., 2003; Vucelić-Radović et al., 2005; Merrifield et al., 2011; Rodiles et al., 2012).

El término “factor antinutricional” se refiere a las sustancias endógenas del alimento que producen efectos negativos en la salud y balance nutricional del organismo que lo consume. Algunas plantas o ingredientes derivados de plantas contienen antinutrientes que pueden causar signos agudos de envenenamiento, alteración de los procesos digestivos, crecimiento, disminución de la eficiencia alimenticia, hipertrofia pancreática, hipoglicemia, disfunción hepática, bocio y supresión inmune (Hardy et al., 2011). Los factores antinutricionales mas importantes presentes en la harina de soya son inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, antivitaminas, fitoesteroles y alergenos (Francis et al., 2001b).

La mayoría de las semillas contienen inhibidores que protegen a sus mayores componentes de la degradación no intencional, ejemplo de esto son los inhibidores de proteína, ceniza y lípidos. Éstas pueden ser proteínas simples o complejas y son desnaturalizadas por medio de tratamientos con calor, extracción de alcohol y fermentación (Hardy et al., 2011). El mecanismo de acción de los inhibidores en los organismos comienza con la unión de éstos a la enzima blanco (tripsina y en menor medida quimotripsina) formando complejos estequiométricos estables lo que en consecuencia inhibe su actividad. Al inhibir la actividad de estas enzimas se estimula la secreción de pancreocimina-colecistoquinina de la pared intestinal las cuales estimulan la secreción de tripsina del tejido pancreático (Krogdahl et al., 2010), sin embargo después de un tiempo prolongado de haber obligado al páncreas a producir una gran

cantidad de enzimas, se produce una hipertrofia pancreática (Hardy et al., 2011; Silva y Silva, 2000), la cual consiste en el agrandamiento de las células pancreáticas y por lo tanto del órgano. Los inhibidores de proteasas, incluso en niveles bajos en las dietas, no sólo reducen la digestibilidad aparente de las proteínas, también reducen la digestibilidad de los lípidos (Berg-Lea et al., 1989; Krogdahl et al., 1994; Olli et al., 1994). Los inhibidores de lipasas se encuentran presentes en muchas semillas oleaginosas donde su importancia radica en el hecho de prevenir la auto digestión de las reservas lipídicas por las lipasas de la misma semilla (Gupta et al., 2003). En las semillas de soya se han identificado inhibidores de lipasa (Satouchi et al., 1998, 2002) y su función se establece a través de la interferencia de la unión de la enzima a la superficie de las gotas emulsificadas de lípidos (Gargouri et al., 1984). Los inhibidores poseen una capacidad hidrofóbica la cual les permite adherirse a la superficie de las micelas, uniéndose de manera inmediata a éstas evitando la unión natural de las lipasas las cuales actúan en la zona de la interfase entre el medio acuoso y la superficie de la micela (Wang y Huang, 1984).

Por otra parte, las lectinas son proteínas atrapadoras de azúcares las cuales son parcialmente resistentes a la desnaturalización por calor, así como a la hidrólisis durante su paso a través del tracto digestivo (Bardocz et al., 1995). Su modo de acción es mediada a través de la unión a los receptores de la superficie de las células epiteliales intestinales (Pusztai et al., 1995) las cuales pueden adherirse a dos o más sitios de unión de las lectinas produciendo la aglutinación de las células con un receptor similar (Krogdhal et al., 2010) lo que produce efectos biológicos importantes en la función intestinal lo cual varía su potencia de acuerdo a la fuerza de unión al

ligando (Grant et al., 1983). En el intestino, algunas lectinas afectan la regulación del transporte de los nutrientes, la liberación de hormonas intestinales, la proliferación de células mucosas y el metabolismo de los nutrientes lo cual varía según el daño y la funcionalidad de la célula afectada (Krogdhal et al., 2010). La unión de la lectina de la soya a las fracciones de carbohidratos de los glucoconjugados en el borde de cepillo de la membrana intestinal, causa cambios histológicos en el intestino distal desarrollando problemas de enteritis (Hendricks et al., 1990; Buttle et al., 2001, Van den Ingh and Krogdahl 1990; Van den Ingh et al., 1991).

Las saponinas son moléculas anfipáticas que contienen un esteroide hidrofóbico al cual se le unen una o más cadenas de azúcares hidrofílicos. La glicación provoca que existan diferentes tipos de azúcares (oligosacáridos) en las saponinas encontrándose comúnmente entre ellas la glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa (Hardy et al., 2011). Entre otras cosas, las saponinas tienen un efecto inhibitorio sobre la digestión de las proteínas (Francis et al., 2002), y existen evidencias que indican que las saponinas son las principales responsables del desarrollo de la enteritis causada por la harina de soya (Knudsen et al., 2007; 2008), ya que éstas forman micelas y pueden intercalarse entre el colesterol contenido en la membrana celular del epitelio intestinal lo cual forma hoyos incrementando la permeabilidad de la membrana, facilitando la entrada de sustancias que normalmente no son absorbidas, tales como alérgenos (Jhonson et al., 1986; Gee et al., 1996).

Los oligosacáridos son carbohidratos solubles que contiene la soya los cuales se encuentran presentes en un porcentaje de entre 12-15%, de éste porcentaje la mitad es

sucrosa. En organismos monogástricos, estos oligosacáridos no son hidrolizados por enzimas endógenas y por lo tanto su valor energético es muy bajo o incluso nulo en peces carnívoros; además son compuestos osmóticamente activos y pueden causar diarrea lo cual interfiere con la digestión de los nutrientes (Krogdahl et al., 2010).

El ácido fítico o fitatos son otro tipo de elementos considerados como antinutricionales. Aproximadamente el 70% del fosforo contenido en la harina de soya se encuentra en la forma de fitatos (Ketola, 1985). Los fitatos actúan como agentes quelantes y forman complejos proteína-ácido fítico que pueden reducir la biodisponibilidad de proteínas (Spinelli et al., 1983) y minerales como zinc, manganeso, cobre, molibdeno, calcio, magnesio, y hierro (Smith, 1977). En los organismos, los fitatos desarrollan anomalías en la tiroides, riñón y tracto digestivo, los ciegos pilóricos desarrollan hipertrofia y vacuolización citoplasmática (Richardson et al., 1985) así como también se desarrolla una hipertrofia y vacuolización del citoplasma del epitelio intestinal (Hossain y Jauncey, 1993).

Por otro lado, formular con un porcentaje adecuado de proteínas y de lípidos no es suficiente para elaborar una dieta, existe un factor muy importante que debe ser considerado: el perfil de aminoácidos y de ácidos grasos que constituyen un ingrediente. Los aminoácidos son metabolitos determinantes en la salud de un organismo debido a su función estructural, en la regulación de diversos procesos celulares y también como precursores de otras moléculas como hormonas y bases nitrogenadas (Wu, 2009). Sin embargo existen ocho aminoácidos (lisina, treonina, metionina, triptófano, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina) que no pueden ser

sintetizados de novo por ningún organismo por lo tanto son considerados aminoácidos esenciales y deben ser suministrados en la dieta (Hryniewiecki, 2000). El alimento proveniente de fuentes vegetales frecuentemente presenta un desbalance de aminoácidos, lo que en consecuencia deriva en un contenido proteico bajo y una baja digestibilidad lo que puede modificar el metabolismo (Bañuelos-Vargas et al., 2014). Por lo tanto, el uso de harinas de origen vegetal puede afectar el perfil de aminoácidos esenciales y la falta de aminoácidos esenciales afecta la actividad de enzimas que metabolizan aminoácidos, el crecimiento de los organismos y su supervivencia (Vilhelmsson et al., 2004).

De igual manera, existe un gran interés en el conocimiento de la digestión, absorción y metabolismo de los lípidos en la nutrición y fisiología de los peces. Los lípidos junto con las proteínas y los carbohidratos son los principales constituyentes de los organismos, sin embargo los lípidos procedentes de los peces son particularmente especiales debido a que son ricos en ácidos grasos altamente insaturados (HUFA). Esta característica se debe a que los peces tienen una excelente fuente de HUFAs en su medio natural, por lo tanto, los organismos marinos tienen una alta exigencia por los ácidos grasos principalmente de la cadena  $\omega$ -3 (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003; Hastings et al., 2005; Grant et al., 2008; Trattner et al., 2008; Qui-Bai et al., 2011).

El ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) son ácidos grasos de la cadena  $\omega$ -3 y son característicos de los aceites provenientes de peces marinos (Sargent et al., 2002; Tocher, 2003). En comparación, el aceite de soya es un elemento rico en ácidos grasos de la cadena  $\omega$ -6 como el ácido linoléico (52%), ácido

oleico (24%) y ácido palmítico (11%), sin embargo el contenido de ácido linolénico ( $\omega$ -3) es del 6% de su totalidad el cual es insuficiente al requerido por las especies marinas. En el caso de los peces marinos, al incrementar la cantidad de ácidos grasos de origen vegetal en las dietas, incluyendo al aceite de soya, se reduce la concentración de ácidos grasos esenciales en las células produciendo alteraciones en la composición de la membrana (Schittmayer y Birner-Gruenberger, 2009; Merrifield et al., 2011), motivo por el cual se considera un ingrediente que puede ser suministrado en las dietas, sin embargo no puede sustituir en su totalidad al aceite de pescado ya que una alteración excesiva en su consumo, puede fácilmente modificar la composición de ácidos grasos contenidos en los tejidos afectando el estado de salud de los organismos (Sargent y Tacon, 1999).

En éste sentido, existen ciertos parámetros fisiológicos que evalúan los cambios generados en el metabolismo causado por un cambio en la dieta (Cowey et al., 1989; Segner et al., 1995; Menoyo et al., 2004). Ejemplo de esto es la evaluación de la actividad de las enzimas debido a que están asociadas con las reacciones químicas involucradas en la digestión (Brody, 1999; Zambombino y Cahu, 2007). La función de las enzimas digestivas es romper los nutrientes del alimento en compuestos que pueden ser absorbidos a través de las membranas de los bordes de cepillo de los enterocitos (Krogdahl et al., 2010). Las proteínas ingeridas son fraccionadas por proteasas durante el proceso de digestión mediante el proceso de hidrolisis para liberar aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos por medio de enzimas digestivas secretadas dentro del tracto gastrointestinal. Estos productos son absorbidos por las células de la mucosa donde se lleva a cabo una digestión intracelular de péptidos de tamaño menor,

siendo ésta la única forma en que los aminoácidos son liberados dentro de la vena porta como productos de la digestión de proteínas (Murai et al., 1987). La descomposición de los aminoácidos ocurre en dos pasos, generalmente el primer paso es la desaminación y comprende la remoción del grupo amino el cual es convertido en amonía. El segundo paso es la conversión del esqueleto de carbón a los productos intermediarios del ciclo del ácido cítrico. La cadena principal de carbono de los aminoácidos contiene energía (libre) utilizable que puede ser aprovechada por el ciclo del ácido cítrico o puede ser convertida en ácidos grasos y/o glucógeno para su posterior uso (Cowey y Walton, 1989).

Estas enzimas pueden ser secretadas dentro del lumen, o pueden estar ancladas a las membranas o contenidas en las vacuolas supranucleares contenidas en los enterocitos (Rust, 2002). Las proteasas son enzimas que actúan sobre proteínas o sobre ellas mismas, rompiendo los enlaces peptídicos produciendo fragmentos de proteína de menor tamaño (eg. tripeptidos, dipeptidos) o incluso hasta aminoácidos libres. Las proteasas en general tienen diversas funciones como: resistencia inmunitaria, apoptosis, replicación celular y digestión de los alimentos (Werner, 2008). La proteína animal consiste de cadenas de L-amino ácidos ligados a otros aminoácidos a través de enlaces peptídicos (-NH·CO-). Para permitir que las proteínas sean biodisponibles, estas deben ser hidrolizadas por endopeptidasas extracelulares, las cuales rompen los enlaces péptidos a lo largo de la cadena proteica, y por exopeptidasas que rompen los aminoácidos terminales. La acción de estas enzimas libera oligopeptidos, dipeptidos y aminoácidos. Oligopeptidos y dipeptidos son además hidrolizados por otras enzimas contenidas en las células epiteliales intestinales (Stevens y Hume, 2004) y que son



liberadas para continuar con la ruptura de las proteínas. Dentro de estas enzimas se encuentran: la pepsina, tripsina, quimiotripsina. Los peces poseen proteasas de tipo ácido (pepsina) segregadas en el estómago y proteasas de tipo básico o neutro (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasas, etc.). Al igual que en los vertebrados, las enzimas proteolíticas pancreáticas en peces son secretadas como proenzimas inactivas y es en el intestino medio el único sitio de activación de éstas enzimas (Conceição et al., 2011).

La Tripsina es una serina proteasa que pertenece a las enzimas endopeptídicas pancreáticas y es la principal enzima proteolítica digestiva. La tripsina es parte de la secreción exocrina del páncreas, liberada en el duodeno y destinada a la digestión de las proteínas consumidas en la dieta. La tripsina cataliza la hidrolisis de los enlaces peptídicos que se encuentran en el interior de las proteínas, proteosomas y peptosomas, mediante una serina como sitio activo, dando lugar a la formación de polipéptidos y péptidos (Mora-Brautigan, 2007) que son absorbidos por la mucosa intestinal (Müller-Esterl, 2008). La tripsina es un factor importante en la activación de las enzimas pancreáticas, y ella misma es activada cuando entra en contacto con la enteropeptidasa unida al borde de cepillo de los enterocitos (Conceição et al., 2011).

La quimotripsina es una enzima proteolítica que rompe los enlaces de los aminoácidos aromáticos y no polares. Es segregada por el páncreas y se origina por la acción de la tripsina sobre el quimiotripsinógeno a pH básico (8.0). Es selectiva para los enlaces contiguos al extremo carboxílico de las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos como la tirosina, triptófano y fenilalanina y de grandes residuos hidrofóbicos como la

metionina. Por lo que hidroliza un mayor número de uniones que la tripsina (Sanz 2012). Su actividad proteolítica es complementaria a la de la pepsina gástrica y de la tripsina (Mora-Brautigan, 2007).

La pepsina es una endopeptidasa y tiene la capacidad de hidrolizar los enlaces  $\text{NH}_2$  de diádicos aromáticos y aminoácidos en general produciendo peptonas y polipeptidos (Sanz, 2012). Los aminoácidos que se liberan gracias a la pepsina son la fenilalanina, el triptofano y la tirosina principalmente a un pH de 1.6 (Lehninger et al., 2008). La llegada de alimento provoca una fase de secreción gástrica cefálica mediada por el nervio vago y esto activa la secreción de la pepsina (Castelló Orvay, 1993). La pepsina se secreta en forma de pepsinogeno (forma inactiva) mediante las glándulas gástricas y es activada por la presencia del ácido clorhídrico y por un proceso auto catalítico (Stevens y Hume, 2004) adquiriendo así su capacidad enzimática.

La  $\alpha$ -amilasa es una enzima proteolítica responsable de la hidrólisis del glucógeno y almidón. Es producido como un zimógeno por las células acinares pancreáticas y su principal función en la digestión es proveer de energía al organismo (Cahu y Zambonino – Infante, 1994; Cahu et al., 2004). El almidón está formado por dos tipos de moléculas: la amilosa y la amilopectina, ambos polisacáridos de glucosa. La amilosa se conforma por cadenas lineales de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$ - C1-C4, mientras que la amilopectina tiene, además de estos últimos enlaces, -uniones C1 con C6, formando cadenas ramificadas. La  $\alpha$ -amilasa rompe uniones C1-C4, tanto en la amilasa como en la amilopectina, dejando dextrinas lineales, ramificadas (oligosacáridos) de diferentes tamaños como productos finales (Rose, 1980; Cruger y Cruger, 1993). Esta

enzima puede ser empleada para el diagnóstico de enfermedades, al determinar sus niveles en plasma y así saber si se puede producir una pancreatitis. Sus niveles pueden estar elevados por un daño a las células productoras de la enzima en el páncreas. Los niveles de actividad de esta enzima en peces carnívoros son bajos debido a que la cantidad de carbohidratos en su dieta es muy reducido (Hendrix, 2002)

La leucina aminopeptidasa pertenece a la familia de las peptidasas M17, es una enzima hexamérica con peso molecular de 320 kDa, actúa a pH de 8.5 y es dependiente de iones  $Mn^{2+}$ . Esta enzima normalmente se encuentra en las células hepáticas y en las células del intestino delgado. La medición de esta enzima puede ser empleada para verificar el estado fisiológico del hígado. Cuando se secreta demasiada leucina aminopeptidasa en la sangre es posible que exista un daño en las células hepáticas o un tumor en el hígado (Pratt, 2010). Dentro de las exoproteasas más estudiadas para determinar el desarrollo de las larvas de peces figuran la leucina-aminopeptidasa (Zambonino-Infante y Cahu, 1994; Tengjaroenkul et al., 2002) y su presencia ha sido asociada con la maduración de los enterocitos. En conclusión, la evaluación de la actividad enzimática puede ser empleada para dilucidar que patrones metabólicos son modificados por cambios en la dieta (Segner y Verreth, 1995).

Por otro lado, la eficiencia alimenticia se ve reflejada de manera directa en el estado de salud de los organismos, por lo que existen medidas, tales como los análisis hematológicos, que analizan ciertos parámetros dependientes del estado nutricional. Los análisis sanguíneos y serológicos básicos constituyen una serie de parámetros que están relacionados en la evaluación primaria de la respuesta inmune innata (Kiron,

2012). Uno de los parámetros bioquímicos más importantes es el nivel de proteína total (albuminas y globulinas) en sangre el cual es un indicador confiable del estado fisiológico (Svetina et al., 2002).

Las investigaciones relacionadas con el reemplazo de ingredientes de origen animal a vegetales han sido dirigidas en diversos organismos principalmente de interés comercial, sin embargo, la importancia ecológica de algunas especies han atraído la atención de ciertos sectores con el propósito de lograr su cultivo y preservación. *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1891), es un pez endémico del Golfo de California y durante varios años representó una importante pesquería en la zona. Sin embargo, la sobreexplotación, la alta mortalidad de sus juveniles en las redes camaroneras, la pesca ilegal, la captura durante su época reproductiva y las alteraciones ambientales de la región han puesto en peligro a la especie (Cisneros-Mata et al., 1995; Rodriguez y Hammann, 1997).

Con el fin de proteger la especie, el Gobierno de México declaró una moratoria sobre la pesquería de la totoaba en el año 1975. Para 1991, fue declarada especie en peligro de extinción y en 1992 se prohibió el uso de redes de enmalle (Pedrín-Osuna y Delgado-Marchena, 2001). A partir de entonces se ha trabajado en su recuperación mediante programas de repoblación realizados por la Unidad de Manejo Ambiental ubicada en la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada, dónde al mismo tiempo se ha tenido la oportunidad de ampliar el conocimiento relacionado con las características nutricionales de la especie.

El propósito de esta investigación es analizar el efecto de la harina y el aceite de soya sobre los parámetros productivos, fisiológicos, hematológicos y actividad de las enzimas digestivas de totoaba (*Totoaba macdonaldi*), con la intención de determinar el mejor contenido protéico y lipídico en el alimento formulado.

## ANTECEDENTES

Debido a la vulnerabilidad de la pesquería mundial para la producción de alimento para peces, existen diversos estudios que se han realizado con el propósito de conocer el efecto producido en los organismos expuestos al reemplazo parcial de harina y aceite de pescado por harina y aceite de soya. En este sentido, el concentrado de proteína de soya (70% de proteína) se considera como una opción prometedora en relación a la sustitución de harina de pescado debido a que su proceso (en mejora continua) elimina o desactiva los factores antinutricionales que posee (Kaushik et al., 1995; Day et al., 2000), además que la digestibilidad aparente de la proteína es similar a la de la harina de pescado (Stickney et al., 1996; Day et al., 2000; Kissil et al., 2000).

En consecuencia, la harina y el aceite de soya son considerados como alternativas sustentables para el reemplazo de la harina y el aceite de pescado en la industria acuícola, sin embargo las propiedades de éstos productos pueden ser modificados debido al tratamiento bajo el cual son procesados. Por ejemplo el tratamiento con calor bajo el cual procesan a la harina de soya, modifica la cantidad de lípidos contenidos en los granos y limita la concentración de aminoácidos lo cual produce una disminución en el crecimiento de los salmónidos (Davies y Morris, 1997).

La variación en el proceso de manufactura de la soya conduce a diferentes productos los cuales varían en sus características y aportes nutricionales. Ejemplo de esto es el estudio realizado con el pez dorada (*Sparus aurata*) donde se utilizó concentrado de proteína de soya y el cual reveló que una sustitución de 30% de harina de pescado por éste ingrediente reduce el crecimiento de los organismos (Kissil et al., 2000), sin

embargo, con turbot (*Scophthalmus maximus*) se logró reemplazar hasta un 25% de la harina de pescado sin efectos negativos tanto en crecimiento como en la utilización de los nutrientes (Day et al., 2000).

Con relación a los estudios realizados con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) existe cierta contradicción ya que Stickney et al. (1996) determinaron que se produce una disminución en el crecimiento de los organismos con el reemplazo de hasta un 50% de harina de pescado por harina de soya, sin embargo Kaushik et al. (1995) revelan que en la misma especie no existen efectos negativos tanto en el crecimiento así como en la utilización de los nutrientes con el reemplazo del 100% de harina de pescado por harina de soya.

En este mismo sentido, la eficiencia de la harina de soya ha sido probada y analizada con trucha arcoíris (Olli y Krogdahl, 1994) y salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Olli et al. 1994) y los resultados demuestran que su efectividad no disminuye si se suministra sin desengrasar en la dieta lo cual refleja una mejora en el crecimiento de los organismos en comparación con las dietas formuladas con harina desengrasada.

Por otro lado el aceite de soya es un elemento de gran importancia en la industria alimenticia. Sin embargo, y tal como ocurre con la porción protéica de la soya, el aceite de soya tiene elementos que podrían tener cierto impacto sobre los organismos que los consumen produciendo problemas alérgicos, bociógenos y anticoagulantes (Stankovic et al., 2011).

Comparativamente con el aceite de pescado, el aceite de soya presenta una carencia de HUFAs, principalmente de la serie  $\omega$ -3, por lo tanto su consumo afecta de manera significativa el crecimiento de la dorada (*Sparus aurata*) (Kalogeropoulos et al., 1992). De igual manera, en los salmónidos el incluir aceites de origen vegetal afecta tanto la composición de las membranas, las funciones inmunológicas y la producción de eicosanoides (Merrifield et al., 2011).

Por otro lado, existen estudios que destacan la eficiencia del aceite de soya como ingrediente en las dietas formuladas para organismos en cultivo. Investigaciones realizadas con el pez dorada (*Sparus aurata*) revelan que el aceite de pescado puede ser sustituido hasta 60% por aceites de soya sin comprometer la salud de los organismos (Montero et al., 2003).

En turbot (*Scophthalmus maximus*), los resultados de la investigación indican que es posible el reemplazo de aceite de pescado por aceite de soya presentando un efecto mínimo en el crecimiento y destacan que los lípidos suministrados en la dieta funcionan como un vector eficaz para modificar la calidad nutricional del producto final (Regost et al., 2003).

Con sargo picudo (*Diplodus puntazo*) se determinó que existe un aumento en la cantidad de ácido linoléico y linolénico, y una disminución poco significativa de ARA, EPA y DHA en los organismos alimentados con aceites de origen vegetal (Piedecausa et al., 2007).



## JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda en la producción acuícola mundial y las cantidades limitadas de proteína de pescado, requiere que los alimentos destinados a esta actividad puedan llegar a estar comprendidos por fuentes alternativas y altamente digestibles de origen vegetal. En este sentido, la soya y sus derivados son productos ampliamente recomendados para su uso en la producción de alimentos balanceados debido a la disponibilidad y accesibilidad económica en comparación con el uso de harina y aceite de pescado. Sin embargo, en la harina y el aceite de soya existen factores que dificultan la digestión y absorción de los nutrientes, los cuales pueden causar problemas digestivos y de salud dependiendo de las concentraciones suministradas. Por este motivo es importante investigar cual es el máximo porcentaje de sustitución de la harina y aceite de pescado por la harina y aceite de soya así como los efectos causados a nivel productivo, enzimático, hematológico y de química sanguínea en juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

## HIPOTESIS

El uso de harina y aceite de soya como fuentes de proteína y lípidos en la dieta para juveniles de *Totoaba macdonaldi* tendrán un efecto positivo en los parámetros productivos, hematológicos y actividad de las enzimas digestivas lo cual se verá reflejado según el nivel de inclusión.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL:

- Analizar el efecto de dietas formuladas con harina y aceite de soya sobre los efectos digestivos, productivos, hematológicos, fisiológicos y metabólicos de totoaba (*Totoaba macdonaldi*).

### OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la respuesta en crecimiento y sobrevivencia de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos formulados con harina y aceite de soya.
- Analizar el perfil de aminoácidos y ácidos grasos de las dietas y de los tejidos de los organismos expuestos a los diferentes tratamientos formulados con harina y aceite de soya.
- Evaluar la actividad de proteasas digestivas: Tripsina, Quimotripsina,  $\alpha$ -Amilasa, Leucina Aminopeptidasa y proteasa alcalina en intestino de juveniles de totoaba

(*Totoaba macdonaldi*) alimentados con dietas formuladas con harina y aceite de soya.

- Analizar los cambios hematológicos y química sanguínea producidos en los organismos expuestos a los diferentes tratamientos formulados con harina y aceite de soya.

# **CAPÍTULO II**

## **EXPERIMENTO I: Evaluación de dietas formuladas con aceite de soya sobre la actividad de enzimas digestivas, parámetros productivos, hematológicos y perfil de ácidos grasos de *Totoaba macdonaldi***

### **2.1.- Materiales y métodos**

#### 2.1.1.- Formulación de las dietas

Se formularon cuatro dietas experimentales isoprotéicas (proteína cruda: 50%, materia seca) e isolipídicas (lípidos crudos: 12%, materia seca) con un incremento en la sustitución de aceite de pescado por aceite de soya: 33, 50 and 68% (AS-33, AS-50 y AS-68, respectivamente); y una dieta control de 100% aceite de pescado (AS-0). Los ingredientes y la composición proximal de las dietas experimentales son presentadas en la Tabla 1. Todos los ingredientes fueron mezclados en un procesador de alimentos (Hobart, Troy, OH, USA). La mezcla húmeda fue peletizada a través de un molde de 3 mm de diámetro en un molidor de carne comercial, posteriormente los pellets fueron secados durante 18 horas en un horno de convección con salida de humedad a  $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Los pellets secos fueron fraccionados a un tamaño menor y posteriormente tamizados para eliminar el polvo fino, posteriormente fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Tabla 1. Composición de ingredientes (g 100g<sup>-1</sup>, base en peso seco), porcentaje de reemplazo y composición proximal de las dietas experimentales conteniendo diferentes concentraciones de aceite de soya en juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

Ingredientes (% peso seco)	Dietas			
	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68
Harina de pescado <sup>a</sup>	80.00	29.30	14.50	0.00
Harina de pescado desengrasada	0.00	37.30	48.60	59.70
Harina integral de trigo	0.00	8.00	8.00	8.00
Celulosa	0.70	3.64	6.43	9.00
Grenetina	5.00	5.00	5.00	5.00
Aceite de pescado	4.10	2.60	1.20	0.00
Aceite de soya	0.00	3.96	6.07	8.10
ASA pre mezcla minerales <sup>b</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00
ASA pre mezcla de vitaminas <sup>c</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00
Nutrikelp <sup>d</sup>	4.00	4.00	4.00	4.00
Cloruro de colina	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina E	0.10	0.10	0.10	0.10
Taurina <sup>e</sup>	1.10	1.10	1.10	1.10
Lisina <sup>e</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30
Metionina <sup>e</sup>	0.20	0.20	0.20	0.20
Probiótico <sup>f</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>Porcentaje de reemplazo</i>				
Harina de pescado	100	100	100	100
Aceite de pescado	100	66	50	32
<b>Aceite de soya</b>	<b>0</b>	<b>33</b>	<b>50</b>	<b>68</b>
<i>Análisis proximal (%)</i>				
Proteínas totales	49.0	51.3	50.5	51.9
Lípidos totales	13.3	13.6	13.0	12.4
Almidón	0.0	5.1	5.3	7.3
Cenizas	12.0	13.3	13.6	13.6
Energía bruta (kJ g <sup>-1</sup> )	19.8	19.8	19.7	19.8
Relación P/E (g kJ <sup>-1</sup> )	23.2	24.2	24.2	25.2

<sup>a</sup> Rangen, commercial HighPro fish meal, U.S.A. (proteína: 54.3%; lípidos: 9.0%; ceniza: 13.4%).

<sup>b</sup> Rangen, commercial HighPro semidesgrazada, U.S.A. (proteína: 71.0%; lípidos: 5.2%; ceniza: 18.5%).

<sup>c</sup> ASA Premix (g kg<sup>-1</sup>): tiamina HCl, 0.5; riboflavina, 8.0; piridoxina HCl, 5.0; Capantothenate, 20.0; niacina, 40.0; biotina, 0.040; folic acid, 1.80; cyanocobalamin, 0.002; vitamina A acetato (500,000 IU g<sup>-1</sup>) 2.40; vitamina D3 (400,000 IU g<sup>-1</sup>), 0.50; DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate, 80.0;  $\alpha$  celulosa 834.26.

<sup>e</sup> ASA Premix (g 100 g<sup>-1</sup>): cobalt chloride, 0.004; cupric sulfate pentahydrate, 0.250, ferrous sulfate heptahidrate, 4.0, sulfato de manganeso anhidros, 0.65; potasio de iodo, 0.067; selenita de sodio, 0.010; zinc sulfate heptahidrate 13.19,  $\alpha$ -celulosa 81.83.

<sup>d</sup> Albiomar, México.

<sup>e</sup> Aminoácidos de Pharmaceutical Co., Ltd., U.S.A.

<sup>f</sup> Probiótico liofilizado (1 x 10<sup>7</sup> células g<sup>-1</sup>): *Bacillus subtilis* aislado de ambiente marino y cultivado en medio mineral de soya (Ochoa-Solano y Olmos-Soto 2006).

### 2.1.2.- Manejo de animales

Los juveniles de *Totoaba macdonaldi* fueron obtenidos de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, México. Los peces fueron transferidos a las instalaciones experimentales las cuales consistieron de un sistema de recirculación termo regulado equipado con 12 tanques de fibra de vidrio de 120 L de capacidad. Durante el ensayo, la temperatura fue mantenida a  $23.2 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$  y el fotoperiodo fue programado a 12:12 h (luz:oscuridad). La concentración promedio de la salinidad fue de 34‰ y el oxígeno fue mantenido a saturación durante todo el experimento. Previo al comienzo del experimento, los peces fueron aclimatados a las instalaciones y a la dieta control (AS-0) por un periodo de dos semanas. Al finalizar la aclimatación, 420 juveniles de totoaba ( $4.03 \pm 0.06$  g) fueron seleccionadas al azar y asignadas a sus respectivos tanques a una densidad de 35 peces/tanque. Cada dieta experimental fue asignada al azar en tres diferentes tanques (triplicados), la alimentación fue a aparente saciedad dos veces al día (09:00 y 16:00 h) durante 60 días.

### 2.1.3.- Biometrías y obtención de muestras

Los peces fueron pesados al inicio, después de 4 semanas y al final del experimento bajo el efecto de anestesia ligera ( $100 \text{ mg L}^{-1}$  de aceite de clavo). Del stock inicial se tomaron veinte peces, y al final del experimento se seleccionaron 4 peces al azar de cada tanque los cuales fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para subsecuentemente realizar

análisis proximales de pez entero. Se seleccionaron otros 10 peces de cada tanque para tomar muestras de hígado y músculo los cuales fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizar futuros análisis. El peso húmedo de los organismos y sus respectivos hígados fueron registrados para la determinación del índice hepatosomático.

#### 2.1.4.- Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia

Los principales parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia fueron calculados usando las siguientes formulas:

##### Sobrevivencia (%)

$$\text{Sobrevivencia} = [(\text{Número final de peces} / \text{Numero inicial de peces}) * 100]$$

##### Ganancia de peso

$$\text{GP (g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [((\text{PF}-\text{PI}) \times 1000) / \text{PCP}] / \text{días}$$

$$\text{PCP (promedio del peso corporal)} = \text{peso inicial (g)} + \text{peso final (g)} / 2$$

##### Índice de crecimiento diario

$$\text{ICD} = [(\text{peso final}^{\wedge} (1/3) - \text{peso inicial}^{\wedge} (1/3)) / (\text{días})] \times 100$$

##### Consumo de alimento

$$\text{CA} = \text{consumo de alimento (g)} * 1000 / \text{PCP} / \text{días}$$

##### Tasa de eficiencia alimenticia

$$\text{TEA} = \text{ganancia de peso} / \text{alimento consumido}$$

##### Tasa de eficiencia proteica

$$\text{TEP} = \text{ganancia de peso (g)} / \text{proteína total consumida (g)}$$

##### Índice hepatosomático

$$\text{IHS (\%)} = (\text{Peso hígado} / \text{peso del pez}) \times 100$$



### 2.1.5.- Retención de nutrientes

Los cálculos hechos para la retención de nitrógeno, lípidos y energía fueron realizados según la metodología descrita por Cho y Kaushik (1990) con base en los resultados obtenidos en los análisis de composición proximal de pez entero.

Las formulas empleadas fueron las siguientes:

#### Retención de nitrógeno

$$NI \text{ (g kg PCP}^{-1}\text{día}^{-1}) = [(((AI \times PC) / 100)) / 6.25] / ((PI + PF) / 2)$$

$$NR \text{ (g kg PCP}^{-1}\text{día}^{-1}) = [(PF \times PFC - PI \times PIC) / 6.25 / ((PI + PF) / 2)] / \text{días}$$

$$NR \text{ (\% NI)} = (NR / NI) \times 100$$

NI = nitrógeno ingerido desde la dieta

PCP = peso corporal promedio (peso corporal inicial + peso corporal final)/2)

AI = alimento ingerido por pez por día (peso seco)

PC = proteína cruda de la dieta (peso seco)

PF = peso corporal final

PI = peso corporal inicial

NR (g kg PCP<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) = cantidad de nitrógeno retenido desde la dieta

PFC = Proteína final de pez entero

PIC = Proteína inicial de pez entero

#### Retención de lípidos

$$LI \text{ (g kg PCP}^{-1}\text{ día}^{-1}) = [(AI \times LC) / 100] / ((PI + PF) / 2)$$

$$LR \text{ (g kg PCP}^{-1}\text{ día}^{-1}) = [(PF \times LFC - PI \times LIC) / ((PI + PF) / 2)] / \text{días}$$

$$LR \text{ (\% LI)} = (LR / LI) \times 100$$

LI = lípidos ingeridos desde la dieta

PCP = peso corporal promedio (peso corporal inicial + peso corporal final)/2)

AI = alimento ingerido por pez por día (peso seco)

LC = lípidos crudos de la dieta (peso seco)

PF = peso corporal final

PI = peso corporal inicial

$L_R$  (g kg PCP<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) = cantidad de lípido retenido desde la dieta

LFC = Lípido final de pez entero

LIC = Lípido inicial de pez entero

### Retención de energía

$$EI \text{ (g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(AI \times EC) / 100] / ((PI + PF) / 2)$$

$$E_R \text{ (g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}) = [(PF \times EFC - PI \times EIC) / ((PI + PF) / 2)] / \text{días}$$

$$E_R \text{ (\% LI)} = (E_R / LI) \times 100$$

EI = energía ingerida desde la dieta

PCP = peso corporal promedio (peso corporal inicial + peso corporal final)/2)

AI = alimento ingerido por pez por día (peso seco)

EC = energía de la dieta (peso seco)

PF = peso corporal final

PI = peso corporal inicial

$E_R$  (g kg PCP<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>) = cantidad de energía retenida desde la dieta

EFC = Energía final de pez entero

EIC = Energía inicial de pez entero

## **2.2.- Métodos analíticos**

### 2.2.1.- Análisis químicos proximales

Los análisis de composición química de dietas (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, peso seco) y tejidos (pez entero, músculo e hígado, g 100 g tejido<sup>-1</sup>, peso húmedo) fueron realizados de acuerdo a los métodos descritos por la AOAC (2000) para humedad, proteína cruda y cenizas. La extracción de lípidos totales se realizó por el método de Folch (1957) empleando la mezcla de 1:metanol-2:diclorometano como solución de extracción en vez de cloroformo. Para realizar el cálculo de glucógeno se empleó la metodología de

Plummer (1987) donde el glucógeno fue hidrolizado hasta glucosa la cual fue determinada mediante un kit comercial (*Pointe Scientific, INC*). La descripción de las metodologías se presenta en la sección de anexos.

### 2.2.2.- Perfil de ácidos grasos

El análisis de ácidos grasos (FA) comienza con la extracción de lípidos mediante la metodología de Folch (1957) usando diclorometano en sustitución de cloroformo. Después de la extracción, se realizó la saponificación y posteriormente la metilación con Trifluoruro de boro ( $\text{BF}_3$ ) en metanol al 14% (Metcalf et al., 1966). Los metil ester de ácidos grasos (FAMES) de las dietas y muestras de tejidos fueron analizados en un cromatógrafo de gases de la marca Agilent Technologies 6850 Network equipado con un detector de flama ionizada usando hidrógeno como gas acarreador y una columna capilar Omegawax™ 320 de Supelco/Sigma-Aldrich: 30 m×0.32 mm, con un espesor de 0.25  $\mu\text{m}$ . Los ácidos grasos fueron identificados comparando en el tiempo de retención con mezclas de estándares (37 Component FAME mix, Nun-Check GLC-96, Supelco GLC-90, PUFA No.1 Mix Marine Source, PUFA No. 2 Animal Source, PUFA No. 3 Menhaden Fish Oil, Supelco RM-2, Supelco RM-6, Nun Check GLC-87). La cuantificación de cada ácido graso fue calculado de acuerdo al área bajo la curva correspondiente de cada cromatograma usando un estándar interno (19:0). Los cálculos correspondientes fueron completados a través del software HP ChemStation AO.6 para Windows (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, base peso seco) de las dietas experimentales.

Ácidos grasos	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68
C14:0	0.29	0.29	0.15	0.09
C14:1n9	0.30	ND	0.03	0.04
C15:0	0.04	0.04	0.02	0.02
C15:1	0.06	ND	ND	ND
C16:0	2.19	2.33	1.79	1.53
C16:1n7	0.40	0.34	0.18	0.12
C16:2n4	0.04	0.05	0.03	0.02
C16:4	0.02	0.03	0.03	0.04
C17:0	0.07	0.04	0.02	0.01
C17:1n7	0.02	0.02	0.01	0.01
C18:0	0.33	0.32	0.36	0.30
C18:1n9	2.01	2.87	2.43	2.43
C18:2n6	1.17	2.70	4.21	4.48
C18:3n4	0.02	0.02	ND	ND
C18:3n3	0.11	0.27	0.41	0.43
C18:4n3	0.06	0.06	0.04	0.04
C20:1n9	0.06	0.14	0.19	0.19
C20:3n6	0.02	0.02	0.06	ND
C20:4n6	0.13	0.11	0.06	0.05
C20:3n3	0.02	0.02	0.02	ND
C20:5n3	0.67	0.61	0.40	0.33
C22:2n6	0.03	0.02	ND	ND
C22:4	0.02	0.03	ND	ND
C22:5n3	0.05	0.04	0.02	0.02
C22:6n3	0.87	0.78	0.49	0.38
Σ SFA	2.92	3.01	2.35	1.94
Σ MUFA	2.85	3.38	2.85	2.79
Σ PUFA	3.23	4.76	5.70	5.81
Σ PUFA n-3	1.79	1.70	1.39	1.19
Σ PUFA n-6	1.35	2.85	4.33	4.53
n-3/n-6	1.33	0.63	0.32	0.26

ND: No detectados; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monosaturados; PUFA: ácidos grasos polinsaturados.

Tabla 3. Composición de aminoácidos (g/100 mg de proteína) de las dietas experimentales.

Aminoácido	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68
Asp	9.2	9.8	7.1	10.0
Glu	17.4	17.4	12.3	17.0
Ser	3.9	4.2	3.0	4.2
His	2.9	2.9	1.7	2.8
Gly	6.4	6.3	4.4	6.1
Thr	3.7	4.0	2.9	4.2
Arg	5.7	6.7	4.5	6.6
Ala	5.8	5.7	4.0	5.6
Tyr	0.7	1.5	0.8	1.4
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0
Pro	2.2	2.2	1.6	2.3
Val	4.1	4.6	3.2	4.7
Met	0.3	1.4	0.7	1.6
Phe	3.3	3.7	2.3	3.9
Ile	3.2	3.8	2.5	4.0
Leu	7.2	7.4	5.2	7.5
Lys	4.1	0.6	0.1	2.1

### 2.2.3.- Análisis hematológico

Al finalizar el experimento se llevaron a cabo los análisis hematológicos con 24 organismos de cada tratamiento expuestos a un ayuno de 24 horas. Con las mezclas de sangre se midió el hematocrito (HT), hemoglobina (HB) y conteo de células rojas (RBC) con solución Dacies. Los valores de HT fueron determinados por el método de microhematocrito (Valenzuela et al., 2002) donde las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente el hematocrito fue cuantificado en un lector de hematocrito de la marca *Spiracrit Lancer*. La HB fue analizada por medio de un procedimiento estandarizado usando un kit de la marca *Pointe Scientific (USA)*. Para calcular la cantidad de eritrocitos circulantes se mezclaron 20 µl de muestra (sangre) en 1 ml de solución Dacie a razón de 1:50 (Blaxhall y Daisley, 1973). El conteo de RBC se realizó de acuerdo a los métodos descritos por *Marienfeld GmbH y Company* a partir de fotos tomadas a una cámara *Neubauer* con una cámara digital *PAXcam2 (Pax-it versión 6, MIS, Inc., USA)* conectada a un microscopio óptico *BH-2 Olympus (Japón)*. Los índices *Wintrobe* (volumen celular medio (MCV), concentración media de hemoglobina (MCH) y concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC) fueron calculados de acuerdo a *Sandnes et al. (1988)* con los valores calculados para HT, HB, y RBC para caracterizar los eritrocitos en la sangre periférica, usando las siguientes fórmulas:

- Media del volumen celular (eritrocitos) (MVC, fL) =  $HT * 10^7 / EC$
- Media de hemoglobina celular (MHC, pg) =  $HB * 10^7 / RBC$

- Media de la concentración de hemoglobina corpuscular (MCHC,  $\text{g dl}^{-1}$ ) =  
 $\text{HB} \cdot 100 / \text{HT}$

Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C para poder obtener plasma sanguíneo que fue empleado para realizar los análisis de glucosa, albumina y proteína total los cuales fueron medidos con kits comerciales de la marca Pointe Scientific. La concentración de globulinas (GLB) y la relación AL:GLB fueron calculados usando las siguientes formulas:

- $\text{GLB} = \text{TP} - \text{AL}$
- $\text{AL:GLB} = \text{AL} / \text{GLB}$ .

#### 2.2.4.- Análisis estadístico

Los resultados son presentados como media  $\pm$  error estándar. La normalidad de los datos fue determinada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov test y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para procesar los resultados, seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples para comparar el comportamiento de las dietas (AS-0, AS-33, AS-50 y AS-68). Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa Sigma Stat versión 3.5 y se empleó un nivel de significancia de 0.05.

## 2.3.- Resultados

### 2.3.1. Crecimiento y eficiencias alimenticias

Durante el periodo experimental no se registraron enfermedades. La sobrevivencia fue similar ( $P = 0.582$ ) en todos los tratamientos y el rango que presentaron va desde 96 a 99% a lo largo de los 60 días del bioensayo. Las mayores ganancias de peso ( $P < 0.001$ ) se presentaron en los organismos alimentados con las dietas AS-0, AS-33 y AS-50, mientras que la menor ganancia de peso se observó en la dieta AS-68. Así mismo, el índice de crecimiento diario mostró diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre las dietas AS-0, AS-33, AS-50 con respecto a la dieta con mayor contenido de aceite de soya, AS-68 ( $3.1 \pm 0.01\%$ ). La tasa de eficiencia alimenticia ( $P = 0.004$ ) y la tasa de eficiencia proteica ( $P = 0.024$ ) de la dieta AS-68 fue significativamente diferente comparadas con el resto de las dietas lo cual indica que existe un efecto por la inclusión de aceite de soya en las dietas (Tabla 4). Finalmente, los resultados obtenidos en la regresión polinomial indican que el máximo porcentaje de reemplazo de aceite de soya por aceite de pescado es de 23%.



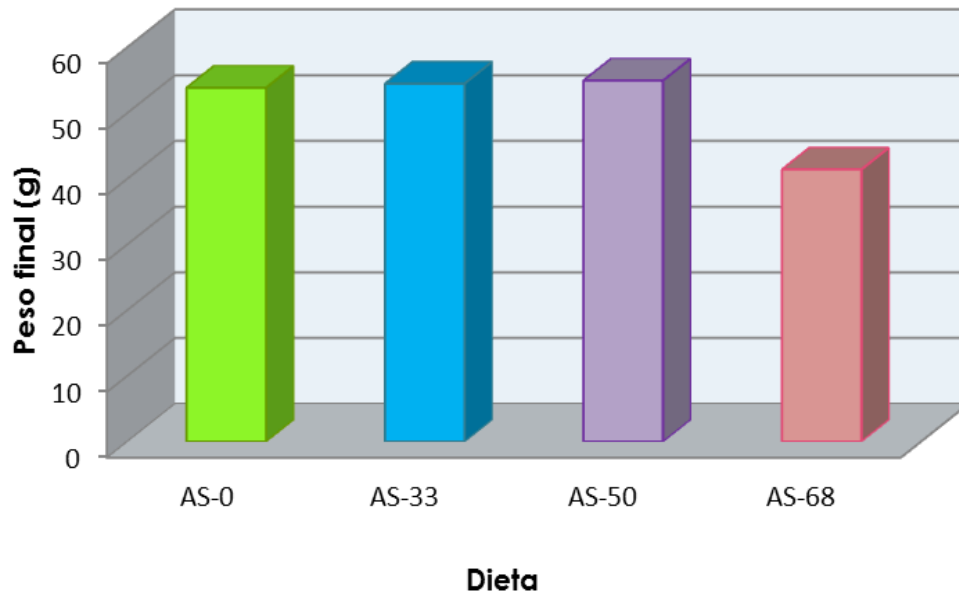


Figura 1. Crecimiento en peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días.

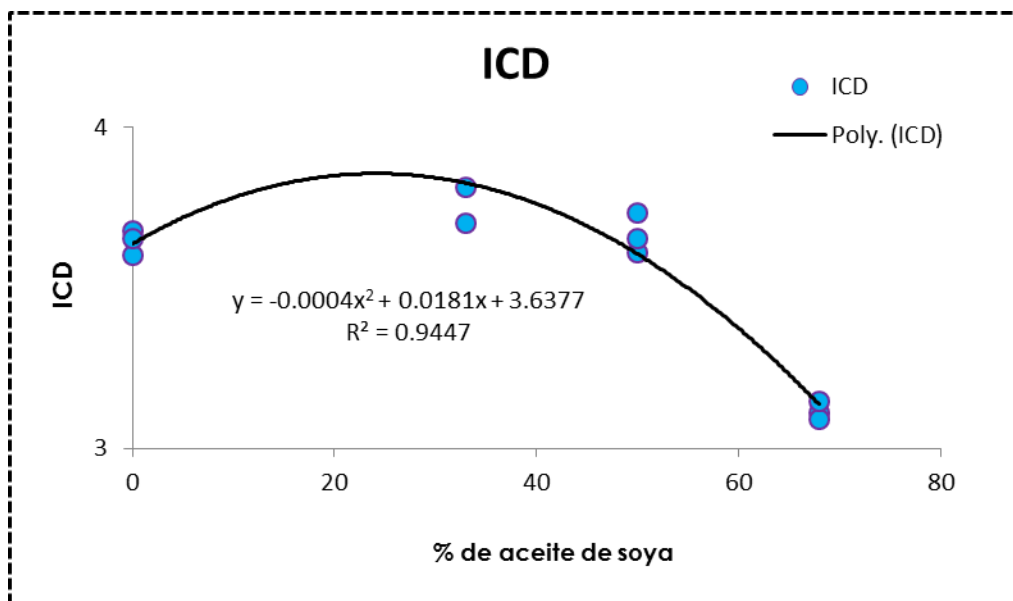


Figura 2. Regresión polinomial entre el índice de crecimiento diario (ICD) y el porcentaje de reemplazo de aceite de soya en las dietas experimentales suministradas a juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

Tabla 4. Crecimiento y rendimiento alimenticio de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días.

	Dietas				Valor P
	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68	
Sobrevivencia (%)	98.1 ± 0.95	99.0 ± 0.95	96.1 ± 1.90	96.1 ± 2.51	0.582
Peso inicial corporal (g)	4.0 ± 0.01	4.0 ± 0.02	4.1 ± 0.03	4.0 ± 0.04	0.133
Peso final corporal (g)	53.8 ± 0.54 <sup>a</sup>	54.5 ± 2.77 <sup>a</sup>	54.9 ± 0.82 <sup>a</sup>	41.4 ± 0.42 <sup>b</sup>	<0.001
Ganancia de peso (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	28.9 ± 0.27 <sup>a</sup>	30.5 ± 0.89 <sup>a</sup>	29.5 ± 0.40 <sup>a</sup>	22.7 ± 0.22 <sup>b</sup>	< 0.001
Tasa de crecimiento diario (%) <sup>†</sup>	3.6 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.01 <sup>b</sup>	< 0.001
Consumo de alimento (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	17.1 ± 0.86	17.4 ± 0.66	17.2 ± 0.34	17.9 ± 0.10	0.740
Tasa de eficiencia alimenticia <sup>‡</sup>	1.75 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.67 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.004
Tasa de eficiencia proteica <sup>§</sup>	1.9 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.024

Media (± SEM) de las dietas AS-0, AS-33, AS-50, AS-68 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

<sup>†</sup>ICD: [(peso final<sup>1/2</sup> - peso inicial<sup>1/2</sup>)/(días)] x100.

<sup>‡</sup>TEA: (ganancia de peso/consumo de alimento).

<sup>§</sup>TEP: (ganancia de peso/consumo de proteína cruda).

PCP: Peso corporal promedio: (peso inicial + peso final)/2.

### 2.3.2.- Composición proximal (peso húmedo)

La composición proximal de los tejidos se presenta en la Tabla 5. Los organismos alimentados con las dietas AS-0, AS-33 y AS-50 presentaron la mayor concentración de proteína cruda en pez entero ( $P = 0.030$ ). El contenido de lípidos crudos no presentaron diferencias significativas ( $P = 0.785$ ) entre los organismos que se alimentaron con las dietas experimentales y la control. El contenido de proteína cruda en el músculo de los organismos fue estadísticamente similar ( $P = 0.123$ ) entre las dietas, al igual que el contenido de lípidos crudos ( $P = 0.415$ ). En hígado, la concentración de proteína cruda fue estadísticamente similar ( $P = 0.952$ ) entre las cuatro dietas experimentales, sin embargo, los lípidos crudos presentaron una tendencia a incrementar (13.07 en AS-0, 14.36 en AS-33, 17.01 en AS-50 y 24.63% en AS-68) con la inclusión de aceite de soya ( $P < 0.001$ ), donde los organismos alimentados con la dieta AS-68 presentaron la mayor concentración de lípidos crudos. El glucógeno presentó diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en todos los tratamientos, mostrando una tendencia a disminuir conforme la inclusión de aceite de soya se incrementó. El índice hepatosomático mostró un incremento sucesivo con la inclusión de aceite de soya hasta alcanzar una diferencia significativa ( $P = 0.007$ ) en el tratamiento AS-68 con un índice de 1.42, con respecto al índice más bajo de 1.04 en los organismos alimentados con la dieta AS-33.

Tabla 5. Composición proximal (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, peso base húmedo) de pez entero, músculo e hígado de *Totoaba macdonaldi* por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=9).

	Dietas				Valor-P
	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68	
<u>PEZ ENTERO</u>					
Humedad	71.17 ± 0.30 <sup>b</sup>	71.39 ± 0.07 <sup>b</sup>	71.62 ± 0.18 <sup>b</sup>	74.60 ± 0.04 <sup>a</sup>	< 0.001
Proteína cruda	18.9 ± 0.32 <sup>a</sup>	18.9 ± 0.28 <sup>a</sup>	18.6 ± 0.28 <sup>a</sup>	15.0 ± 0.70 <sup>b</sup>	< 0.001
Lípidos crudos	0.75 ± 0.03	0.75 ± 0.05	0.73 ± 0.04	0.79 ± 0.05	0.785
Cenizas	1.5 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.9 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.0 ± 0.22 <sup>ab</sup>	2.6 ± 0.21 <sup>a</sup>	< 0.001
Energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	6.22 ± 0.16 <sup>a</sup>	6.15 ± 0.04 <sup>a</sup>	6.09 ± 0.06 <sup>a</sup>	5.33 ± 0.14 <sup>b</sup>	< 0.001
<u>MÚSCULO</u>					
Humedad	76.14 ± 0.21	76.25 ± 0.16	76.33 ± 0.37	76.22 ± 0.21	0.963
Proteína cruda	20.32 ± 0.31	20.15 ± 0.12	19.64 ± 0.09	20.39 ± 0.29	0.123
Lípidos crudos	1.63 ± 0.15	1.53 ± 0.11	1.80 ± 0.13	1.86 ± 0.19	0.415
Cenizas	1.39 ± 0.08	1.60 ± 0.09	1.40 ± 0.10	1.31 ± 0.06	0.145
Energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	5.5 ± 0.11	5.4 ± 0.03	5.5 ± 0.18	5.6 ± 0.04	0.813
<u>HÍGADO</u>					
Humedad	66.66 ± 0.59 <sup>a</sup>	66.25 ± 1.17 <sup>a</sup>	63.07 ± 0.47 <sup>b</sup>	58.02 ± 0.47 <sup>c</sup>	< 0.001
Proteína cruda	13.56 ± 0.51	13.54 ± 0.09	13.53 ± 0.12	13.36 ± 0.08	0.952
Lípidos crudos	13.07 ± 0.70 <sup>c</sup>	14.36 ± 0.46 <sup>c</sup>	17.01 ± 0.28 <sup>b</sup>	24.63 ± 0.19 <sup>a</sup>	< 0.001
Cenizas	1.82 ± 0.15 <sup>ab</sup>	1.85 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.58 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.08 <sup>c</sup>	< 0.001
Glucógeno	2.49 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.22 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.78 ± 0.01 <sup>d</sup>	< 0.001
Energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	9.3 ± 0.49 <sup>c</sup>	9.6 ± 0.37 <sup>bc</sup>	10.7 ± 0.04 <sup>b</sup>	13.4 ± 0.10 <sup>a</sup>	< 0.001
IHS	1.10 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.28 ± 0.09 <sup>ab</sup>	1.42 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.007

Media (± SEM) de las dietas AS-0, AS-33, AS-50, AS-68 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

IHS: Índice Hepatosomático: (peso del hígado / peso corporal) ×100.

### 2.3.3.- Perfil de ácidos grasos

Los valores correspondientes al perfil de ácidos grasos del músculo de totoaba son mostrados en la Tabla 6, los cuales presentaron variaciones en su composición y coinciden con la dieta que consumieron ya que los ácidos grasos saturados (SFA) y los ácidos grasos monosaturados (MUFA) mantuvieron una tendencia a disminuir significativamente ( $P = 0.010$ ) conforme se incrementó la inclusión de aceite de soya en las dietas experimentales. El total de ácidos grasos polinsaturados (PUFA), principalmente de la cadena n-6, se incrementaron significativamente ( $P = 0.007$ ) con el aumento del aceite de soya. En este mismo sentido, la mayor cantidad de PUFA n-3 se presentó en la formulación con 0% de aceite de soya (100% aceite de pescado) y disminuyó conforme el aceite de soya aumentó en las dietas experimentales ( $P = 0.008$ ). La relación n-3/n-6 fue significativamente elevada en los juveniles de totoaba alimentados con 0% de aceite de soya y los niveles disminuyeron ( $P < 0.01$ ) significativamente (1.57, 0.86, 0.53, 0.20) con el aumento de aceite de soya (AS-33, AS-50, AS-68). Por otro lado, las concentraciones de ácido linoleico (C18:2n6) y ácido linolénico (C18:3n3) se incrementaron significativamente con la inclusión de aceite de soya por lo que el valor más bajo se observó en la dieta AS-0. Finalmente, las concentraciones de ARA (C20:4n6), EPA (C20:5n3) y DHA (C22:6n3) disminuyeron significativamente su concentración conforme la inclusión de aceite de soya aumentó.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (g 100 g músculo<sup>-1</sup>, en base seca) de músculo de juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales (n= 6).

Ácido graso	AS-0%	AS-33%	AS-50%	AS-68%	Valor P
C14:0	0.04 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C16:0	1.05 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.86 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.56 ± 0.03 <sup>b</sup>	< 0.001
C16:1n7	0.12 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.04 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C16:2n4	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C16:4	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C18:0	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>b</sup>	< 0.001
C18:1n9	1.44 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C18:2n6	0.66 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.18 <sup>b</sup>	1.75 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.16 <sup>a</sup>	< 0.001
C18:3n4	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>ab</sup>	< 0.001
C18:3n6	ND	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	NA
C18:3n3	0.04 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>a</sup>	< 0.001
C18:4n3	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	< 0.001
C20:1n9	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.060
C20:2n6	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C20:3n6	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00	ND	0.00 ± 0.00	NA
C20:4n6	0.11 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>c</sup>	< 0.001
C20:3n3	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	ND	NA
C20:5n3	0.37 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.22 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>c</sup>	< 0.001
C22:0	ND	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	NA
C22:1n9	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.194
C22:2n6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	ND	ND	NA
C22:4	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	ND	NA
C22:5n3	0.02 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	< 0.001
C22:6n3	0.85 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>b</sup>	< 0.001
Σ SFA	1.29 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.029
Σ MUFA	1.70 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.77 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.010
Σ PUFA	2.26 ± 0.05	1.83 ± 0.39	2.87 ± 0.03	2.41 ± 0.21	0.119
Σ PUFA n-3	1.33 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.97 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.008
Σ PUFA n-6	0.85 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.007
n-3/n-6	1.57 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>d</sup>	<0.01

Media (± SEM) de las dietas AS-0, AS-33, AS-50, AS-68 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05). ND: No detectados; NA: No aplica; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monosaturados; PUFA: ácidos grasos polinsaturados.

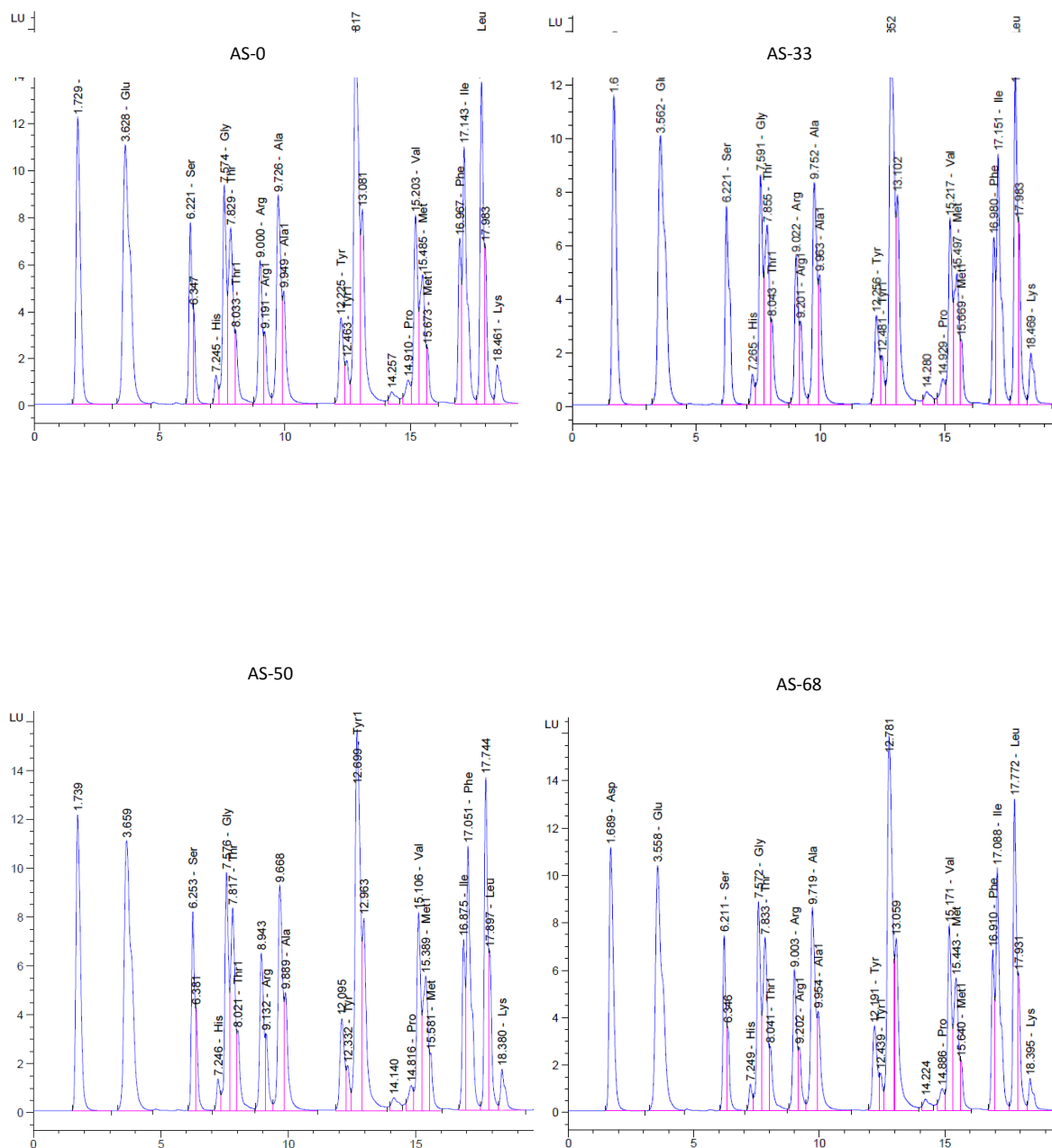


Tabla 7. Perfil de aminoácidos de músculo de *Totoaba macdonaldi* alimentados con aceite de soya.

#### 2.3.4.- Retención de nutrientes

El consumo de nitrógeno ( $\text{g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) no presentó diferencias significativas ( $P = 0.107$ ) entre los tratamientos. Sin embargo, la retención de N tiende a disminuir significativamente ( $P = 0.001$ ) a medida que se aumentó el aceite de soya en las dietas. El consumo de lípidos ( $\text{g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) no presentó diferencias significativas ( $P = 0.373$ ) entre los tratamientos, la retención de lípidos presentó una tendencia a disminuir conforme la inclusión de aceite de soya aumentó, sin embargo esta diferencia no fue significativamente ( $P = 0.235$ ). El consumo de energía ( $\text{kJ kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ( $P = 0.078$ ). Sin embargo el porcentaje de retención de energía fue significativamente más alto en las dietas AS-0, AS-33 y AS-50 ( $P < 0.001$ ) (Tabla 8).



Tabla 8. Retención de nutrientes en pez entero (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, en base húmeda) en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=9).

	Dietas				Valor P
	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68	
<i>Nitrógeno</i>					
Consumo (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	2.64 ± 0.14	2.68 ± 0.07	2.81 ± 0.11	3.07 ± 0.09	0.107
Retención (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.90 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>b</sup>	< 0.001
Retención (%)	32.0 ± 1.12 <sup>a</sup>	33.0 ± 0.77 <sup>a</sup>	31.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	22.0 ± 1.33 <sup>b</sup>	< 0.001
<i>Lípidos</i>					
Consumo (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	4.52 ± 0.24	3.98 ± 0.34	4.51 ± 0.76	4.5 ± 0.14	0.373
Retención (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.20 ± 0.00	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.385
Retención (%)	4.41 ± 0.22	4.76 ± 0.81	4.15 ± 0.17	3.70 ± 0.22	0.235
<i>Energía</i>					
Consumo (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	6.37 ± 0.06	6.47 ± 0.17	6.85 ± 0.27	7.20 ± 0.23	0.078
Retención (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	1.81 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.76 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.03 <sup>b</sup>	<0.001
Retención (%)	28.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	27.7 ± 0.53 <sup>a</sup>	25.9 ± 1.18 <sup>a</sup>	20.3 ± 0.36 <sup>b</sup>	<0.001

Media (± SEM) de las dietas AS-0, AS-33, AS-50, AS-68 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

PCP: Peso corporal promedio: (peso inicial + peso final)/2.

### 2.3.5.- Parámetros hematológicos

Al finalizar el ensayo experimental, la bioquímica sanguínea de los juveniles de totoaba fue afectada significativamente por la composición de las dietas. La concentración plasmática de TP y AL fue significativamente ( $P < 0.001$ ) más baja en los peces alimentados con la dieta AS-68 que en aquellos alimentados con bajas concentraciones de aceite de soya. Las concentraciones de GLB ( $P < 0.001$ ) fueron significativamente bajas en los organismos alimentados con la dieta AS-68 comparativamente con los peces alimentados con las dietas AS-0, AS-50. La relación AL:GLB ( $P < 0.001$ ) incremento significativamente en los peces alimentados con diferentes niveles de aceite de soya. La GLU aumentó significativamente ( $P < 0.001$ ) en los peces alimentados con aceite de soya.

Las RBC permanecieron similares ( $P= 0.705$ ) en todas las dietas, aunque los niveles de HT disminuyen significativamente ( $P < 0.001$ ) en los peces alimentados con aceite de soya (AS-33, AS-50 y AS-68). La concentración de HB disminuyó significativamente ( $P < 0.001$ ) en los organismos alimentados con la dieta formulada con 68% aceite de soya, en comparación con el resto de las dietas. El MCV fue afectado significativamente ( $P < 0.001$ ) con el reemplazo de aceite de soya ya que disminuyó en los peces alimentados con las dietas AS-33, AS-50 y AS-68. La MCH y MCHC disminuyeron significativamente ( $P < 0.001$ ) en los peces alimentados con la dieta SO-68. La MCHC se mantuvo similar en los organismos alimentados con las dietas AS-68 y AS-0. (Tabla 9)

Tabla 9. Parámetros bioquímicos sanguíneos en juveniles de *Totoaba macdonaldi* por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya ( $n=24$ ).

Hematología y bioquímica sanguínea					
	AS-0	AS-33	AS-50	AS-68	Valor P
<i>Hematología</i>					
RBC	2.32 ± 0.17	2.30 ± 0.08	2.23 ± 0.17	2.29 ± 0.09	0.705
HT	31.57 ± 2.00 <sup>a</sup>	18.45 ± 0.90 <sup>b</sup>	20.62 ± 0.63 <sup>b</sup>	19.07 ± 0.54 <sup>b</sup>	< 0.001
HB	5.78 ± 0.22 <sup>a</sup>	5.53 ± 0.21 <sup>a</sup>	6.38 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.36 ± 0.21 <sup>b</sup>	< 0.001
MVC	139.94 ± 11.9 <sup>a</sup>	80.70 ± 4.01 <sup>b</sup>	82.36 ± 4.74 <sup>b</sup>	74.77 ± 2.74 <sup>b</sup>	< 0.001
MCHC	19.89 ± 1.39 <sup>b</sup>	31.04 ± 1.90 <sup>a</sup>	31.64 ± 1.57 <sup>a</sup>	23.36 ± 1.02 <sup>b</sup>	< 0.001
MHC	25.07 ± 1.48 <sup>a</sup>	25.39 ± 0.79 <sup>a</sup>	26.40 ± 1.60 <sup>a</sup>	18.82 ± 0.95 <sup>b</sup>	< 0.001
<i>Bioquímica sanguínea</i>					
TP	2.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.06 <sup>b</sup>	< 0.001
AL	0.79 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.02 <sup>b</sup>	< 0.001
GBL	1.36 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.05 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.05 <sup>b</sup>	< 0.001
AL:GBL	0.59 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.05 <sup>a</sup>	< 0.001
GLU	23.17 ± 1.18 <sup>b</sup>	30.39 ± 1.17 <sup>a</sup>	31.14 ± 0.71 <sup>a</sup>	31.58 ± 1.31 <sup>a</sup>	< 0.001

Resultados: Media ± SEM. TP: Proteína (g dL<sup>-1</sup>), AL: Albumina (g dL<sup>-1</sup>), GBL: Globulina (g dL<sup>-1</sup>), AL:GBL : Relación Albumina/Globulina, GLU: Glucosa (mg dL<sup>-1</sup>). RBC: Células rojas (cel ml<sup>-1</sup>) x 10<sup>6</sup>, HT: Hematocrito (%), HB: Hemoglobina (g dL<sup>-1</sup>), MVC: Media del volumen celular (fL), MCHC: Media de la concentración de hemoglobina (g dL<sup>-1</sup>), MHC: Media de la hemoglobina corpuscular (pg).

### 2.3.6.- Análisis enzimático

La actividad de las enzimas digestivas se modificó en presencia de aceite de soya. La proteasa alcalina es la única enzima que no altero su actividad manteniéndose igual en todas las dietas. La enzima leucina aminopeptidasa presentó un incremento en la actividad cuando un 33% de aceite de soya fue incluido en la dieta, sin embargo éstos niveles descendieron en las dietas AS-50 y AS-68, igualando el nivel presentado en la dieta control. La tripsina mostró su mayor actividad en ausencia de aceite de soya (AS-0), y presentó valores significativamente menores en el resto de las dietas. La quimotripsina disminuyó significativamente su actividad en presencia de 68% aceite de soya. La alfa amilasa mostró su mayor actividad en la dieta AS-50 y disminuyó significativamente en las dietas AS-0 y AS-33 (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de aceite de soya (n=3).

<b>Dieta</b>	<b>AS-0</b>	<b>AS-33</b>	<b>AS-50</b>	<b>AS-68</b>
<i>Proteasa Alcalina</i> U mg prot <sup>-1</sup>	19.29 ± 0.3	19.11 ± 0.7	19.2 ± 0.2	20.13 ± 0.3
<i>Leucina Aminopeptidasa</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.93 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.03 <sup>b</sup>
<i>Tripsina</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	5.20 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.33 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.26 <sup>b</sup>
<i>Quimotripsina</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	2.27 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.1 ± 0.12 <sup>b</sup>
<i>Alfa amilasa</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	5.26 ± 0.18 <sup>c</sup>	5.00 ± 0.32 <sup>c</sup>	8.24 ± 0.31 <sup>a</sup>	6.49 ± 0.24 <sup>b</sup>

Media (± SEM) de las dietas AS-0, AS-33, AS-50, AS-68 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

## 2.4.- Discusión

El creciente interés por encontrar los ingredientes adecuados para disminuir el uso de aceite de pescado en las dietas de los organismos carnívoros marinos en cultivo, ha permitido desarrollar alternativas que igualen o mejoren los efectos causados por las formulaciones tradicionales. En el presente estudio se observó el efecto del aceite de soya sobre el crecimiento en juveniles de totoaba y se determinó que los mejores valores de sobrevivencia, WG y SGR se obtuvieron con las dietas con 33% y 50% de reemplazo de aceite de soya. Algunas especies marinas como el gilthead sea bream (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) (Alexis, 1997; Montero et al., 2008) han reportado bajos rendimientos en presencia de aceite de origen vegetal, sin embargo, existen otras especies como el Atlantic salmon (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758) (Gridale-Helland et al., 2002), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Mourente et al., 2005), Atlantic cod (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758) (Olsen et al., 2007), black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*, Bleeker, 1854) (Peng et al., 2008), turbot (*Scophthalmus maximus*, Linnaeus, 1758) (Peng et al., 2014) y meagre (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) (Emre et al., 2015) que han presentado respuestas positivas sobre los parámetros de crecimiento con la inclusión desde 50% hasta 68% aceite de soya, sin embargo, el crecimiento es solo un factor a considerar para evaluar el éxito de una dieta.

Por otro lado existen otros parámetros que deben ser analizados y el perfil de ácidos grasos es un factor muy importante a evaluar debido a que es necesario mantener un balance adecuado, especialmente cuando se formula con ingredientes de origen vegetal, ya que los peces marinos tienen un alto requerimiento por los ácidos grasos

altamente insaturados, particularmente EPA y DHA (Tocher 2003a; 2003b), los cuales deben mantener cierta relación con los ácidos grasos de la cadena n-6 (Hossain, 2011). La relación n-3/n-6 es considerado el mejor parámetro para evaluar el valor nutricional lipídico de un organismo (Piggot y Tucker, 1990) y se espera que varíe en cada especie, tal y como sucedió en los estudios realizados en gilthead sea bream (Mnari et al., 2007), sea bass (Richard et al., 2006; Fuentes et al., 2010) y rohu (*Labeo rohita*, Hamilton, 1822) (Sharma et al., 2010), entre otros.

En el presente estudio la dieta AS-0 mantiene una relación n-3/n-6 de 1.5 en músculo lo cual es muy cercano a lo calculado por López et al. (2006) para la misma especie, sin embargo, esta relación disminuyó con el incremento de aceite de soya, sucediendo el mismo efecto en diferentes especies como black sea bream (Peng et al., 2008), turbot (Peng et al., 2014), rodaballo (Peng et al., 2014), sea bream (Ganga et al., 2011) y salmón del Atlántico (Tocher et al., 2003b). Cuando esta relación disminuye, existe un desbalance de las cadenas n-3 y n-6, lo que permite que haya cierta acumulación de lípidos en el hígado (Takeuchi et al., 1979). Éste efecto fue consistente con los resultados observados en nuestra investigación, específicamente en el índice hepatosomático, así como también en investigaciones previas (Benedito-Palos et al., 2007; Piedecausa et al., 2007; Peng et al., 2008) donde se observa que conforme se incrementa la inclusión de aceite de soya en las dietas, la relación n-3/n-6 disminuye, favoreciendo la acumulación de lípidos en el hígado.

Otro factor que altera o modifica el índice hepatosomático es la inclusión de aceites hidrogenados (Kummerow, 2009). La soya es un ingrediente de origen vegetal

compuesto mayormente por ácido linoléico, el cual es muy susceptible a la oxidación y degradación debido a que presenta dobles enlaces en su composición bioquímica (Kaplan and Greenwood, 1998; Chen et al., 2001).

Con el propósito de estabilizar los aceites vegetales y prolongar su vida útil, son expuestos a un tratamiento de hidrogenación (Kris-Etherton, 1995), modificando su conformación dando como resultado ácidos grasos *trans* (Kromhout et al., 1995; Lichtenstein et al., 1999), en la presente investigación utilizamos aceite de soya hidrogenado. Estos ácidos grasos son alterados ya que por ser expuestos a éste proceso, se inhibe la conversión metabólica del ácido linoléico a ácido araquidónico y otros ácidos grasos poliinsaturados (Kummerow et al., 2004), sin embargo, su mayor afectación se presenta en la síntesis de colesterol (Ribeiro et al., 2009) ya que incrementa las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre y disminuye las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Mensink y Katan, 1990; Nelson y Cox, 2005; Jun-Cai et al., 2012), lo que afecta el metabolismo hepático favoreciendo la acumulación de lípidos en hígado (Kummerow, 2009) tal y como lo demuestran los datos del presente estudio, donde el incremento gradual de aceite de soya en las dietas, aumentó progresivamente la composición proximal lipídica de hígado y al mismo tiempo, el índice hepatosomático.

La respuesta generada en la salud de los organismos por efecto de las dietas, podría verse reflejada en los análisis hematológicos, los cuales son fácilmente influenciados por la presencia de los ingredientes suministrados en la dieta. El aceite de soya, es un ingrediente que puede o no afectar el rendimiento de los organismos, ejemplo de esto

es el estudio realizado con gilthead seabream, donde el hematocrito y la hemoglobina no se observaron afectadas por la inclusión de hasta 60% de aceite de soya (Montero et al., 2003).

Otro caso es el salmón del Atlántico donde se observó que las dietas formuladas con 46% de proteína de soya y 24% de aceite de soya, no afecta la proteína total, glucosa, hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, MCV, MCHC y MCH (Sissener et al., 2009). Sin embargo, en el presente estudio observamos algunos efectos opuestos a los ya mencionados en otras investigaciones ya que las proteínas totales, albumina, globulinas, eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, MVC y MHC tienden a disminuir con el aumento del aceite de soya.

En los animales terrestres, la anemia se define como la disminución del hematocrito, la concentración plasmática de hemoglobina y/o el conteo de glóbulos rojos (Brockus, 2011). La anemia debida a una disminución en la concentración de hemoglobina, es generalmente causada por la deficiencia de hierro (Wick et al., 2011). El hierro es necesario en la síntesis del grupo Hemo en la formación de hemoglobina para que ésta pueda desarrollar sus funciones como transportar oxígeno en la sangre (Stockham y Scott, 2008). La disminución de hemoglobina en los glóbulos rojos se define como hipocromía, lo que significa un aumento en el número de glóbulos rojos hipocrómicos y no una disminución necesaria en el número de células (rojas) lo que se refleja en el hemograma con una disminución en el MCHC.

El hierro es considerado como un micronutriente esencial y debe ser suministrado al organismo a través de la dieta el cual se absorbe en el epitelio intestinal (Hwang et al.,



2012), sin embargo existen factores que limitan este proceso. Por ejemplo, la soya contiene ácido fítico el cual es considerado como un elemento antinutricional (Krogdhal et al., 2010) que actúa como un agente quelante a nivel intestinal, formando complejos proteína-ácido fítico que pueden reducir la biodisponibilidad de proteínas (Spinelli et al., 1983) y minerales como zinc, manganeso, cobre, molibdeno, calcio, magnesio, y hierro (Smith, 1977). Las observaciones realizadas en los análisis hematológicos de la presente investigación indican el posible desarrollo de un problema de anemia hipocrómica por disminución en la concentración plasmática de hemoglobina reflejado asimismo en la disminución de MCHC en los juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con la dieta SO-68 (68% aceite de soya).

Aunado a lo anterior es importante comentar que el hierro se transporta en la sangre unido a la proteína  $\delta$ -globulina transferrina, por lo que el hierro se mide en el plasma como hierro plasmático (no representa la medida del hierro total en los almacenes corporales). Bajo este escenario, una condición importante que puede disminuir el hierro sérico es también la disminución de las proteínas plasmáticas totales (Brockus 2010).

En los animales domésticos de compañía o de producción, una de las causas más comunes asociadas con la disminución de las proteínas plasmáticas puede ser la insuficiencia hepática por disminución en la síntesis de proteínas o lipoproteínas plasmáticas y la inflamación intestinal por alteraciones de la mucosa (mala absorción) entre otras (Giannini, Testa y Savarino 2005; Stockham y Scott 2008). Con base a lo anterior, los resultados en el perfil proteico de los peces alimentados con 68% de aceite de soya son congruentes debido a que este grupo de peces presentaron la

concentración plasmática de PT, AL y GBL más baja comparado con los demás tratamientos. Esto indica una probable disminución de las proteínas totales por falta de síntesis debido a una posible disfunción hepática, lo que se comprueba con la razón AL:GBL que no se muestra alterada. Debido a que en este estudio no se analizó histología del intestino no podemos concluir que las proteínas disminuyeron además por falta de biodisponibilidad por defectos de absorción intestinal, lo que pudiera sumarse a los resultados del perfil proteico en este grupo de peces.

De acuerdo a lo anterior, en los resultados de los parámetros de crecimiento y composición de los tejidos en los peces de este estudio, encontramos que los juveniles de totoaba alimentados con el 68% de aceite de soya (dieta SO-68), mostraron la razón más baja en n-3/n-6 en la composición de ácidos grasos en el músculo, el contenido más alto de lípidos en el hígado y un aumento en el IHS lo que sugiere una acumulación de lípidos en el hígado en este grupo de peces lo que se pudiera traducir como una disminución o falla en la función hepática.

Por otro lado, existen diversos estudios que indican que los peces carnívoros tienen una baja capacidad regulatoria de glucosa plasmática y ésta característica es variable no sólo entre especies, también se modifica dentro de la misma especie con determinados regímenes alimenticios (Hemre, Mommsen y Krogdahl, 2002). Aproximadamente el 25% de la glucosa absorbida es almacenada en el hígado en forma de glucógeno (Hemre, Mommsen y Krogdahl, 2002). Los resultados observados en éste estudio indican que los niveles de glucosa plasmática incrementaron significativamente por la presencia del aceite de soya mientras que los niveles de

glucógeno hepático disminuyeron. Aunado a éstos resultados, el contenido de lípidos en el hígado y el HIS también se incrementaron con el aumento de aceite de soya en las dietas. Es posible que los efectos de acumulación de lípidos en el hígado puedan estar relacionados con fallas en la función metabólica hepática lo que al mismo tiempo podría afectar la asimilación de glucosa circulante. Sin embargo, es necesario realizar investigación sobre el efecto del aceite de soya en la dieta en el metabolismo intermediario hepático en totoaba.

El conjunto de resultados observados sugieren que la dieta formulada con 68% de aceite de soya pudo afectar la función hepática, lo que a su vez generó un daño en las células rojas de la sangre y en el perfil de proteínas plasmáticas las que, entre otras cosas, generaron una disminución en la tasa de crecimiento de *Totoaba macdonaldi*.

Por otro lado y de forma inesperada, en este estudio se observó que los peces alimentados con 100% de aceite de pescado (AS-0) mostraron en el perfil proteico de la química sanguínea, la relación AL:GBL más baja comparada con el resto de los tratamientos, lo que indica que los peces tienen niveles más altos de globulinas que de albumina. Esto podría sugerir que éste grupo de peces pudiera estar presentando un proceso inflamatorio incipiente. Las alteraciones encontradas en los resultados de la bioquímica sanguínea en este grupo de peces son inexplicables debido a que estos juveniles de *Totoaba* estuvieron alimentados con 100% de aceite de pescado.

## 2.5.- Conclusión

Con base en los resultados generados en la presente investigación se concluye que el aceite de soya podría ser empleado como fuente lipídica en dietas formuladas con harina de pescado, cuando el porcentaje de reemplazo no supere el 50% en la alimentación de *T. macdonaldi* por un periodo de 60 días, lo cual se sustenta con la información resultante en los parámetros de crecimiento, composición proximal, retención de nutrientes, parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea. En comparación, la dieta formulada con 68% de aceite de soya (AS-68) reveló, entre otras cosas, una posible falla hepática la cual se pudo observar con el aumento del índice hepatosomático y con la concentración de lípidos en hígado lo que a su vez, afectó el funcionamiento del hígado lo que alteró los niveles de glucosa circulante. Así mismo, la información generada en el análisis del perfil de ácidos grasos nos permite entender que aunque los organismos asimilaron de manera satisfactoria las dietas formuladas con aceite de soya, los perfiles de ácidos grasos en músculo, en especial los de la cadena n-3, disminuyen simultáneamente con la inclusión de aceite de soya.

## 2.6.- Recomendaciones

Con base en los resultados generados en la presente investigación se recomienda realizar el análisis de actividad enzimática lipídica digestiva y metabólica para conocer el comportamiento de las enzimas encargadas de hidrolizar los lípidos suministrados en el alimento, al igual que los efectos generados en el organismo.

Así mismo es necesario realizar análisis histológicos de hígado e intestino para confirmar y evaluar el daño generado en éstos órganos por efecto del aceite de soya.

Finalmente se recomienda realizar análisis moleculares de hígado, intestino y estómago para analizar el comportamiento de enzimas claves involucradas en la expresión enzimática lipídica y de ésta manera exponer con mayor fundamento los resultados generados en ésta investigación.

# **CAPITULO III**

**EXPERIMENTO 2: Evaluación de dietas formuladas con harina de soya sobre la actividad de enzimas digestivas, parámetros productivos, hematológicos y perfil de aminoácidos de *Totoaba macdonaldi*.**

### **3.1.- Materiales y métodos**

#### 3.1.1.- Formulación de las dietas

Se formularon cuatro dietas experimentales isoprotéicas (proteína cruda: 50%, materia seca) e isolípídicas (lípidos crudos: 12%, materia seca) con un incremento en la sustitución de harina de pescado por harina de soya: 33, 66 and 100% (HS-33, HS-66 y HS-100, respectivamente); y una dieta control de 100% harina de pescado (HS-0). Los ingredientes y la composición proximal de las dietas experimentales son presentadas en la Tabla 11. La metodología que se llevó a cabo se describe en la sección 2.1.1.

Tabla 11. Composición de ingredientes ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ , base en peso seco), porcentaje de reemplazo y composición proximal de las dietas experimentales conteniendo diferentes concentraciones de harina de soya en juveniles de *Totoaba macdonaldi*.

Ingredientes (% peso seco)	Dietas			
	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100
Harina de pescado <sup>a</sup>	80.20	39.00	0.00	0.00
Harina de pescado desengrasada	0.00	10.20	21.00	0.00
Harina de soya	<b>0.00</b>	<b>28.20</b>	<b>55.00</b>	<b>76.50</b>
Celulosa	1.20	0.50	0.00	0.00
Grenetina	5.00	5.00	5.00	5.00
Aceite de pescado	4.10	6.30	8.60	10.10
ASA pre mezcla minerales <sup>b</sup>	1.50	1.50	1.50	1.30
ASA pre mezcla de vitaminas <sup>c</sup>	2.00	2.00	2.00	1.80
Nutrikelp <sup>d</sup>	4.00	4.00	3.15	0.00
Cloruro de colina	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina E	0.10	0.10	0.10	0.10
Taurina <sup>e</sup>	1.10	1.20	1.35	1.60
Lisina <sup>e</sup>	0.30	1.20	1.30	1.10
Metionina <sup>e</sup>	0.00	0.30	0.50	0.60
Probiótico	0.10	0.10	0.10	0.10
<i>Porcentaje de reemplazo</i>				
Harina de pescado	100	66	33	0
Harina de soya	0	33	66	100
Aceite de pescado	100	100	100	100
<i>Análisis proximal (%)</i>				
Proteínas totales	49.0	50.3	52.1	50.0
Lípidos totales	13.3	12.8	12.4	12.9
Almidón	2.39	1.37	0.29	0.20
Cenizas	12.0	10.9	10.0	8.5
Energía bruta ( $\text{kJ g}^{-1}$ )	19.8	20.0	20.3	21.2

<sup>a</sup> Rangen, commercial HighPro fish meal, U.S.A. (proteína: 54.3%; lípidos: 9.0%; ceniza: 13.4%).

<sup>b</sup> ASA Premix ( $\text{g kg}^{-1}$ ): tiamina HCl, 0.5; riboflavin, 8.0; pyridoxine HCl, 5.0; Capantothenate, 20.0; niacin, 40.0; biotina, 0.040; ácido fólico, 1.80; cyanocobalamin, 0.002; vitamina A acetate ( $500,000 \text{ IU g}^{-1}$ ) 2.40; vitamina D3 ( $400,000 \text{ IU g}^{-1}$ ), 0.50; DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate, 80.0;  $\alpha$  cellulose 834.26.

<sup>c</sup> ASA Premix ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ): cobalto chloride, 0.004; cúprico sulfate pentahydrate, 0.250, ferrous sulfate heptahydrate, 4.0, manganous sulfate anhydrous, 0.65; potasio iodide, 0.067; sodiumselenite, 0.010; zinc sulfate heptahydrate 13.19,  $\alpha$ -celulosa 81.83.

<sup>d</sup> Albiomar, México.

<sup>e</sup> Aminoácidos de Pharmaceutical Co., Ltd., U.S.A.



### 3.1.2.- Manejo de animales

Los juveniles de *Totoaba macdonaldi* fueron obtenidos de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, México. La metodología que se llevó a cabo se describe en la sección 2.1.2.

### 3.1.3.- Biometrías y obtención de muestras

La metodología que se llevó a cabo se describe en la sección 2.1.3.

### 3.1.4.- Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia

Los principales parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia fueron calculados usando las formulas descritas en la sección 2.1.4.

### 3.1.5.- Retención de nutrientes

Los cálculos hechos para la retención de nitrógeno, lípidos y energía fueron realizados según la metodología descrita por Cho y Kaushik (1990) con base en los resultados obtenidos en los análisis de composición proximal de pez entero.

Las formulas empleadas fueron las mismas que se usaron en la sección 2.1.5.

## **3.2.- Métodos analíticos**

### **3.2.1.- Análisis químicos proximales**

Los análisis de composición química de dietas ( $\text{g } 100 \text{ g dieta}^{-1}$ , peso seco) y tejidos (pez entero, músculo e hígado,  $\text{g } 100 \text{ g tejido}^{-1}$ , peso húmedo) fueron realizados de acuerdo a los métodos descritos por la AOAC (2000) y se describen en la sección 2.2.1 y anexos.

### **3.2.2.- Perfil de ácidos grasos**

El análisis de ácidos grasos (FA) comienza con la extracción de lípidos mediante la metodología de Folch (1957) usando diclorometano en sustitución de cloroformo. La metodología que se llevó a cabo se describe en la sección 2.2.2. (Tabla 12)

Tabla 12. Composición de ácidos grasos (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, base peso seco) de las dietas experimentales.

Ácido graso	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100
C14:0	0.29	0.30	0.16	0.17
C14:1n9	0.30	ND	ND	ND
C15:0	0.04	0.04	0.02	0.02
C15:1	0.06	0.05	0.03	0.02
C16:0	2.19	2.46	2.04	2.29
C16:1n7	0.40	0.38	0.22	0.25
C16:2n4	0.04	0.12	0.02	0.02
C16:4	0.02	0.02	0.02	0.02
C17:0	0.07	0.05	0.03	0.03
C17:1n7	0.02	0.03	0.01	0.01
C18:0	0.33	0.31	0.30	0.31
C18:1n9	2.01	2.87	3.23	3.79
C18:2n6	1.17	1.97	2.92	3.02
C18:3n4	0.02	0.03	0.02	0.02
C18:3n3	0.11	0.21	0.32	0.33
C18:4n3	0.06	0.06	0.04	0.03
C20:1n9	0.06	0.13	0.18	0.17
C20:3n6	0.02	0.03	0.04	0.04
C20:4n6	0.13	0.12	0.06	0.06
C20:3n3	0.02	0.02	0.02	0.01
C20:5n3	0.67	0.56	0.23	0.20
C22:2n6	0.03	0.02	ND	ND
C22:4	0.02	0.04	0.02	ND
C22:5n3	0.05	0.04	0.03	0.03
C22:6n3	0.87	0.77	0.25	0.18
Σ SFA	2.92	3.17	2.56	2.82
Σ MUFA	2.85	3.46	3.67	4.25
Σ PUFA	3.23	4.01	3.98	3.96
Σ PUFA n-3	1.79	1.66	0.89	0.78
Σ PUFA n-6	1.35	2.14	3.02	3.12
n-3/n-6	1.33	0.78	0.29	0.25

ND: No detectados; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monosaturados; PUFA: ácidos grasos polinsaturados.

Tabla 13. Composición de aminoácidos (g/100 mg de proteína) de las dietas experimentales.

Aminoácido	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100
Asp	9.2	9.8	7.1	10.0
Glu	17.4	17.4	12.3	17.0
Ser	3.9	4.2	3.0	4.2
His	2.9	2.9	1.7	2.8
Gly	6.4	6.3	4.4	6.1
Thr	3.7	4.0	2.9	4.2
Arg	5.7	6.7	4.5	6.6
Ala	5.8	5.7	4.0	5.6
Tyr	0.7	1.5	0.8	1.4
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0
Pro	2.2	2.2	1.6	2.3
Val	4.1	4.6	3.2	4.7
Met	0.3	1.4	0.7	1.6
Phe	3.3	3.7	2.3	3.9
Ile	3.2	3.8	2.5	4.0
Leu	7.2	7.4	5.2	7.5
Lys	4.1	0.1	-0.5	2.1

### 3.2.3.- Análisis hematológico

Al finalizar el experimento se llevaron a cabo los análisis hematológicos con 24 organismos de cada tratamiento expuestos a un ayuno de 24 horas. La metodología que se llevó a cabo se describe en la sección 2.2.3.

### 3.2.4.- Actividad enzimática digestiva

Los análisis comenzaron con la preparación del homogenizado de las dos primeras partes del intestino. Se extrajo el sistema digestivo (estómago e intestino) de 3 organismos de cada tanque los cuales fueron congelados inmediatamente después con hielo seco y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente de cada intestino se realizó un homogenizado obteniendo 3 homogenizados de cada tanque (9 por tratamiento). La actividad de las enzimas se cuantificó en un espectrofotómetro modelo DR 5000 UV-Vis marca HACH en celdas individuales de plástico o cuarzo a longitudes de onda específicas para cada enzima. Las enzimas que se analizaron para estudiar la actividad digestiva proteica fueron tripsina, quimotripsina, proteasa alcalina, leucina aminopeptidasa y alfa amilasa. Las condiciones del desarrollo de cada una de las enzimas se describen en la sección de anexos.

### 3.2.5.- Análisis estadístico

Los resultados son presentados como media  $\pm$  error estándar. La normalidad de los datos fue determinada por la prueba de Kolmogorov-Smirnov test y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para procesar los resultados, seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples para comparar el comportamiento de las dietas (HS-0, HS-33, HS-66 y HS-100). Todos los análisis se llevaron a cabo usando el programa Sigma Stat versión 3.5 y se empleó un nivel de significancia de 0.05.

### 3.3.- RESULTADOS

#### 3.3.1.- Crecimiento y eficiencias alimenticias

Durante el periodo experimental no se registraron enfermedades. La sobrevivencia de los organismos se vio significativamente ( $P < 0.001$ ) afectada por la inclusión de harina de soya ya que las dietas con 66% y 100% de reemplazo presentaron los niveles más bajos con 38% y 13% de sobrevivencia respectivamente. El peso de los organismos al inicio del experimento fue estadísticamente igual (0.711) en todos los tratamientos sin embargo, al final del experimento la ganancia de peso presentó diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) ya que los organismos alimentados con las dietas HS-0 y HS-33 mantuvieron los valores más altos con 28 y 26 gr respectivamente mientras que los organismos alimentados con la dieta HS-100 presentaron la ganancia de peso más baja de 6 gr al final de experimento. El índice de crecimiento diario fue significativamente ( $P < 0.001$ ) mayor en las dietas HS-0, HS-33 y HS-66 con respecto a la dieta con mayor contenido de harina de soya. El consumo de alimento disminuyó significativamente ( $P < 0.001$ ) con el aumento de harina de soya presentando el menor consumo en las dietas HS-66 y HS-100. La tasa de eficiencia proteica presentó los valores significativamente ( $P < 0.001$ ) más elevados en las dietas HS-0 y HS-33 (Tabla 14). Por último, los resultados obtenidos en la regresión polinomial indican que el máximo porcentaje de reemplazo de harina de soya por harina de pescado es de 21%, por lo tanto una sustitución mayor a éste porcentaje estaría afectando negativamente la índice de crecimiento diario de los organismos (Figura 4).

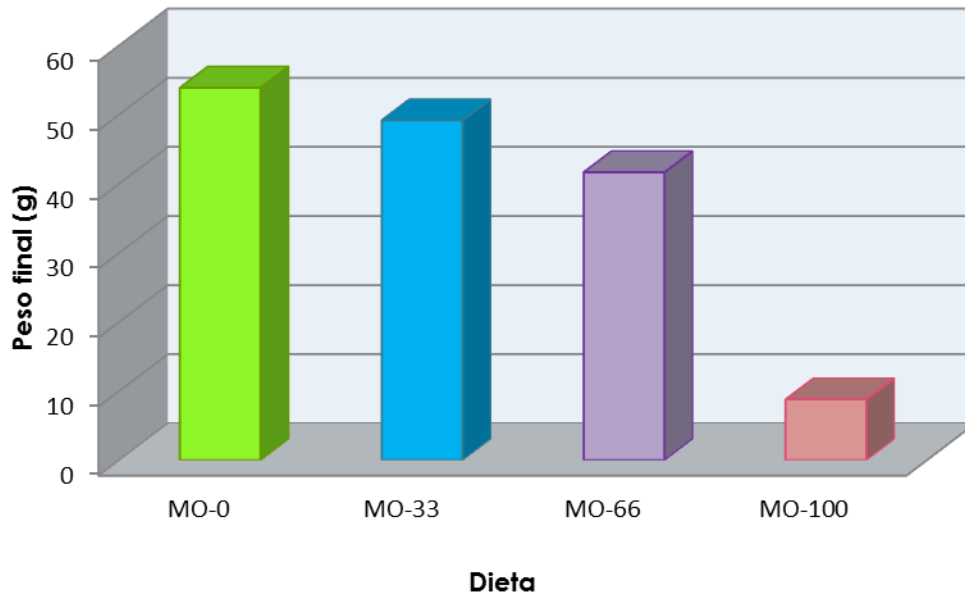


Figura 3. Crecimiento en peso de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días

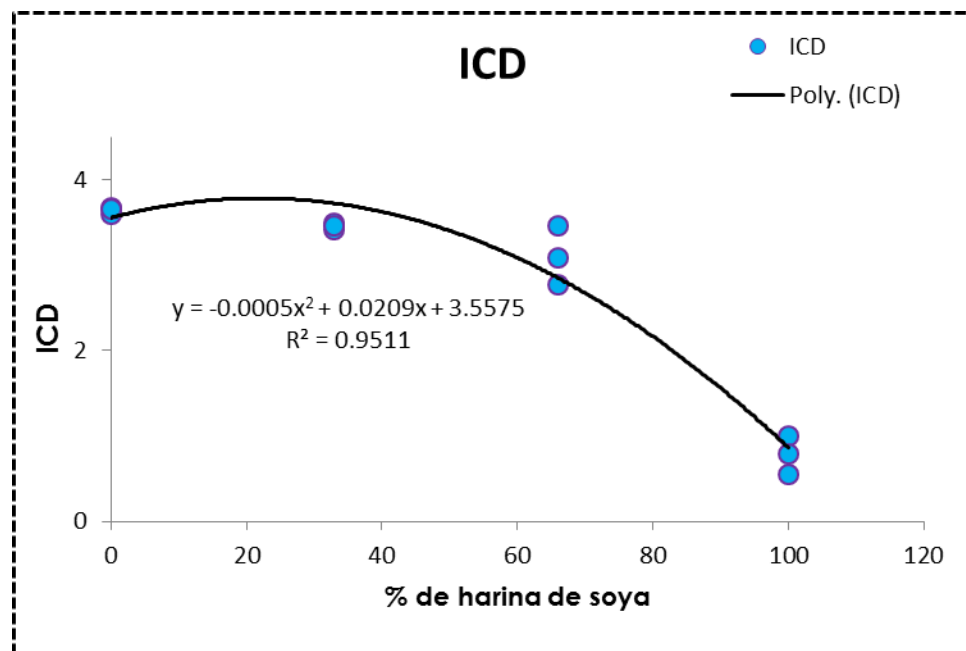


Figura 4. Regresión polinomial entre el índice de crecimiento diario (ICD) y el porcentaje de reemplazo de harina de soya en las dietas experimentales suministradas a juveniles de *Totoaba macdonaldi*.



Tabla 14. Crecimiento y rendimiento alimenticio de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días.

	Dietas				Valor P
	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100	
Sobrevivencia (%)	98.1 ± 0.95 <sup>a</sup>	91.4 ± 4.36 <sup>a</sup>	38.1 ± 1.90 <sup>b</sup>	13.3 ± 3.43 <sup>b</sup>	< 0.001
Peso inicial corporal (g)	4.0 ± 0.01	3.9 ± 0.01	4.0 ± 0.01	4.0 ± 0.04	0.711
Peso final corporal (g)	53.8 ± 0.54 <sup>a</sup>	49.1 ± 0.53 <sup>ab</sup>	41.9 ± 4.34 <sup>b</sup>	9.25 ± 0.97 <sup>c</sup>	< 0.001
Ganancia de peso (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	28.9 ± 0.27 <sup>a</sup>	26.5 ± 0.27 <sup>ab</sup>	22.8 ± 2.17 <sup>b</sup>	6.40 ± 0.49 <sup>c</sup>	< 0.001
Índice de crecimiento diario (%) <sup>†</sup>	3.6 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.01 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.12 <sup>b</sup>	< 0.001
Consumo de alimento (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	17.1 ± 0.86 <sup>ab</sup>	18.7 ± 0.02 <sup>a</sup>	13.1 ± 0.81 <sup>b</sup>	16.5 ± 1.6 <sup>ab</sup>	< 0.001
Tasa de eficiencia alimenticia <sup>‡</sup>	1.68 ± 0.09 <sup>ab</sup>	1.51 ± 0.00 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.16 <sup>c</sup>	< 0.001
Tasa de eficiencia proteica <sup>§</sup>	1.9 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>b</sup>	< 0.000

Media (± SEM) de las dietas HS-0, HS-33, HS-66, HS-100 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

<sup>†</sup>ICD: [(peso final  $\wedge$  (1/3) – peso inicial  $\wedge$  (1/3))/(días)] x100.

<sup>‡</sup>TEA: (ganancia de peso/consumo de alimento).

<sup>§</sup>TEP: (ganancia de peso/consumo de proteína cruda).

PCP: Peso corporal promedio: (peso inicial + peso final)/2.

### 3.3.2.- Composición proximal (peso húmedo)

Los organismos alimentados con las dietas HS-0 y HS-33 presentaron la mayor concentración de proteína cruda en pez entero ( $P < 0.001$ ). El contenido de lípidos crudos no presentaron diferencias significativas ( $P < 0.151$ ) entre los organismos que se alimentaron con las dietas experimentales y la dieta control. El contenido de proteína cruda en el músculo de los organismos incrementó significativamente ( $P < 0.001$ ) en las dietas HS-0 y HS-33, al igual que el contenido de lípidos crudos ( $P < 0.001$ ) los cuales presentaron concentraciones de 1.63% y 1.23% respectivamente. En hígado, la concentración de proteína cruda aumentó significativamente ( $P < 0.001$ ) en la dieta HS-100 con 18.9% y se mantuvo baja en las dietas 1 y 2 con 13.5% y 13.9% respectivamente. En hígado los lípidos crudos incrementaron significativamente ( $P < 0.001$ ) en la dieta HS-66 con 16.9% mientras que su menor concentración se presentó en la dieta HS-100 con 7.02%. El glucógeno presentó una tendencia a disminuir conforme se incrementó la inclusión de harina de soya en las dietas. El índice hepatosomático presentó diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) mostrando el parámetro más alto en la en la dieta HS-100 con un índice de 1.81 (Tabla 15).

Tabla 15. Composición proximal (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, peso base húmedo) de pez entero, músculo e hígado de *Totoaba macdonaldi* por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=9).

	Dieta				Valor P
	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100	
<b><u>PEZ ENTERO</u></b>					
Humedad	71.17 ± 0.89 <sup>b</sup>	72.41 ± 0.18 <sup>b</sup>	72.06 ± 0.45 <sup>b</sup>	74.61 ± 0.21 <sup>a</sup>	< 0.001
Proteína cruda	18.89 ± 0.45	18.22 ± 0.66	18.67 ± 0.49	17.83 ± 0.85	0.656
Lípidos crudos	0.71 ± 0.03	0.71 ± 0.07	0.82 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.486
Cenizas	0.43 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.59 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	< 0.001
Energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	6.22 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.94 ± 0.03 <sup>a</sup>	6.03 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.51 ± 0.04 <sup>b</sup>	< 0.001
<b><u>MÚSCULO</u></b>					
Humedad	76.14 ± 0.21 <sup>c</sup>	77.17 ± 0.25 <sup>bc</sup>	77.25 ± 0.42 <sup>b</sup>	78.88 ± 0.11 <sup>a</sup>	< 0.001
Proteína cruda	20.32 ± 0.32 <sup>a</sup>	20.05 ± 0.13 <sup>a</sup>	18.31 ± 0.31 <sup>b</sup>	17.27 ± 0.51 <sup>b</sup>	< 0.001
Lípidos crudos	1.63 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.15 <sup>ab</sup>	1.11 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.08 <sup>b</sup>	< 0.001
Cenizas	1.39 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.40 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.08 <sup>b</sup>	< 0.001
Energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	5.50 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.36 ± 0.08 <sup>ab</sup>	4.96 ± 0.17 <sup>bc</sup>	4.63 ± 0.06 <sup>c</sup>	< 0.001
<b><u>HÍGADO</u></b>					
Humedad	66.66 ± 0.59	65.66 ± 0.58	63.91 ± 2.98	66.82 ± 0.01	0.459
Proteína cruda	13.56 ± 0.51 <sup>c</sup>	13.93 ± 0.35 <sup>c</sup>	16.45 ± 0.11 <sup>b</sup>	18.90 ± 0.52 <sup>a</sup>	< 0.001
Lípidos crudos	13.07 ± 0.71 <sup>b</sup>	11.57 ± 0.31 <sup>b</sup>	16.98 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.02 ± 0.25 <sup>c</sup>	< 0.001
Cenizas	3.82 ± 0.15	3.89 ± 0.12	3.79 ± 0.47	4.50 ± 0.01	0.658
Glucógeno	2.49 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.16 ± 0.02	----	----
Energía bruta kJ g <sup>-1</sup>	9.26 ± 0.49	8.94 ± 0.11	10.76 ± 0.74	----	----
IHS	1.10 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.21 ± 0.15 <sup>ab</sup>	1.09 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.81 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.014

Media (± SEM) de las dietas HS-0, HS-33, HS-66, HS-100 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

IHS: Índice Hepatosomático: (peso del hígado / peso corporal) ×100.

### 3.3.3.- Perfil de ácidos grasos

Los valores correspondientes al perfil de ácidos grasos muestran variaciones en su composición y presentan la misma tendencia en los valores resultantes para los ácidos grasos saturados (SFA), ácidos grasos monosaturados (MUFA) y ácidos grasos polinsaturados (PUFA) donde los valores tienden a disminuir con la inclusión de harina de soya (dieta HS-0, HS-33 y HS-66), mientras que la última dieta (HS-100) presenta un aumento marcado en la concentración de éstos ácidos grasos, sin embargo, estos cambios no fueron significativos. La concentración de PUFA n-3 presentó una tendencia a disminuir con el aumento de harina de soya, por lo tanto la mayor concentración se observó en la dieta HS-0 y la diferencia fue significativa ( $P < 0.001$ ). Contrario a esto, la mayor concentración de PUFA n-6 presentó su mayor concentración en la dieta HS-100 la cual está formulada con 100% harina de soya y la diferencia fue significativa ( $P < 0.001$ ) en comparación con el resto de las dietas. La relación n-3/n-6 presentó diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) en todos los tratamientos manteniendo una tendencia a disminuir con el aumento de harina de soya. El ácido linoleico y el ácido linolénico presentaron una tendencia a incrementarse con la inclusión de harina de soya, sin embargo éste cambio no fue significativo para ningún caso. Finalmente, las concentraciones de ARA, EPA y DHA disminuyeron su concentración conforme la inclusión de harina de soya aumentó, sin embargo estos cambios no fueron significativos (Tabla 16).

Tabla 16. Composición de ácidos grasos (g 100 g músculo<sup>-1</sup>, en base seca) de músculo de juveniles de totoaba alimentados con las dietas experimentales (n= 3).

Ácido graso	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100	Valor P
C14:0	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.03	0.698
C16:0	1.05 ± 0.02	0.86 ± 0.11	0.56 ± 0.04	1.06 ± 0.63	0.679
C16:1n7	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.07 ± 0.02	0.11 ± 0.05	0.654
C16:2n4	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.271
C18:0	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.14 ± 0.06	0.33 ± 0.21	0.676
C18:1n9	1.45 ± 0.03	1.33 ± 0.10	1.00 ± 0.16	2.02 ± 1.01	0.605
C18:2n6	0.67 ± 0.01	0.75 ± 0.11	1.00 ± 0.37	3.06 ± 0.35	0.677
C18:3n4	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.506
C18:3n3	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.07 ± 0.06	0.824
C18:4n3	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.19 ± 0.18	0.452
C20:1n9	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.21 ± 0.00	0.127
C20:2n6	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.38 ± 0.27	0.303
C20:3n6	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.453
C20:4n6	0.11 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.04	0.561
C20:3n3	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.00	PEND
C20:5n3	0.38 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.030
C22:1n9	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	ND	ND	
C22:2n6	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	ND	0.39 ± 0.00	
C22:4	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.063
C22:5n3	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.258
C22:6n3	0.86 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.030
Σ SFA	1.30 ± 0.04	1.10 ± 0.08	0.72 ± 0.08	1.46 ± 0.89	0.702
Σ MUFA	1.70 ± 0.04	1.54 ± 0.15	1.14 ± 0.14	2.33 ± 1.07	0.545
Σ PUFA	2.26 ± 0.05	1.97 ± 0.24	1.38 ± 0.16	3.31 ± 0.70	0.090
Σ PUFA n-3	1.33 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.10 <sup>ab</sup>	0.55 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.04 <sup>bc</sup>	0.007
Σ PUFA n-6	0.85 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.90 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.43 ± 0.59 <sup>a</sup>	0.049
n-3/n-6	1.57 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.34 ± 0.07 <sup>d</sup>	0.002

Media (± SEM) de las dietas HS-0, HS-33, HS-66, HS-100 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05).

ND: No detectados; SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monosaturados; PUFA: ácidos grasos polinsaturados.

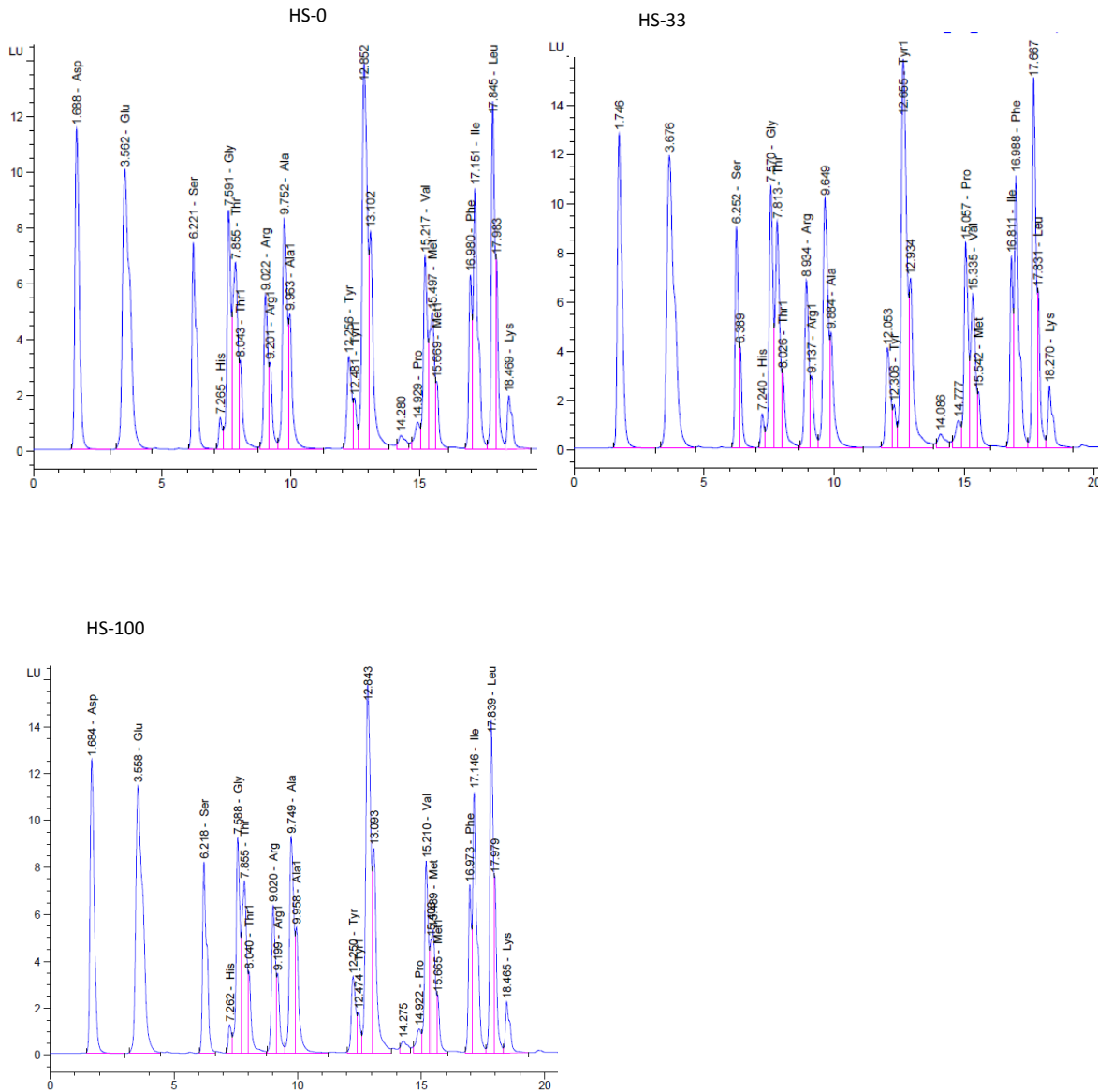


Tabla 17. Perfil de aminoácidos de músculo de *Totoaba macdonaldi* alimentados con harina de soja ( $n=2$ ).

### 3.3.5.- Retención de nutrientes

El consumo de nitrógeno ( $\text{g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) presentó diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los tratamientos mostrando una tendencia a incrementarse con el aumento de harina de soya. Sin embargo, la retención de N tiende a disminuir significativamente ( $P < 0.001$ ) a medida que se incrementa la harina de soya en las dietas. El consumo de lípidos ( $\text{g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) aumentó significativamente ( $P < 0.001$ ) con el incremento de harina de soya en las dietas, mientras que la retención disminuyó con el incremento de harina de soya el cual muestra un cambio significativo ( $P < 0.001$ ). El consumo de energía ( $\text{g kg PCP}^{-1} \text{ día}^{-1}$ ) aumentó significativamente ( $P < 0.001$ ) conforme la harina de soya fue incrementándose en las dietas (Tabla 18).

Tabla 18. Retención de nutrientes en pez entero (g 100 g dieta<sup>-1</sup>, en base húmeda) en juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=3).

	Dieta				Valor P
	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100	
<i>Nitrógeno</i>					
Consumo (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	2.64 ± 0.14 <sup>b</sup>	3.22 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.61 ± 0.49 <sup>b</sup>	22.45 ± 7.13 <sup>a</sup>	< 0.001
Retención (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.89 ± 0.02	0.85 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.43 ± 0.01	< 0.001
Retención (%)	33.8 ± 0.11 <sup>a</sup>	26.4 ± 1.24 <sup>b</sup>	15.4 ± 2.08 <sup>c</sup>	2.41 ± 11.6 <sup>d</sup>	< 0.001
<i>Lípidos</i>					
Consumo (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	4.52 ± 0.24 <sup>b</sup>	5.14 ± 0.25 <sup>b</sup>	8.16 ± 0.71 <sup>b</sup>	36.4 ± 2.65 <sup>a</sup>	< 0.001
Retención (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	0.20 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.02 <sup>b</sup>	< 0.001
Retención (%)	4.50 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.91 ± 0.21 <sup>ab</sup>	2.84 ± 0.36 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.18 <sup>c</sup>	< 0.001
<i>Energía</i>					
Consumo (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	6.37 ± 0.06 <sup>c</sup>	8.00 ± 0.39 <sup>c</sup>	13.7 ± 1.18 <sup>b</sup>	52.1 ± 2.34 <sup>a</sup>	< 0.001
Retención (g kg PCP <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	1.82 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.08 <sup>b</sup>	< 0.001
Retención (%)	28.5 ± 0.70 <sup>a</sup>	21.4 ± 0.91 <sup>b</sup>	12.6 ± 1.54 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.17 <sup>d</sup>	< 0.001

Media (± SEM) de las dietas HS-0, HS-33, HS-66, HS-100 en la misma fila, con diferentes superíndices existe diferencia significativa (ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey de comparaciones múltiples; P < 0.05). PCP: Peso promedio corporal: (peso inicial + peso final)/2.



### 3.3.6.- Parámetros hematológicos

Al finalizar el ensayo experimental, la bioquímica sanguínea de los juveniles de totoaba fue afectada significativamente por la composición de las dietas. La concentración de TP fue significativamente ( $P < 0.001$ ) más baja en los peces alimentados con la dieta HS-100 que en aquellos organismos alimentados con bajas concentraciones de harina de soya. La concentración de AL fue significativamente ( $P < 0.001$ ) más baja en los peces alimentados con la dieta HS-100. Las GLB permanecieron similares en todos los tratamientos sin embargo la relación AL:GLB permaneció significativamente ( $P < 0.001$ ) elevada en los peces alimentados con la dieta 100% harina de soya (HS-100). La GLU fue significativamente ( $P < 0.001$ ) más alta en los peces alimentados con la dieta HS-66.

Las RBC permanecieron similares ( $P = 0.058$ ) en todas las dietas sin embargo los niveles de HT, HB, MVC y MHC se presentaron significativamente ( $P < 0.001$ ) elevados en los peces alimentados con las dietas HS-0 y HS-33. Finalmente la MCHC presenta las concentraciones significativamente ( $P < 0.001$ ) más elevadas en las dietas HS-33 y HS-100 (Tabla 19).

Tabla 19. Parámetros bioquímicos sanguíneos en juveniles de *Totoaba macdonaldi* por efecto de dietas formuladas con diferentes concentraciones de aceite de soya (n=8).

Hematología y bioquímica sanguínea					
	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100	Valor P
<i>Hematología</i>					
RBC	2.32 ± 0.17	2.06 ± 0.11	2.34 ± 0.05	1.83 ± 0.19	0.058
HT	31.57 ± 2.00 <sup>a</sup>	26.99 ± 1.26 <sup>a</sup>	15.98 ± 0.31 <sup>b</sup>	15.14 ± 0.64 <sup>b</sup>	0.000
HB	5.78 ± 0.22 <sup>a</sup>	6.32 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.23 ± 0.18 <sup>b</sup>	3.94 ± 0.32 <sup>b</sup>	0.000
MVC	139.94 ± 11.9 <sup>a</sup>	128.99 ± 8.49 <sup>a</sup>	63.83 ± 1.17 <sup>b</sup>	75.45 ± 3.93 <sup>b</sup>	0.000
MCHC	19.89 ± 1.39 <sup>b</sup>	23.73 ± 1.46 <sup>ab</sup>	19.25 ± 0.95 <sup>b</sup>	25.65 ± 1.26 <sup>a</sup>	0.001
MHC	25.13 ± 1.48 <sup>a</sup>	29.53 ± 1.91 <sup>a</sup>	13.73 ± 0.61 <sup>c</sup>	19.10 ± 1.14 <sup>b</sup>	0.000
<i>Bioquímica sanguínea</i>					
TP	2.16 ± 0.07 <sup>ab</sup>	2.13 ± 0.08 <sup>ab</sup>	2.33 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.045
AL	0.79 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.02 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.000
GBL	1.37 ± 0.05	1.40 ± 0.06	1.22 ± 0.08	1.20 ± 0.19	0.378
AL:GBL	0.59 ± 0.02 <sup>bc</sup>	0.52 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.03 ± 0.09 <sup>abc</sup>	1.24 ± 0.35 <sup>a</sup>	0.001
GLU	23.17 ± 1.18 <sup>c</sup>	25.53 ± 1.66 <sup>c</sup>	39.81 ± 1.06 <sup>a</sup>	33.63 ± 2.75 <sup>b</sup>	0.000

Resultados: Media ± SEM. TP: Proteína (g dL<sup>-1</sup>), AL: Albumina (g dL<sup>-1</sup>), GBL: Globulina (g dL<sup>-1</sup>), AL:GBL : Relación Albumina/Globulina, GLU: Glucosa (mg dL<sup>-1</sup>). RBC: Células rojas (cel ml<sup>-1</sup>) x 10<sup>6</sup>, HT: Hematocrito (%), HB: Hemoglobina (g dL<sup>-1</sup>), MVC: Media del volumen celular (fL), MCHC: Media de la concentración de hemoglobina (g dL<sup>-1</sup>), MHC: Media de la hemoglobina corpuscular (pg).

### 3.3.7.- Actividad enzimática

La presencia de harina de soya en las dietas, modificó la actividad de la mayoría de las enzimas digestivas analizadas en éste estudio. La proteasa alcalina disminuyó significativamente su actividad en presencia de 66 y 100% de harina de soya. Contrario a esto, la enzima Leucina aminopeptidasa incrementó significativamente su actividad en la dieta HS-100 comparativamente con el resto de las dietas. La tripsina mostró su mayor actividad en ausencia de harina de soya (HS-0), y presentó valores significativamente menores en el resto de las dietas. La quimotripsina no presenta diferencias significativas en su actividad. La enzima Alfa amilasa presenta su mayor actividad en la dieta HS-0 y disminuye conforme se incrementa la harina de soya en las dietas, mostrando su menor valor en la dieta HS-100 (Tabla 20).

Tabla 20. Actividad de enzimas digestivas de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de harina de soya.

Dieta	HS-0	HS-33	HS-66	HS-100
<i>Proteasa Alcalina</i> U mg prot <sup>-1</sup>	19.29 ± 0.3 <sup>a</sup>	20.5 ± 0.45 <sup>a</sup>	13.8 ± 1.90 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.38 <sup>b</sup>
<i>Leucina Aminopeptidasa</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	0.71 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.05 <sup>a</sup>
<i>Tripsina</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	5.20 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.16 ± 0.15 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.38 <sup>c</sup>
<i>Quimotripsina</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	2.27 ± 0.5	1.46 ± 0.42	1.19 ± 0.3	1.40 ± 0.37
<i>Alfa amilasa</i> mU x 10 <sup>-3</sup> mg proteína <sup>-1</sup>	5.26 ± 0.18 <sup>a</sup>	3.43 ± 0.35 <sup>b</sup>	2.91 ± 0.40 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.22 <sup>c</sup>

### 3.4.- Discusión

La harina de soya es un ingrediente que a pesar de que contiene diversos factores tóxicos que alteran en cierto grado la salud de los organismos (inhibidores de proteasas, lectinas, ácido fítico, saponinas, fitoestrógenos, alcaloides, taninos, cianógenos, glucosinolatos, etc.) (Murray et al., 2010), sigue siendo ampliamente utilizada para balancear la formulación de dietas para organismos acuáticos, debido a que entre otras cosas posee un balance adecuado de aminoácidos y un alto contenido de proteína disponible (Refstie et al., 2000). La proteína es uno de los nutrientes más importantes en los alimentos acuícolas para peces carnívoros marinos debido a que tienen un alto requerimiento por este nutriente el cual debe ser satisfecho para asegurar una buena salud, sobrevivencia y crecimiento de los organismos en cultivo (Minjarrez-Osorio et al., 2012), ya que en general los peces utilizan las proteínas para la síntesis de tejido, el cual se deposita principalmente en músculo (Carter y Houlihan 2001).

En organismos en desarrollo, la síntesis de tejido es mayor que la degradación y el balance entre éstos dos procesos resultan en la deposición de proteína (Millward, 1989), la cual determina la ganancia de peso en los organismos (Dumas et al., 2007). El crecimiento es la transformación irreversible de los nutrientes de almacenamiento y de la dieta, en tejidos y órganos (Kaushick y Seiliez, 2010), el cual limita su éxito a diferentes factores incluyendo la eficiencia de conversión alimenticia, así como la digestibilidad y la asimilación de los nutrientes (Torrecillas, 2014).

En la presente investigación se presentaron diferencias en los parámetros de crecimiento de los organismos y en las eficiencias alimenticias ya que la inclusión progresiva de harina de soya en las dietas, disminuyó significativamente estos parámetros. Existen investigaciones donde la harina de soya presentó efectos negativos en el crecimiento de los organismos así como también en la eficiencia de conversión alimenticia, ejemplo de esto es el estudio realizado con el salmón del Atlántico (Baeverfjord y Kroghdahl 1996), trucha arcoíris (Refstie et al., 2000, Heikkinen et al., 2006), carpa (Uran et al., 2008) y tilapia nilotica (Lin y Luo, 2011) las cuales fueron alimentadas con diferentes porcentajes de harina de soya resultando en la disminución del crecimiento con el incremento de éste ingrediente en las dietas experimentales.

Las bajas tasas de crecimiento reflejados en nuestros resultados podrían ser el resultado, entre otros factores, de la reducción de la asimilación de los nutrientes causado por los cambios histológicos generados en la mucosa intestinal producidos por la ingesta de harina de soya, tal y como sucedió en los estudios realizados con salmónidos los cuales desarrollaron un acortamiento de las microvellosidades intestinales, presentaron la pérdida de la vacuolización supra nuclear normal de las células absorbentes del epitelio intestinal, el estroma central contenido en los pliegues de la mucosa se ensanchó con el incremento de la cantidad de tejido conectivo y finalmente se produjo una infiltración profunda de células inflamatorias en la lámina propia (Baeverfjord y Kroghdahl, 1996). Dichos cambios morfológicos están asociados a la discapacidad funcional del intestino, así como también a la reducción de la

respuesta inmune, favoreciendo la aparición de enfermedades (Bakke-McKellep et al., 2000; Krogdahl et al., 2000, 2003).

En el proceso digestivo existen elementos que junto con los procesos mecánicos complementan la asimilación y favorecen la absorción de los nutrientes. La digestión y absorción de los nutrientes dependen de la función de las enzimas digestivas, especialmente de aquellas localizadas en el borde de cepillo, las cuales rompen o hidrolizan los nutrientes del alimento en compuestos que pueden ser absorbidos a través de las membranas de los enterocitos (Rust, 2002; Klein et al., 1998). Los peces carnívoros, como la totoaba poseen actividades elevadas de enzimas proteolíticas para digerir las proteínas que poseen sus dietas, sin embargo, la actividad de las enzimas varía entre especies y está influenciada no solo por la edad, también varía según la composición de la dieta y la cantidad suministrada (German et al., 2004).

En la presente investigación observamos que los datos resultantes del análisis enzimático, reflejan una alteración evidente en la actividad de las enzimas digestivas ya que con el incremento gradual de harina de soya, la actividad se observó cada vez más disminuida, afectando directamente la digestión y asimilación de los nutrientes, especialmente de la proteína. De manera óptima, las enzimas realizan la hidrólisis de los nutrientes hasta su mínima expresión (aminoácidos libres) para posteriormente llevar a cabo el proceso de absorción a través de los enterocitos y ser transportados al hígado para su metabolismo (Rust, 2002). Sin embargo, si existe una falla en la actividad de éstas enzimas, los procesos de absorción y asimilación no pueden ser

realizados de manera eficiente, afectando el estado de salud y el crecimiento de los organismos (Zambonino y Cahu, 2007).

La harina de soya es un ingrediente que contiene factores antinutricionales los cuales anulan la actividad de algunas de éstas enzimas (Liener, 1980). La respuesta fisiológica que se podría generar en los organismos que consumen dietas formuladas con éstos factores son pancreatitis e hipertrofia pancreática los cuales han sido ampliamente (Hardy et al., 2011; Krogdahl et al., 2010; Francis et al., 2001, Francis, 2001) relacionados con el uso de productos de la soya. Su mecanismo de acción es inhibiendo la actividad de enzimas proteolíticas, principalmente tripsina y quimotripsina los cuales se unen a la enzima blanco (tripsina y en menor medida quimotripsina) formando complejos estequiométricos estables lo que en consecuencia inhibe su actividad. Al inhibir la actividad de estas enzimas se estimula la secreción de pancreocimina-colecistoquinina de la pared intestinal las cuales estimulan la secreción de tripsina del tejido pancreático (Krogdahl et al., 2010), sin embargo después de un tiempo prolongado de haber forzado al páncreas a producir una gran cantidad de enzimas, se produce una hipertrofia pancreática, lo que a su vez limita la producción de enzimas pancreáticas (Hardy et al., 2011; Silva y Silva, 2000) y su severidad depende del tiempo y de la cantidad de harina suministrada (Berg-Lea et al., 1989).

Al alterar o inhibir la actividad de las enzimas digestivas, la hidrólisis de los nutrientes no se lleva a cabo de manera eficiente, por lo tanto la asimilación, deposición y retención también es poco eficiente. La retención de nutrientes en *Totoaba macdonaldi* se observó drásticamente afectada con la inclusión de harina de soya ya que los

niveles de nitrógeno, lípidos y energía disminuyeron en proporciones considerables con el aumento de inclusión de harina de soya. Dado que la retención de los nutrientes se encuentran íntimamente relacionados con el análisis proximal de los tejidos, es preciso mencionar que en la presente investigación, las proteínas contenidas en pez entero y músculo también disminuyeron con el aumento de harina de soya. La composición proximal de los peces (agua, proteína, lípidos, cenizas) y la utilización de los nutrientes no es constante, cambia a través de ciclo de la vida y pueden ser afectados por factores endógenos (crecimiento) y exógenos (estación, composición de la dieta) (Love, 1980; Dumas et al., 2007), sin embargo y como se ha mencionado en repetidas ocasiones, la razón de éste comportamiento podría deberse al alimento suministrado en las dietas las cuales contienen factores tóxicos que causan lesiones en el intestino que disminuyen la capacidad de asimilar los nutrientes suministrados en el alimento (Baeverfjord y Krogdahl 1996; Krogdahl et al., 2003; Olli y Krogdahl, 1995, Chikwati et al., 2013).

Finalmente el estado de salud de los organismos se evaluó mediante parámetros hematológicos, sin embargo al no existir una tendencia clara acerca de la respuesta generada en los organismos, es necesario especificar que la información es poco alentadora.



### 3.5.- Conclusión

Con base en los resultados generados en la presente investigación, se podría concluir que la harina de soya es un ingrediente que puede sustituir de manera parcial a la harina de pescado en un porcentaje máximo de 33% sin afectar los parámetros productivos, fisiológicos y hematológicos de *Totoaba macdonaldi*.

### 3.6.- Recomendaciones

Para complementar la información generada a partir de éste trabajo, es importante encontrar el porcentaje adecuado de sustitución de harina de soya por harina de pescado el cual se lograría establecer reduciendo el rango de sustitución desde un porcentaje mínimo de 0% hasta 33% según los resultados generados en la presente investigación.

De igual manera se recomienda el uso de un probiótico en la formulación de las dietas para mejorar la digestión y asimilación de la harina de soya.

Así mismo, se recomienda realizar el análisis de enzimas metabólicas para evaluar los efectos generados en el organismo por efecto de la harina de soya.

Además, es necesario realizar análisis histológicos de hígado e intestino para confirmar y evaluar el daño generado en éstos órganos por efecto de la harina de soya.

Finalmente se recomienda realizar análisis moleculares de hígado, intestino y estómago para analizar el comportamiento de enzimas claves involucradas en la

expresión enzimática proteica y de ésta manera exponer con mayor fundamento los resultados generados en ésta investigación.

|

**BIBLIOGRAFIA**

- Agheli N., Kabir M., Berni-Canani S. 1998. Plasma lipids and fatty acid synthase activity are regulated by short-chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. *Journal Nutrition*. 128: 1283-1288
- Alexis M.N. Fish meal and fish oil replacers in Mediterranean marine fish diets. In: Tacon A.G.J. (ed.), Basurco B. (ed). *Feeding tomorrow's fish*. Zaragoza: CIHEAM, 1997. pp. 183-204 (Cahiers Options Méditerranéennes 22).
- Alexis M.N., Nengas I. 2001. Current State of Knowledge Concerning the use of Soy Products in Diets for Feeding Sea Bass and Sea Bream. Needs for Future Research. American Soybean Association. Athens, Greece pp 32.
- Alvarez M.J., Diez A., Lopez-Bote C., Gallego M., Bautista J.M. 2000. Short-term modulation of lipogenesis by macronutrients in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *British Journal of Nutrition*. 84: 619–628.
- Aragão C., Conceição L.E.C., Dias J., Marquez A.C., Gomez E., Dinis M.T. 2003. Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis*. Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. *Aquaculture Research* 34:1443-1452.
- Arantzamendi L. 2002. Effect of dietary lipids on production, composition and lipolytic activity in commercial fish. PhD Tesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.

- Avilés Q.S., Vázquez H.M., 2005. Fortalezas y Debilidades de la Acuicultura en México. Comisión de Pesca de la Cámara de Diputados. México.
- Babin P.J. y Vernier, J.M. 1989. Plasma lipoproteins in fish. *Journal of Lipid Research*. 30: 467–489.
- Baeverfjord G., Krogdahl Å. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Disease* 19: 375-387.
- Bajo M., Fruehauf J., Hwan Kim S., Fountoulakis M. y Lubec G. 2002. Proteomic evaluation of intermediary metabolism enzyme proteins in fetal Down's syndrome cerebral cortex. *Proteomics* 2:1539–1546
- Bakke-McKellep A.M., McL P.C., Baeverfjord G., Krogdahl A., Landsverk T. 2000. Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases* 23:115–127
- Bardocz S., Grant G., Ewen S.W.B., Duguid T.J., Brown D.S., Englyst K., Pusztai A. 1995. Reversible effect of phytohaemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract. *Gut* 37:353-360
- Barnes M.E., Brown M.L., Rosentrater K.A., Sewell J.R. 2012. An initial investigation replacing fish meal with a commercial fermented soybean meal product in the diets of juvenile rainbow trout. *Open Journal of Animal Sciences*. Vol.2 No.4, 234-243
- Berg-Lea T., Brattås L. y Krogdahl A. 1989. Soybean proteinase inhibitors affect nutrient digestion in rainbow trout. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional*

Factors in Legume Seeds (ed. by J. Huisman, T.F.B. van der Pool y I. Liener), pp.99-102. Pudoc, Wageningen

Bergmeyer H.U. 1974. Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 4. Academic Press, New York. 1704–1708 pp.

Bogin E., Otto F., Ibañez A., Lippi E., Wittwer F., Uriarte G. 1989. Patología Clínica Veterinaria.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brockus C.W. 2011. Erythrocytes. In Duncan y Prasse's. Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology. Fifth edition.

Burrels C., Williams P.D., Southgate P.J., Crampton V.O., 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. Veterinary Immunology and Immunopathology. 72, 277–288.

Campbell T.W. y Ellis C.K. 2007. Hematology of Fish. In Avian and Exotic animal Hematology and cytology. 3rd edition. Blackwell Publishing, Oxford. UK. Pp 93-111

Carter C.G. y Houlihan D.F. 2001. Protein synthesis. En: Fish Physiology. Academic Press, New York, NY, USA. Vol.20. Nitrogen Excretion. pp. 31-75.

Christen, P., Graf-Hausner, U., Bossa, F., Doonan, S., Transaminases. John Wiley y Sons, New York, 1985, pp. 173–185.

- Cisneros-Mata M.A., Montemayor L.G., Román-Rodríguez J.M. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation and Biology*. 9: 806-814.
- Clydesdale F., 1997. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutrition Reviews* 55, 413-422.
- Conceição L., Aragão C., Rønnestad I. 2011. Proteins. In *Larval Fish Nutrition*, First Ed. Edited by G. Joan Holt. John Wiley y Sons, Inc.
- Cowey C.B., Walton M.J. 1989. Intermediary metabolism. In: *Fish Nutrition* Ed. by J.E. Halver. pp. 259-329. Academic. Press, NewYork, USA.
- Day O.J., Plascencia Gonzalez H.G. 2000. Soybean protein concentrate as a protein source for turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Nutrition* 6, 221-228.
- De Caterina R. and Madonna R. 2004. Nutrients and Gene Expression. *Nutrigenetics and Nutrigenomics*. *Word Review of Nutrition and Dietetics*. Simopoulos A.P. and Ordovas J.M. (eds). Vol. 93 pp 99-133.
- Dersjant-Li Y. 2002. The use of soy protein in aquafeeds. In: Cruz-Suarez L.E., Riquemarie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simones N. *Avances en Nutrición Acuícola VI*. *Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. 3 al 6 de septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México. Pp. 541-558.
- Dumas A., De Lange C., France J., Bureau D. 2007. Quantitative description of body composition and rates of nutrient deposition in rainbow trout (*Onchorhynchus mikiss*). *Aquaculture* 263: 165-181.
- FAO. 2007. Report of the FAO Expert Workshop on the Use of Wild Fish and / or Other Aquatic Species as Feed in Aquaculture and its Implications to Food Security and

Poverty Alleviation. Kochi, India, 16–18 November 2007. FAO Fisheries Report. No. 867. Rome, FAO. 2008. 29p.

FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Roma. 231 pp.

Francis G, Makkar H.P.S., Becker K. 2001a. Antinutritional factors present in Plant-derived alternate fish feed Ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 3-4:197-227.

Francis G, Makkar H.P.S., Becker K. 2001b. Effects of cyclic and regular feeding of a *Quillaja* saponin supplemented diet on growth and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 24:343-350.

Froese R., Pauly D. 2004. Fish Base. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) version (10/2004).

Ganga R., Montero D., Bell J.G., Atalah E., Ganuza E., Vega-Orellana O., Tort L., Acerete L., Afonso J.M. Benitez-Sanatana T., Fernández V.A. Izquierdo M. 2011. Stress response in sea bream (*Sparus aurata*) held under crowded conditions and fed diets containing linseed and/or soybean oil. *Aquaculture* 311: 215–223

García M.C. 2000. Protocolo diagnóstico del paciente con aumento de transaminasas. *Elsevier Medicine* 08:703-5.

Gargouri Y., Julien R., Pieroni G., Verger R., Sarda L. 1984. Studies on the inhibition of pancreatic and microbial lipases by soybean proteins. *Journal Lipid Research* 25:1214-1221

German, D.P., Horn, M.H., Gawlicka, A., 2004. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: Stichaeidae): ontogenetic, dietary and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology* 77, 789–804



- Goodnight S.H., Harris W., Connor W., y Illingworth D.R. 1982. *Arteriosclerosis* 2:87-113.
- Grant A.A.M., Baker D., Higgs D.A., Brauner C.J., Richards J.G., Balfry S.K., Schulte M.P. 2008. Effects of dietary canola oil level on growth, fatty acid composition and osmoregulatory ability of juvenile fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* 277: 303–312
- Gupta A., Sadeghipour H.R., Bhatla S.C. 2003. Subcellular detection of lipase activity in plant protoplast using fluorescence microscopy. *Plant Growth Regulation* 41:259-264
- Hammann M.G., Roman R.M.J. 1997. *Fishery Bulletin* 95:620-628. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonald*; (Sciaenidae), in the upper Gulf of California
- Haug A. y Hostmark A.T. 1987. *Journal of Nutrition* 117: 1011-1017. Hernell, O. 1975. *European Journal of Clinical Investigation* 5: 267-272.
- Hastings N., Agaba M.K., Tocher D.R., Zheng X, Dickson C.A., Dick J.R., Teale A.J. 2005. Molecular Cloning and Functional Characterization of Fatty Acyl Desaturase and Elongase cDNAs Involved in the Production of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids from  $\alpha$ -Linolenic Acid in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Marine Biotechnology*. 6, 463–474.
- Heikkinen J., Vielma J., Kemiläinen O., Tirola M., Eskelinen P., Kiuru T., Navia-Paldanius D., Wright A. 2006. Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261: 259–268

- Hernández M.D., Martínez F.J., Jover M., García G.B. 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 263: 159 –167.
- Higgs D.A., Dosanjh B.S., Prendergast A.F., Beames R.M., Hardy R.W., Riley W., Deacon G. 1995. Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. In: *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. AOCS Press.
- Hossain M.A., Jauncey K. 1993. The effect of varying dietary phytic acid, calcium and magnesium levels on the nutrition of common carp, *Cyprinus carpio*. Pp 705-715 in *Fish Nutrition in Practice*, S.J. Kaushik and P. Luquent, eds. Proc. IV International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, June 24-27, 1991, Biarritz, France.
- Hsu R.Y., Lardy H.A. 1969. Malic enzyme. In: *Methods in Enzymology*. Lowenstein J.M. Ed. Vol. XIII, pp 230-235. Academic Press, New York.USA.
- Hwang C., Ross V., Mahadevan U. 2012. Clinical Review: Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease: From A to Zinc. *Wiley Online Library*. 18:1961-1981).
- Iijima N., Tanaka S., Ota Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 59-69, 1998.
- Izquierdo M.S., Montero D., Robaina L., Caballero M.J., Rosenlund G., Gine´s R. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250: 431– 444.

- Jahan D.A., Hussain L., Islam M. A., Khan M. M. y Nima A. 2012. Use of Soybean as Partial Substitute of Fish Meal in the Diets of Rohu (*Labeo rohita*, Ham.) fry. The Agriculturists 10 (2): 68-76
- Kalogeropoulos N., Alexis M.N., Henderson R.J. 1992. Effects of dietary soybean and cod liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 104: 293-308.
- Kaushik S.J., Cravedi J.P., Lalles J.P., Sumpter J., Fauconneau B., Laroche M. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 133, 275-274.
- Kasim S.E., Stern B., Khilnani S., McLin P., Bacirowski S. y Jen K.L.C. 1988. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 67: 1-5.
- Kaushik Sadasivam y Seiliez Iban. 2010. Protein and aminoacid nutrition and metabolism in fish: current knowledge and future needs. Review Article. Aquaculture research. 41: 322-332.
- Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J., Gibson L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274 (2008) 1–14.
- Ketola H.G. 1985. Mineral nutrition: Effects of phosphorus in trout and salmon feeds on water pollution. Pp. 465-473 in Nutrition and Feeding of Fish, C. B. Cowey, A. M. Mackie, and J. G. Bell, eds. New York: Academic Press.

- Kiron Viswanath. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology*, 173: 111-133.
- Kissil G.W., Lupatsch I., Higgs D.A., Hardy R.W. 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture Research* 31: 595-601.
- Klein S., Cohn S., Alpers D. 1998. The alimentary tract in nutrition. In: Shils M., Olson A., Shike M., Ross A. (Eds.), *Modern Nutrition in Health and Disease*, pp. 605–630.
- Krogdahl Å., Berg-Lea T., Olli J. 1994. Soybean proteinase inhibitors affect intestinal trypsin activities and amino acid digestibilities in rainbow trout (*Onchornhyncgus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 107: 215-219.
- Krogdahl Å., Bakke-McKellep A., Roed K. Baeverfjord G. 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquaculture Nutrition* 6: 77–84.
- Krogdahl Å., Bakke-McKellep A.M., Baeverfjord G. 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 9, 361-371.
- Lercari D., Chávez E.A. 2007. Possible causes related to historic stock depletion of the totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: Sciaenidae), endemic to the Gulf of California. *Fisheries Research* 86: 136-142
- Lin S., Luo L. 2011. Effects of different levels of soybean meal inclusion in replacement for fish meal on growth, digestive enzymes and transaminase activities in practical diets

for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Animal Feed Science and Technology* 168: 80-87

Liu C., Chiu C., Lin P. Wang S. 2009. Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease producing probiotic *Bacillus subtilis* E20 from natto. *Journal of Applied Microbiology* 107:1031-41.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky L., Darnell J. 2004. *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman and Company (Ed).Fifth Edition. New York. USA. Pág. 973

López-Alarcón M., Rodríguez-Cruz M., Vital-Reyes V.S., Zavala-Ortega M.I., Hinojosa-Cruz J.C. Canizales-Quinteros S., Fernández J. 2012. Short Communication: PPAR $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism is associated with improved lipoprotein lipase functioning in adipose tissue of insulin resistant obese women. *Gene* 511: 404–410.

Love, R.M., 1980. *The Chemical Biology of Fishes*. Advances 1968–1977, vol. 2. Academic Press, London. 943 pp.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Makkar H.P.S. 1993. Antinutritional factors in Foods for livestock. En: Eds. Gill M., Owen E., Pollot G.E., Lawrence T.L.J. *Animal Production in Developing Countries Occasional Publication No 16*. British Society of Animal Production: 69-85.

Menoyo D., Lopez-Bote C.J., Bautista J.M. y Obach A. 2003. Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. *Aquaculture* 225: 295–307.

- Menoyo D., Izquierdo M.S., Robaina L., Ginés R., Lopez-Bote C.J. Bautista J.M. 2004. Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *British Journal of Nutrition*, 92, pp 4152
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Børgwald J., Castex M., Ringø E. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302:1-18.
- Merrifield D.L., Olsen R.E., Myklebust R., Ringø E. 2011. Dietary Effect of Soybean (Glycine max) Products on Gut Histology and Microbiota of Fish, Soybean and Nutrition, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-536-5.
- Millward D.J. 1989. The nutritional regulation of muscle growth and protein turnover. *Aquaculture* 79: 1-28
- Minjarez-Osorio C., González-Félix M.L., Perez-Velazquez M. 2012. Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture*. 362–363:50–54.
- Montero D., Kalinowsky T., Obach A., Robaina L., Tort L., Caballero M.J., Izquierdo M.S. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225:353-370.
- Montero D., Grasso V., Izquierdo M.S., Ganga R., Real F., Tort L., Caballero M.J., Acosta F. 2008. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology* 24, 147-155.

- Morales A.E., García Rejón L., De la Higuera M., 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 95:87-93.
- Murai T., Ogata H., Hirasawa Y., Akiyama T., Nose T. 1987. Portal absorption and hepatic uptake of amino acids in rainbow trout force-fed complete diets containing casein or crystalline amino acids. *Nippon Suisan Gakk.* 53:1847-1859.
- Murray H.M., Lall S.P., Rajaselvam R., Boutilier L.A., Blanchard B., Flight R.M., Colombo S., Mohindra V., Douglas S.E. 2010. A nutrigenomic analysis of intestinal response to partial soybean meal replacement in diets for juvenile Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, L. *Aquaculture* 298: 282–293.
- Nayak S.K. 2010. Probiotics and immunity: a Fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology* 29: 2-14
- Nilsson-Ehle P. 1980. *Annual Review Biochemistry* 49:667-693
- Norton G. 1991. Proteinase inhibitors. En: D’Mello F.J.P., Duffus J.H. Eds., *Toxic Substances in Crops Plants*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge CB4 4WF, Cambridge: 68-106.
- Ochoa-Solano J.L., Olmos-Soto J. 2006. The functional property of Bacillus for shrimps feeds. *Food Microbiology* 23:519-525.
- Ochoa-Solano, L. 2006. Desarrollo de Probióticos para la Camaronicultura. Tesis de doctorado. CICESE. Ensenada, Baja California.

- Olli J.J., Krogdahl Å. 1994. Nutritive value of four soybean products as protein sources in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) reared in fresh water. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A Animal Science* 44, 185-192.
- Olli J.J., Hjelmeland K., Krogdahl Å. 1994a. Soybean trypsin inhibitors in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L): Effects on nutrient digestibilities and trypsin in pyloric caeca homogenate and intestinal content. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 109: 923-928.
- Olli J.J., Krogdahl Å., Van Den Ingh T.S.G.A.M., Brattås L.E. 1994. Nutritive value of four soybean products in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Acta Agriculturae Scandinavica Section A Animal Science* 44, 50-60.
- Olli, J.J., Krogdahl, Å., 1995b. Dehulled solvent-extracted soybean meal as a protein source in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 26, 167–174.
- Otto D.A., Tsai C.E., Baltzell J.K. y Wooten J.T. 1991. *Biochimica et Biophysica. Acta*, in press. O'Looney P.A. y Vahouny C.V. 1987. In *Lipoprotein Lipase*. Jayme Borensztajn Ed. pp. 229-246, Evener Publishers, Inc., Chicago.
- Øverland M., Sørensen M., Storebakken T., Penn M., Krogdahl Å, Skrede A. 2009. Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) - Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* 288: 305-311.



- Pedrin-Osuna O., Córdova-Murueta J.H., Delgado-Marchena M. 2001. Crecimiento y mortalidad de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*, del alto golfo de California. INP. SAGARPA. México. Ciencia Pesquera No. 15.
- Peng S., Chen L., Qin J.G., Hou J., Yu N., Long Z., Ye J., Sun X. 2008. Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture* 276: 154–161.
- Piedecausa M.A., Mazón M.J., García G.B., Hernández M.D. 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 263:211–219.
- Plummer D.T. 1987. *An Introduction to Practical Biochemistry*. 3ª edición. McGraw Hill Book, London, UK.
- Qiu-Bai Z., Hua-Dong W., Chang-Sheng Z., Xing-Hong Y. 2011. Effects of dietary lipids on tissue fatty acids profile, growth and reproductive performance of female rice field eel (*Monopterus albus*). *Fish Physiology Biochemistry* 37:433–445
- Refstie S., Svihus B., Shearer K.D., Storebakken T. 1999. Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soyabean products. *Animal Feed Science and Technology* 79:331-345.
- Refstie S., Korsøen Ø.J., Storebakken T., Baeverfjord G., Lein I., Roem A.J. 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190: 49-63.

- Refstie S., Storebakken T., Baeverfjord G., Roem A.J. 2001. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture* 193:91-106.
- Regost C., Arzel J., Robin J., Rosenlund G., Kaushik S.J. 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217:465-482
- Richard N., Mourente G., Kaushik S., Corraze G. 2006. Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261: 1077–1087
- Richardson N.L., Higgs D.A., Beames R.M., McBride J.R. 1985. Influence of dietary calcium, phosphorus, zinc and sodium phytate level on cataract incidence, growth and histopathology in juvenile Chinook salmon (*Onchorhynchus tsawytscha*). *Journal of Nutrition* 115:553-567
- Ringo E., Olsen R.E., Gifstad T.Ø., Dalmo R.A., Amlund H., Hemre G.I. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 16: 117 – 136.
- Rumsey G.L., Siwicki A.K., Anderson D.P., Bowser P.R. 1994. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 41, 323-339.
- Rust M. 2002. Nutritional Physiology. In *Fish Nutrition*. Third edition. Edited by John E. Halver and Ronald W. Hardy.

- Ruyter B., Moya-Falcon C., Rosenlund G., Vegusdal.A. 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture* 252: 441– 452.
- Sæle Ø., Nordgreen A., Olsvik P.A., Hamre K. 2010. Characterization and expression of digestive neutral lipases during ontogeny of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 157: 252–259.
- Sanchez-Muros M., García-Rejón L., García-Salguero L., Higuera M., Lupiáñez J. 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30:55-63.
- Sarath G. La Motte S., Wagner F.W. 1989. Protease assay methods. 25-55. En: Beynon R.J., Bond J.S. Eds. *Proteolytic enzymes: a practical approach*. Oxford, UK.
- Sargent J.R., Tacon A.G.J. 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proceedings of the Nutrition Society* 58:377-383.
- Sargent J.R., Tocher D.R., Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*, Third ed Academic Press, San Diego, pp. 181– 257.
- Satouchi K., Hirano K., Fujino O., Ikoma M., Tanaka T., Kitamura K. 1998. Lipooxygenase-1 from soybean seed inhibiting the activity of pancreatic lipase. *Bioscience Biotechnology and biochemistry* 62:1498-1503

- Satouchi K., Kodama Y., Murakami K., Tanaka T., Iwamoto H., Ishimoto M. 2002. A lipase-inhibiting protein from lipoxigenase-deficient soybean seeds. *Bioscience Biotechnology and biochemistry* 66:2154-2160
- Schittmayer M. y Birner-Gruenberger R. 2009. Review Functional proteomics in lipid research: Lipases, lipid droplets and lipoproteins. *Journal of Proteomics* 72: 1006 – 1018
- Segner H., Verreth J. 1995. Metabolic enzyme activities in larvae of the African catfish, *Clarias gariepinus*: changes in relation to age and nutrition. *Fish Physiology and Biochemistry* 14:385-398.
- Sheridan M.A. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry Physiology* 90B: 679-690.
- Shikata T., Shimeno S. 1994. Metabolic response to dietary stearic acid, linoleic, and highly unsaturated fatty acid in carp. *Fisheries Science*. 60: 735–739.
- Silva M.R. y Silva M.A.A.P. 2000. Revisão fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. *Revista de Nutricion Campinas* 13(1): 3-9
- Silvana R.A. 2006. Hipertrigliceridemia y resistencia insulínica. Mecanismos involucrados en el tejido adiposo. Efectos de la sustitución del tipo de ácidos grasos dietarios. Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Litoral. San Fe. Argentina.
- Simpson B.K. 2000. Digestive proteinases from marine animals. 531-540. En *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. Haard N.F., Simpson B.K (Eds). Marcel Dekker. New York, USA.

- Smith R.R. 1977. Recent research involving full-fat soybean meal in salmonid diets. *Salmonid* 1:8-18.
- Stanković M.B., Dulić Z.P. y Marković Z.Z. 2011. Protein sources and their significance in carp (*Cyprinus carpio* L.) nutrition. *Journal of Agricultural Sciences*. Vol. 56:75-86.
- Stickney R.R., Hardy R.W., Koch K., Harrold R., Seawright D., Massee K.C. 1996. The effects of substituting selected oilseed protein concentrates for fish meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* diets. *Journal of the World Aquaculture Society* 27:57-63.
- Storebakken T., Reftsie S., Ruyter B., 2000. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackey, J.K. (Ed.), *Soy in Animal Nutrition*. Federation of Animal Science Societies, pp. 127–170.
- Sveier H., Nordås H., Bege G.E., Lied E. 2001. Dietary inclusion of crystalline D- and L-methionine: effects on growth, feed and protein utilization, and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 7:169-181.
- Svetina A., Matasin Z., Tofant A., Vucemilo M., Fijan N. 2002. haematology and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. *Acta Veterinaria Hungarica* (50) 4: 459-467.
- Swick R., Barnstein P. y Stange J. 1965. The metabolism of mitochondrial proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 240:8
- Tacon A.G.J, Forster I. 2000. Global trends and challenges to aquaculture and aquafeed development in the millennium. pp.4-25. *International Aquafeed Directory and Buyers Guide 2001*, Turret RAI plc, Uxbridge, Middlesex, UK.

- Tacon A.G.J. y Metian M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146-158
- Tacon A.G.J., Hasan M.R., Metian M. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564*. 87 pp.
- Taija-Riitta T., Maren E. 2003. Food for thought: The use of marine resources in fish feed. Norwegian Industrial and Regional Development Fund. WWF Norway.
- Takagi S., Shimeno S., Hosokawa H., Ukawa M. 2001. Effect of lysine and methionine supplementation to a soy protein concentrate diet for red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science* 67:1088-1096.
- Thievend P., Mercier C., Guilbot A. 1972. Determination of starch with gluco-amylase. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. 6. Ed. R.L. Whistler. Academic Press, New York, pp 171–176.
- Tibaldi E., Hakim Y., Uni Z., Tulli F., Francesco M., Luzzana U., Harpaz S. 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 261: 182–193.
- Tocher D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* (11) 2: 107-184.

- Tranulis M.A., Christophersen B., Biota A.K., Borrebaek B. 1991. Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effects of starvation and temperature variations. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B: 687-691.
- Trattner S., Kamal-Eldin A., Brännäs E., Moazzami A., Zlabek V., Larsson P. Ruyter B., Gjøen T., Pickova J. 2008. Sesamin Supplementation Increases White Muscle Docosahexaenoic Acid (DHA) Levels in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed High Alpha-Linolenic Acid (ALA) Containing Vegetable Oil: Metabolic Actions. *Lipids* 43: 989–997
- Uran P., Goncalves A., Taverne-Thiele J., Schrama J., Verreth J., Rombout J. 2008. Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish y Shellfish Immunology* 25: 751–760.
- Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 655-671.
- Vucelić-Radović V., Barić M., Stanojević S., Pešić M., Hristić M., Miladinović J., Prijić Lj., Srebrić M. 2005. Biološki vredni proteini domaćih sorti soje u proizvodnji riblje hrane. II Međunarodna konferencija, "Ribarstvo", Zbornik predavanja. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, pp. 272-278.
- Wang S. y Huang A. 1984. Inhibitors of lipase activities in soybean and other oil seeds. *Plant Physiology* 76:929

- Wassef, E.A., Saleh, N.E., El-Abd El-Hady, H.A., 2009. Vegetable oil blend as alternative lipid resources in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Aquaculture International* 17 (5) 421–435.
- Watanabe T. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68:242-252.
- Weintraub M.S., Zechner R., Brown A., Eisenberg S., y Breslow J.L. 1988. Dietary polyunsaturated fat of n-6 and n-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. Chronic and acute effects of fat saturation on postprandial lipoprotein metabolism. *Journal of Clinical Investigation* 82:1884-1893.
- Werner M. 2008. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida*. Editorial Reverté, S. A. Pag. 651. Wing-Keong N., Cheong-Yew C., Wang Y., Romano N. 2013. Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture* 372–375 : 97–110
- Willmott M.E., Clements K.D., Wells R.M.G. 2005. The influence of diet and gastrointestinal fermentation on key enzymes of substrate utilization in marine teleost fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 317:97-108.
- Zambonino I. J.L., Cahu C.L. 2007. Dietary modulation of some digestive enzymes and Metabolic processes in developing marine fish: Applications to diet formulation. *Aquaculture* 268: 98–105.



# **ANEXOS**



## ANÁLISIS QUÍMICOS PROXIMALES

**Humedad:** se calculó por diferencia de peso de una muestra expuesta a cierta temperatura (105°C) en un lapso de tiempo determinado (8 hrs).

### *Procedimiento:*

- Registrar el peso de un crisol de porcelana o aluminio
- Pesar por triplicado 0.5 – 1 gr de muestra molida en una capsula de porcelana o aluminio
- Meter a secar la muestra a una estufa de convección a 105°C por 8 hrs.
- Dejar enfriar las muestras en un desecador
- Registrar el peso de la cápsula o aluminio con la muestra seca

### *Cálculos:*

$$\% \text{ Humedad: } [(PM - PMS) / PM] \times 100$$

PM = Peso de muestra

PMS = Peso de muestra seca

$$\% \text{ Sólidos Totales: } 100 - \% \text{ Humedad}$$

**Cenizas:** se calculó por diferencia de peso de una muestra expuesta a temperaturas más elevadas (550°C) en un lapso de 8 hrs.

*Procedimiento:*

- Registrar el peso de un crisol de porcelana
- Pesar por triplicado 0.5 – 1 gr de muestra molida en una capsula de porcelana
- Meter a la mufla y pre-calcinar la muestra a 200°C por 2 hrs. hasta que no se produzca humo (evitar que se inflame y se proyecte)
- Transcurrido éste tiempo, subir la temperatura de la mufla a 550°C por 6 hrs. mas (hasta que el residuo mineral se presente libre de carbón)
- Dejar enfriar las muestras en un desecador
- Registrar el peso del crisol de porcelana con la muestra seca

*Cálculos:*

$$\% \text{ ceniza} = (\text{peso del residuo} / \text{peso de muestra}) \times 100$$

**Proteínas:** Se calculó el nitrógeno total en forma de amonio por el método Micro Kjeldahl.

Procedimiento:

### Digestión

- Pesar 1.5 gr de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) en un matraz Micro Kjeldahl (no es necesario registrar el peso)
- Agregar 0.05 gr de sulfato de cobre ( $CuSO_4$ )
- Pesar 0.05 gr de muestra y registrar el peso (Muestra por triplicado + blanco + control (grenetina))
- Agregar 3 ml de ácido sulfúrico a cada muestra
- Colocar el matraz en el digestor y calentar a ebullición hasta que la solución se vea clara continuando con el proceso de calentamiento 30 minutos mas
- Dejar enfriar y posteriormente aforar a 25 ml con agua destilada, agitar hasta que la mezcla se torne transparente (reacción exergónica)

### Destilación

- Medir 40 ml en un vaso de precipitado (uno por muestra)
- Añadir 15 ml de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) al 3%
- Agregar de 3 gotas de Shiro-toshiro
- En el destilador, agregar 5 ml de mi muestra haciendo cambio de pipeta entre cada muestra
- Agregar 10 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 40%
- Agregar 10 ml de agua destilada
- Calentar hasta obtener 40 ml de destilado

### Titulación

- Los 40 ml de destilado se titulan con ácido clorhídrico (HCl) al 0.02 N, gota a gota se agrega el ácido hasta obtener un cambio de color
- Se registra el volumen agregado al destilado

### *Cálculos:*

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = [(A-B) * C * 0.014 * 100] / D]$$

$$\text{Proteína (\%)} = \% \text{Nitrógeno en la muestra} * 6.25$$

A = Ácido clorhídrico usado en la titulación (ml) de la muestra

B = Ácido clorhídrico usado en la titulación (ml) del blanco

C = Normalidad del HCl

D = Peso de la muestra

**Lípidos:** Se extrajeron los lípidos totales contenidos tanto en las dietas experimentales, así como en los tejidos de los organismos, siguiendo la siguiente metodología de Folch et al. (1957):

*Procedimiento:*

- Pesar 0.05 gr de muestra seca en tubos con rosca. Como estándar se usa 0.025 gr de tripalmitina
- Agregar a cada muestra 0.2 ml de agua destilada para homogenizar e hidratar, agitar en vortex
- Adicionar 2 ml de metanol y agitar por 2 minutos, posteriormente añadir 4 ml de cloroformo
- Dejar en agitación continua por 12 horas
- Filtrar la muestra en tubos nuevos para eliminar impurezas
- Adicionar 1.5 ml de KCl al 1.76%
- Dejar reposar por 12 horas (separación de fases)
- Extraer con pipetas Pasteur la fase de metanol (fase superior) y eliminar. La fase posterior contiene el cloroformo y los lípidos
- Tomar 2 ml de la fase de cloroformo y colocarlos en un tubo ámbar (previamente pesado)
- Evaporar el solvente a 60°C en campana de extracción
- Pesar el tubo al final de la evaporación y por diferencia de peso se determina la concentración de lípidos

*Cálculos:*

$$\% \text{ Lípidos totales} = [(A-B) / C] * 100$$

A= Tubo + lípidos

B= Tubo sin muestra

C= Peso de la muestra (gr)

**Almidón:** Se realizará de acuerdo a la metodología planteada por Thievend et al. (1972). El almidón en las muestras se determinará mediante hidrolisis enzimática que rompe los enlaces  $\alpha$ -D (1-4) y  $\alpha$ -D (1-6) liberando la glucosa. Posteriormente, la curva estándar y la determinación de la glucosa se evaluó mediante un kit comercial para determinar glucosa de la marca Pointe Scientific.

*Procedimiento:*

- Enumerar y pesar matraces
- Pesar 0.05 gr de muestra
- Agregar 25 ml de agua destilada
- Meter todos los matraces al autoclave a 121°C por 1 hora
- Transcurrido ese tiempo poner los matraces en baño maría a 60°C
- Agregar 2.5 ml de solución Tampón de Ácido Acético y ajustar el peso a 50 gr con agua destilada, regresar a baño maría
- Agregar 2 ml de glucamilasa (0.05 g enzima / 25 ml agua destilada)
- Continuar la agitación por 2 horas a 60°C
- Dejar enfriar
- Filtrar (embudo y papel whatman) y aforar con agua destilada a 100 ml
- Colocar 1 ml de solución "Glucosa Oxidasa" en tubos eppendorf
- Calentar en baño maría por 10 minutos a 37°C
- Sacar y agregar 10  $\mu$ l de solución aforada
- Incubar a 37°C por 10 minutos
- Medir absorbancia a 520 nm

*Cálculos:*

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = [(A / B) * (C)]$$

A = Absorbancia de las muestras

B = Absorbancia del control

C = Absorbancia del estándar de glucosa



$$\text{Almidón (g/100 g)} = [(\text{glucosa} * 0.001 * 0.9) * (100 * E) * [(100 - H) / 100]]$$

Glucosa= glucosa leída en muestra en mg/dl

0.001= para transformar de mg/dl de glucosa en gr/dl

0.9= constante de hidrolisis (transformación de glucosa a almidón)

E= peso de la muestra en gr

H= humedad de la muestra en %

**Glucógeno:** La determinación del glucógeno se realizó en el hígado de los organismos mediante la metodología de Plummer (1987), mediante la separación de los enlace glucosídicos 1,4, para liberar las unidades de  $\alpha$ -glucosa. Posteriormente, la curva estándar y la determinación de la glucosa se evaluó mediante un kit comercial Glucose Oxidase de la marca Pointe Scientific.

*Procedimiento:*

- Agregar 2 ml de KOH al 30% en tubos de 50 ml
- Pesar 0.5 g de hígado o 1.5 g de musculo (3 de cada tanque)
- Colocarlo en baño María a 100°C por 20 minutos
- Realizar agitación con vortex cada 5 minutos (al menos tres repeticiones por muestra)
- Pasar a baño frío con hielo molido
- Añadir a cada muestra 0.2 ml de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y agitar con vortex
- Agregar a cada muestra 5 ml de etanol al 95% y agitar con vortex
- Dejar reposar la muestra por 5 minutos en el baño de agua helada
- Centrifugar las muestras en frío (4°C) a 2000 g por 10 minutos
- Retirar el sobrenadante hasta dejar únicamente el pellet
- Suspende el pellet en 5 ml de agua destilada caliente y agitar con vortex
- Esperar a que la espuma disminuya
- Aforar a 10 ml con agua destilada fría y agitar con vortex
- Transferir 1 ml de solución de la muestra a un tubo de ensayo de 10 ml
- Agregar 1 ml de HCl a 1.2 M
- Poner a baño maría a 100°C por 2 horas
- Colocar en baño frío por 5 minutos y agregar 5 gotas de rojo fenol
- Neutralizar con NaOH a 0.5 M hasta obtener un color amarillo canario
- Aforar la muestra a 5 ml con agua destilada
- En tubos eppendorf de 1.5 ml agregar 1 ml del reactivo para determinar glucosa (Pointe Scientific)

- Calentar el reactivo a 37°C durante 5 a 10 minutos
- Agregar 10 µl de la muestra
- Incubar a 37°C por 10 minutos
- Leer la absorbancia a 500 nm
- 

#### *Cálculos*

- $Glucosa (mg/dl) = [(A / B) * (C)]$

A = Absorbancia de las muestras

B = Absorbancia del control

C = Absorbancia del estándar de glucosa

- $\% Glucógeno: [(Glucosa (mg) * 0.5 * 0.9 * 0.001 * 100) / Peso de muestra]$

0.9= factor de conversión de glucosa en glucógeno

0.5= mg de glucosa en 5 ml de dilución de muestra

0.001= transformación de la concentración de glucosa (mg) en g.

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS

### **Desengrasado de muestras (Método modificado de Folch)**

#### *Procedimiento:*

- Pesar 200 mg (0.200 g) de muestra de cada tratamiento por duplicado
- Agregar 4 ml de la mezcla de diclorometano:metanol en una proporción 2:1
- Agregar 4 ml de KCl a 0.88%
- Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente
- Desechar fases (dos fases)
- Agregar 4 ml de diclorometano para lavar
- Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente
- Eliminar nuevamente el solvente
- Evaporar el resto del solvente con N<sub>2</sub> por 5 minutos
- Secar en estufa a 65°C por 3 horas

### **Hidrólisis**

#### *Procedimiento:*

- Moler las muestras
- Identificar los viales con un biselador para vidrio
- Pesar el equivalente a 10 mg de proteína
- Agregar 40 µl de AABA (ácido alfa amino butírico) al 0.25 M
- Evaporar en flujo de N<sub>2</sub> por 5 minutos
- Poner viales sin tapa dentro de un frasco con tapa y agregar 400 µl de HCl 6N por cada muestra cuidando que el ácido no entre dentro de los viales
- Poner los frascos tapados dentro de una estufa a 108°C por 18 horas

## Filtrado

### *Procedimiento:*

- Posterior a la hidrólisis, se secan las muestras con N<sub>2</sub> y en baño maría a 70°C por un periodo aproximado de 20 minutos o hasta notar que la muestra no presenta halos de líquido
- Una vez que la muestra esté seca se le agrega por partes 1 ml de HCl 20 mM para disolver la muestra y colocarla dentro de una jeringa con filtro
- El filtrado se guarda en un vial previamente identificado (concentrado)
- Previo a la inyección en el HPLC, se hace una dilución del concentrado en una proporción de 1:100 (10 µl de muestra concentrada : 990 µl de agua grado HPLC)

PREPARACION DE MUESTRAS PARA EL ANALISIS DEL PERFIL DE ACIDOS  
GRASOS

**Desengrasado de muestras (Método modificado de Folch)**

*Procedimiento:*

- Identificar y pesar viales (3 de cada tratamiento)
- Pesar 1 gr de muestra
- Agregar la solución de extracción (1 metanol: 2 diclorometano) en una proporción de 1:1
- Homogenizar por 2 minutos en vortex y dejar en agitación durante la noche
- Repetir la agitación por 2 minutos
- Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C
- Remover los sólidos de la solución mediante centrifugación o filtración y/o remover el sobrenadante y almacenarlo en otro vial previamente pesado e identificado
- Una vez que se colectó el sobrenadante, los sólidos vuelven a lavarse con una mezcla 1:1 metanol:diclorometano y agitar en vortex
- Volver a colectar el sobrenadante en el mismo vial
- Repetir el mismo procedimiento de lavado 2 o 3 veces más según sea necesario
- Desechar los sólidos
- Al sobrenadante colectado se le agrega 1 ml de agua desionizada y una gota de HCl 6 N
- Mezclar suavemente y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C
- Separar las dos fases eliminando la parte superior de la mezcla la cual únicamente contiene agua
- Evaporar los solventes con flujo de N<sub>2</sub> en campana de extracción

- Pesar el vial con los lípidos contenidos y calcular el contenido de lípidos totales por diferencia de peso con el peso inicial del vial.

## Saponificación

### *Procedimiento:*

- Agregar 100  $\mu$ l de solución metanólica 3 N de KOH a los lípidos contenidos en los viales usados en la extracción (Aproximadamente 0.080 gr de lípidos)
- Dejar en baño maría a 80°C por 1 hora
- Dejar enfriar y agregar 200  $\mu$ l de agua desionizada y 300  $\mu$ l de hexano
- Centrifugar a 3000 rpm por 2 minutos a 21°C
- Retirar el sobrenadante y desecharlo
- Volver a agregar 200  $\mu$ l de agua desionizada y 300  $\mu$ l de hexano
- Retirar y desechar el sobrenadante
- Agregar 1 gota de HCl 6 N, 300  $\mu$ l de hexano y 200  $\mu$ l de agua desionizada
- Centrifugar a 3000 rpm por 2 minutos a 21 °C
- Identificar un vial UV para cada muestra y pesarlo
- El sobrenadante se coloca en los viales UV y se guarda
- A la muestra inicial agregar 300  $\mu$ l de hexano y 200  $\mu$ l de agua desionizada
- Centrifugar a 3000 rpm por 2 minutos a 21 °C
- Nuevamente guardar el sobrenadante en el mismo vial UV
- El vial UV se seca con flujo de N<sub>2</sub> en campana de extracción
- Pesar el vial para obtener el peso de los lípidos saponificables

## Metilación

### *Procedimiento:*

- A los viales UV con los lípidos saponificables se les agrega 300  $\mu$ l del reactivo de esterificación (Trifluoruro de Boro en metanol al 14%)
- Calentar la mezcla a 60°C en baño maría por 15 minutos

- Una vez hecha la esterificación, se le agregan 200  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y 200  $\mu\text{l}$  de hexano
- Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos
- Eliminar la parte inferior de la mezcla
- Secar con flujo de  $\text{N}_2$  en campana de extracción
- Almacenar en seco a  $4^\circ\text{C}$
- Antes de inyectar la muestra en el Cromatógrafo de Gases se le agregan 40  $\mu\text{l}$  de hexano y se agita en vortex



## PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

### **Conteo de eritrocitos**

#### *Procedimiento:*

- Extraer una muestra de sangre con anticoagulante
- Homogenizar suavemente
- En un tubo eppendorf agregar 1 ml de solución Dacie filtrada
  - Agua destilada (500 ml)
  - Azul de cresilo brillante (0.5 gr)
  - Solución de formaldehído al 37% (5 ml)
  - Citrato de trisodio (15.7 gr)
  
- Agregar 20  $\mu$ l de la muestra
- Homogenizar sin agitar
- Realizar el conteo en cámara Neubauer

## **Hematocrito**

### *Procedimiento:*

- Extraer una muestra de sangre con anticoagulante
- Homogenizar suavemente
- Tomar una muestra con tubos capilares para micro hematocrito
- Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos
- Cuantificar el tubo capilar en un lector para tubos capilares de hematocrito

### *Cálculos:*

$$HT (\%) = \% \text{ leído} / \text{factor de dilución}$$

**Hemoglobina:** En un medio alcalino, el ferricianuro de potasio oxida la hemoglobina y su derivado la metahemoglobina. La reacción subsecuente con cianuro de potasio produce la estabilidad de la cianometahemoglobina la cual tiene una absorbancia máxima a 540 nm. La intensidad del color es proporcional al total de la concentración de hemoglobina.

*Procedimiento:*

- Extraer una muestra de sangre con anticoagulante
- Homogenizar suavemente
- En un tubo eppendorf agregar 2 ml del reactivo Hemoglobin Reagent Set de la marca Pointe Scientific
- Agregar 10 µl de la muestra
- Agregar 10 µl del estándar y un blanco
- Homogenizar sin agitar (por inversión)
- Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente
- Colocar la mezcla en celdillas para espectrofotómetro
- Leer la absorbancia de las muestras a 540 nm

*Cálculos:*

$$\text{Hemoglobina (g/dl)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del estandar}} * \text{concentracion del estandar}$$

**Glucosa:** La glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa a gluconato y peróxido de hidrógeno. El fenol +4-AAP junto con el peróxido de hidrógeno, en presencia de la peroxidasa, produce un colorante de quinona imina la cual es medida a 500 nm. La absorbancia a 500 nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

*Procedimiento:*

- Extraer una muestra de sangre con anticoagulante
- Homogenizar suavemente
- Centrifugar la muestra a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C
- Separar el plasma del paquete celular
- En un tubo eppendorf agregar 1 ml del reactivo Liquid Glucose (oxidase) Reagent Set de la marca Pointe Scientific
- Calentar el reactivo a 37°C en baño maría por 5 minutos
- Agregar 10 µl de la muestra (plasma)
- Agregar 10 µl del estándar y un blanco
- Homogenizar sin agitar (por inversión)
- Incubar por 10 minutos a 37°C
- Colocar la mezcla en celdillas para espectrofotómetro
- Leer la absorbancia de las muestras a 500 nm

*Cálculos:*

$$\text{Glucosa (mg/dl)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del estandar}} * \text{concentracion del estandar}$$

**Proteína:** La proteína en suero produce un color violeta cuando reacciona con iones de cobre en una solución alcalina. La intensidad del color violeta es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

*Procedimiento:*

- Extraer una muestra de sangre con anticoagulante
- Homogenizar suavemente
- Centrifugar la muestra a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C
- Separar el plasma del paquete celular
- En un tubo eppendorf agregar 1 ml del reactivo Total Proteín (Biuret) Reagent Set de la marca Pointe Scientific
- Agregar 20 µl de la muestra (plasma)
- Agregar 20 µl del estándar y un blanco
- Homogenizar sin agitar (por inversión)
- Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
- Colocar la mezcla en celdillas para espectrofotómetro
- Leer la absorbancia de las muestras a 540 nm

*Cálculos:*

$$\text{Proteína Total (g/dl)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del estandar}} * \text{concentracion del estandar}$$

**Albúmina:** La albúmina se enlaza al colorante verde bromocresol para producir un incremento en el color verde azulado medido a 630 nm. El incremento del color es proporcional a la concentración de albumina presente en las muestras

*Procedimiento:*

- Extraer una muestra de sangre con anticoagulante
- Homogenizar suavemente
- Centrifugar la muestra a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C
- Separar el plasma del paquete celular
- En un tubo eppendorf agregar 1 ml del reactivo Albumin Reagent Set de la marca Pointe Scientific
- Agregar 10 µl de la muestra (plasma)
- Agregar 10 µl del estándar y un blanco
- Homogenizar sin agitar (por inversión)
- Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
- Colocar la mezcla en celdillas para espectrofotómetro
- Leer la absorbancia de las muestras a 630 nm

*Cálculos:*

$$\text{Albumina (g/dl)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del estandar}} * \text{concentracion del estandar}$$

## METODOLOGÍA ACTIVIDAD ENZIMATICA DIGESTIVA

### Homogenizados

#### *Procedimiento:*

- Descongelar el paquete visceral. Separar el estómago y el paquete visceral
- Fragmentar las primeras dos terceras partes del intestino y registrar el peso
- El peso del intestino se multiplica por 5 para calcular la cantidad de buffer que se tiene que agregar a esa muestra
- El tubo donde se molerá la muestra, se coloca en un vaso de precipitado con hielo. Introducir al tubo, el intestino y la cantidad de buffer calculado
- Homogenizar la muestra sin sacar el tubo del hielo (no grumos)
- Centrifugar el tubo a 16,000 rpm por 30 minutos a 4°C
- Extraer el sobrenadante y repartirlo en tubos eppendorf (aproximadamente 50 µl por cada tubo)
- Congelar los tubos (alícuotas) a -80°C hasta su uso (almacenamiento)

#### *Preparación del buffer (1 L):*

- Tris HCl 30 mM (3.68 g)
- $\text{ClCa}_2$  12.5 mM (6.06 gr)
- pH 7.5

**Leucina aminopeptidasa (Maraux et al., 1975)**

- 1.- Preparar 4 tubos eppendorf por cada muestra
- 2.- Agregar 980  $\mu$ l del sustrato L-leucin-P-nitroanilida diluido en buffer fosfato de sodio 50mM pH 7.2
- 3.- Agregar 20  $\mu$ l de extracto enzimático (No colocarle a los controles)
- 4.- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente (25°C)
- 5.- Detener la reacción con 250  $\mu$ l de ácido acético
- 6.- Agregar extracto al testigo o control
- 7.- Leer la absorbancia a 410 nm en el espectrofotómetro

**Preparación del sustrato L-leucin-P-nitroanilida**

- 1.- Pesar el sustrato en tubo eppendorf:
  - 0.025 g – 100 ml
  - 0.0038 g – 15 ml
  - 0.0025 g – 10 ml
- 2.- Mezclar con 200  $\mu$ l de DMSO (Dimethyl sulfoxide, ACS Reagent) en el tubo eppendorf para que se diluya
- 2.- Agitar el tubo eppendorf en el vortex
- 3.- Aforar a 10 ml con el buffer fosfato de sodio pH 7.2 y agitar con el agitador magnético



Preparación del buffer fosfato de sodio pH 7.2

- 1.- Para 100 ml de buffer, pesar 0.780 g de fosfato de sodio
- 2.- Ajustar a pH 7.2 con HCl
- 3.- Aforar a 100 ml con agua destilada en un matraz volumétrico

**Tripsina sustrato BAPNA (Erlanger et al., 1976)**

- 1.- Agregar en 6 tubos eppendorf, 990  $\mu$ l de sustrato BAPNA (N $\alpha$ -Benzoyl- DL-arginine-4 nitroanilide hydrochloride) 3.5 mM diluido en buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8
- 2.- 10  $\mu$ l de extracto enzimático (No agregar a los dos controles)
- 3.- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (25°C)
- 4.- Agregar 250  $\mu$ l de ácido acético 30% para detener la reacción
- 5.- Agregar extracto al control
- 6.- Leer en el espectrofotómetro a 410 nm con celda de cuarzo

NOTA: El buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8 debe estar a temperatura ambiente o a la temperatura a la que se preparó porque puede tomar un color blanco cuando se prepara y no sirve.

**Preparación del sustrato BAPNA**

- 1.- Para preparar 10 ml de sustrato pesar 0.015 g de BAPNA en un tubo eppendorf
- 2.- Agregar 200  $\mu$ l de DMSO (Dimethyl sulfoxide)
- 3.- Aforar a 10 ml con buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8

Preparación de buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 8

1.- Para 100 ml de buffer pesar en un vaso de precipitado Tris-HCl:

- 1.21 g – 100 mM – 100 ml
- 2.42 g – 100 mM – 200 ml

2.- Pesar CaCl<sub>2</sub>:

- 147 g – 100 mM – 1000 ml
- 0.147 g – 10 mM – 100 ml
- 0.294 g – 10 mM – 200 ml

3.- Mezclar los dos reactivos con el agitador magnético en 150 ml de agua destilada

4.- Ajustar a pH 8

5.- Colocar la mezcla en un matraz volumétrico de 200 ml y aforar

**Quimotripsina con sustrato SAPNA (Del mar et al., 1961)**

- 1.- Agregar en 6 tubos eppendorf, 980  $\mu$ l de sustrato SAPNA
- 2.- Agregar 20  $\mu$ l de extracto enzimático (No agregar a los dos controles)
- 3.- Incubar de 3-5 minutos a 25°C
- 4.- Agregar 250  $\mu$ l de ácido acético 30% para detener la reacción
- 5.- Agregar extracto a los controles
- 6.- Leer en el espectrofotómetro a 405 nm

**Preparación del sustrato BAPNA**

- Para 10 ml de sustrato pesar 0.0218 g de sustrato SAPNA
- Disolver en 200  $\mu$ l de DMSO (Dimethyl sulfoxide, ACS Reagent)
- Aforar a 10 ml con buffer Tris-HCl 100mM + CaCl<sub>2</sub> 100 mM con pH 7.8

**Preparación de buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 100 mM pH 7.8**

- Para 100 ml de buffer pesar 1.21 g de Tris-HCl (100 mM)
- Pesar 1.47 g de CaCl<sub>2</sub> (100 mM)
- Mezclar los dos reactivos con 80 ml de agua destilada en un vaso de precipitado de 100 ml Ajustar el pH a 7.8 Aforar a 100 ml con agua destilada en un matraz volumétrico

**Proteasa alcalina (Sarath et al., 1989)**

- 1.- Agregar en 6 tubos eppendorf, 500  $\mu$ l de caseína (1%)
- 2.- Agregar 500  $\mu$ l de tampón Tris- HCl 100 mM +  $\text{CaCl}_2$  10 mM a pH 9
- 3.- Agregar 10  $\mu$ l de extracto enzimático (No agregar a los dos controles)
- 4.- Incubar a 37°C por 30 minutos
- 5.- Agregar 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 20% para detener la reacción
- 6.- Agregar extracto a los controles
- 7.- Dejar reposar las muestras por 30 minutos a 4 °C para que precipiten las proteínas
- 8.- Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C
- 9.- Medir la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a 366 nm

**Preparación de buffer Tris-HCl 100 mM +  $\text{CaCl}_2$  10 mM pH 9**

- Para 100 ml de buffer pesar 1.21 g de Tris-HCl y 0.147 g de  $\text{CaCl}_2$
- Mezclar ambos reactivos en un vaso de precipitado y agregar 80 ml de agua destilada
- Ajustar el pH a 9
- Aforar a 100 ml con agua destilada

Preparación de caseína 1% con buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 9

- Para 10 ml pesar 0.1 g de caseína
- Agregar en un vaso de precipitado 7 ml del buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 9
- Mezclar ambos reactivos
- Ajustar el pH a 9
- Aforar a 10 ml con buffer Tris-HCl 100 mM + CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 9

**$\alpha$ -Amilasa (Robyt y Whelan, 1968)**

- 1.- En 7 tubos de ensayo agregar 0.125 ml de tampón fosfato de sodio y citrato de sodio 0.1 M + NaCl 0.05 M a pH 7.5 (4 muestras, 1 blanco y 2 controles)
- 2.- Agregar 0.125 ml de solución de almidón al 2%
- 3.- Agregar 10  $\mu$ l de extracto enzimático (No agregar a los dos controles), al blanco se le agregan 10  $\mu$ l de agua destilada
- 4.- Incubar a 30°C por 15 minutos
- 5.- Agregar 10  $\mu$ l de extracto enzimático a los controles
- 6.- Agregar 0.3 ml del reactivo 4 Somogy-Nelson
- 7.- Hervir las muestras durante 20 minutos “exactos”
- 8.- Dejar enfriar a temperatura ambiente
- 9.- Añadir 0.3 ml del reactivo 3 Somogy-Nelson
- 10.- Agitar en el vortex hasta que no se desprenda CO<sub>2</sub> (sin burbujas)
- 11.- Añadir 3.33 ml de agua destilada y agitar
- 12.- Dejar reposar 5-10 minutos
- 8.- Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm

**Preparación del reactivo 1 (100 ml)**

- En un vaso de precipitado agregar 2.5 g de carbonato de sodio anhidro
- 2.5 g de tartrato sódico potásico
- 2 g de bicarbonato sódico
- 20 gr de sulfato sódico anhidro
- Agregar 8 ml de agua destilada y agitar hasta disolver
- Aforar a 100 ml con agua destilada

- Filtrar si es necesario
- Conservar a 37°C

#### Preparación del reactivo 2 (50 ml)

- En un vaso de precipitado agregar 7.5 g de sulfato de cobre pentahidratado
- Agregar 50 ml de agua destilada
- Agregar 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado
- Agitar y conservar a temperatura ambiente

#### Preparación del reactivo 3 (100 ml)

- En un vaso de precipitado agregar 5 g de molibdato amónico
- Agregar 90 ml de agua destilada
- Agregar 4.2 ml de ácido sulfúrico concentrado
- Agitar para mezclar completamente
- En otro vaso de precipitado agregar 0.6 g de arseniato sódico heptahidratado
- Agregar 5 ml de agua destilada
- Agitar para mezclar completamente
- Añadir lentamente a la solución anterior
- Completar la solución a 100 ml y calentar en baño de agua caliente a 37°C
- Conservar a 37°C



#### Preparación del reactivo 4

- Preparar justo antes de usar con :
- 2 ml del reactivo 2
- 50 ml del reactivo 1

#### Tampón fosfato de sodio dibásico y citrato de sodio monohidratado 0.1 M + NaCl 0.05

##### M a pH 7.5

- Para 100 ml de buffer pesar en un vaso de precipitado 2.6807 g de fosfato de sodio dibásico (0.1 M)
- Pesar 2.1411 g de citrato de sodio monohidratado (0.1 M)
- Mezclar los dos reactivos en 80 ml de agua destilada
- Ajustar a 7.5 el pH
- Aforar a 100 ml con agua destilada

#### Solución de almidón soluble al 2%

- Hervir 150 ml de agua destilada
- Pesar 2 gr de almidón y suspenderlos en 4 ml de metanol
- Apartar el agua del fuego y añadir el almidón
- Dejar hirviendo por 20 minutos (evitar que se seque)
- Aforar a 100 ml con agua destilada