



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
(BIOLOGÍA MARINA)

Diseño y evaluación de dietas a base de harina de canola para la alimentación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869): Efecto en crecimiento, digestibilidad y estado de salud.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
BIOL. LAURA PATRICIA OLMEDA GUERRERO

TUTOR:
DRA. CRISANTEMA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DRA. MARTHA GABRIELA GAXIOLA CORTÉS
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN, FACULTAD
DE CIENCIAS (SISAL, YUCATAN)
DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DRA. MARÍA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** a través del **Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (PCML)**, por brindarme la oportunidad de lograr un nuevo nivel académico. Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico otorgado, el cual permitió mi preparación académica.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental**, por permitirme hacer uso libre de sus instalaciones para la realización de la parte experimental de este proyecto de tesis.

Al **Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación (FORDECYT)** proyecto No. 147325 denominado "Desarrollo de la tecnología de engorda de pargo en jaulas flotantes: Una alternativa productiva para las costas del noroeste mexicano" y al **proyecto del Fondo sectorial-CICESE**, con clave SAGARPA-2011-164673 denominado: "Desarrollo de Alimentos Formulados nutricionalmente eficientes para el cultivo rentable de peces", ambos proyectos a cargo de la Dra. Crisantema Hernández González, gracias por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Crisantema Hernández González** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por dirigir con sus conocimientos y experiencia mi proyecto de tesis, también por darme la oportunidad de seguir aprendiendo, por sus consejos, ayuda y dedicación en todo momento, quedo especialmente agradecida con usted por todo el apoyo brindado durante la realización de mi servicio social, tesis de licenciatura y ahora tesis de maestría, lo cual ayudo a mi formación como bióloga y ahora como maestra en ciencias, gracias por las herramientas brindadas durante mi formación académica.

A los miembros de mi comité: **Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés, Dra. María Cristina Chávez Sánchez, Dr. Carlos Alfonso Álvarez González** y al **Dr. Luis Héctor Hernández Hernández**, por sus observaciones y recomendaciones que permitieron el enriquecimiento de este trabajo.

Al Biol. **Alan Jesús Humberto González Santos** por sus consejos, amistad y apoyo técnico durante el desarrollo del bioensayo. A la Biol. **Blanca Teresa de Jesús González**

Rodríguez por sus consejos, apoyo técnico y capacitación en los análisis químicos proximales. A la **Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez** por todo el apoyo brindado en la cuantificación de óxido de cromo, determinación de aminoácidos, análisis de química sanguínea y determinación de enzimas. **Al M. en C. Asahel Benítez Hernández** por su ayuda y capacitación en la determinación de enzimas digestivas.

A la **Dra. María Cristina Chávez Sánchez** y la **M. en C. Selene María Abad Rosales** por sus enseñanzas, apoyo y capacitación teórico-práctica en el análisis histológico. Gracias por compartir sus conocimientos a favor de concluir con la interpretación de resultados.

A la **Téc. Ma. Clara Ramírez Jáuregui** por el apoyo en la búsqueda de bibliografía necesaria para el desarrollo de la tesis. A la **Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, Margarita Cordero, Natalia Medina, Diana Juárez, Guadalupe Godoy, Gabriela Almaraz y Chantal Ruiz**, por el apoyo en todos los trámites correspondientes al posgrado.

A la **IBQ. Nancy Peraza Oropeza** y al **IBQ. Ramón Márquez Maldonado** por el apoyo técnico prestado en el desarrollo del bioensayo. A **Julissa Soriano** y **Rafael Águila** por su apoyo en la metodología de masaje abdominal del pargo.

A mis profesores: **Dr. Federico Páez, Dr. Carlos Green, Dr. Yovani Montaña, Dr. Mariano Sánchez, Dra. Cristina Chávez, M. en C. Selene abad** y el equipo encabezado por la **Dra. Gloria Vilaclara Fatjó**, que compartieron conmigo sus conocimientos.

A amigos y compañeros del CIAD: **Alan González, Nancy Peraza, Álvaro Ramírez, Gabriel Quintero, Ramón Rendón, Alejandra Marcos, Margarita Hernández, Juan Sánchez, Ramón Márquez, Emanuel Sánchez, Emyr Peña, Cinthia Lizárraga, Diego Osuna, Daniela Contreras, Maribel Rodríguez, Lorena Osuna, Carlos Hernández, Erika Sánchez, Asahel Benítez, Denise Márquez.**

Al **M. en C. Emyr Saúl Peña Marín**, por el apoyo prestado en la disección de peces, pero sobre todo por compartir conocimientos a favor de concluir con la interpretación de datos.

A mis amigos y compañeros de posgrado, **Ramón, Marcelita, Joel, Alejandra, José Luis, Omar, Mario, Tito, Itzel, Ada, Marce del corral, Misha, Lawren, Erick**, por compartir momentos agradables durante el posgrado, a todos GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios

Gracias por llenarme de bendiciones hoy y siempre.

A mis padres

Gracias Elizabeth y Jesús por ser unos padres ejemplares, porque a ustedes les debo lo que soy y a pesar de que hemos pasado por momentos difíciles siempre nos han sacado adelante, gracias por darme una buena educación y por formarme como ser humano inculcándome valores, lo cual les agradezco de corazón.

A mis hermanos

Porque a pesar de las adversidades han sabido salir adelante, gracias por ser muy buenos hermanos y porque si hay alguien que sabe que se pueden hacer las cosas, esos son ustedes, los quiero Jessica, Roxana y Manuelito.

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Situación actual de cultivo del pargo flamenco	4
2.2. El uso de la harina de canola (HCA) en la alimentación de peces	4
2.3. Evaluación del crecimiento, digestibilidad de nutrientes y estado de salud de peces, utilizando subproductos de canola.....	8
III. JUSTIFICACIÓN ACÁDEMICA	12
IV. HIPÓTESIS	13
V. OBJETIVOS	13
5.1. Objetivo general.....	13
5.2. Objetivos específicos	13
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	14
6.1. Análisis proximal	14
6.1.1. Análisis de proteína (AOAC 4.2.08)	14
6.1.2. Análisis de lípidos (AOAC 4.5.05)	14
6.1.3. Análisis de cenizas (AOAC 32.1.05).....	14
6.1.4. Análisis de humedad (AOAC 4.1.06).....	14
6.1.5. Análisis de fibra (AOAC 962.09).....	14
6.2. Perfil de aminoácidos	15
6.3. Formulación y elaboración de dietas experimentales	15
6.4. Sitio de realización del bioensayo.....	18
6.5. Evaluación biológica, determinación de la digestibilidad <i>in vivo</i> y estado de salud del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i>	19
6.5.1. Origen de los organismos y sistema experimental	19
6.5.2. Diseño experimental (crecimiento)	19

6.5.3. Parámetros fisicoquímicos del sistema experimental	20
6.5.4. Evaluación biológica	20
6.5.5. Diseño experimental (digestibilidad).....	21
6.5.6. Digestibilidad	21
6.5.7. Análisis del estado de salud de los peces	23
6.5.7.1. Análisis hematológicos.....	23
6.5.7.1.1. Hematocrito	24
6.5.7.1.2. Proteína plasmática	24
6.5.7.1.3. Hemoglobina	25
6.5.7.1.4. Glucosa.....	25
6.5.7.1.5. Triglicéridos	26
6.5.7.2. Análisis de histología normal y patológica de peces	26
6.6.- Análisis estadístico	28
VII. RESULTADOS	28
7.1. Análisis proximal del cadáver del pargo	28
7.2. Evaluación biológica.....	29
7.2.1. Ganancia en peso (GP)	29
7.2.2. Consumo de alimento individual (CAI).....	30
7.2.3. Tasa de crecimiento específica (TCE)	30
7.2.4. Tasa de conversión alimenticia (TCA)	30
7.2.5. Supervivencia (S)	31
7.2.6. Índice de eficiencia proteica (IEP)	31
7.3. Análisis hematológicos	31
7.3.1. Hematocrito.....	32
7.3.2. Proteína	32

7.3.3. Hemoglobina	32
7.3.4. Glucosa	32
7.3.5. Triglicéridos	32
7.4. Análisis histológicos	33
7.4.1. Hígado.....	33
7.4.2. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio (DTC) del hígado	34
7.4.3. Glándula tiroides	35
7.4.4. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio (DTC) de la glándula tiroides	38
7.5. Digestibilidad in vivo	39
7.5.1. Coeficiente de digestibilidad aparente de proteína (CDA-P), lípidos (CDA-L) y materia seca (CDA-MS)	39
VIII. DISCUSIÓN	40
IX. CONCLUSIONES	48
X. REFERENCIAS	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores antinutricionales de la harina de canola (¹ Newkirk <i>et al.</i> , 2003a).....	7
Tabla 2. Análisis próximoal materias primas (valores promedio ± desviación estándar n=3).	15
Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las materias primas utilizadas en la elaboración de la dieta control y las dietas experimentales.	16
Tabla 4. Composición y análisis próximoal de las dietas experimentales (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45) utilizadas en la alimentación de juveniles de pargo flamenco.	17
Tabla 5. Índices biológicos de crecimiento calculados al término del experimento, en juveniles de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i>	20
Tabla 6. Porcentaje de óxido de cromo obtenido en dietas experimentales y heces.....	22
Tabla 7. Composición próximoal corporal en base húmeda de pargo flamenco.	28
Tabla 8. Parámetros de evaluación biológica de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> alimentado con la dieta control y las dietas experimentales, obtenidos después de 10 semanas de experimentación.....	29
Tabla 9. Parámetros hematológicos de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> alimentado durante un periodo de 75 días.	31
Tabla 10. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio en los tejidos (DTC), calculado para el tejido hepático de <i>Lutjanus guttatus</i> de una dieta control D-HCA 0 y tres dietas experimentales D-HCA 15, DHCA 30, D-HCA 45.	34
Tabla 11. Área de los folículos de la glándula tiroides del pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i>	36
Tabla 12. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio en los tejidos (DTC), calculado para la glándula tiroides de pargo alimentado con cuatro dietas experimentales D- HCA 0, D-HCA 15, DHCA 30 y D-HCA 45.	38
Tabla 13. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA's) obtenidos para pargo flamenco alimentados con la dieta control y experimentales.	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema experimental.....	19
Figura 2. Método de stripping o masaje abdominal.....	21
Figura 3. Ganancia en peso semanal del pargo flamenco alimentado con la dieta control y experimentales durante 75 días de experimento. Los valores son la media \pm SD, n=3.	30
Figura 4. Corte transversal del hígado de juveniles de pargo alimentados con las dietas: A) D-HCA 0, B) D-HCA 15, C) D-HCA 30 y D) D-HCA 45, en las cuales se observan hepatocitos vacuolados lo que indica degeneración grasa en estas secciones pues se ha perdido la estructura normal de las células, rompiéndose en muchos casos la membrana celular. Se observa un aumento en el tamaño y número de vacuolas lipídicas conforme se aumenta el porcentaje de canola. H&E. barra 50 μ m.....	33
Figura 5. Corte transversal de la glándula tiroides de juveniles de pargo alimentados con los tratamientos: A) D-HCA 0, B) D-HCA 15, C) D-HCA 30 y D) D-HCA 45. H&E. barra 50 μ m.....	35
Figura 6. Corte transversal de un folículo tiroideo de los juveniles de pargo flamenco <i>Lutjanus guttatus</i> utilizados al inicio del experimento. H&E. barra 20 μ m.	36
Figura 7. Corte transversal de cuatro folículos tiroideos de pargo alimentados con los tratamientos: A) D-HCA 0, B) D-HCA 15, C) D-HCA 30 y D) D-HCA 45. H&E. barra 20 μ m.....	37

RESUMEN

El desarrollo de alimentos artificiales para la alimentación del pargo *Lutjanus guttatus* en la etapa de engorda, requiere del conocimiento de la capacidad digestiva que presenta el pez, con el objetivo de mejorar la eficiencia en la alimentación y por lo tanto el crecimiento del organismo. Sin embargo, la utilización de ingredientes alternos a la harina de pescado puede traer consecuencias negativas que se reflejan en el estado de salud del organismo, lo cual afecta la calidad alimentaria del producto. En el presente estudio se evaluó el potencial de la harina de canola (HCA) como sustituto parcial de la harina de pescado (HP), para ello se elaboraron cuatro dietas isoproteicas 49% e isolipídicas 12%. Una a base de HP como control (D-HCA 0) y tres dietas con niveles de 15%, 30% y 45% de inclusión de proteína de HCA en reemplazo de la HP (D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45). Las cuatro dietas se evaluaron por triplicado en términos de crecimiento, estado de salud y digestibilidad aparente *in vivo*, para lo cual se utilizó un sistema experimental que constó de 12 tanques negros de fibra de vidrio con capacidad de 400 L, se colocaron 15 peces por tanque, con un peso promedio de 37 g para la determinación del crecimiento y estado de salud y para el ensayo de digestibilidad mediante la técnica de masaje abdominal se utilizaron organismos de 160 g. La alimentación fue a saciedad tres veces/día durante 16 semanas. Los valores promedio de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto oscilaron en 30.25°C, 33.2‰ y 5.25mg l⁻¹ respectivamente. Los mejores resultados de tasa de crecimiento específica (TCE % día⁻¹), índice de eficiencia proteica (IEP) y la tasa de conversión alimenticia (TCA) lo presentaron los peces alimentados con la dieta D-HCA 0 (1.70 % día⁻¹, 1.73, 1.17 respectivamente), sin embargo, no presentaron diferencias estadísticas con las dietas D-HCA 15 y D-HCA 30, mientras que la supervivencia no se mostró afectada por ningún tratamiento. El análisis de química sanguínea arrojó que no se presentaron diferencias entre tratamientos para los parámetros de hematocrito, proteína, hemoglobina, glucosa y triglicéridos. El análisis histológico demostró que el mayor valor medio de evaluación (MAV) para indicar la degeneración lipídica del hígado lo presentaron los peces alimentados con la D-HCA 0, D-HCA 30 y D-HCA 45 no resultando diferente a la D-HCA 15, en todos los tratamientos se observó que las lesiones del tejido fueron focales, para el grado de cambio del tejido (DTC) la D-HCA 45 obtuvo el valor más alto, sin embargo no fue diferente a la D-HCA 0, D-HCA 15 y D-HCA 30, por lo que se clasificó al hígado como funcionalmente normal. Para la glándula tiroidea el MAV y DTC indicaron que no hubo alteraciones de los peces alimentados con la D-HCA 0 y D-HCA 15, a diferencia de los que consumieron las dietas con inclusiones de 30% y 45% de HCA los cuales si mostraron afectación. Las alteraciones observadas con estas dietas indicaron hiperplasia folicular e hiperplasia epitelial, las cuales de acuerdo con el MAV obtenido fueron focales, aunque los valores de DTC consideraron al órgano como moderadamente dañado. El valor más alto de coeficiente de digestibilidad aparente de proteína y lípidos fue para la D-HCA 0, la cual no resultó diferente a la D-HCA 15 y D-HCA 30. Este estudio indica que la proteína de HCA podría reemplazar hasta un 30% a la proteína de la HP, sin afectar el crecimiento y la digestibilidad aparente de nutrientes y que altas inclusiones de HCA no afecta a los parámetros fisiológicos de esta especie en materia de bienestar animal. Sin embargo, el análisis histológico indicó que niveles de inclusión del 30 y 45% de HCA no resultaron apropiados, pues generan efectos perjudiciales en el tejido tiroideo del pez,

que a largo plazo podrían afectar la salud del pargo, por lo que el 15 % es el nivel óptimo de inclusión de HCA para reemplazar a la HP en la dieta de *Lutjanus guttatus*.

ABSTRACT

The development of artificial food to feed the snapper *Lutjanus guttatus* in the growing stage, requires knowledge of the digestive capacity having the fish, with the objective of improve efficiency in food and thus the growth of the organism. However, the use of alternative ingredients to fishmeal can cause negative consequences that are reflected in the health of the fish, which affects food quality. In this study the potential of canola meal (HCA) as a partial substitute for fishmeal (HP) was evaluated, for this four isocaloric diets were formulated to contain 49% protein and 12% lipid. A diet based on fishmeal as a control (D-HCA 0) and three diets with protein inclusion levels of 15%, 30% and 45% of canola meal as a substitute for fishmeal (D-HCA 15, HCA D-30, D-HCA 45). The four diets were tested in triplicate in terms of growth, health and apparent digestibility of snapper, for which an experimental system compound 12 black fiberglass tank with a capacity of 400 L was used, 15 fish were placed in each tank, with an average weight of 37 g for determining the growth and health status and on the apparent digestibility bioassay by abdominal massage technique, fish of 160 g were used. The food was to satiation three times daily for 16 weeks. The average values of temperature, salinity and dissolved oxygen ranged in 30.25 °C, 33.2 ‰ and 5.25 mg l⁻¹ respectively. The best results of specific growth rate (% day⁻¹ TCE), protein efficiency index (IEP) and feed conversion ratio (TCA) were presented by the fish fed diet D-HCA 0 (1.70% day⁻¹, 1.73, 1.17 respectively), but presented no statistical difference with diet D-HCA 15 and D-HCA 30, whereas the survival rate was not affected by any treatment. For analysis of blood chemistry no were presented differences between treatments for the parameters of hematocrit, protein, hemoglobin, glucose and triglycerides. Histological analysis showed that the higher mean assessment value (MAV) for indicating lipid degeneration of liver, which had the fish fed with the D-HCA 0, D-HCA 30 and D-HCA 45 not resulting different from the D-HCA 15, in all treatments was observed that tissue lesions were focal, to the degree change tissue (DTC) the D-HCA 45 had the highest value, however was not different from the D-HCA 0, D-HCA 15 and D-HCA 30, so that the liver was classified as functionally normal. In the thyroid gland the MAV and DTC did not indicate pathological changes of fish fed with the diets D-HCA 0 and D-HCA 15, unlike fish that consumed diets with inclusions of 30% and 45% of HCA, which did show involvement of tissue. The changes observed with these diets indicated follicular hyperplasia and epithelial hyperplasia, which according to the MAV obtained were only focal, although DTC values considered as moderately damaged organ. The highest value of apparent digestibility coefficient of protein and lipids was for D-HCA 0, which resulted not different from the D- HCA 15 and D-HCA 30. This study indicate that HCA protein could replace up to 30% to the HP protein, without affecting the growth and the apparent digestibility of nutrients of snapper and high inclusions of this ingredient does not affect physiological parameters of snapper in animal welfare. However, histological analysis indicated that inclusions of 30 and 45% of HCA were not appropriate, because they create adverse effects on the thyroid tissue of the fish, in the long term could severely affect the health of snapper, so that 15% is the optimum level of inclusion of HCA to replace HP in the diet of *Lutjanus guttatus*.

I. INTRODUCCIÓN

La investigación dirigida al cultivo de especies marinas en México es reciente, actualmente existe la necesidad de diversificar la maricultura, debido a que en los últimos años existe una creciente demanda de alimentos, lo cual está provocando la sobreexplotación de recursos pesqueros como la sardina, atún, barrilete, pargo, corvina etc., por ello la industria solicita investigaciones que apoyen en la diversificación con otras especies con potencial de cultivo. De esta forma instituciones de todo el país se han sumado al desarrollo de la tecnología para producir peces marinos, entre las que destaca el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* por su elevado valor en el mercado y alta demanda comercial.

Anteriormente, en la costa mexicana del océano Pacífico, los juveniles de pargo flamenco eran capturados del medio ambiente y engordados en jaulas flotantes hasta que alcanzaban la talla comercial; sin embargo, hoy en día se han desarrollado con éxito las tecnologías para su cultivo, asimismo existen operaciones a pequeña escala para su cultivo en jaulas en algunos estados de la república mexicana. Es así que aunque se tienen estos avances, no se contaba con un alimento comercial específico, por ello los primeros estudios en el desarrollo de alimentos balanceados se enfocaron en conocer sus requerimientos nutricionales, los cuales indican de acuerdo con Abdo-de la Parra *et al.* (2010), que son peces carnívoros que requieren de dietas a base de harina de pescado con 45-50% de proteína y 9-12% lípidos para un buen crecimiento.

A pesar de los avances en maricultura, se presentan limitaciones en el uso de la harina de pescado (HP) como fuente proteica para la elaboración de alimento balanceado para las especies de cultivo, ya que de acuerdo con la OCDE/FAO, (2013) la porción de peces silvestres utilizados para producir harina y aceite de pescado se reducirá a alrededor de 16% al final del periodo 2013-2022. Mencionan que la demanda sostenida y los altos precios de la HP, junto con la reducción de la disponibilidad de la materia prima a partir de pescado entero y el creciente número de productos de pescado con valor agregado para consumo humano, darán lugar a una mayor cantidad de residuos que se utilizan en la fabricación de HP, la cual representará el 49% de la producción mundial en el 2022. Esto puede afectar la

composición y la calidad de la HP resultante, con más minerales y menos proteínas, lo que obstaculiza su mayor uso en forrajes.

El rápido crecimiento de la producción en acuicultura y las limitaciones en la harina de pescado ha obligado al sector acuícola a la búsqueda de fuentes de proteínas como sustitutos de la HP en alimentos para acuicultura. Una opción importante para el suministro continuo de nutrientes de alta calidad se basa en el uso de materias primas vegetales (Tusche *et al.*, 2012). Entre las alternativas vegetales disponibles comercialmente se encuentran el gluten de trigo, la soya y la canola siendo esta última poseedora de un perfil de aminoácidos (Enami, 2011; Wanasundara, 2011), similar al de harina de pescado (Higgs *et al.*, 1982; Mwachireya *et al.*, 1999). Por lo tanto, los productos de canola se utilizan cada vez más como ingrediente para la producción de alimentos para peces.

Con respecto a la producción de semillas de oleaginosas de acuerdo con Maluenda (2011), la producción de canola representa el 13% del conjunto de las oleaginosas en el mundo, con tendencia a ir aumentando ligeramente año tras año, con unas proyecciones de superar en 2013/14 los 63 millones de toneladas de acuerdo con el CIC (Consejo internacional de Cereales) y en casi 65 millones según el FAS-USDA (Foering Agricultural Service). La canola se sitúa en el segundo lugar con el 13% del sector de oleaginosas, sólo superado por el sector soya con una participación del 58% de la producción mundial prevista para la campaña 2013/14.

La harina de canola (HCA) se ha probado como fuente de proteína en la dieta de varias especies de peces, como la carpa *Cyprinus carpio* (Dabrowski y Kolowska, 1981), el salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha* (Higgs *et al.*, 1983), la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Davies *et al.*, 1990), la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Hilton y Slinger, 1986; Gomes *et al.*, 1993; Thiessen *et al.*, 2003; Yiğit *et al.*, 2012), el bagre de canal *Ictalurus punctatus* (Webster *et al.*, 1997), la lobina japonesa *Lateolabrax japonicus* (Cheng *et al.*, 2010), el rodaballo *Psetta maxima* (Nagel *et al.*, 2012) y la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idellus* (Tan *et al.*, 2013). Sin embargo, la calidad nutricional de la HCA es inferior a la de la HP y depende en gran medida de su nivel de proteína y factores

antinutricionales (Mawson *et al.*, 1995). Por lo tanto, la utilización de la HCA como fuente de proteína alternativa de la harina de pescado en la nutrición de los peces es limitada.

Es bien sabido que la HCA ofrece resultados positivos en cuanto a digestibilidad de proteína y lípidos en la alimentación del pargo (Hernández *et al.*, 2010), sin embargo se desconoce cuál es el nivel de reemplazo de la HP que se puede utilizar en la alimentación de esta especie sin que se vea afectado su crecimiento, digestibilidad y estado de salud. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, en este estudio se evaluó el potencial que posee la HCA como sustituto parcial de la HP en dietas para la alimentación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* y cuyo objetivo es determinar su crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia, digestibilidad de nutrientes y estado de salud, utilizando niveles de 0, 15, 30 y 45% de proteína de HCA en reemplazo de la proteína de la HP.

II. ANTECEDENTES

2.1. Situación actual de cultivo del pargo flamenco

Lutjanus guttatus es un pez marino que alcanza un valor en el mercado de aproximadamente 7-11 dólares americanos por kilogramo, es una especie importante en la pesca artesanal en México y tiene un alto potencial para cultivo a escala comercial. En la actualidad se han desarrollado con éxito las tecnologías para su cultivo y la reproducción en cautiverio y la producción controlada de larvas y juveniles (Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchère, 2011; Alvarez-Lajonchère *et al.*, 2012), asimismo existen operaciones a pequeña escala para su cultivo en jaulas flotantes (García *et al.*, 2010).

Años atrás no existía un alimento balanceado específicamente formulado para la alimentación del pargo flamenco, por lo que parte de las investigaciones en años recientes, se enfocaron en la elaboración de formulaciones prácticas y costeables de alimentos para el cultivo a escala comercial de esta especie (García *et al.*, 2010). Hoy en día existe un alimento balanceado para la pre-engorda y engorda de este pez el cual aún no se comercializa, por ello se sigue haciendo necesaria la investigación de ingredientes de origen marino, pecuario y vegetal como fuente de proteína y lípidos en alimentos para esta especie (Hernández *et al.*, 2010; Silva-Carrillo *et al.*, 2012; Sánchez-Rodríguez, 2013) que continúen disminuyendo los costos del alimento balanceado sin que esto afecte el crecimiento y la salud del organismo.

2.2. El uso de la harina de canola (HCA) en la alimentación de peces

Los subproductos de semillas oleaginosas son las proteínas vegetales más utilizadas en la alimentación animal, por su alto contenido de proteína, amplia disponibilidad y su costo generalmente menor al de la harina de pescado (Taylor y Berk, 1981). El Raps o canola (*Brassica spp.*) es mayormente una fuente de aceite (40-45%), pero la harina de canola (HCA) obtenida después de la extracción del aceite es una interesante fuente de proteína, con un contenido proteico de entre 32% y 45% (Burel *et al.*, 2000a). A continuación se enlistan algunos estudios que se han realizado para probar el efecto que tiene esta materia prima en la alimentación de peces.

Se ha investigado el uso de la HCA como alimento en vertebrados superiores, observándose que durante los procesos de extracción de aceite los efectos antinutricionales de la enzima mirosinasa y los glucosinolatos se pueden reducir significativamente (Dabrowski *et al.*, 1982). Cuando se usó HCA en dietas para carpa *Cyprinus carpio* los resultados mostraron que el material estaba bien balanceado en términos de proteína y contenido de energía para ésta especie, sin embargo en dietas con altos niveles de glucosinolatos (GLS) se incrementó el nivel de lípidos en el cuerpo y se observó reducción del crecimiento. En este trabajo, se usaron harinas de canola que contenían diferentes niveles de GLS y con adición de fósforo para reducir el problema de los fitatos. Los resultados mostraron que se puede sustituir el 50% de la harina de pescado por harina de canola. Se observó que el efecto en carpas depende de la inactivación de la enzima mirosinasa (Dabrowski y Kolowska, 1981).

Niveles de inclusión del 25% de proteína de harina de canola (30-32% materia seca) en la dieta de salmón chinook *Onchorhynchus tshawytscha* causaron reducción significativa del crecimiento, hipertrofia e hiperplasia de la tiroides, incremento en la grasa corporal y reducción en la utilización alimenticia, sin embargo se demostró que la canola se puede incluir hasta un 13 a 16% de proteína de la dieta (Higgs *et al.*, 1982). Posteriormente, en un trabajo con la misma especie de salmón, se concluyó que la HCA puede comprender hasta el 25% de proteínas de la dieta sin influir negativamente en la calidad de la proteína del alimento, con la condición de que el contenido de glucosinolatos en la dieta esté por debajo de 2,65 $\mu\text{moles/g}$ (300 $\mu\text{g/g}$ como 3-butenil isotiocianato), sin embargo las dietas se deben suplementar con 3,5,3-triyodo-L-tironina, para compensar la pérdida de la función tiroidea (Higgs *et al.*, 1983).

Como se mencionó anteriormente niveles de inclusión del 25% de proteína de harina de canola (HCA) ofreció resultados favorables en dietas para salmón chinook *Oncorhynchus tshawytscha*, por el contrario, Abdou Dade *et al.* (1990) no encontraron ninguna diferencia con el 8% de inclusión de HCA en trucha y Davies *et al.* (1990) observaron reducción del crecimiento de la tilapia mosambica con inclusiones superiores al 15% de esta harina, así mismo Gomes *et al.* (1993) mostraron que la canola puede ser utilizada en dietas para trucha arcoíris a niveles de hasta el 20% de inclusión sin mostrar efectos negativos sobre el

crecimiento. De acuerdo con Abdou Dade *et al.* (1990) las variaciones en los resultados se relacionan con el tipo de semilla y su contenido de antinutrientes, Higgs *et al.* (1982) y Hardy y Sullivan (1983) mencionaron que los peces pequeños son más susceptibles al efecto de sus antinutrientes.

Debido a la presencia de factores antinutricionales en la canola, la calidad de esta harina ha sido mejorada en los últimos años con selección genética de nuevas variedades *Brassica napus* y *Brassica campestris*, sin ácido erusico y con bajo contenido de GLS (Mwachireya *et al.*, 1999). Además tratamientos tecnológicos como descascarado, altas temperaturas y solventes orgánicos durante la extracción del aceite, se traducen en una disminución del contenido de GLS, fibra, sinapina y taninos (Burel *et al.* 2000b). Satoh *et al.*, (1998) señalan que el concentrado proteico de canola (CPC) y el CPC sin ácido fitico, puede ser incluido hasta en un 39% de proteína en la dieta de *Oncorhynchus mykiss*. Además Kissil *et al.* (2000), señala que el reemplazo total de la HP por CPC en dietas para trucha, es factible cuando se añade un mejorador de palatabilidad para evitar la disminución del consumo.

Los estudios descritos anteriormente muestran que la harina de canola contiene niveles de proteína de calidad, adecuado perfil nutricional y que su inclusión en dietas para peces es bueno si se añaden mejoradores de la palatabilidad o cuando se utiliza este ingrediente con bajo contenido de glucosinolatos (GLS). Sin embargo, debido a que contiene altos niveles de fibra (30-40%) y factores antinutricionales como taninos, sinapina, ácido fitico (Thiessen *et al.*, 2003), estos pueden potencialmente disminuir la palatabilidad de la dieta, la ingesta, la absorción de nutrientes y por lo tanto el crecimiento de los organismos (Francis *et al.*, 2001).

En la Tabla 1 se presenta el perfil teórico de factores antinutricionales de la harina de canola, los cuales pueden disminuir el valor nutritivo del ingrediente, cuando no se considera que la fibra es un factor antinutricional, la mayoría de los peces de cultivo no consumen altos niveles de fibra en su dieta, la HCA comercial contiene un 10.6% de fibra cruda (Mwachireya *et al.*, 1999), la cual no puede ser empleada por los peces y puede disminuir el valor nutritivo de otros ingredientes de la dieta (Poston, 1986). Sin embargo, niveles de fibra en la dieta de menos de 8% no afectan el rendimiento del pez

en cuanto a crecimiento, lo que indica que inclusiones menores al 50% de HCA no tendrá ningún efecto negativo en el rendimiento del pez (Poston, 1986).

Tabla 1. Factores antinutricionales de la harina de canola (¹Newkirk *et al.*, 2003a).

Componente	Efecto en el organismo
Taninos 1.5%	Los taninos están presentes en la HCA de 1.5 a 3.0% y no tienen los mismos efectos negativos de mal sabor y digestibilidad de proteína, que en otras plantas.
Sinapina 1.0%	La HCA contiene 0.6-1.8% de sinapina, tradicionalmente se ha pensado que la sinapina da un sabor amargo y que puede afectar la ingestión del alimento, sin embargo estudios demuestran que el nivel que existe en la harina no afecta la ingestión, ni el crecimiento. Los extractos de sinapina purificada mejoran el metabolismo de la energía y la digestibilidad de proteína de la dieta, lo que sugiere puede no ser antinutriente, sino que puede tener efectos positivos en el aprovechamiento de nutrientes y la función intestinal.
Ácido fitico 3.3%	La harina de canola contiene 0.85% de fósforo unido al ácido fitico, lo que no es muy digerible para los animales monogástricos.
Glucosinolatos 7.2 $\mu\text{mol/g}^1$	Los GLS se descomponen en aglucones tóxicos, la mayoría inhibe la producción de hormonas tiroideas, pero algunos afectan el hígado, además su sabor amargo provoca menos ingestión del ingrediente. Se necesitan temperaturas mínimas de procesamiento a fin de desactivar la enzima mirosinasa que si no se destruye, va a descomponer a los GLS en sus metabolitos tóxicos en el aparato digestivo del pez. El proceso de trituración de la canola también puede causar degradación térmica de 30-70% de GLS en la harina

(Daun y Adolphe, 1997). Durante la cocción de la semilla, debe elevarse la temperatura a 80-90°C lo más rápidamente posible. La hidrólisis de GLS por mirosinasa catalizada continuará a medida que aumenta la temperatura hasta que se desactiva la enzima, de modo que una velocidad menor de calor favorece la hidrólisis de GLS.
--

2.3. Evaluación del crecimiento, digestibilidad de nutrientes y estado de salud de peces, utilizando subproductos de canola.

Los experimentos de alimentación de peces que involucran formulación de dietas, normalmente se han evaluado en términos de ganancia de peso y eficiencia alimenticia, sin embargo la medición de la digestibilidad de nutrientes es un aspecto importante en la evaluación de la efectividad de un insumo alimenticio, así mismo la utilización de métodos histológicos para evaluar el efecto del alimento en el hígado, intestino y glándula tiroides de peces son de vital importancia, debido a que al sustituir la harina y aceite de pescado por materias primas de origen vegetal se incrementa el contenido de fibra, carbohidratos, factores antinutricionales y otros compuestos pudiendo tener efectos negativos sobre el sistema digestivo y endócrino de los peces y por lo tanto en sus características externas y estado de salud. El hígado, el intestino y la glándula tiroides son los tejidos más importantes para la digestión, absorción y metabolismo de nutrientes de los alimentos, por lo tanto el monitoreo histológico, es el método ideal para la evaluación de los efectos que generan los antinutrientes que presentan algunos ingredientes vegetales.

Hardy y Sullivan (1983), evaluaron el efecto de la HCA sobre la ganancia en peso, eficiencia alimenticia y función tiroidea de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* y obtuvieron que el crecimiento y la tasa de conversión alimenticia no se vieron influenciadas por ningún tratamiento (0, 10, 15 y 20% harina de canola), mientras que la función tiroidea se mostró significativamente afectada por la inclusión de HCA. Los cambios histológicos de la glándula tiroides y los niveles de tiroxina y triyodotironina indicaron ajustes compensatorios en la función de la tiroides, que permite el crecimiento normal de los peces

alimentados con canola. Los posibles mecanismos de influencia de GLS en la dieta sobre la función tiroidea se discuten y se sugieren áreas para la investigación futura.

Davies *et al.* (1990), evaluaron el potencial de la HCA en la alimentación de juveniles de *Oreochromis mossambicus*. La dieta control contenía harina de pescado y soya como fuente de proteína, siendo parcialmente sustituida por HCA, al final se obtuvo que se puede incluir hasta un 15% a la HCA en la dieta de tilapia, mientras que niveles más altos de inclusión llevan a un pobre rendimiento en la alimentación. Los niveles de GLS en esta harina fueron medidos y se observaron sus efectos sobre la histología de la tiroides, mostrando que inclusiones elevadas erosionan las regiones centrales de coloide en los folículos tiroideos.

Gomes *et al.* (1993), evaluaron el efecto de la HCA en la alimentación de la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, sobre el crecimiento y digestibilidad de nutrientes, obtuvieron que en comparación con el grupo de control los peces alimentados con el 5, 10 y 15% de proteína de HCA mostraron un rendimiento en el crecimiento equivalente o ligeramente mejor, mientras que un 45% de HCA condujo a una tasa de crecimiento específico significativamente menor. No se observaron diferencias significativas en la digestibilidad de proteína y lípidos independientemente del tratamiento dietético, mientras que la digestibilidad de materia seca y energía si resultó afectada. Las observaciones histológicas de la tiroides no mostraron diferencias entre los tratamientos dietéticos.

Webster *et al.* (1997), evaluaron el efecto de la HCA en la dieta de *Ictalurus punctatus*, obtuvieron que los peces alimentados con inclusiones del 12 y 36% de HCA tuvieron significativamente mayor ganancia de peso porcentual, que los peces alimentados con una dieta que contenía 48% de canola. No se presentaron diferencias histológicas en la glándula tiroides de los peces alimentados con ninguno de los tratamientos. Estos datos sugieren que el bagre de canal puede ser alimentado con dietas que contenían hasta 36% de HCA, sin mostrar efectos adversos sobre el crecimiento o la composición corporal.

Cheng *et al.* (2010), evaluó diferentes niveles de HCA en la dieta de lobina japonesa, sobre el crecimiento, supervivencia y digestibilidad de nutrientes, los resultados mostraron que con el aumento de los niveles de HCA, la supervivencia, tasa de crecimiento específico y la eficiencia de la alimentación se redujo. Los coeficientes de digestibilidad aparente de la

materia seca, proteína y lípidos disminuyeron significativamente con el aumento de nivel de HCA en la dieta. Los resultados del presente estudio indican que la proteína de HCA podría sustituir hasta en un 20% a la proteína de la harina de pescado sin influir en el crecimiento de *Lateolabrax japonicus*.

Hernández *et al.* (2010), determinaron los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA's) de proteína, lípidos y materia seca, utilizaron harina de pescado (HP), canola, subproductos de carne y hueso (MBM), atún (TBM), cerdo (PME), ave (PBM) y soya (SBM) en dietas para pargo flamenco *Lutjanus guttatus*, obtuvieron que los CDA's fueron superiores en la HP, seguido de la TBM, PBM, SBM y canola; e inferiores para la MBM y PME esto debido a un alto contenido de ceniza, lo que pudo afectar directamente su digestibilidad.

Yiğit *et al.* (2012), evaluaron el efecto de la HCA sobre el crecimiento, tasa de conversión alimenticia (TCA), supervivencia y digestibilidad de nutrientes en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*. Los peces alimentados con las dietas que contenían el 8 y 16% de HCA mostraron un rendimiento similar en crecimiento, TCA, y digestibilidad de proteína comparado con la dieta control, los alimentados con el 32% de HCA tuvieron el peor crecimiento. Este estudio mostró que la HCA puede reemplazar hasta en un 16% a la harina de pescado en alevines de trucha arcoíris, sin provocar efectos adversos en el rendimiento.

Nagel *et al.* (2012), evaluaron el efecto de un Concentrado Proteico de Canola (CPC) como remplazo parcial de la HP en dietas para *Psetta máxima*. Se probaron inclusiones del 33, 66 y 100% de CPC y obtuvieron que el crecimiento no varió entre los peces alimentados con el 33% CPC y la dieta control. La digestibilidad de materia seca y proteína se redujo con un 66% de CPC. No se presentaron diferencias en los parámetros de hematocrito, glucosa, triglicéridos y cortisol en los tratamientos probados. La histopatología del hígado reveló una ligera hipertrofia de los hepatocitos en el grupo control y una hipertrofia severa en los peces alimentados con un 33% de CPC. En conclusión el 66% de HP de la dieta podría ser sustituido por CPC, sin afectar los parámetros fisiológicos de rodaballo en materia de salud animal, pero el crecimiento se reduce utilizando niveles superiores al 33%.

Tan *et al.* (2013), evaluaron inclusiones de 0, 16, 32, 48 y 64% de HCA sobre el crecimiento, bioquímica sanguínea e histología hepatopancreática de la carpa herbívora

Ctenopharyngodon idellus. Los resultados mostraron que la tasa de crecimiento específico (TCE) disminuyó conforme se incrementó el nivel de inclusión de HCA y los valores más altos de TCE se observaron en el grupo de control y con el 16% de HCA. El contenido de lípidos aumentó significativamente conforme se incrementó la HCA en la dieta, y los valores más altos se observaron con el 32% y el 64% de inclusión. No se observaron diferencias significativas en los índices de la bioquímica sanguínea de la especie.

III. JUSTIFICACIÓN ACÁDEMICA

El pargo flamenco *Lutjanus guttatus* es una especie de alto valor comercial en algunos países de Latinoamérica; las investigaciones realizadas sobre su biología, indican que tiene un alto potencial para su cultivo. Años atrás, en la costa mexicana del océano Pacífico, los juveniles de pargo flamenco eran capturados del medio silvestre y engordados en jaulas flotantes hasta que alcanzaban la talla comercial, siendo alimentados con dietas importadas o para otras especies, ya que en México no existe un alimento comercial específico para pargo. Para que el cultivo de pargo flamenco sea sostenible, no debe depender de organismos silvestres y debe alimentarse con dietas específicas para la especie.

De esta manera, la nutrición de peces marinos es una de las áreas de investigación y desarrollo más importantes dentro de la acuicultura, debido a que el alimento generalmente constituye la fracción más significativa dentro de los costos de operación en las empresas dedicadas al cultivo de organismos acuáticos (FAO, 1989), la producción de alimento balanceado depende del uso de la harina y aceite de pescado para la formulación de dietas nutricionalmente completas, sin embargo estos ingredientes están disponibles en cantidades limitadas y sus costos son inciertos, existiendo una creciente preocupación con respecto a la confiabilidad de los sistemas acuícolas basados en esos recursos (Hernández *et al.*, 2003).

El uso de fuentes de proteínas vegetales alternativas, son la base de formulaciones las cuales tendrán por objeto ser más sustentables y reducir los costos del alimento balanceado. Entre los ingredientes vegetales con potencial para ser utilizados como sustitutos se encuentra la harina de canola, la cual ha sido evaluada en animales de engorda como borregos, vacas, cerdos, etc. sin embargo se ha incrementado su utilización en alimentos para acuicultura en especies como salmón, trucha, bagre, carpa, tilapia, camarón etc. obteniéndose resultados favorables, demostrándose con ello la importancia del ingrediente para la formulación y elaboración de alimento balanceado, gracias a su amplia disponibilidad, bajo costo y adecuado perfil nutricional.

IV. HIPÓTESIS

La sustitución del 15 y 30% de la harina de pescado por harina de canola en dietas para la alimentación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), no afectará su crecimiento, digestibilidad de nutrientes y estado de salud.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

- Evaluar la eficiencia nutricional de la sustitución parcial de la harina de pescado por harina de canola en dietas para la alimentación del pargo *Lutjanus guttatus*.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de cuatro niveles de inclusión de harina de canola (0, 15, 30, 45%) como sustitutos de la harina de pescado en dietas para *Lutjanus guttatus*, en términos de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia.
- Evaluar el estado de salud del pargo flamenco mediante los siguientes parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, proteína total, glucosa y triglicéridos, cuando es alimentado con las dietas experimentales (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45).
- Determinar los coeficientes de digestibilidad aparente de proteína, lípidos y materia seca de las dietas experimentales (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45) en la alimentación de *Lutjanus guttatus*.
- Determinar la histología normal y patológica del hígado y la glándula tiroides del pargo flamenco, para determinar si se generó efecto alguno, cuando se alimenta a esta especie con dietas que contienen harina de canola.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Análisis proximal

Se realizó el análisis proximal a las harinas y dietas elaboradas, el cual incluyó los parámetros de proteína, lípidos, cenizas, humedad y fibra cruda. Se analizó el cadáver de los peces al inicio del experimento para lo cual se tomó una muestra de diez peces del total de organismos utilizados en el bioensayo. Los resultados obtenidos para el cadáver de peces iniciales son: proteínas, lípidos, cenizas y humedad. El análisis se realizó por triplicado y una vez finalizado el experimento se tomó un total de seis organismos por tratamiento.

6.1.1. Análisis de proteína (AOAC 4.2.08)

El análisis de proteína se realizó siguiendo la técnica para la cuantificación de nitrógeno/proteína empleando el método de combustión y cromatografía con el equipo Flash 2000, CHN Organic Elemental Analyzer, Thermo Scientific.

6.1.2. Análisis de lípidos (AOAC 4.5.05)

Se siguió el método de grasa cruda de Randall, usando éter de petróleo como solvente, en un equipo FOSS Sox-Tec 2050 (Soxhlet Avanti 2050, Suecia).

6.1.3. Análisis de cenizas (AOAC 32.1.05)

Para medir el contenido de cenizas, se utilizó el método de calcinación a 550°C en una mufla (Fisher Scientific, Reino Unido).

6.1.4. Análisis de humedad (AOAC 4.1.06)

Se determinó siguiendo el método gravimétrico descrito por la AOAC (2011) secando la muestra a 105°C por 12 horas en un horno CRAFT ESP (CRAFT, China).

6.1.5. Análisis de fibra (AOAC 962.09)

El análisis de fibra se determinó siguiendo el método descrito por la AOAC (2011) para la determinación de fibra cruda, con ciertos ajustes para utilizar el equipo FiberCap.

6.2. Perfil de aminoácidos

Se realizó el perfil de aminoácidos (AA's) de los ingredientes siguiendo la técnica para la detección y cuantificación de AA's por cromatografía líquida de alta resolución en el Laboratorio de cromatografía y espectrofotometría de CIAD Mazatlán. La identificación y cuantificación se obtiene comparando el tiempo de retención de la muestra contra los del estándar. El sistema de cromatografía líquida Varian (Palo Alto, CA) modelo 9012 de alta resolución se conecta a un software (Varian Star Chromatography versión 4.0) donde se reportan lecturas de los picos en áreas (Vázquez-Ortiz *et al.*, 1995).

6.3. Formulación y elaboración de dietas experimentales

Se formularon dietas isoproteicas 49% e isolipídicas 12%. Una dieta control (D-HCA 0) de acuerdo con Silva-Carrillo *et al.* (2012) y tres dietas experimentales utilizando el 15, 30 y 45% de inclusión de proteína de harina de canola (D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45) en reemplazo de la proteína de la harina de pescado, para ello se determinó la composición proximal de las materias primas utilizadas en la elaboración de las dietas (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis proximal materias primas (valores promedio \pm desviación estándar n=3).

Composición proximal (% en base seca)	Materias primas				
	H. Pescado a	H. Canola b	H. Calamar c	H. krill d	Glúten maíz e
Proteína cruda	74.20 \pm 0.00	42.80 \pm 0.07	79.10 \pm 0.10	60.53 \pm 0.10	72.72 \pm 0.07
Lípidos cruda	9.01 \pm 0.05	1.58 \pm 0.17	3.32 \pm 0.10	12.04 \pm 0.10	2.43 \pm 0.20
Cenizas	12.91 \pm 0.10	7.24 \pm 0.10	11.63 \pm 0.10	9.60 \pm 0.10	1.39 \pm 0.04
Fibra Cruda	0.05 \pm 0.01	9.80 \pm 0.04	0.99 \pm 0.00	0.28 \pm 0.10	0.49 \pm 0.10
E.L.N.	3.83 \pm 0.20	38.58 \pm 0.25	4.96 \pm 0.20	17.55 \pm 0.23	22.97 \pm 0.20

ELN (Extracto libre de nitrógeno).

ELN= 100- (% humedad + % proteína cruda + % lípidos crudos + % ceniza+% fibra cruda).

a Selecta de Guaymas, S.A. de C.V., Guaymas, Sonora, México.

b Proteínas marinas y agropecuarias, S.A. DE C.V. Guadalajara, Jalisco, México.

c PROAQUA, S.A. DE C.V. Mazatlán, Sinaloa, México.

d CP Ingredientes, S.A. de C.V , Guadalajara, Jalisco, México.

La Tabla 3 muestra la composición de aminoácidos de las harinas utilizadas en la formulación de las dietas experimentales, las cuales se encuentran expresadas en gramos de

aminoácidos por cada 100 gramos de proteína, se observa que la materia prima con mejor perfil de aminoácidos es la harina de pescado presentándose cantidades elevadas de lisina y metionina, comparado con la canola quien presenta porcentajes relativamente bajos.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de las materias primas utilizadas en la elaboración de la dieta control y las dietas experimentales.

AA's (gr/100grs proteína)	Materias primas				
	Glúten de maíz	H. Pescado	H. Calamar	H. Canola	H. Krill
AANE					
ASP	5.13±0.66	10.17±1.95	9.04±1.08	9.35±1.12	13.72±4.63
GLU	21.14±2.26	17.55±1.02	14.47±1.75	23.69±2.58	19.18±5.46
SER	5.58±0.69	5.96±0.03	4.90±0.15	6.30±0.61	6.69±1.64
GLI	3.58±0.53	5.31±0.58	5.21±0.45	5.97±1.75	5.96±1.35
ALA	8.25±0.84	8.47±0.43	6.34±0.04	7.23±1.45	7.85±2.15
TIR	3.75±0.52	3.51±0.22	2.53±0.37	3.52±0.35	4.47±1.33
AAE					
HIS	1.87±0.35	2.98±2.13	1.36±0.82	2.62±0.21	3.49±0.65
TRE	4.54±0.57	2.77±0.26	2.55±0.46	5.78±3.20	5.07±1.72
ARG	3.04±0.47	5.79±0.64	5.18±0.61	8.44±3.39	6.88±1.71
MET	1.57±0.13	3.32±0.67	2.28±0.58	2.15±0.36	2.41±0.45
VAL	3.48±0.38	4.99±0.37	3.07±0.68	6.14±0.97	4.35±1.67
FEN	5.64±0.68	5.02±0.06	3.57±0.17	5.22±0.70	5.61±1.43
ISO	2.77±0.31	4.11±0.25	2.87±0.74	4.52±0.74	3.94±1.44
LEU	15.19±1.87	9.69±0.27	7.37±0.59	9.17±1.13	10.14±2.76
LIS	1.09±0.16	10.65±0.35	6.08±1.28	6.99±0.99	8.06±2.02

AA's aminoácidos, AANE aminoácidos no esenciales, AAE aminoácidos esenciales.
Los valores son la media ± desviación estándar n=3, en base seca.

A continuación se muestra la formulación y análisis proximal de las dietas (Tabla 4), la cual se realizó remplazando la proteína de la HP por diferentes niveles de inclusión de proteína de HCA, se decidió que el máximo nivel de remplazo fuera del 45% porque de acuerdo con Dabrowski y Kolowska, 1981 no se puede remplazar HP por más del 50% de HCA, pues la utilización del alimento por el organismo se ve afectada. El análisis proximal mostró que a pesar de haber formulado las dietas para ser isoproteicas 49% e isolipídicas

12%, se presentó cierta variación en cuanto al contenido de proteína y lípidos registrándose intervalos de 48.1 – 48.76% para proteína y 13.30 – 13.60% para lípidos.

Tabla 4. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45) utilizadas en la alimentación de juveniles de pargo flamenco.

Ingredientes (gr/kg-1)	Dietas			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
Harina de pescado	48.8	43.78	36.05	28.33
Harina de canola	0	13.37	26.77	40.16
Harina de calamar	6	6	6	6
Harina de krill	7.59	7.59	7.59	7.59
Aceite de pescado	5.94	5.68	6.17	6.7
Dextrina	23.61	14.97	8.81	2.31
Alginato	3	3	3	3
Glúten de maíz	2	2	2	2
Soluble de pescado	0	0.5	0.5	0.5
Fitasa	0	0.005	0.005	0.005
Proteasa	0	0.04	0.04	0.04
Fosfato dibásico de calcio	0	0	0	0.05
DL-Metionina	0	0	0	0.25
Óxido de cromo	0.5	0.5	0.5	0.5
Premezcla de vitaminas ^a	0.6	0.6	0.6	0.6
Premezcla de minerales ^b	0.23	0.23	0.23	0.23
Carotenoides ^c	0.08	0.08	0.08	0.08
Antioxidante	0.05	0.05	0.05	0.05
Lecitina de soya	1.5	1.5	1.5	1.5
Vitamina C	0.1	0.1	0.1	0.1
Suma	100.00	100.00	100.00	100.00
Composición (% en base seca)				
Proteína cruda	48.49± 0.90	48.65± 0.30	48.76± 0.01	48.10± 0.60
Lípidos crudos	13.30± 0.20	13.40± 0.01	13.40± 0.10	13.60± 0.20
Cenizas	9.40± 0.20	10.00± 0.10	9.90± 0.10	9.81± 0.10
E.L.N. ¹	28.81±0.76	27.94±0.33	27.97±0.15	28.51±0.37
Energía(Kcal/100gr) ²	505.72±1.91	504.11±0.11	504.82±0.66	504.93±1.84

¹ ELN con fibra incluida (calculado por diferencia).

² Energía (Kcal/g) fue calculada en función de los valores fisiológicos de proteína, 5.5 Kcal/g; lípidos, 9.1 Kcal/g; y extracto libre de nitrógeno, 4.1 Kcal/g (New, 1987).

^a Pre-mezcla de vitaminas: Vitamina A, 2400 IU o mg g⁻¹; Vitamina D3, 2250 IU; Vitamina E, 160 g; Vitamina K3, 8.00 g; Vitamina B1, 20.00 g; Vitamina B2, 40.00 g; Acido Pantoténico, 60.00 g; Acido Nicotínico, 160.00 g; Vitamina B6, 16.00 g; Ácido Fólico, 4.00 g; Vitamina B12, 80 mg; Biotina, 500 mg; Vitamina C, .2 g; Colina (cloruro).

^b Pre-mezcla mineral: Manganeso, 100 g; Zinc, 160g; Hierro, 200g; Cobre, 20g; Yodo, 5g; Selenio, 0.40mg; Cobalto 0.60mg.

^c DSM Nutritional Products México S.A. de C.V., El Salto, Jalisco, México.

Para la elaboración de las dietas se molieron las harinas (pescado, canola, calamar, krill, glúten de maíz) en un molino martillo, se pesaron en una báscula TORREY EQB 25 kg y cada una de las dietas se depositó en una mezcladora Hobart AT-200 de 5 kg para su homogenización, se pesaron los ingredientes menores en una balanza Mettler PM4800-Delta Ranger y se mezclaron por separado hasta la obtención de un color homogéneo y se agregaron a la mezcla de ingredientes mayores, una vez obtenida la mezcla se añadió el óxido de cromo a razón de 5 g. por kilogramo de alimento (0.5%) como se observa en la Tabla 5, se adicionó el aceite de pescado, lecitina de soya y agua caliente hasta la obtención de una masa la cual se somete a baño maria para su acondicionamiento.

Finalmente, cada dieta se peletizó en un molino para carne TORREY, modelo 22 equipado con orificios de salida de 3/32'' (3 mm). Las dietas peletizadas fueron recibidas en charolas tipo cernidor y se colocaron en un secador de aire forzado, a un rango de temperatura de 37-39 °C durante 12 horas, una vez secas las dietas se partieron los pellets manualmente y se depositaron en bolsas de plástico etiquetadas, finalmente se almacenaron en un cuarto frío a una temperatura de 4°C, hasta el momento de su utilización.

6.4. Sitio de realización del bioensayo

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Cromatografía, Nutrición y Planta de alimentos, el análisis histológico se llevo a cabo en el Laboratorio de Histopatología, situados en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental (CIAD, A.C.).

6.5. Evaluación biológica, determinación de la digestibilidad *in vivo* y estado de salud del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

6.5.1. Origen de los organismos y sistema experimental

Los juveniles de pargo flamenco utilizados en el experimento, fueron producidos en la planta piloto de peces marinos del CIAD, siguiendo los protocolos ya establecidos para el desove y cultivo larvario (Abdo de la Parra *et al.*, 2010). El área donde se llevó a cabo el experimento se integró de 12 tanques negros circulares de fibra de vidrio (Fig. 1) con capacidad de 400 L cada uno con drenaje central de 50 mm, cubierto con malla con una luz de 0.5 cm. para evitar la salida de los peces y a la vez permitir la limpieza de los tanques, estos cuentan con aireación constante y flujo de agua continuo.



Figura 1. Sistema experimental

6.5.2. Diseño experimental (crecimiento)

El bioensayo de crecimiento tuvo una duración de 10 semanas y se emplearon 180 organismos con peso promedio inicial de 37 ± 5.7 grs. El sistema experimental contó con un total de 12 tanques, en cada uno se colocaron 15 organismos, utilizándose tres réplicas por tratamiento. Los organismos fueron alimentados a saciedad durante la primera semana para aclimatarlos a las dietas, así como a los tanques experimentales, transcurridos siete días se alimentó a los organismos tres veces al día en el horario de las 9 am, 12 pm, 4 pm.

6.5.3. Parámetros fisicoquímicos del sistema experimental

Antes de la primera alimentación de los organismos, se registraron diariamente los siguientes parámetros fisicoquímicos: temperatura 30.25 ± 0.5 °C y oxígeno disuelto 5.25 ± 1 mg/l, mientras que la salinidad se registró cada tercer día registrándose un valor de 33.2 ± 0.7 ‰, mediante un oxímetro de mano marca YSI 85 y un refractómetro.

6.5.4. Evaluación biológica

La evaluación biológica de los organismos se determinó durante un periodo de 10 semanas (75 días), para ello se realizaron biometrías quincenales para conocer el crecimiento, supervivencia y eficiencia en la alimentación de la especie, durante los muestreos los peces se anestesiaron con esencia de clavo (0.5 ml/l) y se pesaron individualmente en una balanza analítica con precisión de ± 0.1 g, su longitud total se determinó con un ictiometro convencional. Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes índices biológicos de acuerdo a Kader *et al.* (2010), los cuales se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Índices biológicos de crecimiento calculados al término del experimento, en juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

Índice	¿Cómo se calcula?
Peso ganado (g.)	PG= Peso promedio final- peso promedio inicial.
Tasa de crecimiento (%)	TC= {(Peso final-peso inicial)/(peso inicial)}*100.
Tasa de crecimiento específico (%.día ⁻¹)	TCE= 100* (Ln peso final-Ln peso inicial)/tiempo.
Supervivencia (%)	SUP= (Numero de organismos finales)/(Numero inicial de organismos)*100.
Factor de Conversión Alimenticia	FCA= Alimento consumido (g) /peso ganado (g).

6.5.5. Diseño experimental (digestibilidad)

El bioensayo de digestibilidad tuvo una duración de 6 semanas (45 días) y se emplearon 120 organismos con peso promedio inicial de 160 ± 15.8 g. El sistema experimental contó con un total de 12 tanques, en cada uno se colocaron 10 organismos, utilizándose tres réplicas por tratamiento. Los organismos fueron alimentados a saciedad durante la primera semana para aclimatarlos a las dietas, transcurridos siete días se alimentó a los organismos tres veces al día en el horario de las 10 am, 12 pm y 2 pm.

6.5.6. Digestibilidad

Para la determinación de la digestibilidad *in vivo* se siguió con el siguiente protocolo para la colecta y tratamiento de las heces. Posteriormente se determinó la digestibilidad aparente de las dietas, mediante el conocimiento de los nutrientes consumidos por el organismo y excretado en heces y el análisis de óxido de cromo Cr_2O_3 en dietas y heces.



Figura 2. Método de stripping o masaje abdominal

Para la colecta, secado y limpieza de heces, se alimentó a los organismos en los siguientes horarios: 10 am, 12 pm y 2 pm, posteriormente se colectó el material fecal a las 4:00 pm, usando el método de stripping o masaje abdominal (Fig. 2) descrito por Austreng (1978), para ello se anestesió a los organismos utilizando esencia de clavo, una vez colectadas se colocaron en una estufa a 60°C durante 12 horas, ya secas se depositaron en frascos

cerrados, una vez reunido el material fecal se pulverizó en un mortero y se analizó en un estereoscopio con el fin de remover partículas que pudieran adherirse a estas, finalmente se depositaron en frascos de vidrio hasta el momento de su análisis.

Para la determinación de la digestibilidad aparente se cuantificó el óxido de cromo en heces y alimento (Tabla 6), aplicando el método espectrofotométrico previa digestión ácida de Furukawa y Tsukahara (1966), la técnica consistió en digerir la muestra con ayuda de un digestor eléctrico tipo kjeldahl, con ácido nítrico y perclórico. Una vez terminada la digestión se aforó y se procedió a leer la muestra en un espectrofotómetro modelo UV-1800 120 V. a 350 nm. Se realizó un análisis proximal a las dietas y heces para determinar su contenido de nutrientes, el cual incluyó los parámetros de proteína, lípidos, cenizas y humedad, el análisis se realizó siguiendo las técnicas descritas en la AOAC (2011).

Tabla 6. Porcentaje de óxido de cromo obtenido en dietas experimentales y heces.

Tratamientos	Porcentaje Cr₂O₃ en dietas	Porcentaje Cr₂O₃ en heces
D-HCA 0	0.47±0.01	1.13±0.03
D-HCA 15	0.50±0.02	1.00±0.01
D-HCA 30	0.50±0.01	1.01±0.02
D-HCA 45	0.52±0.03	0.89±0.01

Los valores son la media ± desviación estándar, n=3.

Una vez obtenida la concentración de óxido de cromo y el contenido de nutrientes en heces y alimento se calcularon los CDA's de proteína y lípidos de acuerdo al principio de sustitución de Cho y Slinger (1979). El CDA de materia seca se determinó mediante el método indirecto descrito en Hernández-González *et al.* (2010), para lo cual se incluyó en las dietas el marcador Cr₂O₃ a razón de 0.5%.

$$CDA\ ms = 100 - \left[\frac{\% Cr_2O_3\ dieta}{\% Cr_2O_3\ heces} \right] \times 100$$

CDA ms= coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca.

$$CDA\ dieta = 100 - \left[\frac{\% Cr_2O_3\ dieta}{\% Cr_2O_3\ heces} \right] \left[\frac{\% Nutriente\ heces}{\% Nutriente\ alimento} \right] \times 100$$

CDA dieta = coeficiente de digestibilidad aparente de la dieta.

% Cr₂O₃ alimento = porcentaje de óxido de cromo en el alimento.

% Cr₂O₃ heces= porcentaje de oxido de cromo en las heces.

% Nutriente heces = porcentaje del nutriente a evaluar en las heces.

% Nutriente alimento = porcentaje del nutriente a evaluar en el alimento.

6.5.7. Análisis del estado de salud de los peces

La utilización de parámetros sanguíneos y métodos histológicos en los peces indican su estado fisiológico, que a su vez sirve para evaluar el control de enfermedades infecciosas, desbalance nutricional, efectos tóxicos, condiciones anóxicas, cambios ambientales y otros agentes estresantes que se presentan durante los cultivos.

En términos de nutrición al sustituir la harina de pescado y aceite por materias primas menos costosas de origen vegetal se incrementa el contenido de fibra, carbohidratos, factores antinutricionales, contenido inadecuado de aminoácidos y otros compuestos, pudiendo tener efectos negativos sobre el sistema digestivo de los peces y por tanto en sus características externas y estado de salud.

6.5.7.1. Análisis hematológicos

Para determinar el estado de salud del pargo al inicio y al final del experimento se tomaron muestras de sangre de los organismos alimentados con las dietas experimentales.

Se obtuvieron muestras de sangre utilizando un promedio de 10 peces por nivel de remplazo para realizar los análisis hematológicos correspondientes (hematocrito, proteína plasmática, hemoglobina, glucosa y triglicéridos), para ello no se alimentó a los organismos durante un periodo de 24 horas previo a la extracción de sangre, se utilizaron jeringas para insulina efectuando una punción directa a la vena caudal de los peces. Los peces se anestesiaron con esencia de clavo (0.5 ml/l) para evitar el efecto del factor estrés por

manipulación, del tiempo de captura hasta el momento de la extracción la muestra de sangre no superó los tres minutos.

Después de la extracción, se almacenó en dos tubos: tubos Eppendorf de 1ml (2/3 del volumen extraído) y en tubos Microtainer con heparina (1/3 del volumen extraído). De la sangre contenida en el tubo eppendorf, se tomo la muestra para la determinación de hematocrito inmediatamente después de extraerla, la sangre que se colocó en los tubos heparinizados se utilizó para determinar la concentración de hemoglobina. Posteriormente los tubos eppendorf fueron centrifugados por 10 minutos a 7000 rpm (BECKMAN Microfuge® Lite Modelo 2^a, Alemania) velocidad estándar y una vez separado el suero, este se depositó en otro tubo eppendorf y se congeló a -20°C hasta su posterior análisis. Del suero se determinaron triglicéridos y proteínas totales (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008).

6.5.7.1.1. Hematocrito

Para la determinación del hematocrito se utilizó un tubo capilar heparinizado el cual se lleno hasta 2/3 de la longitud total del tubo, uno de los extremos fue sellado con pegamento y bicarbonato de sodio para evitar su derrame, los tubos se colocaron en una centrifuga SOL-BAT P600 por 10 min. Posteriormente se determinó el porcentaje del paquete celular con respecto al volumen total con un lector para microhematocrito (Mytutoyo, México) Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008.

6.5.7.1.2. Proteína plasmática

La proteína plasmática se midió en suero utilizando el kit de Biuret (Biosystems, España). Para ello se colocó 20 µl de suero con 1 ml de reactivo en una celda de plástico, se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se midió a una longitud de onda de 545 nm, utilizando agua destilada como blanco y una solución de concentración conocida como patrón de referencia.

Cálculos:

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

Donde;

Amuestra = Absorbancia de muestra

CPatron = Concentración del patrón

APatron = Absorbancia del patrón

CMuestra = Concentración de muestra

6.5.7.1.3. Hemoglobina

Se determinó mediante un kit colorimétrico de la marca (Randox Laboratories LTD, Reino Unido), basado en el método de la cianometahemoglobina, para ello se tomaron 10 µl de sangre heparinizada de los tubos microtainer almacenados a -20°C y se hicieron reaccionar con 2.5 ml de reactivo, se dejó reposar por un periodo de 3 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Se midió contra agua destilada.

Cálculos:

$$\text{Concentración de hemoglobina} = \text{Abs muestra} \times 36.77 \text{ g/dl}$$

6.5.7.1.4. Glucosa

Se determinó por el método GOD-PAD enzimático colorimétrico utilizando un kit estándar Randox Laboratories LTD (Antrim, Reino Unido), se leyó a una longitud de onda a 500-546 nm, este se midió frente a un blanco, posteriormente se pipeteo en un tubo de ensayo 10 µl de sangre y 1000 µl del reactivo (muestra), en otro tubo de ensayo se agregó 1000 µl del reactivo (blanco). Se mezcló bien y se incubo por 10 min a 37°C, por último se midió la absorbancia del patrón y la muestra frente al reactivo blanco antes de 60 min en un espectrofotómetro marca SHIMADZU modelo UV-1800 (Sozhou, Jiangsu, China).

6.5.7.1.5. Triglicéridos

Los triglicéridos fueron hidrolizados por una lipasa específica liberando ácidos grasos y glicerol. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit (Grupo Mexlab, México). El cual consistió en hacer reaccionar 1 ml de reactivo con 0.01 ml de suero y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min, se leyó por espectrofotometría a una longitud de onda de 545 nm, usando reactivo como blanco. Se preparó un estándar para la cuantificación de triglicéridos con una solución de concentración conocida.

$$\text{Triglicéridos (mg dl}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia estándar}} \times 200$$

6.5.7.2. Análisis de histología normal y patológica de peces

La histología como método de diagnóstico permite tener un panorama general del estado de salud de los organismos, para determinar la histología normal y patológica del pargo se utilizaron 10 organismos al inicio y 24 al final del bioensayo (6 peces/tratamiento) para determinar el efecto que tiene en el organismo el ser alimentado con dietas que contienen harina de canola, los tejidos utilizados fueron el hígado y la glándula tiroides. El análisis histológico se llevó a cabo en el laboratorio de histopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán (CIAD, A.C.).

En el presente estudio se realizó la técnica histológica descrita en Luna 1968; Drury y Wallington 1980; Kamonporn *et al.* (1999). Para lo cual se sacrificaron a los organismos para la extracción de los órganos requeridos en el análisis, los cuales se fijaron en formalina al 10% (100 ml de formaldehído al 37-40%; 900 ml de agua de mar; 4.0 g de fosfato de sodio monobásico, y 6.5 g de fosfato de sodio dibásico) con el objetivo de evitar la destrucción de células por autólisis o bacterias. Posteriormente, los tejidos fueron sometidos a un proceso de deshidratación siendo sumergidos en diferentes concentraciones de alcohol (70, 80, 96, 100%) para la extracción del agua y disolución del contenido lípidico, se realizó el aclaramiento del tejido utilizando un solvente orgánico (xilol) el cual permitió la inclusión del tejido en parafina (Histoembebedor Leica Jung, EUA), después se realizó el bloqueo de muestras con un micrótopo rotatorio (Jung Histocut Leica #820)

realizándose cortes de 5 µm. Finalmente, se obtuvo el corte histológico el cual se coloca en un portaobjetos para su tinción con hematoxilina-eosina para la diferenciación de los componentes tisulares.

Una vez obtenidas las láminas se procedió a la identificación de posibles patologías reportadas en la literatura para organismos alimentados con dietas que contienen harina de canola, finalmente se tomaron fotografías del tejido hepático y tiroideo mediante un microscopio OLYMPUS (CH-30RF100, Japón) equipado con una cámara Micropublisher 3.3 (Olmaging, Canadá) y el software QCapture Pro v6.0.0.605 (Media Cybernetics Inc. and Olmaging Inc.), Por último se midió el área de los folículos tiroideos, usando el software Image Tool v3.00 (UTHSCSA, USA).

Las alteraciones del hígado y la glándula tiroides se evaluaron semicuantitativamente en función de dos criterios de acuerdo con Schwaiger *et al.* (1997) y Simonato *et al.* (2008):

- a) Valor medio de evaluación (MAV): basado en la incidencia de lesiones en el tejido: grado 1= sin alteración patológica, 2= cambios focales, 3= patología extendida.
- b) Grado de cambio del tejido (DTC): basado en la gravedad de las lesiones y en la posibilidad de recuperación del tejido: etapa I= cambios que no dañan el órgano, en una medida tal que puede repararse si las condiciones mejoran, etapa II= cambios que son más graves y afectan el órgano o función del tejido, etapa III= cambios que impiden al órgano repararse a sí mismo, incluso si las condiciones mejoran.

El DTC se calculó con la suma de los tipos de lesiones de cada uno de los tres estados multiplicado por el índice del estado, usando el modelo matemático de Silva y Martínez (2007) y Simonato *et al.* (2008) y propuesto por Poleksic y Mitrovic-Tutundzic (1994).

$$DTC = 1 \times \Sigma I + 10 \times \Sigma II + 100 \times \Sigma III$$

Donde I, II y III son el número de etapas de la lesión. El DTC promedio se dividió en cinco categorías: 0-10 órgano funcionalmente normal, 11-20 órgano ligeramente a moderadamente dañado, 21-50 órgano moderadamente a fuertemente dañado, 51-100 órgano severamente dañado y 100 órgano irreparablemente dañado.

6.6. Análisis estadístico

Se realizó una transformación de los valores que se presentan como porcentajes (arco-seno de la raíz cuadrada de la proporción correspondiente), para cumplir con el supuesto de normalidad de los datos, los resultados obtenidos fueron sometidos a una prueba de normalidad y homocedasticidad, posteriormente fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía ANOVA con un 95% de confianza mediante el programa Sigma Plot 11.0. Los tratamientos que presentaron diferencias significativas se analizaron mediante pruebas de comparación múltiple de medias de Tukey, $P < 0.05$ (Zar, 1984).

VII. RESULTADOS

7.1. Análisis proximal del cadáver del pargo

A continuación se presentan los resultados del análisis proximal corporal en base húmeda de los organismos utilizados al inicio del experimento, los cuales fueron 18.90% de proteína, 2.59% de lípidos, 5.79% de cenizas, 71.23% de humedad y 1.49% de extracto libre de nitrógeno. En la Tabla 7 se muestran los resultados porcentuales en base húmeda del proximal corporal obtenidos una vez finalizado el experimento, los cuales son el promedio de 3 réplicas \pm SD.

Tabla 7. Composición proximal corporal en base húmeda de pargo flamenco.

Composición Próximo (%)	Tratamientos			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
Proteína	18.19 \pm 0.1 ^c	18.27 \pm 0.16 ^c	17.31 \pm 0.14 ^b	16.26 \pm 0.15 ^a
Lípidos	10.16 \pm 0.1 ^a	9.88 \pm 0.12 ^a	9.46 \pm 0.29 ^a	11.27 \pm 0.15 ^b
Cenizas	5.01 \pm 0.07 ^a	5.09 \pm 0.24 ^a	4.82 \pm 0.23 ^a	4.89 \pm 0.04 ^a
Humedad	65.97 \pm 0.1 ^a	65.31 \pm 0.5 ^a	67.24 \pm 0.3 ^b	66.74 \pm 0.3 ^a
E.L.N ¹	0.64 \pm 0.09 ^a	1.54 \pm 0.15 ^c	1.18 \pm 0.29 ^c	0.85 \pm 0.01 ^b

Promedios con el mismo superíndice dentro de cada fila indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos $P > 0.05$.

¹ELN (extracto libre de nitrógeno) incluyendo fibra.

¹ELN = 100 - (%humedad + %proteína + %lípidos + %cenizas).

7.2. Evaluación biológica

En la Tabla 8 se presentan los índices de evaluación biológica obtenidos en el pargo flamenco *Lutjanus guttatus* después de 10 semanas de experimentación, los parámetros calculados son peso inicial (PI), peso final (PF), ganancia en peso (GP), consumo de alimento individual (CAI), tasa de crecimiento (TC), tasa de crecimiento específico (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA), supervivencia (S) e índice eficiencia proteica (IEP).

Tabla 8. Parámetros de evaluación biológica de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* alimentado con la dieta control y las dietas experimentales, obtenidos después de 10 semanas de experimentación.

Parámetros biológicos	Dietas			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
PI (g)	36.23±0.03 ^a	36.34±0.09 ^a	36.34±0.13 ^a	36.29±0.08 ^a
PF (g)	129.79±6.66 ^a	124.16±2.72 ^{ab}	121.17±4.26 ^{ab}	116.31±2.05 ^b
GP (g)	93.56±6.67 ^a	87.83±2.74 ^{ab}	84.83±4.37 ^{ab}	80.02±2.03 ^b
CAI (g)	108.58±5.26 ^a	109.41±5.76 ^a	106.86±3.32 ^a	118.46±4.20 ^a
TC (%)	258.23±18.47 ^a	241.71±7.65 ^{ab}	233.46±12.74 ^{ab}	220.51±5.51 ^b
TCE (%·día)	1.70±0.07 ^a	1.64±0.03 ^{ab}	1.61±0.05 ^{ab}	1.55±0.02 ^b
TCA	1.17±0.13 ^a	1.25±0.10 ^{ab}	1.26±0.05 ^{ab}	1.48±0.08 ^b
S (%)	97.78±3.85 ^a	97.78±3.85 ^a	93.33±0.00 ^a	97.78±3.85 ^a
IEP	1.73±0.19 ^a	1.56±0.13 ^{ab}	1.54±0.06 ^{ab}	1.35±0.07 ^b

Los valores son la media ± SD, n=3. Promedios con el mismo superíndice dentro de cada fila indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos P>0.05.

7.2.1. Ganancia en peso (GP)

En la Figura 3 se muestra la ganancia en peso de los organismos durante 75 días de experimento. A partir de la sexta semana se observó un mejor crecimiento de los peces alimentados con las cuatro dietas experimentales, obteniendo la mayor ganancia en peso los organismos alimentados con la D-HCA 0 (93.56 grs.), que resultó significativamente diferente a la D-HCA 45 quien obtuvo el valor más bajo 80.02 grs.

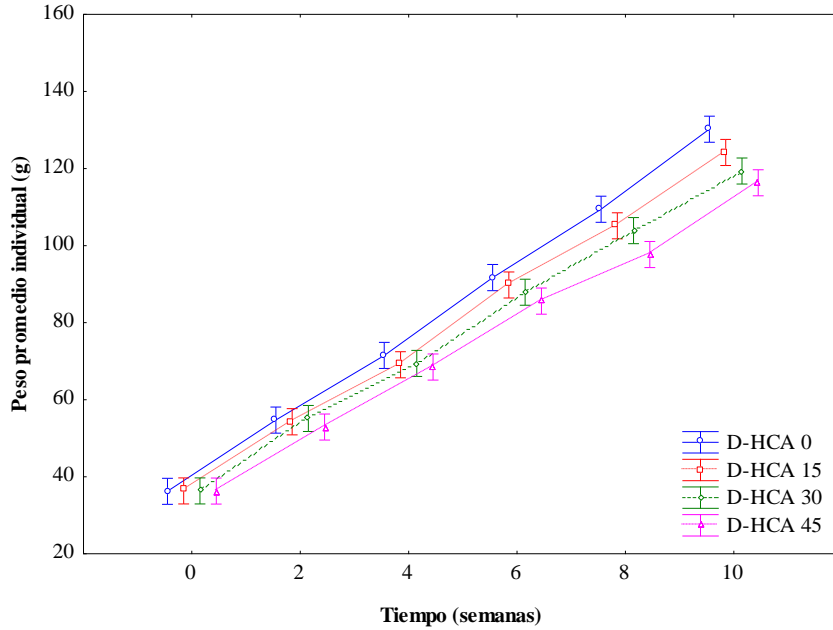


Figura 3. Ganancia en peso semanal del pargo flamenco alimentado con la dieta control y experimentales durante 75 días de experimento. Los valores son la media \pm SD, n=3.

7.2.2. Consumo de alimento individual (CAI)

Los peces alimentados con la D-HCA 45 presentaron el mayor consumo de alimento (118.46 grs.) no presentando diferencias significativas con respecto al alimento consumido por los organismos alimentados con la D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30.

7.2.3. Tasa de crecimiento específica (TCE)

Los organismos alimentados con la D-HCA 0 obtuvieron la mayor TCE (1.70%/día), no presentándose diferencias significativas con el resto de las dietas experimentales, a excepción de la D-HCA 45 quien obtuvo la TCE más baja con 1.55%/día.

7.2.4. Tasa de conversión alimenticia (TCA)

Se presentaron diferencias significativas entre la dieta control (D-HCA 0) quien obtuvo un TCA equivalente a 1.17 y la D-HCA 45 que obtuvo el valor más alto 1.48.

7.2.5. Supervivencia (S)

La supervivencia no se mostró afectada por las cuatro dietas probadas en pargo, reportándose porcentajes superiores al 90%, por lo que no se presentaron diferencias entre tratamientos (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30 y D-HCA 45).

7.2.6. Índice de eficiencia proteica (IEP)

Como se observa en la Tabla 8 el IEP fue superior en los peces alimentados con la D-HCA 0 (1.73), no presentándose diferencias significativas con respecto a la D-HCA 15 y D-HCA 30, pero siendo diferente a la D-HCA 45 quien obtuvo el valor más bajo (1.35).

7.3. Análisis hematológicos

El análisis hematológico inicial arrojó valores de 59.71% para hematocrito, 39.73 g l⁻¹ para proteína, 5.58 g dl⁻¹ para hemoglobina, 159.38 mg dl⁻¹ para glucosa y 375.91 mg dl⁻¹ para triglicéridos. En la Tabla 9 se observan los parámetros sanguíneos obtenidos después de 75 días de bioensayo.

Tabla 9. Parámetros hematológicos de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* alimentado durante un periodo de 75 días.

Parámetro Hematológico	Final			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
Hematocrito (%)	57.89±15.01 ^a	62.00±8.37 ^a	54.00±7.38 ^a	55.80±7.22 ^a
Proteína (g l ⁻¹)	58.78±8.91 ^a	62.46±8.38 ^a	60.22±9.47 ^a	63.53±4.86 ^a
Hemoglobina (g dl ⁻¹)	11.98±1.00 ^a	12.01±1.29 ^a	11.79±1.02 ^a	12.30±1.67 ^a
Glucosa (mg dl ⁻¹)	710.13±215.67 ^a	730.49±165.44 ^a	668.81±165.35 ^a	871.01±165.96 ^a
Triglicéridos (mg dl ⁻¹)	489.4±98.0 ^a	470.1±75.2 ^a	453.4±101.9 ^a	437.2±105.8 ^a

Promedios con el mismo superíndice dentro de cada fila indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos P>0.05.

7.3.1. Hematocrito

El análisis de hematocrito de los organismos alimentados con las cuatro dietas experimentales arrojó que no se existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, siendo la D-HCA 15 quien obtuvo el porcentaje más alto.

7.3.2. Proteína

No hubo diferencias significativas en cuanto a la concentración de proteína plasmática en los cuatro tratamientos. Sin embargo la concentración más alta se presentó en los organismos alimentados con la D-HCA 45 y la más baja fue para la D-HCA 0.

7.3.3. Hemoglobina

No se presentaron diferencias significativas en las concentraciones de hemoglobina reportadas en este estudio para las cuatro dietas experimentales, en el pargo flamenco.

7.3.4. Glucosa

No se encontraron diferencias significativas en los tratamientos probados en pargo, sin embargo la concentración más alta de glucosa la obtuvieron los organismos alimentados con la D-HCA 45, seguida de la D-HCA 15, D-HCA 0 y finalmente la D-HCA 30.

7.3.5. Triglicéridos

No se presentaron diferencias en la concentración de triglicéridos en los tratamientos probados, siendo la D-HCA 0 quien obtuvo el valor más alto (489.4 mg dl^{-1}) el cual fue decreciendo conforme se incrementó la inclusión de harina de canola, presentando el valor más bajo los peces alimentados con la D-HCA 45 (437.2 mg dl^{-1}).

7.4. Análisis histológicos

7.4.1. Hígado

Los hígados de los peces iniciales presentaron degeneración grasa que se consideró normal debido a que se observó claramente la estructura de los hepatocitos, con sus núcleos centrales y sus sinusoides. En el transcurso del experimento, los peces mostraron aumento en el contenido de grasa en el hígado. En la Figura 4, se muestra el corte transversal del hígado de pargo y las imágenes muestran áreas con vacuolación lipídica. En base a estos resultados no se observaron diferencias entre los hígados de la dieta control y las dietas con inclusiones de canola, por lo que el tejido hepático de todos los tratamientos presentó una lipidosis o degeneración grasa no severa, pues la acumulación de grasa se presentó solo en ciertas secciones del hígado. El páncreas no presentó ningún cambio patológico.

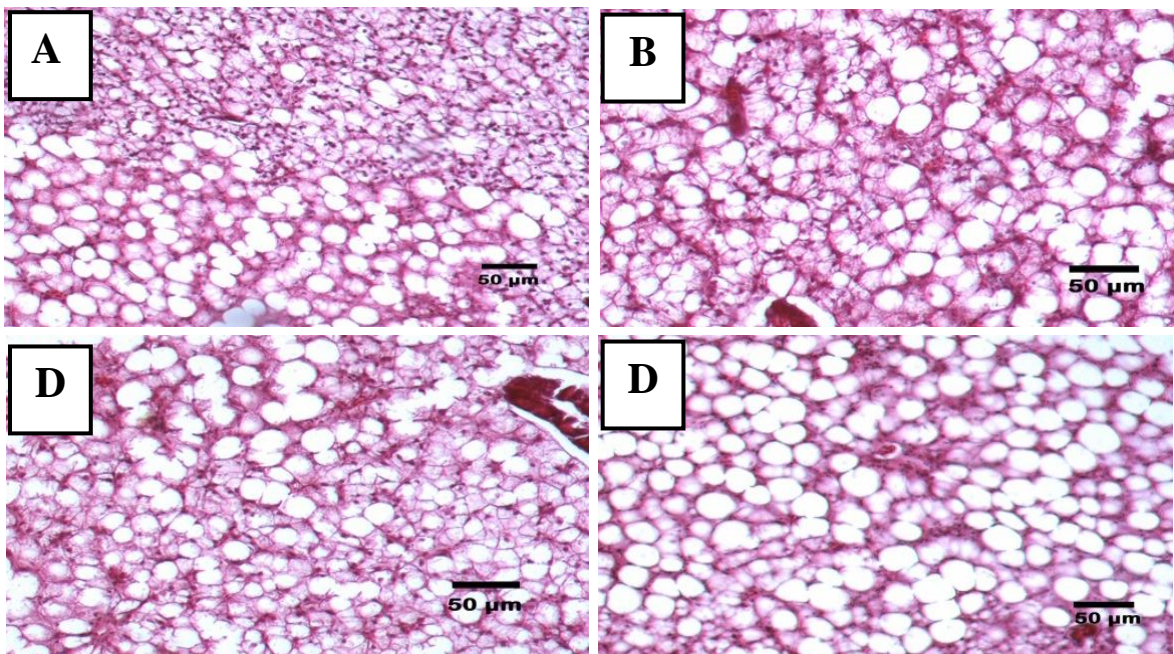


Figura 4. Corte transversal del hígado de juveniles de pargo alimentados con las dietas: A) D-HCA 0, B) D-HCA 15, C) D-HCA 30 y D) D-HCA 45, en las cuales se observan hepatocitos vacuolados lo que indica degeneración grasa en estas secciones pues se ha perdido la estructura normal de las células, rompiéndose en muchos casos la membrana celular. Se observa un aumento en el tamaño y número de vacuolas lipídicas conforme se aumenta el porcentaje de canola. H&E. barra 50 µm.

7.4.2. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio (DTC) del hígado

En la Tabla 10 se muestran los valores del MAV y el DTC obtenido para el tejido hepático de los peces alimentados con las dietas experimentales. El MAV más alto lo presentaron los peces alimentados con la D-HCA 0 (2.17), D-HCA 30 (2.17) y D-HCA 45 (2.17) no resultando diferente a la D-HCA 15 (1.83), estos valores indicaron que las lesiones del tejido fueron focales. Para el DTC, la D-HCA 45 obtuvo el valor más alto (10.00), sin embargo no fué diferente a la D-HCA 0 (8.33), D-HCA 15 (5.00) y D-HCA 30 (8.33), según estos datos el tejido se clasificó como un órgano funcionalmente normal. No obstante se observa una tendencia del DTC a aumentar por lo que posiblemente con más tiempo el daño al hígado pase de focal a extendido y de ligero a moderado o severo, por lo que las dietas se deberán evaluar con un tiempo mayor para determinar si es factible su uso o no, o durante cuánto tiempo es factible su inclusión sin que ocasione daños irreversibles, reducción de crecimiento y muerte.

Tabla 10. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio en los tejidos (DTC), calculado para el tejido hepático de *Lutjanus guttatus* de una dieta control D-HCA 0 y tres dietas experimentales D-HCA 15, DHCA 30, D-HCA 45.

Grados de alteración	Dietas			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
MAV	2.17±0.98 ^a	1.83±0.98 ^a	2.17±0.75 ^a	2.17±0.98 ^a
DTC	8.33±4.08 ^a	5.00±5.47 ^a	8.33±4.08 ^a	10.00±0.00 ^a

Los valores se presentan como la media±SD, n=6. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos P>0.05.

7.4.3. Glándula tiroides

En la Figura 6. Se muestra el corte transversal de la glándula tiroides de pargo alimentado con las dietas experimentales, las imágenes A-B correspondientes a las dietas D-HCA 0 y D-HCA 15 presentaron folículos tiroideos bien definidos con coloide color fuerte en el centro y epitelio tipo cuboidal y columnar, rodeados de tejido conectivo y grandes vasos sanguíneos (venas, arterias), esto se compara a lo obtenido en los peces iniciales, sin embargo en los tratamientos D-HCA 30 y D-HCA 45 (C,D) se presentó un incremento en el número de folículos y una disminución en su tamaño, presentándose hiperplasia folicular.

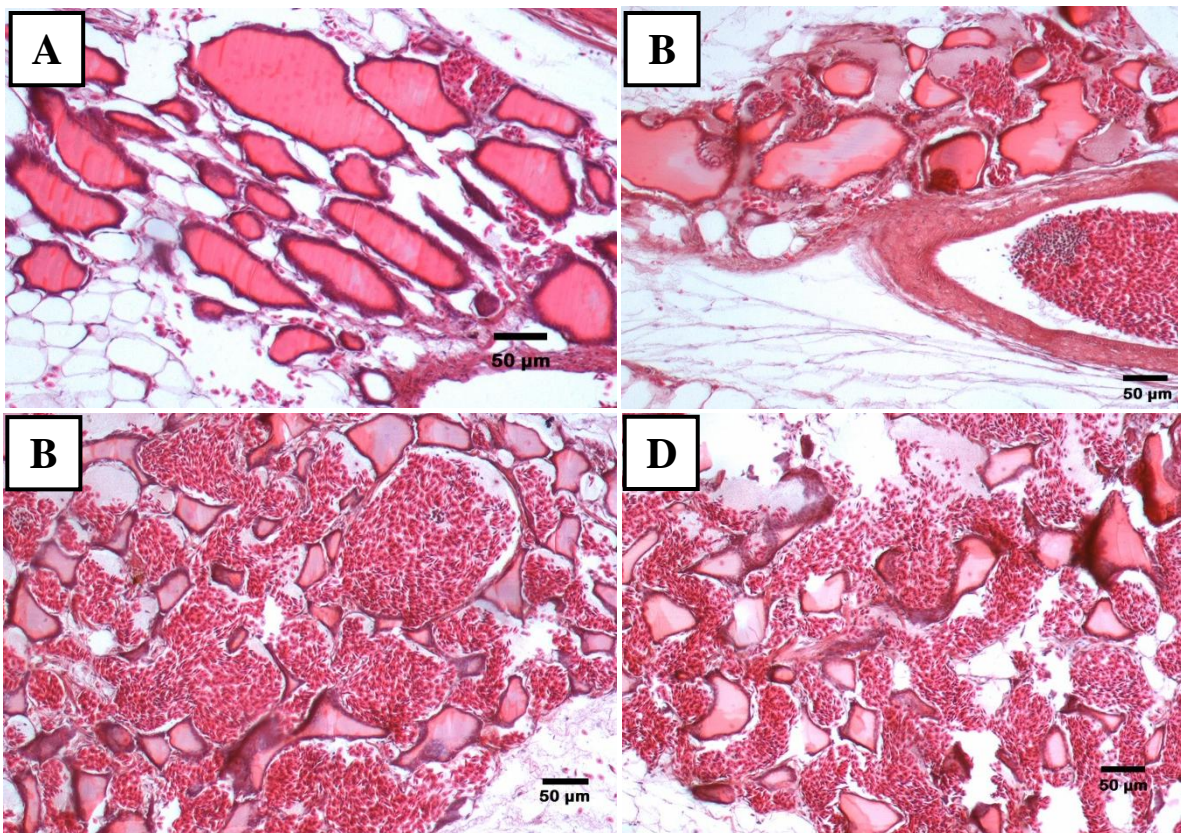


Figura 5. Corte transversal de la glándula tiroides de juveniles de pargo alimentados con los tratamientos: A) D-HCA 0, B) D-HCA 15, C) D-HCA 30 y D) D-HCA 45. H&E. barra 50 µm.

En la Tabla 11 se presenta una comparación del área de los folículos tiroideos obtenidos de los cuatro tratamientos probados en pargo, con los datos obtenidos se demostró que conforme incrementó la inclusión de harina de canola en la dieta, el número de folículos tiroideos se incrementó y el tamaño de estos disminuyó, presentando la D-HCA 30 y D-

HCA 45 folículos atrofiados, siendo estadísticamente diferentes a la D-HCA 0 y D-HCA 15 las cuales presentaron áreas comparables a las obtenidas de los folículos tiroideos (3487.92 ± 1311.13) de los organismos utilizados al inicio del experimento.

Tabla 11. Área de los folículos de la glándula tiroides del pargo flamenco *Lutjanus guttatus*.

Glándula tiroides	Tratamientos			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
Área folículos (μm)	3626.68 ± 878.47^a	3712.57 ± 805.52^a	927.29 ± 438.81^b	996.26 ± 498.09^b

Los valores son la media \pm SD, n=36. Promedios con el mismo superíndice indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos $P > 0.05$.

En la Figura 7 se presenta el corte transversal de un folículo tiroideo de un pez utilizado al inicio del experimento, en donde se observó la forma característica ovalada rodeado con epitelio columnar lleno de coloide color fuerte. La altura del epitelio indicó una glándula de tiroides activa. El folículo se encontró rodeado de vasos sanguíneos y adipocitos.

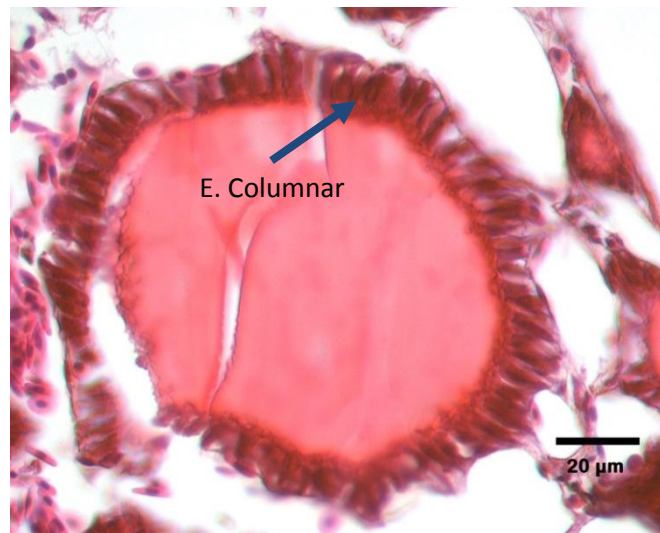


Figura 6. Corte transversal de un folículo tiroideo de los juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* utilizados al inicio del experimento. H&E. barra 20 μm .

Al igual que en la imagen anterior, en la Figura 8 se presenta el corte transversal de los folículos tiroideos de los cuatro tratamientos probados (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45) en pargo, mostrándose especial atención en el epitelio folicular, con respecto a la imagen A (D-HCA 0) se observó la forma característica oval de un folículo, pero en este caso el epitelio es cuboidal lo que indicó que no está activo, sin embargo se observa lleno

de coloide. Mientras que en la imagen B (D-HCA 15) no se observaron diferencias con respecto a los folículos de los peces iniciales (Figura 7), En estos tratamientos el coloide de los folículos son de color fuerte y se encuentran rodeados de vasos sanguíneos y adipocitos. En estos dos casos folículos se consideraron normales.

Para las dieta con el 30% y 45% de inclusión de harina de canola correspondientes a las imágenes C y D, se observó aumento en el número de células epiteliales vacuoladas estratificadas y el coloide fue más pálido, lo cual indicó hiperplasia epitelial.

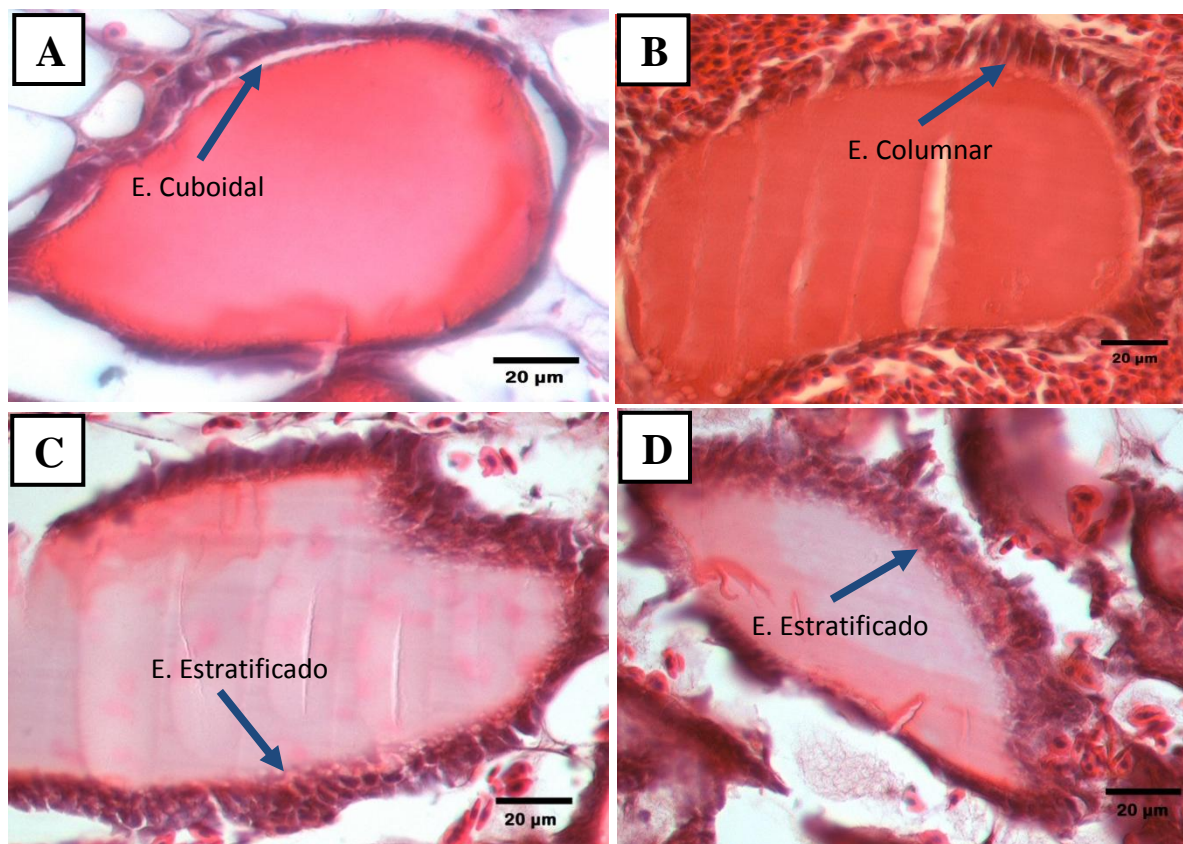


Figura 7. Corte transversal de cuatro folículos tiroideos de pargo alimentados con los tratamientos: A) D-HCA 0, B) D-HCA 15, C) D-HCA 30 y D) D-HCA 45. H&E. barra 20 µm.

7.4.4. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio (DTC) de la glándula tiroides

En la Tabla 12 se presenta el MAV y DTC, obtenido para la glándula tiroides de los peces alimentados con los distintos tratamientos. Se observó como el menor MAV en el tejido tiroideo lo presentaron los peces alimentados con la D-HCA 0 (1.17 ± 0.26), D-HCA 15 (1.17 ± 0.26) y D-HCA 30 (1.83 ± 0.61), presentándose diferencias significativas con respecto a la D-HCA 45 (2.00 ± 0.63). En los tratamientos con mayor inclusión de canola se obtuvo un MAV equivalente a 1.83 y 2.0 lo cual fue indicativo de alteraciones focales en el tejido tiroideo, mientras que la D-HCA 0 y D-HCA 15 no presentaron alteración alguna. Para el grado de cambio de los tejidos (DTC), la D-HCA 0 (8.33) y D-HCA 15 (8.33) obtienen el valor más bajo, sin embargo no fue diferente a la D-HCA 30 (15.00) y D-HCA 45 (16.67), sin embargo los valores de DTC para las dietas con mayores inclusiones de harina de canola consideraron al órgano como moderadamente dañado.

Tabla 12. Valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio en los tejidos (DTC), calculado para la glándula tiroides de pargo alimentado con cuatro dietas experimentales D-HCA 0, D-HCA 15, DHCA 30 y D-HCA 45.

Grados de alteración	Dietas			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
MAV	1.17 ± 0.26^a	1.17 ± 0.26^a	1.83 ± 0.61^{ab}	2.00 ± 0.63^b
DTC	8.33 ± 7.53^a	8.33 ± 4.08^a	15.00 ± 5.48^a	16.67 ± 8.16^a

La tabla muestra la media \pm SD, n=6. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos $P > 0.05$.

7.5. Digestibilidad *in vivo*

En la Tabla 13 se muestran los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA's) obtenidos después de 45 días de experimentación, los coeficientes calculados son coeficiente de digestibilidad aparente de proteína (CDA-P), lípidos (CDA-L) y materia seca (CDA-MS).

Tabla 13. Coeficientes de digestibilidad aparente (CDA's) obtenidos para pargo flamenco alimentados con la dieta control y experimentales.

CDA (%)	Tratamientos			
	D-HCA 0	D-HCA 15	D-HCA 30	D-HCA 45
CDA-P	92.56±0.11 ^b	91.86±0.22 ^b	92.35±0.45 ^b	89.46±0.55 ^a
CDA-L	99.00±0.16 ^b	98.47±0.17 ^b	98.66±0.36 ^b	97.93±0.06 ^a
CDA-MS	58.28±1.23 ^c	49.57±0.68 ^b	50.52±1.36 ^b	41.21±2.56 ^a

Promedios con el mismo superíndice dentro de cada fila indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos $P > 0.05$.

7.5.1. Coeficiente de digestibilidad aparente de proteína (CDA-P), lípidos (CDA-L) y materia seca (CDA-MS)

En base a los resultados obtenidos en la Tabla 13 se demostró que la dieta control obtuvo el mayor CDA-P (92.56%) y lípidos (99%), sin embargo no se presentaron diferencias significativas con respecto a la D-HCA 15 y D-HCA 30, pero si resultó estadísticamente diferente a la D-HCA 45 (89.46% y 97.93% respectivamente). El valor más alto de CDA-MS fue para los organismos alimentados con la D-HCA 0 (58.28%), el cual resultó estadísticamente diferente al resto de los tratamientos D-HCA 15 (49.56%), D-HCA 30 (50.52%) y D-HCA 45 (41.21%), sin embargo la D-HCA 15 y D-HCA 30 no resultaron diferentes.

VIII. DISCUSIÓN

El rápido crecimiento de la acuicultura y las limitaciones en el uso de la harina de pescado (HP) han obligado al sector acuícola a la búsqueda de fuentes de proteínas como sustitutos de la HP y una opción importante se basa en el uso de materias primas vegetales, siendo la harina de canola (HCA) un ingrediente con potencial para la producción de alimentos para peces, sin embargo la presencia de factores antinutricionales presentes en esta harina provoca que su inclusión en dietas acuícolas se vea limitada. Por ello diversos estudios se han realizado en especies como el pargo (Hernández *et al.*, 2010), lobina (Cheng *et al.*, 2010), trucha (Yiğit *et al.*, 2012) y rodaballo (Nagel *et al.*, 2012) obteniéndose resultados favorables los cuales serán discutidos a continuación.

Este estudio demostró que existe una relación inversa entre el crecimiento del pargo y los niveles de HCA en la dieta, por lo que se marcó un límite de inclusión del 30% de proteína de HCA en reemplazo de la HP en dietas para esta especie con peso inicial de 37 g. Tendencias similares han obtenido Webster *et al.* (1997) que señalan que en bagre de canal con peso inicial de 10 g la HCA puede ser incluida hasta en un 36% sin afectar el crecimiento, Nagel *et al.* (2012) que indica un límite del 33% de un concentrado de canola en rodaballo con peso inicial de 32 g y Thiessen *et al.* (2004) que no encuentran diferencias en el crecimiento de la trucha arcoíris con un peso inicial de 106 g con la adición del 30% de un concentrado de canola. Sin embargo Cheng *et al.* (2010) marca un límite menor al 20% de HCA en lobina japonesa con peso inicial de 8.3 g y menciona que estas diferencias podrían deberse a las diferentes especies, edad, composición de la dieta, estrategia de la alimentación, etc.

La supresión de la ingesta de alimento pudo ser la razón principal por la que se redujo el crecimiento de la trucha arcoíris conforme aumentó el nivel de HCA en la dieta (Hilton y Slinger, 1986), sin embargo en este estudio hubo una tendencia creciente en el consumo de alimento individual (CAI) con el aumento de HCA, lo que puede explicarse por la adición de soluble de pescado como attractante, lo cual mejoró el CAI del pargo para obtener más energía debido a la pérdida de energía digestible con el aumento del nivel de HCA en la dieta. Este resultado difiere de estudios previos (Kissil *et al.*, 2000; Nagel *et al.*, 2012) que

muestran que el CAI disminuyó significativamente con el aumento de nivel de HCA en la dieta, pero similar a los hallazgos de Gomes *et al.* (1993) y Cheng *et al.* (2010). Por lo tanto, en este estudio el CAI no explicó la reducción del crecimiento del pargo con el aumento de nivel de HCA en la dieta, si no pudo deberse a una menor digestibilidad.

El incremento de la tasa de conversión alimenticia (TCA) y la disminución del índice de eficiencia proteica (IEP), conforme aumentaron los niveles dietéticos de HCA en el pargo, pudo ser indicativo de la disminución de la digestibilidad de la dieta. Davies *et al.* (1990), Webster *et al.* (1997) y Nagel *et al.* (2012) presentaron en sus estudios la misma tendencia para tilapia, bagre de canal y rodaballo e indicaron que cuanto más alta la TCA del tratamiento es indicador que la palatabilidad y el consumo de alimento disminuyeron, Davies *et al.* (1990) menciona que la TCA y el IEP son parámetros que se vieron notablemente afectados por los altos niveles dietéticos de canola, lo que indicó una reducción progresiva de la utilización de proteínas de la dieta, debido a un desequilibrio de aminoácidos o reducción de la digestibilidad de proteínas. En este estudio la disminución de la digestibilidad fue un factor probable que afectó la TCA y el IEP por la proporción de fibra cruda (10%) presente en la HCA, que de acuerdo con Glencross *et al.* (2009) la fracción insoluble afecta la digestibilidad de proteína, lípidos y energía de los alimentos y Higgs *et al.* (1983) que señala que la canola contiene porcentajes elevados de fibra que aceleran el paso del bolo alimenticio, siendo menor el tiempo de retención de este en el tracto intestinal y disminuyendo con ello la digestibilidad de proteína y energía del ingrediente. Lo cual pudo provocar una utilización menos eficiente de la proteína por parte del pargo, disminuyendo con ello los índices de crecimiento de la especie.

La supervivencia no se vio afectada por los niveles dietéticos de canola (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45), reportándose porcentajes superiores al 90%. Al igual que en este estudio Webster *et al.* (1997), Silva-Carrillo *et al.* (2012) y Nagel *et al.* (2013) demostraron que la evaluación de niveles de inclusión de ingredientes vegetales en la dieta de peces marinos y dulceacuícolas, no afectaron la supervivencia, contrario a estos resultados Cheng *et al.* (2010) encontró que la supervivencia de lobina japonesa (peso inicial 8.3 g) disminuyó significativamente con el aumento de los niveles dietéticos de

HCA. Higgs *et al.* (1982) y Hardy y Sullivan (1983), señalaron que los peces pequeños son más susceptibles al efecto de los antinutrientes de la harina de canola.

La composición corporal de *Lutjanus guttatus* se mostró afectada por los altos niveles dietéticos de HCA (D-HCA 30 y D-HCA 45), resultados similares encontraron Cheng *et al.* (2010) en *Lateolabrax japonicus* y Nagel *et al.* (2012) en *Psetta maxima L* en donde las mayores inclusiones de canola provocaron una disminución significativa de la proteína y lípidos corporales, que de acuerdo con Nagel *et al.* (2012) el rendimiento en la alimentación se ve disminuido con altas inclusiones de proteína vegetal. Con la D-HCA 45 el nivel lipídico corporal del pargo se incrementó significativamente, tendencias similares obtienen Tan *et al.* (2013) en la carpa herbívora y Dabrowski y Kolowska (1981) con la carpa común. Es bien sabido que el principal factor antinutricional de la harina de canola son los glucosinolatos (GLS), que de acuerdo con Francis *et al.* (2001) provocan una serie de efectos negativos en animales de engorda, los cuales finalmente afectan su crecimiento.

El reemplazo de la HP por HCA en la dieta del pargo flamenco no presentó ningún efecto adverso sobre la química sanguínea de esta especie y los valores de hematocrito, proteína plasmática y hemoglobina reportados en este estudio concuerdan con los obtenidos por Del Rio Zaragoza *et al.* (2008) para *Lutjanus guttatus* con un cuadro clínico saludable, al igual Nagel *et al.* (2012) concluyó que altas inclusiones de un concentrado de canola no afecta los parámetros fisiológicos de *Psetta maxima L* en materia de bienestar animal.

Por otra parte los altos niveles de glucosa y triglicéridos (TGC) obtenidos en este estudio pudieron deberse al porcentaje de carbohidratos que presentaron los tratamientos (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, DHCA 45) y un exceso de estos si no son utilizados, se convierten a glucógeno o ácidos grasos que se almacenan como TGC en el tejido adiposo. De acuerdo con Tan *et al.* (2013) a medida que se incrementó la canola en la dieta, también lo hicieron los carbohidratos y TGC, sin embargo en este estudio las condiciones de cultivo en las que se mantuvo a los organismos fue un espacio limitado con mínimos movimientos, por lo que casi no utilizaron energía en su desplazamiento, permaneciendo los TGC en la sangre hasta su almacenamiento como tejido adiposo. Además el estrés que se presentó en

el pargo al momento de la extracción sanguínea pudo provocar los altos niveles de glucosa, considerándose a este parámetro como un dato poco confiable.

El hígado de los peces juega un papel importante en varias funciones vitales del metabolismo básico y el contenido en la sangre de glucosa, colesterol, triglicéridos y proteína total, es generalmente afectado por el metabolismo de carbohidratos, lípidos, y proteínas (Andenen *et al.*, 1992). En este trabajo el funcionamiento del hígado del pargo no se vio afectado por el uso de HCA en la dieta, ya que no se presentaron diferencias entre tratamientos (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45) y de acuerdo con los valores de MAV y DTC indicaron que la acumulación lípidica en el tejido hepático es solo focal, por lo que el órgano se consideró como normal.

Comparado con los mamíferos, los hepatocitos de los peces tienden a ser más vacuolados, y se debe a que tienden a tener más contenido de glicógeno o lípidos (Ferguson, 1989). Esta vacuolación tiende a ser uniformemente distribuida, lo cual ocurre frecuentemente en peces en cautiverio (Wolf y Wolf, 2005). De acuerdo a Wolf y Wolf (2005) muchos peces silvestres y cautivos tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de lípidos (triglicéridos) en sus hígados. Por lo tanto es difícil determinar cuándo dicha vacuolación se considera excesiva y dañina. Estos mismos autores mencionan que no hay un criterio universal para la diagnosis de la lipidosis hepática pero se puede definir arbitrariamente en el punto en que las membranas hepatocelulares aparecen visiblemente desintegradas, resultando en fusión de glóbulos de grasa con los hepatocitos cercanos, sin embargo aún en este caso extremo puede no ser dañino. Hepatocitos con estas últimas características se observaron de manera focal en el presente estudio en los peces de todos los tratamientos incluyendo el control, por lo que no se le puede atribuir a las concentraciones de canola.

Sin embargo, en la literatura se menciona que un exceso de glucosa y triglicéridos en sangre se asocia con la enfermedad del hígado graso y con base en nuestra química sanguínea se obtuvo que en todos los tratamientos los niveles de estos resultaron altos. Cabe mencionar que las condiciones experimentales en las que se mantuvo a los organismos no son las idóneas en cuanto a espacio se refiere, sin embargo si se lleva a los organismos a condiciones de cultivo a mayor escala, estos problemas de acumulación grasa

(hepática y corporal) podrían no presentarse. Pereira *et al.* (2002) al evaluar el efecto de la harina de repollo sobre la histología del hígado de la trucha arcoíris, encontró mayor vacuolización hepática con la dieta control en comparación con la dietas que contenían repollo, menciona que esta vacuolización aumentó con el nivel de almidón gelatinizado de la dieta control, lo que significó que la mayor cantidad de glucosa del almidón se transformó en glucógeno y en lípidos en el hígado, así las dietas D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30 Y D-HCA 45 utilizadas en este estudio tuvieron una cantidad importante de carbohidratos (27-28% E.L.N), lo que es indicativo que la energía utilizada por el pargo posiblemente fue obtenida de la proteína y lípidos de la dieta al ser un organismo netamente carnívoro, lo que ocasionó que los carbohidratos no se utilizaran en su totalidad y un exceso de estos en general se convirtieron a grasa.

La histología de la glándula tiroides del pargo se vio afectada por las mayores inclusiones de HCA en la dieta, con respecto a la D-HCA 0 y a la D-HCA 15 el valor medio de evaluación (MAV) y grado de cambio del tejido (DTC) indicaron que no hubo alteraciones patológicas en el tejido tiroideo, por lo que el órgano se consideró como funcionalmente normal, sin embargo las alteraciones observadas en las dietas D-HCA 30 y D-HCA 45 indicaron hiperplasia folicular e hiperplasia epitelial que de acuerdo con el MAV obtenido fueron solo focales, sin embargo los valores de DTC consideraron al órgano como moderadamente dañado. Al igual que en el caso del hígado, se observó una tendencia creciente en el DTC de las dietas con el 30 y 45% de canola, por lo que se desconocen las consecuencias de otorgar esta dieta por un tiempo más largo.

Higgs *et al.* (1982) al utilizar HCA en trucha, encontró que los peces alimentados con dietas carentes de glucosinolatos (GLS) tuvieron una estructura típica de la tiroides, por el contrario los alimentados con dietas que contenían 300 µg/g de GLS presentaron una tiroides muy activa caracterizada por una clara hiperplasia e hipertrofia folicular, los folículos tenían poco coloide, numerosas figuras mitóticas y alturas significativamente más altas de las células epiteliales. En carpa Dabrowski *et al.* (1982) no observó ningún cambio en la altura de las células epiteliales de los folículos y Gomes *et al.* (1993) no encontró diferencias en la histología de la tiroides cuando alimentó a trucha arcoíris con HCA.

Hardy y Sullivan (1983), mostraron que la función tiroidea en la trucha fue significativamente afectada y encontraron un aumento en la altura de las células epiteliales de los folículos de los peces alimentados con dietas que contenían de 10 a 20% de HCA. Hilton y Slinger (1986) también reportaron alteraciones histológicas de la tiroides en la trucha arcoíris alimentada con HCA. Davies *et al.* (1990) informaron que los altos niveles de canola dietética afectan el tamaño y la forma de los folículos tiroideos, además de que las regiones centrales de coloide parecían ser más erosionadas y menos claramente definidas, comparadas con una dieta control en tilapia mosambica, al igual Gomes *et al.* (1993) indicaron que la incorporación en la dieta de canola pudo llevar a cambios histopatológicos de los folículos tiroideos de la trucha arcoíris.

De acuerdo con Hardy y Sullivan (1983) la canola puede contener varios GLS cuyos productos hidrolíticos pueden suprimir la función de la tiroides. Para el desarrollo y crecimiento normal de los peces se requiere un adecuado estado tiroideo y los estudios de Yurkowski *et al.* (1978) demostraron que las aberraciones histológicas de la tiroides inducidas por los GLS en la trucha arcoíris, puede ir acompañada de una reducción de los niveles de tiroxina (T4) en plasma y por lo tanto en una disminución de la tasa de crecimiento, Hardy y Sullivan (1983) mencionaron que el mantenimiento del crecimiento y los niveles normales de T4 en trucha arcoíris con dietas con el 10 y 20% de HCA indicaron compensación tiroidea para cualquier efecto de los GLS de la dieta sobre la síntesis de hormonas tiroideas, tal compensación fue corroborada en los resultados obtenidos por Higgs *et al.* (1982) quien indicó que en salmón chinook no se reduce el crecimiento, ni las concentraciones de T4 en plasma en dietas con niveles inferiores a 300µg/g, aunque la hipertrofia e hiperplasia de la tiroides puede resultar en los niveles más altos de GLS.

En este estudio la sustitución del 45% de HP por HCA en la dieta afectó la histología tiroidea del pargo, lo cual se vio reflejado en su crecimiento, sin embargo no se midieron los niveles de hormonas tiroideas, ni el porcentaje de GLS en las dietas, lo que hace difícil la comparación de estos resultados con los descritos en el párrafo anterior, por ello se hacen necesarias investigaciones a largo plazo que impliquen mediciones de los niveles de hormonas como la tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) circulantes que ayuden a evaluar el grado de perturbación del metabolismo de la tiroides, así como el mecanismo por el cual

los productos hidrolíticos de los GLS en la dieta afectan la función tiroidea, pues la mayoría de los estudios han utilizado solo análisis histológicos para observar la apariencia de la tiroides o estudios de los niveles de T3 y T4 para evaluar el estado tiroideo. Por lo tanto criterios histológicos por sí solos no son indicadores adecuados de la medición de la actividad y del estado tiroideo (Yurkowski *et al.*, 1978).

Conforme se incrementaron los niveles de HCA en la dieta del pargo, la digestibilidad de nutrientes disminuyó, por lo que se marcó un límite de inclusión del 30% de HCA en reemplazo de la HP en dietas para esta especie. La misma tendencia encontraron Gomes *et al.* (1993) y Yiğit *et al.* (2012) en trucha arcoíris; Cheng *et al.* (2010) en lobina japonesa y Nagel *et al.* (2012) en rodaballo. En la trucha arcoíris Gomes *et al.* (1993) no encontró diferencias en cuanto a digestibilidad de proteína, lípidos y materia seca con inclusiones del 5, 10 y 15% de canola y Yiğit *et al.* (2012) indicó un límite de inclusión del 16% para la digestibilidad de proteína, en lobina japonesa se marcó un límite menor al 20% para digestibilidad de materia seca y proteína, mientras que en rodaballo la digestibilidad de la dieta se vio notablemente afectada con la inclusión de HCA. Los porcentajes límites de inclusión de canola en el pargo, trucha, lobina y rodaballo puede atribuirse a una menor capacidad digestiva de estas especies, al ser organismos netamente carnívoros y tener un sistema digestivo adaptado a la proteína animal.

De acuerdo con Cheng *et al.* (2010) la reducción del crecimiento de la lobina japonesa se debió probablemente a una menor digestibilidad de la HCA. En el presente estudio, los CDA de materia seca, proteína y lípidos en peces alimentados con dietas que contienen HCA fueron significativamente más bajos que los alimentados con la dieta control y los resultados de la Tabla 13 proporcionaron evidencia de que el nivel de HCA en la dieta se relacionó negativamente con la digestibilidad de nutrientes. La disminución de la digestibilidad de la proteína explica probablemente la disminución en el rendimiento del crecimiento del pargo flamenco cuando la HCA fue incluida en las dietas experimentales, por lo tanto se pudo concluir que la digestibilidad fue un factor limitante importante cuando se utilizó harina de canola como fuente de proteína en la dieta del pargo.

Según Gomes *et al.* (1993) la disminución significativa de la digestibilidad de materia seca y energía en la dieta con la máxima inclusión de canola en trucha, fue muy probablemente atribuible a la gran cantidad de fibra no digestible en la HCA, es bien sabido que los peces no secretan celulasa (NRC, 1993) y que los niveles más altos de fibra pueden disminuir la absorción de nutrientes (Cheng *et al.*, 2010). La harina de canola utilizada en este estudio presentó un porcentaje cercano al 10% de fibra cruda y de acuerdo con Glencross *et al.* (2009) la fracción insoluble de la fibra afecta los parámetros de digestibilidad de proteína, aminoácidos, lípidos y energía de los alimentos.

De acuerdo con Mwachireya *et al.* (1999) los altos niveles de fibra ya sea solos o junto con fitatos, tienen los mayores efectos adversos sobre la digestibilidad de la proteína de canola en la trucha arcoíris. Sin embargo en este trabajo las dietas experimentales se suplementaron con fitasa para reducir el problema de la no-utilización del fósforo por el organismo. McCurdy y March, (1992) también reportaron que la sinapina y los taninos pueden reducir la digestibilidad de la proteína y la palatabilidad de la dieta provocando con ello una disminución en el consumo, cabe mencionar que diversos estudios demuestran que el nivel de sinapina que existe en la HCA no afecta la ingestión, ni el crecimiento. En el presente estudio estos factores antinutricionales no se determinaron por lo que se hace difícil su comparación con estudios en los que sí fueron medidos.

Finalmente, a pesar de que los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia, digestibilidad de proteína-lípidos y química sanguínea arrojaron que se puede reemplazar hasta en un 30% a la harina de pescado por harina de canola en la dieta del pargo flamenco, el análisis histológico indicó que inclusiones del 30 (D-HCA 30) y 45% (D-HCA 45) de HCA no son las adecuadas pues generan efectos perjudiciales en el tejido tiroideo, las cuales a largo plazo podrían afectar severamente el estado de salud del pargo, por lo que el 15% fue el porcentaje límite ideal de HCA en la dieta de *Lutjanus guttatus*.

IX. CONCLUSIONES

1. Los organismos que presentaron mayor crecimiento (PG, TC y TCE), fueron los peces alimentados con la D-HCA 0, sin embargo no se presentaron diferencias significativas con respecto a la D-HCA 15 y D-HCA 30.
2. El consumo de alimento (CAI) no se mostró afectado por las máximas inclusiones de harina de canola en la dieta del pargo, por lo que la disminución de la palatabilidad no fue un elemento que elevó la tasa de conversión alimenticia (TCA) de los tratamientos (D-HCA 0, D-HCA 15, D-HCA 30, D-HCA 45), sin embargo la fracción de fibra cruda presente en la HCA, probablemente fue un factor importante que perjudicó los parámetros de digestibilidad de proteína y lípidos de las dietas, afectando con ello el rendimiento en la alimentación.
3. La inclusión de ingredientes vegetales en la dieta de peces carnívoros como el pargo no es un factor que afecte su supervivencia, pues en este estudio se reportaron porcentajes superiores al 90% en todos los tratamientos, lo cual fue corroborado por estudios realizados previamente, en donde se probó a la HCA como fuente alimenticia.
4. Esta investigación demostró que a pesar de que el pargo flamenco es un organismo de hábitos alimenticios carnívoros, tiene una utilización eficiente de la proteína de la harina de canola de entre el 15 y 30% de inclusión en su dieta, pues no se presentaron diferencias en los coeficientes de digestibilidad aparente de lípidos y proteína cuando se alimento a esta especie con la D-HCA 15 y la D-HCA 30.
5. Niveles de reemplazo de hasta el 45% (D-HCA 45) de la harina de pescado por harina de canola en la dieta de *Lutjanus guttatus*, no afectan los parámetros fisiológicos (hematocrito, hemoglobina, proteína total, glucosa y triglicéridos) de esta especie en materia de bienestar animal, sin embargo el crecimiento si resulta afectado.
6. El análisis histológico realizado demostró que el funcionamiento del hígado del pargo no se vio afectado por el uso de HCA en la dieta, por lo que el órgano fue

considerado como funcionalmente normal, no obstante se observó mayor acumulación lípidica con las dietas D-HCA 30 y D-HCA 45, por lo que posiblemente con más tiempo el daño al hígado pase de focal a extendido y de ligero a moderado, por lo que las dietas se deberían evaluar con un tiempo mayor a 10 semanas, para determinar si es factible su uso o no, o durante cuánto tiempo es factible su inclusión sin que ocasione daños irreversibles en el organismo.

7. La histología de la glándula tiroidea se mostró afectada cuando se alimentó al pargo con las dietas D-HCA 30 y D-HCA 45, observándose hiperplasia folicular e hiperplasia epitelial. Al igual que en el caso del hígado, se desconocen las consecuencias de otorgar estas dietas por un tiempo más largo.
8. A pesar de que los resultados obtenidos en cuanto a crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia, digestibilidad de proteína-lípidos, y química sanguínea arrojaron que se puede sustituir a la HP hasta en un 30% por HCA en la dieta de *Lutjanus guttatus*, el análisis histológico indicó que niveles de inclusión del 30 y 45% de HCA no son las adecuadas, pues generan efectos perjudiciales en el tejido tiroideo, los cuales a largo plazo podrían afectar severamente su estado de salud. Por lo que el 15% fue el porcentaje límite ideal de HCA en la dieta de *Lutjanus guttatus*.

X. REFERENCIAS

Abdo de la Parra, I., Rodríguez-Ibarra, E.G., Hernández, C., Hernández-Mendoza, K., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I., y García Ortega, A., 2010. **Effect of dietary and lipid level on growth performance and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus***. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 45(3):433-439.

Abdou Dade, B., Aguirre, P., Blanc, D., Kaushik, S.J., 1990. **Incorporation du colza 00 sous forme de tourteau ou d'amande dans les aliments de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*): performance zootechnique et digestibilité**. Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture 317, 50–57.

Alvarez-Lajonchère L. S., Abdo de la Parra M. I., Rodríguez Ibarra L. E., Velasco Blanco G., Puello-Cruz A. C., González Rodríguez B., Ibarra-Soto A., and Ibarra-Castro L. 2012. **Pilot-scale larval rearing of spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) at Mazatlan, Mexico**. Journal World Aquaculture Society (In Press).

Andenen, D.E., Reid, S.D., Moon, T.W., Perry, S.F., 1992. **Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48, 1811–1817.

AOAC, 2011. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 18th edition.

Austreng, E., 1978. **Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of different segments of the gastrointestinal tract**. Aquaculture 13, 265–272.

Božidar, S., Rašković, M.B., Stanković, Z.Z., Marković & Vesna D.P., 2011. **Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish**. Journal of Agricultural Sciences Vol. 56, No. 1, 2011 Pp. 87-100.

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

Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K.A., Kuhn, E.R., Quinsac, A., Krouti, M. and Ribailier, D., 2000b. **Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilization and thyroid status.** *Aquaculture*, 188: 363-382.

Burel, C., Boujard, T., Tulli, F, Kaushik, S.J., 2000a. **Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*).** *Aquaculture*, 188: 285-298

Cheng, Z., Qinghui, A., Kangsen, M., Wei, X., Hongming, M., Yan, L., Jiaming, Z., 2010. **Effects of dietary canola meal on growth performance, digestion and metabolism of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*.** *Aquaculture* 305 (2010) 102–108.

Cho, C.Y., Slinger, S., 1979. **Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout.** In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), *Finfish Nutrition and fishfeed Technology*, vol. II. Heenemann GmbH, Berlín, pp. 239-247.

Christine, M., Von, H., Grajales, A., Gutiérrez, A., 2011. **Parámetros hematológicos de *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1757) con peso entre 250 g y 350 g, en el Centro Experimental Piscícola de la Universidad de Caldas.** *Vet.Zootec.* 5(1): 47-61, 2011.

Dabrowski, K. and Kozłowska, H. 1981 **Rapeseed meal in the diet of common carp reared in heated waters. I. Growth of fish utilization of the diet.** *Proceedings of the World Symposium on Aquaculture in heated effluents and recirculation systems.* Stavanger, 20- 3' may, 1980. Vol. II, PP. 263-274.

Dabrowski, K., Evans, R., Czarnocki, H. Kozłowska. 1982. **Rapeseed meal in the diet of common carp reared in heated waters. IV. Iodide (125I) accumulation and thyroid histology.** *Z. Tierphysiol., Tiernährg. u. Futtermittelkde.* 48: 1-9. Verlag Paul Parey, Hamburg and Berlin.

Daun, J.K. and D. Adolphe. 1997. **A revision to the canola definition.** *GCIRC Bulletin.* July, 1997. Pages 134-141.

Davies, S.J., McConnell, S., Bateson, R.I., 1990. **Potential of rapeseed meal as an alternative protein source in complete diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus*)**. *Aquaculture*, 87: 145-154.

Del Rio-Zaragoza, O., Hernández, M., Buckle, L., 2008. **Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichlidae) blood parameters**. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, Vol. 41, no. 2, 135-145.

Drury, R. y Wallington, E. 1980. **Bone and decalcification**. *Carleton's Histological Technique*, 150-151.

Enami, H.R., 2011. **A review of using canola/rapeseed meal in aquaculture feeding**. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 6, 22–36.

FAO, 1989. **Nutrición y Alimentación de peces y camarones cultivados**. Manual de Capacitación. Programa Cooperativo Gubernamental. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación-FAO Proyecto Aquila II, Documento de campo No.4.pp.3250.

Ferguson, HW 1989. **Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts** (Iowa State University Press, Ames, IA), p 263.
Google Scholar

Forster, I., Higgs, D.A., Dosanjh, M.R., Parr, J., 1999. **Potential for dietary phytase to improve the nutritive value of canola protein concentrate and decrease phosphorus output in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) held in 11 °C fresh water**. *Aquaculture* 179, 109–125.

Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. **Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish**. *Aquaculture* 199, 197–227.

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

García-Ortega, A., Muy-Rangel, D., Puello-Cruz, A., Villa-López, Y., Escalante-Rojas, M., Preciado-Iñiguez, K., 2010. **Uso de ingredientes de origen vegetal como fuentes de proteína y lípidos en alimentos balanceados para peces marinos carnívoros.** en: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola X - Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-546-0. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 321-340.

Glencross, B., Hawkins, W., Evans, D., Rutherford, N., McCafferty, P., Dogs, K., Karopoulos, M., Veitch, C., Sipsas, S., Buirchell, B., 2008. **Variability in the composition of lupin (*Lupinus angustifolius*) meals influences their digestible nutrient and energy value when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Australia. Aquaculture, 277 (2008) 220–230.

Gomes, E., Corraze, G., Kaushik, S., 1993. **Effects of dietary incorporation of a co-extruded plant protein (rapeseed and peas) on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquaculture, 113 (1993) 339-353.

Hardy, R.W., Sullivan, C.V., 1983. **Canola meal in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) production diets.** Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40: 281-286.

Hernández, C., Abdo de la Parra, I., García Ortega, A., 2003. **Utilización de fuentes de proteína no convencionales y reciclamiento de subproductos en la alimentación de peces y crustáceos.** Boletín CIAD, A.C Vol.12, No. 6.

Hernández, C., Varillas, P., Olvera-Novoa, M., Márquez, D., González-Rodríguez, B., 2010. **Apparent digestibility of various protein ingredient in diets for spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*.** X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. X Symposium on aquatic Nutrition. Noviembre 8-10, 2010. San Nicolás de la Garza, Nuevo León, México. Pp 67.

Higgs, D.A., Fagerlund, U.H.M., McBride, J.R., Plotnikoff, M.D., Dosanjh, B.S., Markert, J.R. and Davidson J., 1983. **Protein quality of altex canola meal for juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) considering dietary protein and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine content.** *Aquaculture*, 34:213-238.

Higgs, D.A., McBride, J.R., Markert, J.R., Dosanjh, B.S., Plotnikoff, M.D. and Clarke, W.C., 1982. **Evaluation of tower and candle rapeseed (canola) meal and Bronowski rapeseed protein concentrate as protein supplements in practical dry diets for juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).** *Aquaculture*, 29: 1-31.

Hilton, J.W., Slinger, S.J., 1986. **Digestibility and utilization of canola meal in practical type diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 1149–1155.

Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchere L. 2011. **GnRHa induced multiple spawns and voluntary spawning of captive spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) at Mazatlan, Mexico.** *Journal of the World Aquaculture Society* 42, 564-574.

Jackson, A.J., Capper, B.S., Matty, A.J., 1982. **Evaluation of some plant proteins in complete diets for the tilapia *S. mossambicus*.** *Aquaculture*, 27: 97-109.

Kader, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Bulbul, M. 2010. **Supplemental effects of some crude ingredients in improving nutritive values of low fishmeal diets for red sea bream, *Pagrus major*.** *Aquaculture*, 308, 136-144.

Kamonporn, T., Supranee, C., Temdoug, S., Pornlerd, C., Somkeat, K., 1999. **Diagnostic procedures for finfish diseases.** Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Thailand.

Kissil, G.W.M., Lupatsch, I., Higgs, D. A., Ardí, 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 *Spaurus aurata* L.** *Aquaculture Research*, 31: 595-601.

Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp.** Baton Rouge: World Aquaculture Society.

Lim, C., Klesius, P.H., Higgs, D.A., 1998. **Substitution of canola meal for soybean meal in diets for channel catfish *Ictalurus punctatus***. J. World Aquaculture. Soc. 29 (2) 161-168.

Luna, L. G. 1968. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**, McGraw-Hill New York.

Maluenda, José. “**Situación mundial del sector de la colza 2013/14**”, [en línea]. Enero 2011, Julio 2013, [03 de julio de 2014]. Disponible en la Web: <http://www.agrodigital.com/Documentos/colza201314.pdf>

Martinez-Palacios, C., Chávez-Sanchez, M., Olvera-Novoa, M., Abdo de la Parra, M., **Fuentes alternativas de proteínas vegetales como sustitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura**. Avances en Nutrición Acuícola III - Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Manejo Ambiental del CIAD, A.C. Sinaloa, México. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Mérida, Yucatán, México.

Mawson, R., Heaney, R.K., Zdunczyk, Z., Kozłowska, H., 1995. **Rapeseedmeal-glucosinolates and their antinutritional effects: part 7. Processing**. Die Nahrung 39, 32–41.

McCurdy, S.M., March, B.E., 1992. **Processing of canola meal for incorporation in trout and salmon diets**. J. AOCS 69, 213–220.

Mwachireya, S. A., Beames, R. M., Higgs, D. A., Dosanjh, B. S. 1999. **Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in freshwater**, Aquaculture Nutrition, 5 (2): 73-82.

Nagel, F., Von Danwitz, A., Tusche, K., Kroeckel, S., Van Bussel, C.G.J., Schlachter, M., Adem, H., Tressel, R.P., Schulz, C., 2012. **Nutritional evaluation of rapeseed protein isolate as fish meal substitute for juvenile turbot (*Psetta maxima* L.) — Impact on**

growth performance, body composition, nutrient digestibility and blood physiology. *Aquaculture*, 356–357 (2012) 357–364.

National Research Council, 1993. **Nutrient Requirement of Fish.** National Academy of Press, Washington, D.C. 114pp.

Naylor R.L., Goldburg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M. C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H. & Troell M. (2000). **Effect of aquaculture on world fish supplies.** *Nature* 405,1017-1024.

Newkirk, R.W., H.L. Classen., T.A. Scott, and M.J. Edney.2003a. **The digestibility and content of amino acids in toasted and non-toasted canola meals.** *Can. J. Anim. Sci.*83:131-139.

OCDE/FAO (2013), **OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022**, Texcoco, Estado de México, Universidad Autónoma Chapingo. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2013-es

Papoutsoglou, E.S. y Lyndond A.R. 2006. **Digestive enzymes along the alimentary tract of the parrotfish *Sparisoma cretense*.** *Journal of Fish Biology* 69, 130-140.

Pereira, O., Rosa, E., Pires, M.A., Fontainhas-Fernandes, A. 2002. **Brassica by-products in diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their effects on performance, body composition, thyroid status and liver histology.** *Animal Feed Science and Technology*, 101 (2002) 171–182.

Poleksic´ V, Mitrovic´-Tutundz´ic´ V. 1994. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Mu¨ller R, Lloyd R (eds) Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish.** Fishing News Books, Oxford.

Poston, H.A. 1986. **Response of rainbow trout to source and level of supplemental dietary methionine.** *Comp. Biochem. Physiol.*, 83A, 739-744.

Quinn, G. G. P., Keough, M. J. 2002. **Experimental design and data analysis for biologists:** Cambridge University Press).

Regost, C., Arzel, J., Kaushik, S.J. 1999. **Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*)**. France. Rev. Aquaculture., 180 (1999) 99-117.

Sánchez-Rodríguez, J.E. 2013. **Efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por una mezcla de krill-soya en la dieta de juveniles de pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)**. (Tesis de maestría no publicada). Universidad Nacional Autónoma de México, Mazatlán, Sinaloa, México.

Satoh, S., Higos, D. A., Dosanjh, B. S., Hardy, R. W., Geoffery Eales, J., Deacon, G. 1998. **Effect of extrusion processing on the nutritive value of canola meal for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in seawater**. Aquaculture Nutrition, 4: 115–122.

Schwaiger J, Wanke R, Adam S, Pawert M, Honnen W, Tribskorn R. 1997. **The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish**. J Aquat Ecosyst Stress Recov 6:75–86.

Silva GA, Martinez CBR. 2007. **Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream**. Environ Toxicol Pharmacol 23:185–192.

Silva-Carrillo, Y., Hernández, C., Hardy, R.W., González-Rodríguez, B., Castillo-Vargasmachuca, S., 2011. **The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)**. Aquaculture 364–365, 180–185.

Simonato JD, Guedes LBC, Martinez BCR 2008. **Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil**. Ecotoxicol Environ Saf 69:112–120.

Sosulski, F., 1979. **Organoleptic and nutritional effects of phenolic compounds on oilseed products: A review**. J. Am. Oil Chem. Soc., 56: 71 I-715.

Spinelli, J., Houle, C.R., Wekell, J.C., 1983. **The effects of phytates on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed purified diets containing varying quantities of calcium and magnesium**. Aquaculture 30, 71–83.

- Tan, Q., Liu, Q., Chen, X., Wang, M., and Wu, Z. 2013. **Growth performance, biochemical indices and hepatopancreatic function of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*, would be impaired by dietary rapeseed meal.** *Aquaculture* 414–415, 119–126.
- Taylor, T.G. and Berk, Z., 1981. **Novel sources of protein in animal and human nutrition.** *Nutrition in health and disease and International development: Symposia from the XII International Congress of Nutrition*, New York, pp. 619-629.
- Thiessen, D., Campbell, G., and Adelizi, P. 2003. **Digestibility and growth performance of juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products.** *Aquaculture Nutrition*, 9: 67-75.
- Thiessen, D.L., Maenz, D.D., Newkirk, R.W., Classen, H.L., Drew, M.D., 2004. **Replacement of fish meal by canola protein concentrate in diets fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture Nutrition* 10, 379–388.
- Tusche, K., Wuertz, S., Susenbeth, A., Schulz, C., 2011. **Feeding fish according to organic aquaculture guidelines EC 710/2009: influence of potato protein concentrates containing various glycoalkaloid levels on health status and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Aquaculture* 319, 122–131.
- Vázquez-Ortiz, F.A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., Hernández, G., 1995. **High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp.** *J. Liq. Chromatogr.* 18, 2059-2068.
- Wanasundara, J.P.D., 2011. **Proteins of Brassicaceae oilseeds and their potential as a plant protein source.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 635–677.
- Webster, C.D., Tiu, L.G., Tidwell, J.H., Grizzle, J.M., 1997. **Growth and body composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed diets containing various percentages of canola meal.** *Aquaculture* 150, 103–112.
- Wolf, C.J. and Wolfe, J.M. 2005. **A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish.** *Toxicol Pathol* 33, 75-85

Yiğit, N. Ö., Bahadır koca, S., Bayrak, H., Dulluç, A., Diler, İ., 2013. **Effects of canola meal on growth and digestion of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry.** *Tübitak* 36(5): 533-538.

Yurkowski, M., J. K. Bailey, R. E. Evans, J. L. Tabachek, G. B. Ayles, and J. G. Eales. 1978. **Acceptability of rapeseed proteins in diets of rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** *J. Fish. Res. Board Can.* 35: 951 -962.

Zar, J.H. 1984. **Biostatistical analysis.** 2nd edition. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. 130 p.