



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“Efecto de la dieta con concentrados de proteína vegetal en el crecimiento y respuesta inmune en crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)”.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**SANDRA YUNUÉN GARCÍA MENDOZA**



**ASESOR: DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2021.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN214718 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM”

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico y agradezco primeramente a mis papás por apoyarme anímica y económicamente durante toda mi carrera; gracias por los esfuerzos que hicieron día con día y por el gusto con que lo hicieron para que lo lograra. Gracias a ti ma, por ser mi más grande pilar en todos los aspectos de mi vida. A mis hermanos, por transmitirme el gusto y la seguridad de querer dedicarme al área de las ciencias. A mis tías y a mi abue por ser mi motivación y mis ganas por salir adelante, y en general gracias a toda mi familia por estar siempre al pendiente de mi desarrollo académico, profesional, y personal.

A mis amigos del laboratorio, Sue, Yaz, Lalo y Charly, por hacer tan amenas las tardes de trabajo, y por haberme brindado su ayuda en cualquier cosa que necesitara. Gracias por ser compañeros y por compartir nuestras ganas de superarnos.

A mis amigas de toda la vida Amairany, Gaby e Ivonne, y a mi amigo Irving, gracias por la lealtad, cariño y apoyo a lo largo de tantos años de amistad.

Y especialmente gracias a ti Dan; mi guía, mi compañero, mi consejero, y mi mejor amigo hasta el día de hoy. Has contribuido enormemente para que yo sea una mujer fuerte, segura, determinante, transparente e inteligente; nunca terminaré de estar agradecida con la vida por haberme permitido compartir esta etapa de mi vida contigo. Gracias por enseñarme tantas cosas, por tu cariño y amor tan cálido, por motivarme día con día. No hace falta escribir todo lo que significas para mí, tú lo sabes.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Héctor, gracias por haber sido paciente conmigo, por aclarar todas mis dudas y por siempre facilitarme todo lo que necesité para culminar exitosamente mi trabajo.

A Alonso, gracias por haber estado constantemente al pendiente de mis avances y por apoyarme siempre sin importar el día o la hora; gracias por compartir tu conocimiento conmigo y por haberme llevado de la mano durante todo mi proyecto.

Al profe Omar, gracias infinitas porque además de siempre haberme ayudado cuando lo necesitaba, estuvo presente en la mayoría de las veces cuando no tenía el deber de hacerlo. Mi aprecio y cariño especial hacia usted.

Al profe Mario, un agradecimiento especial por haberme dado esos 'jalones de orejas', por haberme transmitido un poco de sus conocimientos no solo académicos, y por haberme ayudado a ser una persona más consciente en mis decisiones académicas. Lo estimo como persona y como docente.

## CONTENIDO

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. MARCO TEÓRICO .....	3
3.1. Panorama mundial de la acuicultura .....	3
3.2. Situación de la acuicultura en México.....	3
3.3. Cultivo de trucha arcoíris en México.....	4
3.4. Descripción de la especie.....	4
3.4.1. Distribución geográfica .....	4
3.4.2. Morfología.....	5
3.4.3. Ciclo de vida:.....	5
3.4.4. Hábitat .....	5
3.4.5. Alimentación.....	5
3.5. Uso y problemática de la harina de pescado.....	5
3.6. Productos de origen vegetal como sustitutos de harina de pescado .....	6
3.7. Concentrados de proteína vegetal en dietas para peces carnívoros .....	6
3.7.1. Soya.....	7
3.7.2. Maíz .....	8
3.7.3. Arroz .....	8
4. ANTECEDENTES .....	9
5. JUSTIFICACIÓN .....	11
5. OBJETIVOS.....	12
6.1. Objetivo general.....	12
6.2. Objetivos particulares.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODO.....	13
7.1. Formulación de dietas.....	13
7.2. Obtención de organismos.....	15
7.3. Sistema de recirculación .....	15
7.4. Prueba de alimentación. ....	15
7.5. Parámetros de crecimiento .....	16
7.6. Composición proximal.....	16

7.7. Respuestas inmunológicas .....	16
7.7.1 Actividad de lisozima.....	16
7.7.2 Actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	17
7.8. Análisis estadístico.....	17
8. RESULTADOS .....	18
9. DISCUSIÓN .....	23
10. CONCLUSIONES .....	28
11. REFERENCIAS.....	29
12.1. ANEXO 1. Descripción de la especie.....	37
12.2. ANEXO 2. Contenido de humedad.....	38
12.3. ANEXO 3. Contenido de cenizas.....	39
12.4. ANEXO 4. Cuantificación de proteína cruda.....	40
12.5. ANEXO 5. Cuantificación de lípidos totales .....	42
12.6. ANEXO 6. Nitrógeno amoniacal por método de Nessler .....	44
12.7. ANEXO 7. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) .....	45

## 1. RESUMEN

La harina de pescado (HP) como materia prima en la fabricación de alimentos balanceados en la acuicultura enfrenta un problema debido a la alta demanda alimenticia por parte de la población mundial; por ello surge la necesidad de considerar ingredientes alternativos que suplan la demanda de HP y que sean apropiados para los organismos. Este trabajo plantea la utilización de un concentrado de proteínas vegetales (CPV) en dietas para crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), con el objetivo de determinar sus efectos en el crecimiento y respuesta inmune no específica, así como de evaluarlo como candidato en la sustitución total de HP. Se formularon dos dietas experimentales denominadas CPV y HP; como control se utilizó una dieta comercial (Malta-Cleyton, Biofingerling®). El crecimiento individual promedio, ganancia en peso (GP), tasa de crecimiento específico (TCE), peso final (PF), y contenido proximal de proteína en músculo, fue significativamente mayor en el tratamiento Control con respecto a CPV Y HP; no obstante, se observó valores más altos en el tratamiento CPV que en HP en todos los parámetros mencionados; a pesar de ello, no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos. En cuanto al contenido de lípidos en hígado, no se observó diferencias significativas entre los tres tratamientos, mientras que, para el contenido de lípidos en músculo, se observó valores más altos en los tratamientos CPV y HP con respecto al Control, no obstante, sólo existieron diferencias significativas entre el Control en relación con CPV y HP. Respecto a la actividad de lisozima y SOD, el tratamiento CPV mostró valores más altos, seguido de HP y Control. Finalmente, el tratamiento CPV tuvo el porcentaje más bajo de supervivencia (26%) con respecto a HP (82%) y Control (91.3%).

Palabras clave: dieta, proteína, trucha arcoíris, inmune, crecimiento, soya, lípidos.

## **2. INTRODUCCIÓN**

El cultivo de organismos acuáticos contempla dentro de sus principales objetivos la producción intensiva de especies de elevado valor económico y biológico, además de representar una de las estrategias para disminuir la presión sobre los recursos pesqueros y una alternativa para satisfacer la demanda de los mismos (Jiménez y Nava, 2008).

De acuerdo con la FAO (2018), la población mundial enfrenta una situación de cambio climático, incertidumbre económica y financiera, degradación de los recursos naturales, así como el desafío de proveer alimento a más de 9,000 millones de personas para el año 2050; para ello en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible se han planteado objetivos relativos a la contribución y la práctica de la pesca y la acuicultura en pro de la seguridad alimentaria de tal manera que se garantice un desarrollo sostenible en términos económicos, sociales y ambientales; sin embargo la situación de los recursos pesqueros en la actualidad es poco alentadora, pues muchos de ellos se encuentran mermados por la sobreexplotación y lenta recuperación de especies marinas, así como por la contaminación ambiental.

El desarrollo y consolidación de la actividad acuícola supone una alternativa para ampliar la oferta alimenticia; para ello será necesario mejorar los volúmenes de producción, así como la calidad de las dietas balanceadas suministradas a las especies de cultivo. La optimización de recursos en la fabricación de las dietas permitirá que la acuicultura pueda ser una práctica sostenible bajo el contexto actual (Ortiz-Tirado, 2015). La participación de las instituciones públicas, así como del sector productivo será sumamente importante en los trabajos de investigación y desarrollo tecnológico sobre aspectos como sanidad, genética, manejo ambiental, y nutrición (FAO, 2005).

El presente proyecto plantea la utilización de un concentrado de proteínas vegetales con el fin de evaluar su efecto en el crecimiento y respuesta inmune no específica, así como analizar la posible sustitución total de harina de pescado por

concentrados de proteína vegetal en dietas para crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Panorama mundial de la acuicultura**

Actualmente la acuicultura es el sistema de producción de alimentos con mayor crecimiento a nivel mundial experimentando un crecimiento significativo en las últimas cinco décadas con un aumento en la producción de 9.3% en el 2012, y con una tasa media anual de 8% en los últimos 10 años, frente al crecimiento de 1.4% registrado en la pesca de captura (Chibras-Guillermo, 2015).

La producción acuícola mundial alcanzó un máximo de aproximadamente 80 millones de toneladas en 2016, la cual representó un 47% del total de la producción pesquera mundial (FAO, 2018). El desarrollo de la acuicultura ha superado el crecimiento demográfico, lo que ha dado lugar a un incremento de la producción acuícola per *capita* en los últimos tres decenios en la mayoría de las regiones (FAO, 2016); sin embargo, al ritmo que crece la población mundial, para poder mantener el nivel actual de consumo de alimentos acuáticos per cápita, en 2020 el mundo necesitará 23 millones de toneladas adicionales de dichos alimentos. Este suministro complementario deberá provenir de la acuicultura (FAO, 2012).

#### **3.2. Situación de la acuicultura en México**

En México, la acuicultura aún no se ha consolidado como sector económico importante; sin embargo, se ha desarrollado de manera constante en los últimos años, perfilándose como una de las actividades con mayor potencial y desarrollo (Platas, R. D. E. y Vilaboa, A. J., 2014).

En 2017, la producción acuícola en México generó 404 mil toneladas de pescados y mariscos cultivados en zonas marítimas ribereñas, aguas interiores y estanques, con valor de 17 mil 813 millones de pesos; las principales especies cultivadas en México fueron el camarón (150 mil 76 toneladas); mojarra tilapia (149 mil 95

toneladas); ostión (45 mil 149 toneladas), carpa (30 mil 295 toneladas) y trucha (9 mil 499 toneladas) y los principales estados productores son Sonora, Sinaloa, Jalisco y Veracruz. (CONAPESCA, 2017).

A pesar de su contribución positiva a la sociedad y a la economía, el desarrollo de la acuicultura en México aún no alcanza el potencial para incrementar la producción pues el crecimiento ha sido lento como resultado de factores como la carencia de información, el uso inadecuado de conocimientos básicos científicos y tecnológicos, y la escasez de recursos para su desarrollo, entre otros (FAO, 2005).

### **3.3. Cultivo de trucha arcoíris en México**

Una de las principales especies dulceacuícolas que más se producen en el país, es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), que por su volumen se encuentra posicionada en el lugar 18 de la producción acuícola nacional; sin embargo, por su valor económico se posiciona en el lugar 8 (SAGARPA, 2017). La producción acuícola de trucha es una de las más importantes del país por las 19 mil 118 toneladas producidas con valor de \$876 millones de pesos (SAGARPA, 2018). Se cultiva principalmente en 9 estados de la república asociados generalmente a regiones donde las condiciones climáticas y de los ecosistemas contribuyen al desarrollo del sector (sitios con altitud superior a los 1200 msnm y clima templado a frío), siendo el Estado de México el principal productor nacional con 6,471 toneladas en 2017 representando el 46% en la producción a nivel nacional (CONAPESCA, 2017).

### **3.4. Descripción de la especie**

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), es un pez de agua dulce que pertenece a la familia de los salmónidos. La información taxonómica de la especie se encuentra en ANEXO 1. A continuación se destacan los aspectos más importantes respecto a la biología de la especie (INAPESCA, 2013).

#### **3.4.1. Distribución geográfica**

La trucha arcoíris es originaria de América del Norte; se distribuye naturalmente en la Costa Este del Océano Pacífico desde Alaska hasta la Península de Baja

California en México. En el país, su distribución natural abarca las zonas montañosas más altas de los estados de Durango, Chihuahua, Baja California, Sinaloa y Sonora; también se encuentra en otras regiones del país debido a que fue introducida de manera artificial. Está catalogada como categoría “E” o “Especie establecida en México”.

#### 3.4.2. Morfología

Dorso verdoso con flancos más claros; banda irisada en todo el cuerpo. Presenta numerosas manchas negras en el dorso, flancos y sobre las aletas dorsal, adiposa y caudal. Los machos adultos tienen la cabeza más alargada que las hembras, mandíbula prominente, y coloración más acentuada

#### 3.4.3. Ciclo de vida:

Se reproduce una vez al año durante los meses de octubre a marzo. El desove lo hacen sobre arena o grava en aguas con temperaturas de 8 a 13 °C. Los machos maduran a los 15 - 18 meses, las hembras después de los 2 años.

#### 3.4.4. Hábitat

Habita en ríos, lagos y lagunas de aguas frías, limpias y cristalinas. Prefieren corrientes moderadas y fondos pedregosos.

#### 3.4.5. Alimentación

En su medio natural la trucha es un pez carnívoro que se alimenta de insectos, pequeños peces y anfibios.

### **3.5. Uso y problemática de la harina de pescado en la acuicultura**

El incremento en la industria de la acuicultura ha estado acompañado consecuentemente por un rápido crecimiento en la producción de alimentos acuícolas, en los que la harina de pescado (HP) es utilizada como principal fuente de proteína debido a su perfil adecuado de aminoácidos, su alta digestibilidad y su alto contenido de proteína (Miles y Chapman, 2006)

Históricamente, la HP ha sido la proteína más económica y efectiva (Craft *et al.*, 2016); el precio de la HP en 2002 era de \$6000 pesos por tonelada métrica, pero

en 2020 se alcanzaron precios de aproximadamente \$33000/tonelada, lo que equivale a un aumento de 368% (Indexmundi, 2021). Esto se debe en gran parte a la presión ejercida por la pesca en los mares hacia las especies empleadas para la fabricación de dietas comerciales lo que hace que la demanda de estos insumos sea cada vez mayor. (Aguillón, 2015).

Por otra parte, la generación de grandes cantidades de desechos nitrogenados como consecuencia del alimento fabricado a base de HP ha ocasionado un impacto negativo en el medio ambiente a través de procesos como la eutrofización de los cuerpos de agua (Buschmann, 2001). En este contexto resulta necesario implementar estrategias que faciliten el suministro continuo de productos acuícolas que, bajo una adecuada planificación, estabilice los precios en los mercados y reduzca el impacto de la actividad humana sobre el medioambiente.

### **3.6. Productos de origen vegetal como sustitutos de harina de pescado**

Para que un ingrediente pueda ser candidato como sustituto de la HP, debe poseer características como una amplia disponibilidad, precio competitivo, facilidad de manejo, envío y almacenamiento; además debe poseer ciertas propiedades nutricionales tales como niveles bajos de fibra, almidón y factores antinutricionales (FAN), pues se ha observado que en algunos peces han ocasionado un crecimiento reducido, morfología intestinal anormal, bajo consumo de alimento, mortalidad, entre otros (Francis, *et al.*, 2001); asimismo debe tener un contenido proteínico relativamente alto, un perfil de aminoácidos favorable, una alta digestibilidad de nutrientes y una palatabilidad aceptable. Diversas proteínas de origen vegetal han sido ampliamente estudiadas como posible sustituto de HP en los alimentos acuáticos. Varios productos vegetales tienen alta disponibilidad, precios competitivos y buen valor nutricional, lo que los hace candidatos como posibles reemplazantes, sin embargo, esto implica un problema mayor en peces carnívoros, como la trucha arcoíris (Gatlin, *et al.*, 2007).

### **3.7. Concentrados de proteína vegetal en dietas para peces carnívoros**

Una cantidad importante de estudios se han concentrado en dietas fabricadas con harina de soya (HS), que contiene 462-562 g/kg de proteína cruda (Yang *et al.*,

2007; Faudzi, *et al.*, 2018, Gatlin *et al.*, 2007). La mayoría de estos estudios informan que la inclusión de HS en dietas de trucha arcoíris disminuye el crecimiento, la ingesta de alimento y la eficiencia de la alimentación debido a los FAN, como inhibidores de la proteasa, taninos, lectinas, ácido fítico, y polisacáridos no amiláceos. Así mismo, estos FAN son los responsables de afectar negativamente a la salud intestinal de los peces. Dichos FAN también se encuentran presentes en otras harinas vegetales como la harina de gluten de maíz (Hisano, Pilecco y Ferreira de Lara, 2015) y la harina de arroz (Gai *et al.*, 2012); sin embargo, el valor nutritivo de las harinas vegetales puede mejorarse mediante el fraccionamiento para producir concentrados de proteína, el cual se elabora mediante la extracción en fase alcohol-agua o por lixiviación en medio ácido de la harina; el proceso remueve los carbohidratos solubles y el producto resultante contiene alrededor de 70% de proteína que a su vez resulta en concentraciones de FAN más bajas (Collins *et al.*, 2012). A continuación, se profundiza en las propiedades de los productos a base de soya, maíz y arroz, y que a su vez son comúnmente utilizados en la elaboración de dietas para peces en la acuicultura:

### 3.7.1. Soya

La soya (*Glycine max*) es el principal cultivo de semillas oleaginosas producido a nivel mundial. Una gran parte de esta producción se usa en la extracción de aceite que se procesa para producir una amplia gama de productos de soya, como harina de soya (HS), aislado de proteína de soya (APS) y concentrado de proteína de soya (CPS). Los productos de soya son considerados alimentos económicos y nutritivos, con alto contenido de proteína cruda y un perfil de aminoácidos equilibrado. En general, las concentraciones de los aminoácidos esenciales (AAE) en la HS son bajas (Chen *et al.*, 2010); sin embargo, con el procesamiento de soya a CPS, se acercan o superan los encontrados en la harina de pescado (Dersjant-Li, 2002). Los carbohidratos presentes en la soya se encuentran como oligosacáridos, tales como sacarosa, rafinosa y estaquiosa; sin embargo, estas dos últimas no son digeribles para animales acuáticos debido a la falta de *α*-galactosidasas que son necesarias para metabolizar estos azúcares. Una

preocupación adicional es la baja disponibilidad de fósforo y minerales catiónicos que en gran medida no están disponibles debido a que están unidos en o por ácido fítico (Gatlin, *et al.*, 2007).

### 3.7.2. Maíz

La producción de maíz (*Zea mays*) a nivel mundial es más grande que cualquier otro cereal. En México es el cultivo más representativo por su importancia económica, social y cultural; sin embargo, la producción de maíz amarillo (utilizado en la industria de alimentos balanceados para la producción pecuaria) satisface sólo el 24% de la demanda nacional (SAGARPA, 2017), lo cual hace que Estados Unidos sea el principal proveedor, en donde su producción es más alta que cualquier otro grano o semilla oleaginosa (Gatlin, *et al.*, 2007).

En el proceso de molienda en húmedo, el grano de maíz se separa en sus componentes principales: salvado/fibra, germen, almidón, y gluten; este último se concentra, se filtra y se seca para formar harina de gluten de maíz, la cual se garantiza que contenga un mínimo de 60% de proteína. Actualmente, la harina de gluten de maíz es ampliamente utilizada en alimentos acuícolas para salmón y varias especies marinas. La harina de gluten de maíz es altamente digerible, pero deficiente en la lisina, por lo cual es generalmente usada en rangos de inclusión de 10-15% (Gatlin, *et al.*, 2007).

### 3.7.3. Arroz

Entre las fuentes de proteína vegetal, el concentrado de proteína de arroz (CPA) es una materia prima potencial para la nutrición de peces debido a su alto contenido de proteína (75% de proteína cruda) y de lípidos (11% de extracto de éter). Estos valores de proteína y lípidos son comparables con las cantidades de componentes de harina de pescado (Gatlin, *et al.*, 2007).

#### 4. ANTECEDENTES

- Storebakken, y colaboradores, evaluaron el efecto de una dieta experimental con CPS como principal fuente protéica. En el estudio se suministró alimento a adultos de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con dos dietas distintas: una contenía 75% de inclusión de CPS (experimental), y la otra contenía 100% de HP (control), teniendo así dos tratamientos experimentales. Se encontró que el crecimiento fue similar en el salmón alimentado con las dos dietas, obteniendo una tasa de crecimiento específico (TCE) de 0.89 para la dieta con 100% de HP, y 0.88 para la dieta con CPS. A pesar de que los organismos alimentados con la dieta con CPS presentaron concentraciones decrecientes de elementos (Ca, Mg, y P) en su composición corporal, no se observaron reducciones en el crecimiento individual de los peces.
- En un estudio realizado en 2016 por Metochis y colaboradores, se alimentó a juveniles de salmón Atlántico (*Salmo salar*) con dietas de 50, 65, y 80% de sustitución de harina de pescado (HP) por concentrado de proteína de soya (CPS), las cuales fueron comparadas con una dieta tipo comercial (control) preparada con 35% de reemplazo de HP por CPS; se encontró que las dietas con alta inclusión de CPS (65 y 80%) mostraron reducciones significativas en los parámetros de crecimiento (GP y TCE) de los organismos, sin embargo no comprometieron las respuestas inmunes innatas del salmón; por otra parte la dieta con 50% de CPS promovió un crecimiento similar al de la dieta control por lo que sugieren utilizar hasta este nivel de inclusión de CPS en dietas para juveniles de salmón Atlántico. Los autores recomendaron una alta suplementación de fósforo y otros nutrientes (vitaminas, minerales y aminoácidos) en dietas con sustituciones mayores al 65% de CPS por HP para mejorar el crecimiento, composición elemental y prevenir posibles complicaciones en respuestas inmunes.
- Palmegiano y colaboradores en 2006 evaluaron el concentrado de proteína de arroz (CPA) como el potencial sustituto de harina de pescado en juveniles de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En el experimento se formularon 3 dietas con niveles de inclusión de CPA de 20%(CPA20), 35%(CPA35) y

53%(CPA53) y se probaron contra una dieta sin CPA (CPA0). Las dietas CPA0 y CPA20 mostraron los mejores resultados siendo similares entre ambas, mientras que las dietas CPA35 y CPA65 mostraron un crecimiento significativamente menor. Se concluyó que la dieta puede utilizarse a un nivel de inclusión de hasta un 20% sin una reducción del crecimiento en alimentos de trucha arco iris.

- Saez y colaboradores en 2014, realizaron una prueba para evaluar los efectos de la alimentación con gluten de maíz (GM) sobre el crecimiento en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): se formularon dietas con niveles de GM (0%, 9% y 18%) y se obtuvo que la inclusión de GM hasta el 18% no afectó significativamente el peso corporal final en la trucha arco iris.

## **5. JUSTIFICACIÓN**

Dada la problemática económica, ambiental y social que actualmente implica el suministro de harina de pescado en la formulación de alimentos comerciales para su uso en la acuicultura, el presente proyecto plantea la utilización de un concentrado de proteínas vegetales (a base de soya, arroz y maíz) en dietas para crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), con el objetivo de determinar sus efectos en el crecimiento y respuesta inmune no específica, así como de evaluarlo como candidato en la sustitución total de harina de pescado.

## 5. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Determinar el efecto de dietas con concentrados de proteína vegetal (soya, arroz y maíz) en el crecimiento y respuesta inmune no específica en crías de trucha arcoíris.

### 6.2. Objetivos particulares

- Determinar parámetros de crecimiento en crías de trucha arcoíris alimentadas con concentrados de proteína vegetal.
- Cuantificar el contenido de proteína en músculo e hígado en crías de truchas arcoíris.
- Evaluar la respuesta inmune no específica en crías de trucha arcoíris.

## **7. MATERIALES Y MÉTODO**

El experimento se realizó en el Laboratorio de Producción Acuícola de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

### **7.1. Formulación de dietas.**

Se formularon dos dietas experimentales de acuerdo con Cruz *et al.* (2011); para ello los ingredientes se pesaron en una balanza digital (marca Denver Instrument, modelo TP-6101), se homogenizaron en una mezcladora Kitchen Aid (modelo Pro-450) al mismo tiempo que se agregó agua purificada para formar una masa que se procesó por una extrusora Tor Rey (modelo M-12-F5) con una criba de aberturas de 0.5 mm de diámetro para hacer pellets. La mezcla extruida se colocó en un horno Prendo (modelo HSCF-46) a una temperatura de 60°C durante 24 h. Los pellets se guardaron en bolsas herméticas y se almacenaron en un congelador comercial Criotec (modelo CTC-05) a -24 ° C hasta su uso. La dieta denominada CPV, fue preparada concentrados de proteína vegetal (soya, arroz y gluten de maíz) como única fuente de proteína, mientras que para la dieta denominada HP se empleó harina de pescado como único aporte proteico; ambas dietas fueron formuladas con un porcentaje mínimo de proteína del 43% y 38% respectivamente (Tabla 1). Como control, se utilizó una dieta comercial (Malta-Cleyton, Biofingerling®).

Se determinó composición químico proximal de las dietas según el manual AOAC (1990); los análisis determinados fueron humedad (ANEXO 2), cenizas (ANEXO 3), proteína cruda (ANEXO 4), y lípidos totales (ANEXO 5); este último se determinó mediante la extracción con el método de cloroformo-metanol descrito por Bligh & Dyer (1959).

Tabla 1 Formulación de las dietas con concentrados de proteína vegetal (CPV), y con harina de pescado (HP).

<b>INGREDIENTES</b>	<b>CPV (g/kg)</b>	<b>HP (g/kg)</b>
Harina de pescado	0	615
Concentrado de proteína de soya	200	0
Concentrado de proteína de arroz	200	0
Gluten de maíz	150	0
Aceite de pescado	100	100
Lecitina de soya	50	50
Dextrina	100	100
Mezcla de vitaminas y minerales	40	40
Gluten de trigo (aglutinante)	50	50
Celulosa	110	45
<b>Total</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
Composición proximal en peso seco (%)		
Proteína	43.4 ± 0.03	38 ± 0.8
Humedad	3.4 ± 0.19	6.1 ± 0.5
Cenizas	4.9 ± 0.01	15.4 ± 0.3
Lípidos	17.6 ± 2.1	20.4 ± 2

## **7.2. Obtención de organismos**

Se adquirieron crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de  $0.1 \pm 0.02$  g provenientes de la granja acuícola Xote, municipio de San Miguel Tecpan (Estado de México), y se transportaron al Laboratorio de Producción Acuícola de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en donde se mantuvieron en un tanque de 1000 L adaptado como un sistema de recirculación con aireación constante proveniente de un soplador (Modelo blower Regenair) para su aclimatación.

Durante un periodo de 3 días los organismos fueron alimentados dos veces al día *ad libitum* con dieta comercial (Malta-Cleyton, Biofingerling®) antes de comenzar la prueba de alimentación.

## **7.3. Sistema de recirculación**

El sistema de recirculación consistió en un tanque cilíndrico de 1000 L dentro del que se colocaron 3 tanques de polipropileno de 100 L perforados con agujeros de 1cm de diámetro en las paredes con la finalidad de mantener el flujo de agua en cada tanque para lo cual se colocó una bomba para fuente (Modelo FL7342. Grupo Lomas); de igual manera cada tanque de 100L contaba con 2 aireadores proveniente de un soplador (Modelo blower Regenair) funcionando las 24 horas que duró la prueba de alimentación. Este sistema fue replicado para los 3 tratamientos con sus respectivas repeticiones. Cada sistema contaba con un filtro mecánico/biológico. La limpieza de los sistemas se realizó cada quince días, mientras que los recambios de agua se realizaron dos veces a la semana.

## **7.4. Prueba de alimentación.**

El experimento se realizó durante un periodo de 70 días durante los meses de diciembre de 2017 a marzo de 2018. Cada dieta se ofreció a grupos por triplicado de 50 individuos en una ración diaria del 10% de la biomasa total por tanque; los individuos fueron alimentados dos veces al día a las 09:00 y a las 17:00 horas. Los organismos se pesaron cada 10 días y el tamaño de la ración se ajustó de acuerdo con la nueva biomasa. Se realizó el registro de las condiciones físicoquímicas del agua de cada tratamiento: temperatura (°C) medida diariamente

y nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) calculado cada quince días con el método de Nessler (reactivos Hach, Hach CO., Colorado, USA) (ANEXO 6).

Al finalizar la prueba de alimentación, se seleccionaron organismos al azar para su posterior sacrificio y evaluación de composición proximal y pruebas inmunológicas.

### **7.5. Parámetros de crecimiento**

Los parámetros que se consideraron fueron Ganancia en peso (GP) = ((peso final - peso inicial) / peso inicial) x 100, y Tasa de crecimiento específico (TCE) = ((ln peso final - ln peso inicial) / tiempo de alimentación) x (100).

### **7.6. Composición proximal**

Se determinó la composición proximal de proteína en músculo, así como de lípidos en músculo e hígado en las crías de trucha arco iris. Para tales ensayos se seleccionaron 6 organismos al azar por tratamiento los cuales se sacrificaron mediante punción cefálica; posteriormente se extrajeron muestras de músculo e hígado para calcular contenido de proteína cruda (ANEXO 4) y lípidos totales (ANEXO 5).

### **7.7. Respuestas inmunológicas**

Se sacrificaron 5 organismos por tratamiento para realizar la prueba de actividad de lisozima en suero sanguíneo, sin embargo, para el tratamiento CPV no fue posible obtener suficiente muestra por lo que no se consideraron repeticiones para este parámetro en ninguno de los tratamientos. Por otra parte, se utilizó el hígado de los organismos para realizar la prueba de actividad de superóxido dismutasa (SOD). La técnica para ambos ensayos se describe a continuación:

#### **7.7.1 Actividad de lisozima**

Se realizó una prueba de actividad de lisozima en suero sanguíneo para la cual se colectó muestras de sangre de la vena caudal de las crías de trucha con capilares eparinizados y se dejó coagular a 4 °C por tres horas. Transcurrido este periodo, las muestras se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min y se colectó el sobrenadante (suero). Posteriormente, siguiendo la técnica reportada por Taoka *et al.* (2006), las muestras de suero se mezclaron con una suspensión acuosa de *Micrococcus*

*lysodeikticus* (células liofilizadas, Sigma-Aldrich Chemical, MO, EUA) y se incubaron a 25 °C; la absorbancia se midió a 530 nm a 0.5, 4.5 y 20 min. La actividad de la lisozima se expresó como unidades de actividad de la lisozima (U).

#### 7.7.2 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

Se desarrolló un ensayo para determinar la actividad de SOD en hígado de acuerdo con un Kit de Ensayo Superóxido Dismutasa (Cayman Chemical Company SOD Assay Kit®) (ANEXO 7). Para tal ensayo, el tejido se homogeneizó con una solución buffer (HEPES 20mM, pH 7.2, conteniendo 1mM EGTA, 210mM de manitol y 70mM sacarosa). Las muestras se centrifugaron 1500rpm por 5 minutos para utilizar el sobrenadante. Para iniciar la reacción, se añadió xantina oxidasa a los pocillos de la curva estándar y de las muestras, después se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se leyó la absorbancia a 450nm. Una unidad de SOD se define por la cantidad de enzimas necesarias para exhibir un 50% de disminución del radical O<sub>2</sub>.

#### **7.8. Análisis estadístico.**

Los datos se analizaron con las pruebas de W de Shapiro y Wilk y de Barlett para normalidad y homocedasticidad. De acuerdo con los resultados obtenidos, los datos se probaron con un análisis de varianza (ANDEVA) de una variable y una prueba post-hoc de LSD de Fisher utilizando el programa estadístico Stat Plus.

## 8. RESULTADOS

El crecimiento individual promedio de los organismos alimentados con dieta comercial (Control) fue mayor al de los tratamientos alimentados con CPV y HP; sin embargo, estos últimos tuvieron un crecimiento similar, aunque fue ligeramente mayor el tratamiento CPV (Figura 1). Se observa que durante los primeros veinte días desde que inició la prueba, los tres tratamientos mostraron un crecimiento parecido, pero después de 30 días el tratamiento control experimentó un crecimiento acelerado, mostrando esta tendencia hasta que la prueba finalizó. Por el contrario, en los tratamientos CPV y HP, el crecimiento fue más lento, aunque fue semejante durante toda la prueba.

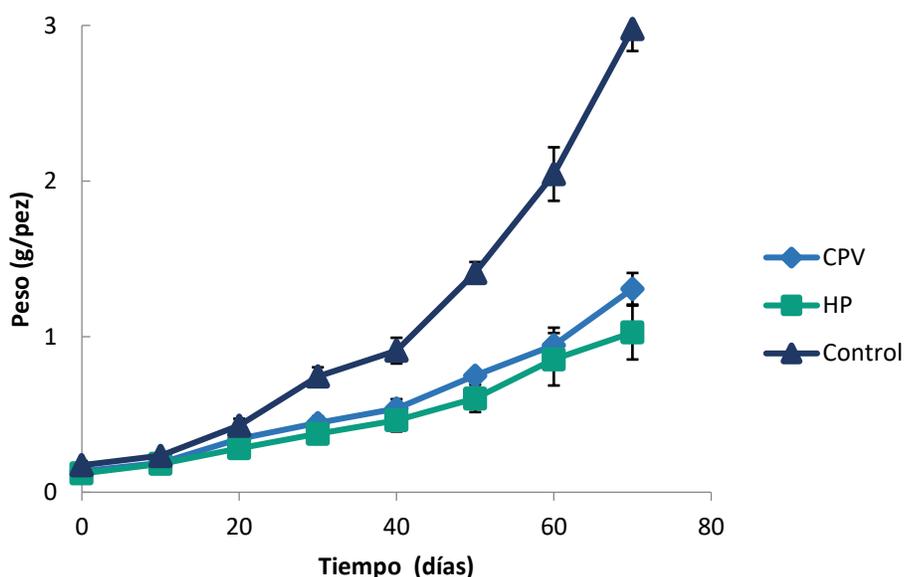


Figura 1. Peso por individuo de crías de trucha arco iris determinado cada 10 días, alimentadas con concentrados de proteína vegetal (CPV), harina de pescado (HP), y dieta comercial (Control).

Respecto a los parámetros de crecimiento (Tabla 2), la ganancia en peso (GP) fue mayor en los organismos alimentados con la dieta comercial (control), seguido por los organismos alimentados con CPV y por último los alimentados con HP; para este parámetro el tratamiento Control fue el único que mostró diferencias

significativas contra los otros dos tratamientos. En cuanto a la Tasa de crecimiento específico (TCE), el tratamiento control resultó significativamente mayor al de los tratamientos CPV y HP, cuyos valores fueron similares entre sí, aunque el tratamiento CPV mostró un valor más alto.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento obtenidos de crías de trucha arcoíris y parámetros fisicoquímicos del agua. Los datos son la media de los grupos por triplicado. Las letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas.

	<b>CPV</b>	<b>HP</b>	<b>Control</b>
<b>GP<sup>1</sup> (%)</b>	864.3±32.3 <b>b</b>	744.1±160.0 <b>b</b>	1612.4±43.6 <b>a</b>
<b>TCE<sup>2</sup> (%/día)</b>	3.2±0.04 <b>b</b>	3.0±0.2 <b>b</b>	4.05±0.0 <b>a</b>
<b>PI<sup>3</sup> (g/pez)</b>	0.14±0.02	0.14±0.02	0.17±0.03
<b>PF<sup>4</sup> (g/pez)</b>	1.31±0.1	1.02±0.18	2.98±0.11
<b>Supervivencia (%)</b>	26	82	91.3

<sup>1</sup> Ganancia en peso

<sup>2</sup> Tasa de crecimiento específico

<sup>3</sup> Peso inicial

<sup>4</sup> Peso final

En relación con el porcentaje de supervivencia, los organismos alimentados con la dieta control mostraron la supervivencia más alta seguida por el tratamiento HP; sin embargo, el tratamiento CPV mostró una baja supervivencia (Tabla 2) observándose una mortalidad mayor durante los primeros días y siendo constante durante toda la prueba de alimentación.

En referencia al contenido proximal de proteína en músculo, los tratamientos CPV y HP arrojaron valores muy parecidos, aunque ligeramente menores en el tratamiento CPV; no existieron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Por el contrario, el contenido de proteína en el tratamiento con dieta comercial fue más elevado que los tratamientos CPV y HP, y por lo tanto estadísticamente significativo (Figura 2).

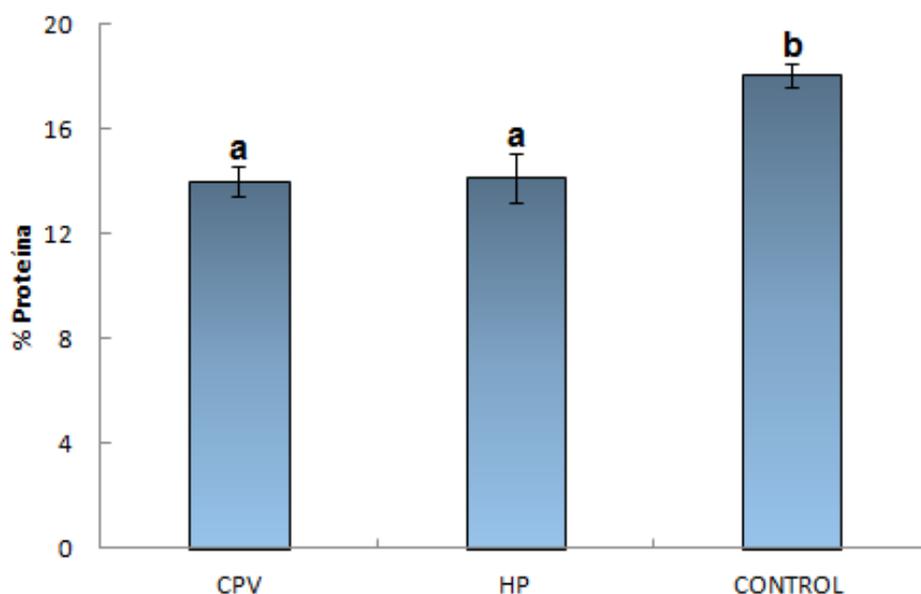


Figura 2. Proteína en músculo en crías de trucha arco iris alimentadas con concentrados de proteína vegetal (CPV), harina de pescado (H.P.), y dieta comercial (Control). Los datos son la media de los grupos por triplicado.

El contenido proximal de lípidos en músculo en los tratamientos CPV y HP fue similar, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre ambos; por el contrario, en el tratamiento con dieta comercial el contenido lipídico fue menor siendo esta diferencia estadísticamente significativa contra los otros dos tratamientos. Por lo que concierne al contenido de lípidos en hígado, la mayor deposición se observó en el tratamiento CPV, seguido de HP y por último el tratamiento con dieta comercial; a pesar de ello, las pruebas estadísticas no arrojaron diferencias significativas entre ningún tratamiento (Figura 3).

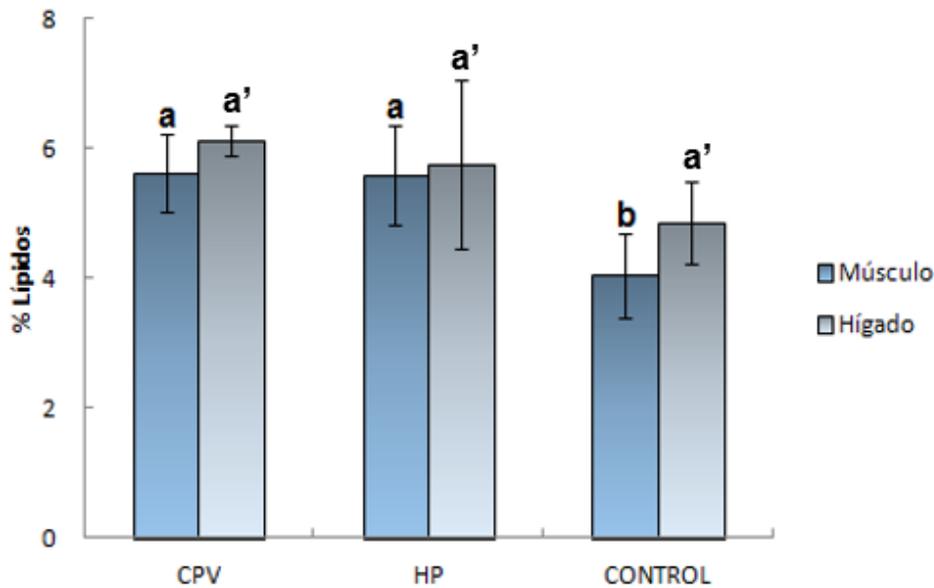


Figura 3. Lípidos en músculo y en hígado en crías de trucha arco iris alimentadas con concentrados de proteína vegetal (CPV), harina de pescado (HP), y dieta comercial (Control). Los datos son la media de los grupos por triplicado.

Las respuestas inmunológicas se muestran en la Tabla 3. La actividad de lisozima en suero sanguíneo fue mayor en el tratamiento CPV, seguido por el tratamiento HP, y menor en el tratamiento control; cabe resaltar que para este ensayo las muestras de suero obtenidas no fueron suficientes para poder tener repeticiones, por este motivo no fue posible realizar análisis estadísticos. Asimismo, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue mayor en el tratamiento CPV, seguida por HP, y más baja en el tratamiento control; no obstante, no existieron diferencias significativas entre tales valores.

Tabla 3. Parámetros inmunológicos obtenidos de crías de trucha arcoíris alimentadas con concentrados de proteína vegetal (CPV), harina de pescado (HP) y dieta comercial (Control).

	<b>U Lisozima (U/ml)</b>	<b>SOD (U/ml)</b>
<b>CPV</b>	9.2	0.94 ± 0.02 <b>a</b>
<b>HP</b>	8.5	0.89 ± 0.11 <b>a</b>
<b>Control</b>	6	0.80 ± 0.16 <b>a</b>

Los parámetros fisicoquímicos del agua en los tanques de experimentación se mantuvieron estables durante la prueba de alimentación para el caso de nitrógeno amoniacal, cuyos valores resultaron ser mayores en el tratamiento Control ( $0.08 \pm 0.01$ ), seguido por el tratamiento HP ( $0.07 \pm 0.01$ ) y más bajos para el tratamiento CPV ( $0.06 \pm 0.01$ ); por otro lado la temperatura registró variaciones entre los tratamientos, siendo ligeramente más altas en el tratamiento HP ( $12.9 \pm 1.8$  °C) y semejantes entre los tratamientos Control ( $12.2 \pm 1.5$  °C) y CPV ( $12.2 \pm 1.6$  °C).

## 9. DISCUSIÓN

En la presente investigación la sustitución total de harina de pescado por concentrados de proteína vegetal no afectó el crecimiento de los peces, sin embargo, sí comprometió la supervivencia de estos. El crecimiento individual promedio de los organismos alimentados con la dieta CPV fue muy parecido al crecimiento de la dieta HP durante toda la prueba de alimentación (Figura 1); esto puede atribuirse a los efectos de los nutrientes e ingredientes de la dieta CPV; pues se esperaría que dos dietas que son equivalentes en nutrientes mantengan el mismo nivel de crecimiento (Collins *et al.*, 2012); por otra parte Salze *et al.* (2010) mencionan que altos niveles de sustitución de harina de pescado en dietas para carnívoros de alto nivel se han logrado llevar a cabo exitosamente al incluir la combinación de varias fuentes alternativas de proteínas, así como se realizó en este trabajo. A pesar de esto, el crecimiento individual observado en ambos tratamientos fue menor que en el tratamiento control.

En cuanto a la GP y TCE, los resultados del tratamiento CPV fueron similares aunque ligeramente menores a los reportados por Enríquez *et al.* (2015) y Sanchez *et al.* (2015) quienes utilizaron concentrado de proteína de soya y harina de soya respectivamente como principal fuente de proteína; sin embargo tales estudios no realizaron un reemplazo total de harina de pescado por ingredientes de origen vegetal y suplementaron sus dietas con enzimas como proteasa y fitasa; podría presumirse entonces que los valores de GP y TCE obtenidos en este trabajo para la dieta CPV son alentadores, pues fueron más altos que en el tratamiento HP (Tabla 2). De acuerdo a lo observado en este proyecto, Craft *et al.* (2016), mencionan que cuando se formulan dietas a partir de múltiples fuentes de proteínas vegetales teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales, los organismos tienen el potencial de generar altas tasas de crecimiento, comparables a las dietas comerciales estándar.

Las proteínas en los peces son fundamentales, pues son utilizadas como la principal fuente de energía para su crecimiento, además de que sus componentes principales, los aminoácidos, determinan su valor nutricional (Gélineau, *et al.*,

2001); por otra parte los lípidos también son importantes ya que funcionan como la segunda fuente más importante de energía y son constituyentes principales de las membranas celulares; los lípidos se encuentran almacenados en diferentes tejidos como el tejido muscular y el hígado principalmente (Venugopal y Shahidi,1996). De este modo, para conocer el estado nutricional de los peces, es conveniente realizar un análisis de composición proximal a los mismos. Los valores obtenidos respecto al análisis de proteína en músculo en las dietas HP Y CPV fueron similares entre sí, observándose una media de 14% ( $\pm 0.2$ ) entre ambos tratamientos (Figura 2); dicho comportamiento resultó parecido al reportado por Aguillón (2015) con valores de  $\approx 15\%$  y Arzel *et al* (1995) con valores de 13% ( $\pm 0.1$ ), quienes utilizaron aislado de proteína de soya (como principal aporte proteico) y harina de pescado en trucha arcoíris y trucha marrón (*Salmo trutta*), respectivamente. Paralelamente el contenido de lípidos en hígado y músculo fue similar y sin diferencias significativas entre los tratamientos HP y CPV (6.2 %  $\pm$  0.9 en hígado, y 5.6 %  $\pm$  0.1 en músculo), así como también respecto a los valores del tratamiento Control para el contenido de lípidos en hígado únicamente (5.2 %  $\pm$  0.3); dichos valores fueron equiparables a los reportados por Enríquez *et al* (2015) ( $\approx 6.2\%$  y  $\approx 4.8\%$  en hígado y músculo, respectivamente), quienes utilizaron CPS (principal fuente de proteína) en alevines de trucha arcoíris; sin embargo los resultados de esta investigación discrepan con los obtenidos por Carrillo (2015) quien utilizó dietas a base de gluten de maíz y en cuyo trabajo se observaron valores lipídicos más altos ( $\approx 10\%$  y  $\approx 33\%$  en hígado y músculo, respectivamente), así como también los valores reportados por Zhou *et al* (1995) (20.2% en músculo) quienes utilizaron una dieta comercial; en ambos trabajos los autores experimentaron con organismos juveniles y adultos, respectivamente a diferencia de esta investigación en donde se utilizaron alevines; esta tendencia podría deberse debido a que el contenido de grasa total está regulado por la edad y tamaño de los peces, de modo que los más jóvenes tienen relativamente pocos lípidos totales en comparación con los adultos así como lo explica Weil *et al* (2012). Lo anterior sugiere que la dieta CPV no afectó la deposición de lípidos en el

hígado y músculo, así como de proteína en músculo de las crías de trucha arco iris.

La actividad de SOD obtenida en los tratamientos CPV y HP fue semejante a la reportada para el grupo control de juveniles de salmón del pacífico (*Oncorhynchus kisutch*) en el trabajo de Nakano *et al.* (2014); sin embargo a pesar de no haberse encontrado diferencias significativas, los valores fueron más altos en el tratamiento CPV (Tabla 3). Se informa que los niveles de sustancias antioxidantes como SOD pueden aumentar para proteger los tejidos contra el daño oxidativo (Nakano *et al.* 2014), lo cual podría estar en parte relacionado a la alta mortalidad encontrada en el tratamiento CPV. De igual manera, la actividad de lisozima en suero sanguíneo fue mayor en el tratamiento CPV que en los otros dos tratamientos; esta tendencia fue similar a la reportada por Bruce, *et al.* (2016) quienes observaron niveles de lisozima más altos en los tratamientos que contenían altas inclusiones de CPS mientras que en el tratamiento sin proteínas vegetales la actividad fue menor. De acuerdo con Krogdahl *et al.* (2000), quienes utilizaron harina de soya, esta puede causar una sobreestimulación de las células inmunes o una respuesta inflamatoria en el intestino, lo que lleva a un aumento de la producción de anticuerpos gástricos y lisozima durante la digestión. Los factores anti nutricionales (FAN) que se encuentran en ingredientes vegetales incluida la soya, podrían ser los responsables de afectar negativamente la función inmune, y aunque algunos pretratamientos son capaces de reducir o eliminar los FAN de las harinas, pueden quedar niveles no deseados de estos (Bruce, *et al.* 2016). La actividad de la lisozima podría depender del grado de estrés y el tipo de estresores en los organismos, aunque sigue siendo una noción controvertida, pues se ha informado que la actividad aumenta y disminuye bajo el estrés (Caruso, *et al.* 2003).

En esta investigación no fue posible realizar una inclusión total exitosa de concentrados de proteína vegetal en crías de trucha arco iris pues la supervivencia para el tratamiento CPV fue muy baja (26%) comparada a los dos tratamientos. Afectaciones en el desarrollo y salud de los peces por altos niveles de inclusión de proteínas vegetales en dietas para salmónidos se ha explicado anteriormente por

la presencia de FAN (Carrillo, 2017). Trabajos como el de Zhang *et al.* (2012); Escaffre *et al.*, (2007), y Daniel, N. (2018) respaldan lo anterior pues demostraron que es posible un reemplazo total en dietas de trucha arco iris sin efectos adversos en crecimiento, composición corporal, respuesta inmune o mortalidad siempre y cuando se adicione o enriquezca a las dietas con aminoácidos esenciales, enzimas exógenas o ciertos aditivos con el fin de contrarrestar los efectos adversos de los FAN. De los ingredientes empleados en este trabajo, el concentrado de proteína de arroz (CPA) es el menos estudiado, sin embargo Gai, *et al.* (2011) mencionan que la inclusión de CPA de hasta del 80% de la proteína de la dieta, no induce cambios histomorfológicos o procesos inflamatorios severos en la trucha arco iris, por lo tanto dicha aseveración podría descartar la posibilidad de que los FAN presentes en el CPA pudieran estar implicados en la mortalidad de los organismos, pues en esta investigación el nivel de inclusión de CPA fue mucho menor. Por otro lado, el gluten de maíz (GM) es un ingrediente desprovisto de FAN, aunque deficiente en lisina, no obstante, si se combina con otros componentes, como el concentrado de proteína de soya (CPS), los niveles de este aminoácido resultan aceptables (Gatlin, *et al.*, 2007). Finalmente, en el CPS el contenido de FAN varía en función del tratamiento previo que se le haya dado; componentes como lectinas, glicina,  $\beta$ -conglucina, oligosacáridos, e inhibidores de tripsina aparecen en niveles bajos además de no verse afectada la disponibilidad de aminoácidos esenciales (FEDNA s.f.); a pesar de ello el ácido fítico presente en el CPS podría ser uno de los posibles factores implicados en la mortalidad de los organismos; esto puede explicarse de la siguiente forma: aproximadamente dos tercios del fósforo total en harinas o semillas oleaginosas (como la soya) están presentes como ácido fítico (fitato); el fósforo en forma de fitato no es biodisponible en animales monogástricos porque carecen de la enzima fitasa, paralelamente el ácido fítico reduce la disponibilidad de otros minerales para especies carnívoras de peces (como trucha y salmón) (Gatlin, *et al.*, 2007); en el estudio realizado por Baeverfjord, *et al.* (1998) se evaluó efecto de la deficiencia de fósforo en salmón del atlántico (*Salmo salar*) y se encontró que los salmónidos mantuvieron un rápido crecimiento somático en un corto período de

tiempo mientras desarrollaron deficiencias severas de Ca, Mg y P, los efectos observados fueron altas tasas de crecimiento y posteriormente una gran mortalidad; tal comportamiento fue similar al observado en este trabajo, por lo tanto se especula que la mortalidad en esta investigación probablemente resultó del deterioro de las funciones metabólicas producto de la escasez de suministro de P tal y como lo menciona Baeverfjord, *et al.* (1998). Por otra parte, la baja digestibilidad de los componentes del CPS y su alto contenido de fibra también pudo haber propiciado la mortalidad de los organismos; Escaffre, *et al.* (1998) señala que altos niveles de inclusión de productos a base de soya pueden afectar la integridad intestinal pudiéndose encontrar todo el tracto digestivo en condiciones inflamatorias generalmente asociadas a enteritis; tales observaciones podrían estar asociadas a los signos observados en los organismos del tratamiento CPV al momento de encontrarse muertos, pues estos aparecían en su mayoría eviscerados en la parte abdominal; lo anterior podría ser respaldado por el trabajo de Salze *et al.* (2010), quienes realizaron reemplazos totales de HP por CPS en juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*) con o sin suplementación de manano-oligosacáridos (MOS), los resultados fueron una supervivencia de 38% en los organismos alimentados sin MOS mientras que los alimentados con MOS mostraron una supervivencia del 61%; los autores señalan que se observó una tendencia beneficiosa en la suplementación de este aditivo debido a que mejoró la digestión y asimilación de altos niveles de proteína vegetal.

Por último, se presume que la edad de los organismos jugó un papel clave en la mortalidad, pues durante la fase inicial de desarrollo de los peces óseos, el intestino es un tubo recto indiferenciado que se desarrolla y madura con el consumo del saco vitelino y el inicio de la alimentación de fuentes externas de alimentos (Ingerslev, *et al.*, 2014); por tal motivo se podría presumir que los organismos pudieron no haber asimilado o aprovechado los nutrientes adecuadamente. Estudios previos han utilizado juveniles (Yang, 2011; Escaffre, 2007) y adultos (Espe *et al.*, 2006) de trucha arcoíris, y hasta donde se tiene conocimiento, en ninguna investigación se ha realizado reemplazos totales de harina de pescado sin adición de suplementos durante los primeros días de vida.

## 10. CONCLUSIONES

- Se presume que la inclusión total de concentrados de proteína vegetal en dietas para crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) no afectó los parámetros de crecimiento, la deposición proteica en músculo y contenido lipídico en hígado y músculo en comparación con la dieta HP.
- La salud de los organismos alimentados con CPV, así como su supervivencia, resultó afectada negativamente debido a la posible presencia de FAN en la dieta. Se sugiere emplear otro tipo de ensayos inmunológicos en futuras investigaciones.
- Se recomienda suplementar con aminoácidos esenciales, enzimas exógenas o ciertos aditivos, las dietas con niveles de reemplazo total de harina de pescado por proteínas vegetales para contribuir a una mejor asimilación de los nutrientes presentes en las proteínas vegetales.
- No se recomienda utilizar la dieta evaluada en la etapa de cría de la trucha arcoíris.

## 11. REFERENCIAS

- Aguilón, H. O. E. (2015). *Suplementación de metionina y taurina en dietas para trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* formuladas con proteína vegetal y su efecto sobre el crecimiento y otras respuestas metabólicas*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. UNAM dirección general de bibliotecas. [https://etesiunam.dgb.unam.mx/F?func=find-b-0&local\\_base=TESBIDI](https://etesiunam.dgb.unam.mx/F?func=find-b-0&local_base=TESBIDI)
- Association of Official Analytical Chemists [AOAC], y Helrich, K. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, VA: The Association.
- Arzel, J., Métailler, R., Kerleguer, C., Le Delliou, H., y Guillaume, J. (1995). The protein requirement of brown trout (*Salmo trutta*) fry. *Aquaculture*, 130(1), 67-78. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00201-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00201-X)
- Baeverfjord, G., Åsgård, T. y Shearer, K. D. (1998). Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr and post-smolts. *Aquaculture Nutrition*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1998.00095.x>
- Bligh, E. G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37(8), 911-917.
- Bruce, T. J., Sindelar, S. C., Voorhees, J. M., Brown, M. L. y Barnes, M. E. (2016). Performance and immunological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed bioprocessed plant-based proteins. *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1–9.
- Burr, G.S., Wolters, W.R., Barrows, F.T. y Hardy, R.W. (2012). Replacing fishmeal with blends of alternative proteins on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) y early or late-stage juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 334-337, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.044>
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J. y Crampton, V.O. (1999). Immunological, physiological, and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean

proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 277-288. 10.1016/s0165-2427(99)00143-9

- Buschmann, A. H. (2001). *Impacto ambiental de la acuicultura el estado de la investigación en Chile y el mundo*. Terram Publicaciones. <https://www.cetmar.org/DOCUMENTACION/dyp/ImpactoChileacuicultura.pdf>
- Carrillo, L. J. A. (2017). *Evaluación el crecimiento y respuestas inmunes en juveniles de trucha arcoíris (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792) alimentadas con dietas con alto contenido de proteína proveniente de gluten de maíz*. [Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México]. UNAM dirección general de bibliotecas. [https://etesiunam.dgb.unam.mx/F?func=find-b-0&local\\_base=TESBIDI](https://etesiunam.dgb.unam.mx/F?func=find-b-0&local_base=TESBIDI)
- Caruso, D., Schlumberger, O., Dahm, C. y Proteau, J-P. (2002). Plasma lysozyme levels in sheatfish *Silurus glanis* (L.) subjectecd to stress and experimental infection with *Edwardsiells tarda*. *Aquaculture Research*, 33(12), 999-1008. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2002.00716.x>
- Chen, C. C., Shih, Y. C., Chiou, P. W. S. y Yu, B. (2010). Evaluating Nutritional Quality of Single Stage- and Two Stage-fermented Soybean Meal. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(5), 598 – 606. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90341>
- Chibras-Guillermo, D. E. (2015). Sustentabilidad de la acuicultura en México: perspectivas desde un caso de estudio en la Costa Chica de Oaxaca. *Interdisciplina* 3(7), 161-191.
- Collins, S. A., Desai, A. R., Mansfield, G. S., Hill, J. E, Kessel, A. G. V. y Drew, M. D. (2012). The effect of increasing inclusion rates of soybean, pea and canola meals and their protein concentrates on the growth of rainbow trout: Concepts in diet formulation and experimental design for ingredient evaluation. *Aquaculture* 344-349, 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.018>
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca [CONAPESCA]. (2017). *Anuario estadístico de acuicultura y pesca*.

[https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_2017.pdf](https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf)

- Craft, C. D., Ross, C., Sealey, W. M., Gaylord, T. G., Barrows, F. T., Fornshell, G. y Myrick, C. A. (2016). Growth, proximate composition y sensory characteristics of Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* consuming alternative proteins. *Aquaculture*, 459. 10.1016/j.aquaculture.2016.03.039
- Cruz, C.C.A., Hernández, H.L.H., Fernández A.M.A., Ramírez, P.T. y Angeles, L.O. (2011). Effects of diets with soybean meal on the growth, digestibility, phosphorus and nitrogen excretion of juveniles rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Hidrobiológica*, 21(2), 118-125.
- Daniel, N. (2018). A review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2): 164-179.
- Dersjant-Li, Y., (2002, del 3 al 6 de septiembre). The use of soy protein in aquafeeds. Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI. [Simposio Internacional de Nutrición Acuícola]. Cancún Q. Roo, México. [https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/VI/archivos/A34.pdf](https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/VI/archivos/A34.pdf)
- Enríquez, R.M.L., Ramírez, V.E.A., Hernandez, H.L.H. y Fernández, A.M.A. (2015). The effect of the substitution of fish oil with a mixture of plant-origin oils in diets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings on growth, phosphorus and nitrogen excretion. *The Israeli Journal of Ahquaculture Bamidgeh*, 1-9.
- Escaffre, A. M., Kaushik, S. y Mambrini, M. (2007). Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrates. *Aquaculture*, 273(1), 127–138. 10.1016/j.aquaculture.2007.09.028
- Espe, M., Lemme, A., Petri, A. y El-Mowafi, A. (2006). Can Atlantic salmon (*Salmo salar*) grow on diets devoid of fish meal? *Aquaculture*, 255, 255–262. 10.1016/j.aquaculture.2005.12.030

- Food and Agriculture Organization of the United Nations. [FAO]. (2005). *Visión general del sector acuícola nacional*. [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_mexico/es](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_mexico/es)
- FAO. (2012). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012*. <http://www.fao.org/3/a-i2727s.pdf>.
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
- Faudzi, N. M., Kian-Yong, A. S., Shapawi, R., Senoo, S., Biswas, A. y Takii, K. (2018). Soy protein concentrate as an alternative in replacement of fish meal in the feeds of hybrid grouper, brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) 3 giant grouper (*E. lanceolatus*) juvenile. *Aquaculture Research*, 49, 431–441. 10.1111/are.13474
- Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal [FEDNA]. (s.f.). *Concentrado de proteína de soja, fermentación*. [http://www.fundacionfedna.org/ingredientes\\_para\\_piensos/concentrado-de-prote%C3%ADna-de-soja-fermentaci%C3%B3n](http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/concentrado-de-prote%C3%ADna-de-soja-fermentaci%C3%B3n)
- Francis, G., Makkar, H. P. S. y Becker, K. (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199(3-4), 197–227. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9)
- Gai, F., Gasco, L., Dapra, F., Palmegiano, G. B. y Sicuro, B. (2012). Enzymatic and Histological Evaluations of Gut and Liver in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Fed with Rice Protein Concentrate-based Diets. *Journal of the world aquaculture society*, 43(2). <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00557.x>
- Gatlin D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Kroghdahl Å., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E.J., Stone D., Wilson, R. y Wurtele, E.

- (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture. Res.*, 38. 551-579. 10.1111/j.1365-2109.2007.01704.x
- Gélineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L. y Kaushik, S. (2001). Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain, lipid deposition and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reproduction Nutrition Development*, 41(6), 487–503. 10.1051/rnd:2001103
  - Hisano, H., Pilecco, J. L. y Ferreira de Lara, J. A. (2015). Corn gluten meal in pacu *Piaractus mesopotamicus* diets: effects on growth, haematology y meat quality. *Aquacult Int.* 10.1007/s10499-016-9970-7
  - Instituto Nacional de Pesca [INAPESCA]. (2013). *Carta Nacional Acuícola. Trucha arcoíris.* [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308084/02trucha\\_arcoiris.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308084/02trucha_arcoiris.pdf)
  - Indexmundi. (2020). *Fishmeal commodity price.* <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal>
  - Ingerslev, H. C., Jørgensen, L. G., Strube, M. L., Larsen, N., Dalsgaard, I., Boye, M. y Madsen, L. (2014). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. *Aquaculture*, 424–425, 24–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032>
  - Jiménez, G. C. P. y Nava, V. J. L. (2008). *Efecto de tres diferentes dietas, sobre bioindicadores de producción (crecimiento), en la alimentación en cautiverio del charal *Chirostoma jordani* (Woolman 1894).* [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. UNAM dirección general de bibliotecas. [https://repositorio.unam.mx/contenidos/efecto-de-tres-diferentes-dietas-sobre-bioindicadores-de-produccion-crecimiento-en-la-alimentacion-en-cautiverio-de-222388?c=EKXWld&d=false&q=\\*&i=7&v=1&t=search\\_0&as=1](https://repositorio.unam.mx/contenidos/efecto-de-tres-diferentes-dietas-sobre-bioindicadores-de-produccion-crecimiento-en-la-alimentacion-en-cautiverio-de-222388?c=EKXWld&d=false&q=*&i=7&v=1&t=search_0&as=1)
  - Metochis, C., Crampton, V. O., Ruohonen, K., Bell, J. G., Adams, A. y Thompson, K. D. (2016). The effects of increasing dietary levels of amino

acidsupplemented soy protein concentrate and constant dietary supplementation of phosphorus on growth, composition, and immune responses of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem*, 42(3), 24-34. 10.1007/s10695-015-0177-z

- Miles, R. D. y Chapman, F. A. (2006). *The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets*. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FA/FA12200.pdf>
- Nakano, T., Kameda, M., Shoji, Y., Hayashi, S., Yamaguchi, T. y Sato, M. (2014). Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. *Redox Biology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.007>
- Ortiz-Tirado, J. C. (2015). *Acuacultura. Producción dulceacuícola en el Ecuador I. Universidad de las Fuerzas Armadas*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10164/3/Acuacultura.pdf>
- Palmegiano, G. B., Dapra, F., Forneris, G., Gai, F., Gasco, L., Guo, K., Peiretti, P. G., Sicuro, B. y Zoccarato, I. (2006). Rice protein concentrate meal as a potential ingredient in practical diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 258(1-4), 357-367. 10.1016/j.aquaculture.2006.04.011
- Platas, R. D. E. y Vilaboa, A. J. (2014). La acuacultura mexicana: potencialidad, retos y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 35, 1065-1071.
- Saez, P. J., Abdel-Aal, E. S. M. y Bureau, D. P. (2014). Feeding increasing levels of corn gluten meal induces suboptimal muscle pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 47(6), 1–12. <https://doi.org/10.1111/are.12653>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA]. (2017). Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2017. [https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_2017.pdf](https://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/dgppe/2017/ANUARIO_ESTADISTICO_2017.pdf)
- SAGARPA. (2018). Impacta positivamente producción acuícola de trucha en economía del sector rural del país.

<http://www.sagarpa.mx/Delegaciones/veracruz/boletines/2018/enero/Documents/2018B009.PDF>

- SAGARPA. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017 – 2030. México. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B\\_sico-Ma\\_z\\_Grano\\_Blanco\\_y\\_Amarillo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256429/B_sico-Ma_z_Grano_Blanco_y_Amarillo.pdf)
- Salze, G., McLean, E., Battle, P.R., Schwarz, M.H. y Craig, S.R. (2010). Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 298. 294–299. 10.1016/j.aquaculture.2009.11.003
- Sánchez, A. D., Arvizu, S. E., Hernández, H. L. E., Fernández, A. M. F. y Ángeles, L. O. (2015). Addition of Yeast and/or Phytase to Diets with Soybean Meal as Main Protein Source: Effects on Growth, P Excretion and Lysozyme Activity in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 215-222. 10.4194/1303-2712-v15\_2\_03
- Storebakken, T., Shearer, K. D. y Roem, A. J. (2000). Growth, uptake and retention of nitrogen and phosphorus y absorption of other minerals in Atlantic salmon *Salmo salar* fed diets with fish meal and soy-protein concentrate as the main sources of protein. *Aquaculture nutrition*, 6(2), 103-108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2000.00135.x>
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K. y Koshio, S. (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72(2), 310-321. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01152.x>
- Venugopal, V. y Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12(2), 175–197. doi:10.1080/87559129609541074
- Weil, C., Lefèvre, F. y Bugeon, J. (2012). Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23(2), 157–173. doi:10.1007/s11160-012-9288-0

- Yang, Y. H., Wang, Y. Y., Lu, Y. y Li, Q. Z. (2011). Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult Int.* 19, 405–419. 10.1007/s10499-010-9359-y
- Zhang, Y., Overland, M., Shearer, K. D., Sorensen, M., Mydland, L. T. y Storebakken, T. (2012). Optimizing plant protein combinations in fish meal-free diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a mixture model. *Aquaculture* 360–361, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.003>
- Zhol, S., Ackman, R. G., & Morrison, C. (1995). Storage of lipids in the myosepta of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(2), 171–178. doi:10.1007/bf00002460

## 12.1. ANEXO 1. Descripción de la especie

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Salmoniformes

Subfamilia: Salmoninae

Familia: Salmonidae

Género: *Oncorhynchus*

Especie: *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792.

Cuerpo alargado, sin espinas dorsales, 12 radios dorsales, 10-12 radios anales, 19 radios caudales con 60-66 vértebras. Lados del cuerpo con pequeños puntos de color negro, dispuestos longitudinalmente, aunque la coloración puede variar de acuerdo al hábitat, tamaño, estado de maduración sexual o si está en confinamiento o en el medio silvestre. Es carnívora generalista oportunista.

## 12.2. ANEXO 2. Contenido de humedad

\*Usar guantes para evitar alterar las mediciones

1. Eliminar la humedad de los crisoles de aluminio en el horno de convección por 2 horas aproximadamente para evitar variaciones en la medición.
2. Obtener el peso inicial de la muestra
3. Poner a secar la muestra en un horno de convección a  $90 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas
4. Sacar la muestra del horno y pesar
5. Introducir la muestra nuevamente en el horno por una hora
6. Sacar la muestra del horno y pesar.
7. Si el peso de la muestra en el paso 6 es diferente del peso de la muestra en el paso 4 continuar secando a intervalos de una hora hasta que el peso sea constante y este valor será peso final. Obtener el porcentaje de humedad total.

Cálculos:

$$\text{Humedad total \%} = \frac{PI - PF}{PF} \times 100$$

Dónde: PI=Peso inicial PF=peso final

### 12.3. ANEXO 3. Contenido de cenizas

1. Pesar muestra seca. Se recomienda un tamaño de muestra de entre 0.5 y 2 g
2. Colocar la muestra en un crisol de porcelana dejándolo ligeramente abierto
3. Introducir el crisol en la mufla y encenderla, programar a 550°C por 6-8 horas
4. Colocar el crisol con la muestra en un desecador para que se termine de enfriar
5. Dejar enfriar por un periodo de 10 a 15 minutos, pesar y registrar

Cálculos:

$$Cenizas \% = \frac{PF \times 100}{PI}$$

Dónde: Donde: PI=Peso inicial PF=peso final

#### 12.4. ANEXO 4. Cuantificación de proteína cruda

Se describe la técnica por el método de Kjeldahl.

Esta técnica consta de tres pasos: digestión, destilación y titulación para conocer el estimado de nitrógeno dentro de una muestra. El procesamiento de la muestra toma alrededor de 5 horas para 8 muestras.

Preparar:

- A. Solución neutralizadora de ácidos (scrubber): 2 L NaOH 15%.
- B. Solución álcali: 5 L NaOH 40% que va en el bidón conectado al destilador.
- C. Solución indicadora:
  - I. Solución A: (0.22 g rojo de metilo/100 ml de etanol) + (0.11 g verde de bromocresol/50ml etanol)
  - II. Solución B: (40 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/700 ml H<sub>2</sub>O) + 200ml etanol

En un matraz aforado agregar 17 ml de la solución A y agregar la solución B, y aforar a 1 L.

- D. Solución para titulación: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N
- E. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (96%) 15 ml/muestra
- F. Verificar que existan suficientes Kjeltabs (2 por muestra)
- G. Configurar destilador: 50 ml NaOH y 5 minutos en el temporizador

Digestión

1. Agregar la solución neutralizadora de ácidos y agua destilada a los depósitos del Scrubber hasta el nivel indicado
2. Colocar 1 g de muestra homogenizada en cada tubo, dejando un tubo sin muestra (blanco)
3. Añadir 2 Kjeltabs a cada tubo

4. Agregar 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a cada tubo
5. Encender el digestor a 420°C
6. Colocar los tubos cuando la temperatura alcance los 200°C, colocar extractor de gases e iniciar el programa (digerir por 1 hora)
7. Encender Scrubber cuando el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comience a evaporarse
8. Una vez finalizada la digestión esperar a que los tubos se enfríen
9. Agregar 70 ml de agua destilada a cada tubo

#### Destilación

1. Colocar un tubo limpio con agua destilada a la mitad. En el otro soporte colocar un matraz limpio de 250 ml
2. Encender el destilador e iniciar purga presionando el botón de en medio. La purga debe realizarse entre cada corrida
3. Colocar 25 ml de solución indicadora en 8 matraces de 250 ml
4. Colocar tubo con muestra y en el otro soporte un matraz con solución indicadora, presionar el botón de arranque
5. Una vez terminada la destilación, desechar el contenido del tubo y reservar el matraz para titular

#### Titulación

1. En constante agitación, titular con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N. hasta virar.

Cálculos:

$$\%N = \frac{(Vm - Vb) \times 140.07}{mg \text{ muestra}}$$

Dónde: V<sub>m</sub>= ml usados para titular muestra. V<sub>b</sub>= ml usados para titular blanco

$$\%proteína \text{ cruda} = \%N * 6.25$$

### **12.5. ANEXO 5. Cuantificación de lípidos totales**

Se describe la técnica por el método de Bligh and Dyer (1959).

\*Usar guantes para evitar alterar mediciones.

1. Lavar viales y tubos de ensayo con jabón libre de fosfatos, posteriormente introducir al sonificador durante 5 minutos
2. Enjuagar los viales con agua corriente, después con agua destilada y para finalizar con alcohol
3. Pesar en una balanza analítica los viales
4. Preparar un vaso de precipitado con cubos de hielo
5. Colocar en un tubo de ensayo 200 de muestra
6. Agregar al tubo 1.5ml de cloroformo y 3 ml de metanol, homogenizar por dos minutos
7. Agregar 1.5 ml de cloroformo y homogenizar por dos minutos
8. Armar y conectar bomba de vacío
9. Colocar filtro Fluoropore Membrane Filters (25mm) entre un matraz Kitasato y una probeta graduada con fondo esmerilado
10. Verter el contenido de los tubos de ensayo, en la probeta y esperar a que se filtre la muestra hacia el matraz Kitasato
11. Verter el contenido de cada muestra en un embudo de separación
12. Agregar 0.8ml de agua destilada manteniendo una proporción de 0.8:1:1 de agua-cloroformo-metanol
13. Agitar vigorosamente y dejar reposar unos segundos para que se formen dos fases; si no se formaran las dos fases, agua destilada gota por gota hasta que se formen
14. Verter la fase más densa en un vial y pesar

15. Poner a secar los viales bajo una corriente de aire constante hasta que se evapore la parte líquida

16. Pesar viales

Cálculos:

$$\% \text{ lípidos totales} = \left( \frac{\text{Peso total de los lípidos}}{\text{Peso de la muestra seca}} \right) \times 100$$

### **12.6. ANEXO 6. Nitrógeno amoniacal por método de Nessler**

1. Se emplea un espectrofotómetro (HACH) con el programa "380 N Amonia de Ness"
2. Preparar un blanco con: 10 ml de agua destilada, 3 gotas de estabilizador de minerales, 3 gotas de alcohol polivinílico y 1 ml de reactivo de Nessler
3. Preparar muestras de agua con: 10 ml de agua, 3 gotas de estabilizador de minerales, 3 gotas de alcohol polivinílico y 1ml de reactivo de Nessler
4. Dejar reposar 1 minuto
5. Calibrar a cero con el blanco, presionando la opción "Zero"
6. Introducir muestras y presionar la opción "Read" los resultados se expresan en mg/l de NH<sub>3</sub>-N.

### 12.7. ANEXO 7. Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

1. Preparar los 5 reactivos indicados en el manual Cayman, SOD Assay Kit®: Buffer de ensayo final, Buffer de muestra final, Detector de radicales, SOD estándar, y SOD de las muestras. El Buffer de ensayo final se usa para diluir el Detector de radicales mientras que el Buffer de muestra final se utiliza para diluir la Xantina oxidasa, SOD estándar, y SOD de las muestras.

2. Homogeneizar el tejido en 7.5 ml de buffer (HEPES 20mM frío, pH 7.2, conteniendo 1mM EGTA, 210mM de manitol, y 70mM sacarosa) por gramo de muestra.

2. Centrifugar la muestra a 1500 rpm por 5min. El ensayo se realiza con el sobrenadante.

3. Preparar curva estándar: diluir 20 µl de la solución SOD estándar en 0.98ml de Buffer muestra diluido para obtener la solución SOD stock; posteriormente se añade el Buffer muestra de acuerdo a la Tabla 4. La preparación de la curva estándar se realiza directamente en los pocillos de una microplaca.

Tabla 4 Preparación de la curva estándar para el ensayo de actividad de SOD. Tomado del manual Cayman, SOD Assay Kit®

<b>Tube</b>	<b>SOD Stock (µl)</b>	<b>Sample Buffer (µl)</b>	<b>Final SOD Activity (U/ml) in Well</b>
<b>A</b>	0	1,000	0
<b>B</b>	20	980	0.005
<b>C</b>	40	960	0.010
<b>D</b>	80	920	0.020
<b>E</b>	120	880	0.030
<b>F</b>	160	840	0.040
<b>G</b>	200	800	0.050

4. Añadir 200 µl del Detector de radicales y 20 µl de Xantina oxidasa en todos los pocillos (estándar y muestra). El volumen final del ensayo es de 230 µl en cada pocillo.

5. Homogenizar el contenido de los pocillos e incubar la microplaca durante 30 minutos a 25°C.

6. Medir la absorbancia a 440-460nm en un lector de microplaca.

Cálculos:

Para los cálculos, se divide la absorbancia del blanco por sí misma y por cada una de las muestras. Los valores se sustituyen en la siguiente ecuación donde 0.23 ml/0.01ml es un factor para convertir de U/ml en el pozo a U/ml en 10 µl agregados a 230 µl de volumen de pozo.

$$SOD (Uml) = \left[ \left( \frac{\text{sampleLR-y-intercept}}{\text{slope}} \right) \times \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \right] \times \text{sample dilution}$$