



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

COMPOSICIÓN NUTRICIA DEL PLANCTON  
DEL LAGO DE PÁTZCUARO,  
MICHOACÁN, MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

*JEANETTE ADRIANA AGUILAR NAVARRO*



MÉXICO, D. F.

2005



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.

*“Hijo mío no todos nacemos con alas... y sería penoso que te limitaras a caminar teniendo esas alas que Dios te ha dado”*

*... mi vuelo no ha cesado.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios y la Virgen por permitirme llegar hasta aquí, por dejarme vivir en este tiempo y espacio, por darme los medios para crecer y realizarme día a día.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por la educación, los valores y la cultura, por el presente y el futuro.*

*A la M. en C. Ángela Sotelo López por el apoyo, por sus consejos y la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto.*

*A Rosita por su asesoramiento, por su apoyo y estímulos que me ayudaron a que este trabajo se concluyera.*

*A Arge, Ericka, Ili, Lety, Betito y Juan por los bellos momentos de convivencia, por el apoyo que me brindaron pero sobre todo por su grandiosa amistad y sinceridad en todo momento.*

*A la Sra. Vicky por el cariño y apoyo, por esa palabra amable, por los detalles que tiene no solo para conmigo y por demostrar que la amistad no tiene que ver con la edad.*

*A Brenda, Abraham, Jorge, Berenice, Cristian, Lupita, Amalia, Manolillo y René porque en estos años de convivencia han estado para brindarme apoyo y afecto, por sus agradables charlas y las buenas y malas experiencias compartidas.*

## DEDICATORIAS

A MI PADRE:

*J. Alfredo Aguilar Sayago*

*Con mi más profundo amor y agradecimiento, con toda mi admiración al valor, entereza y nobleza con que has enfrentado la vida, a ese gran ejemplo que eres, pero sobre todo por estar siempre a mi lado y ayudarme a cumplir esta meta, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir.*

A MI MADRE:

*Ma. Dolores Navarro Godínez*

*Con infinito amor y mi mayor reconocimiento a la sensibilidad y coraje con que vives la vida, por estar conmigo cuando te he necesitado, por tu apoyo incondicional como cómplice y amiga y por todo aquello que nunca podré agradecerte y retribuir suficientemente.*

A MIS HERMANOS:

Liliana: *Por ese lazo especial que nos une, por ser una excelente hermana y amiga y por aprender juntas a compartir tantos sueños, ilusiones y retos.*

Alfredo: *Por escucharme y entenderme, por ser un gran amigo, por cuidarme sin sobreprotegerme y por demostrar que cuando se quiere, se puede.*

Aldo: *Por esa alegría que te caracteriza, por estar siempre presente y por preocuparte continuamente de nuestro bienestar.*

Martín: *Por tu enorme fuerza espiritual, por aferrarte a la vida y por esa gran lección que nos has dado.*

Jesús: *Por la confianza y cariño que siempre has demostrado y por estar siempre en los momentos importantes.*

*Gracias a todos ustedes por el apoyo y amor que me han brindado siempre.*

A: ANGIE, JENHY, SARAY, SONIA, DANIEL, JUAN Y VÍCTOR

*Por los inolvidables momentos que hemos compartido, por la unidad y sinceridad que tenemos, pero más que nada por el apoyo incondicional y el invaluable obsequio que pudieron darme y que hemos cuidado juntos a través de los años... su amistad*

*...porque un hermano no sólo es el que lleva tu misma sangre.*

---

---

## 1. ÍNDICE TEMÁTICO

ÍNDICE	Página
1. ÍNDICE TEMÁTICO	
2. ÍNDICE DE FIGURAS	
3. ÍNDICE DE TABLAS	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	4
<b>ANTECEDENTES</b>	
1. PLANCTON	5
2. ÁREA DE ESTUDIO	7
3. PEZ BLANCO ( <i>Chirostoma estor</i> , Jordan 1880)	
3.1 Descripción	10
3.2 Dieta	11
3.3 Hábitat y reproducción	11
4. REQUERIMIENTOS NUTRIMENTALES DE LOS PECES	
4.1 Proteínas	12
4.1.1 Aminoácidos	13
4.2 Lípidos	15
4.3 Hidratos de carbono	16
4.4 Minerales	17
4.5 Vitaminas	18
<b>METODOLOGÍA</b>	
1. DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN	21
2. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA	22
3. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA	
3.1 Conservación de la muestra	22
3.2 Análisis Proximal	23

---

---

---

3.2.1	Humedad Analítica	23
3.2.2	Grasa Cruda	24
3.2.3	Proteína Cruda	24
3.2.4	Proteína verdadera	25
3.2.5	Cenizas	26
3.2.6	Fibra cruda	26
3.2.7	Hidratos de Carbono	26
3.3	Determinación del perfil de aminoácidos	27
3.4	Determinación de Triptofano	28
3.5	Determinación del perfil de ácidos grasos	29
3.6	Determinación de Vitamina C	29
3.7	Determinación de minerales	
3.7.1	Minerales por Absorción atómica	30
3.7.2	Hierro total	30
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	31
	<b>CONCLUSIONES</b>	49
	<b>RECOMENDACIONES</b>	51
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	52
	<b>ANEXO</b>	
	Anexo. Materiales y métodos	57

---

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Ubicación del plancton en los ecosistemas acuáticos	5
2	Pez blanco ( <i>Chirostoma estor</i> , Jordan 1880)	10
3	Cromatograma del estándar de aminoácidos	36
4	Cromatograma del perfil de aminoácidos en la muestra de plancton	37
5	Cromatograma del estándar de ácidos grasos	42
6	Cromatograma del perfil de lípidos en la muestra de plancton	43
7	Estructura de colesterol encontrada en el plancton por EM	46
8	Estación de trabajo Pico-Tag, empleada en la determinación del perfil de aminoácidos	75
9	Vial de reacción empleado en la preparación de muestras e hidrólisis en la determinación del perfil de aminoácidos	76
10	Vial de reacción en la estación de trabajo	76

---

---

---

---

### 3. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
11	Requerimientos de aminoácidos esenciales de algunas especies de peces de agua dulce (g aa/ 100 g de proteína en la dieta)	14
12	Resumen de la información sobre requerimientos de minerales de los peces	18
13	Análisis proximal del plancton del Lago de Pátzcuaro (g/100g muestra)	31
14	Proteína total y proteína verdadera en plancton del Lago de Pátzcuaro (g/100g muestra)	32
15	Nitrógeno total, nitrógeno proteínico y nitrógeno no proteínico en el plancton del Lago de Pátzcuaro (g/100g muestra)	33
16	Contenido de aminoácidos presentes en la proteína del plancton	38
17	Calificación química de la proteína del plancton del Lago de Pátzcuaro	40
18	Contenido de ácidos grasos y colesterol presentes en el plancton del Lago de Pátzcuaro	44
19	Concentración de minerales en el plancton del Lago de Pátzcuaro	47

---

---

## INTRODUCCIÓN

El Lago de Pátzcuaro se encuentra en el estado Michoacán y, por sus aspectos socioeconómicos, se sitúa como uno de los embalses más importantes en México, especialmente por la pesca. Sus aguas explotadas desde la época Precolombina han producido valiosas especies nativas, como el pez blanco (*Chirostoma estor*), los charales (*Chirostoma grandocule*, *C. attenuatum* y *C. Pátzcuaro*), la acúmara (*Algansea lacustris*), la chegua (*Alloophorus robustus*), el tiro (*Goodea atripinnis*) y el achoque (*Ambystoma dumerilii*). Sin embargo, la comunidad de peces del lago ha sido fuertemente modificada por la introducción de especies exóticas como: la lobina negra (*Micropterus salmoides*), la carpa (*Cyprinus carpio*), la tilapia (*Oreochromis spp*), etc., ya que en la mayoría de los casos dichas introducciones se realizan sin considerar el impacto ecológico que ocasionan, propiciando la extinción total o local de especies nativas.<sup>1,2,3</sup>

La producción de peces en el lago ha variado con el tiempo, a partir de 1981 se registraron 737 ton, producción que fue en ascenso hasta 1988 cuando se registran 2,524 ton, para descender a 392 ton en 1998 (Registro Nacional de Pesca), esta variación es debida a diversas causas como son el aumento paulatino de pescadores, la gran cantidad de artes de pesca, la introducción de especies exóticas al lago, la captura de peces con tallas pequeñas cuando todavía no se reproducen, la carencia de medidas de administración pesquera y alteración en la calidad del agua del lago por el aumento de nutrimentos, sólidos suspendidos y desechos urbanos.<sup>1</sup>

En el Lago de Pátzcuaro los aterínidos representan una pesquería importante, y en especial *Chirostoma estor*, que es conocido localmente con el nombre común de pez o pescado blanco. Esta especie presenta gran importancia desde el punto de vista biológico, debido a su endemismo, y también desde el económico, ya que soporta gran parte de la actividad pesquera de la región.<sup>1,4</sup>

El pescado blanco tiene un alto contenido proteínico, además de un sabor muy apreciado, por lo que se le prefiere sobre otras especies que se extraen del lago. Además es el aterínido con la cotización más alta del mercado regional.<sup>4</sup>

Esta especie se encuentra en peligro de extinción, razón por la cual la pesquería enfrenta grandes problemas de rendimiento. La amenaza de extinción de esta especie está determinada por: a) El desequilibrio ecológico provocado por la introducción de diferentes especies de peces al lago, b) La excesiva explotación por parte de los pescadores, ya que se realiza de forma irracional capturando alevines, juveniles, adultos y reproductores, es decir, todos los estadios de su ciclo de vida en forma indiscriminada, lo cual pone en peligro el desarrollo y la existencia del pez, y c) Los problemas de reglamentación pues no se respetan las épocas de veda, y se utilizan redes no permitidas.<sup>4,5,6</sup>

La Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), realiza desde hace varios años, un programa de reservas de especies nativas, denominados cultivos, refiriéndose a “poblaciones de organismos criados y mantenidos bajo condiciones controladas” con la finalidad de evitar la extinción de especies como el pez blanco del Lago de Pátzcuaro.<sup>5</sup>

Actualmente se realizan trabajos que tienen la finalidad de encontrar una solución efectiva para evitar la extinción de esta especie, y al mismo tiempo incrementar las poblaciones de peces en el lago, elaborando y perfeccionando técnicas de cultivo para el pez blanco, primordialmente en sus primeras etapas: larvaria y juvenil. Sin embargo, para una planificación pesquera es fundamental el conocimiento de las especies nativas, sus costumbres y necesidades ecológicas para sustentar una explotación racional y propiciar su cultivo. En este ámbito, la alimentación es uno de los aspectos más importantes, por lo que el conocimiento de las variaciones alimenticias, evaluadas desde una perspectiva nutrimental, ayudará a plantear estrategias adecuadas para su cultivo.

En los peces, al igual que en los demás seres vivos, la alimentación es el proceso por el cual adquieren energía y nutrimentos necesarios para el crecimiento, reproducción y funciones metabólicas, por ello resulta de vital importancia conocer los nutrimentos que contiene la fuente alimenticia de los peces en su hábitat natural; es decir, los nutrimentos que contiene el plancton con el cual se alimentan en el lago.

El principal objetivo de este trabajo es determinar los nutrimentos contenidos en el plancton del Lago de Pátzcuaro, debido a que existe una necesidad inmediata de propagar esta especie. En segundo término, contribuir con dicha información a la producción acuícola de esta especie nativa, que ha presentado serios problemas originados por la imposibilidad de cubrir los requerimientos básicos para su supervivencia y reproducción en cautiverio. Hasta el momento, ha resultado imposible repoblar con crías, juveniles o adultos de esta especie, razón por la cuál se considera primordial conocer la composición nutrimental del plancton existente en la región.

## OBJETIVOS

### GENERAL

- Determinar la composición nutricia del plancton del Lago de Pátzcuaro con el fin de conocer los nutrimentos de los cuales dispone el pez blanco en su hábitat natural y contribuir con dicha información al incremento de la supervivencia y recuperación de la producción de esta especie en el lago, ya sea implementando nuevas técnicas acuícolas o mejorando las existentes.

### PARTICULARES

- Determinar la composición nutricia del plancton del Lago de Pátzcuaro.
- Identificar y cuantificar los aminoácidos presentes en el plancton del Lago de Pátzcuaro.
- Identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en el plancton.
- Contribuir con la información obtenida en este estudio, en la elaboración de un plan alimentario de recuperación y producción acuícola de esta especie en peligro de extinción.

---

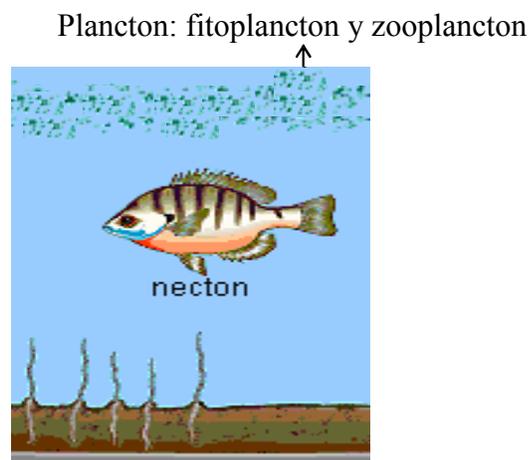
---

## ANTECEDENTES

### 1. PLANCTON

Tanto los océanos como los lagos poseen un gran conjunto de organismos microscópicos y macroscópicos que permanecen suspendidos en el agua. Estos organismos constituyen el plancton. El plancton es uno de los principales componentes dentro de los ecosistemas acuáticos, se le considera como la parte medular de las cadenas alimenticias, ya que constituye la unidad básica de producción de materia orgánica en los ecosistemas acuáticos. Hensen (1887) lo define como “partículas que viajan errantes en el agua”, actualmente se le conoce como el conjunto de organismos autótrofos (fitoplancton) y heterótrofos (zooplancton) cuya capacidad de desplazamiento en contra de la corriente es nula o baja, por lo que son transportados pasivamente por los movimientos del agua que los contiene (Figura 1).<sup>7,8,9</sup>

Figura 1. Ubicación del plancton en los ecosistemas acuáticos.



Necton: Son organismos capaces de nadar libremente y, por tanto, de trasladarse de un lugar a otro recorriendo a veces grandes distancias (migraciones). Los peces son los principales representantes de esta clase, aunque también encontramos algunas especies de anfibios y otros grupos.

Debido a la naturaleza de sus componentes y modalidades de nutrición se distinguen dos grupos de organismos planctónicos: a) El Fitoplancton, que se define como el plancton capaz de sintetizar su propia sustancia orgánica por fotosíntesis a partir del agua, gas carbónico y energía luminosa. b) El Zooplancton o plancton animal, que está constituido por organismos heterótrofos que no pueden sintetizar su propia sustancia orgánica, y la obtienen del medio exterior por ingestión de partículas vivas o muertas.<sup>10</sup>

El fitoplancton es el primer eslabón de la cadena trófica. De él depende el zooplancton y la comunidad pelágica. La contribución del fitoplancton como alimento para muchos organismos acuáticos es ampliamente conocida, los organismos que lo forman contienen sustancias nutritivas, especialmente carbohidratos, lípidos y proteínas, que son necesarios en la nutrición de los organismos cultivados.<sup>11</sup>

El fitoplancton esta representado por diatomeas, dinoflagelados, algas verde-azules, clorofitas, cianofíceas, etc. Las diatomeas y dinoflagelados son los productores más importantes de materia orgánica, y son considerados los pilares fundamentales del ecosistema.<sup>8,12</sup>

El zooplancton representa una comunidad conformada por una extensa variedad de seres (incluyendo estadios larvarios, juveniles o adultos de especies bentónicas y pelágicas). Está representado por *protozoarios*, *celenterados*, *rotíferos*, *briozoarios* y, sobre todo, por algunos grupos de *crustáceos* como los cladóceros, los copépodos y los ostrácodos. Además, en aguas continentales, también incluye larvas de muchos insectos, huevos y larvas de peces. La mayoría de los organismos que pertenecen al zooplancton se alimentan de otros animales más pequeños, ya sea fitoplancton o incluso zooplancton de menor tamaño.<sup>11,12</sup>

Al igual que el fitoplancton, el zooplancton se distribuye en el medio natural en función de la hidrodinámica. En los ambientes acuáticos, las comunidades zooplanctónicas presentan variaciones espacio-temporales tanto en su composición como en su biomasa.<sup>11</sup>

Los métodos de colecta de las comunidades planctónicas dependen del tipo de información que se desee obtener. La forma tradicional de captura es el empleo de redes con mallas de diferente abertura. Cada tipo de malla realiza una selección. Las redes son arrastradas a través del agua a una determinada profundidad. Las redes de malla fina de 35, 50 y 90  $\mu\text{m}$  retienen una parte del fitoplancton y elementos menores del zooplancton, como ciliados y rotíferos, junto con animales mayores. El fitoplancton se recolecta con redes de malla fina (600  $\mu\text{m}$  o 300  $\mu\text{m}$ ) que sólo retienen algas de tamaño relativamente grande o que están reunidas en colonias extensas; mientras que, para muestras de zooplancton se pueden usar redes de malla fina de 50-60  $\mu\text{m}$  que proporciona muestras adecuadas de rotíferos y nauplios o redes mayores (200-300  $\mu\text{m}$ ) que se usan para separar selectivamente animales más corpulentos.<sup>11,13</sup>

## 2. ÁREA DE ESTUDIO

El Lago de Pátzcuaro, se encuentra dentro del Eje Neovolcánico Transversal, en la población centro-norte del estado de Michoacán. De origen tecto-volcánico, se cree que formaba parte de un sistema de cuencas lacustres que alguna vez estuvieron unidas con la red fluvial del Río Lerma, que al dividirse dio origen a los actuales lagos de: Chapala, Pátzcuaro, Zirahuén, y Cuitzeo.<sup>1,14</sup>

El Lago se asemeja en su forma a una letra “C”, tiene una profundidad máxima de 10.8 m en la parte norte, y 2 a 3 m por la parte sur, situándose a 2035 metros del nivel del mar. El clima de la cuenca es del tipo templado subhúmedo con lluvias en verano, con una

temperatura promedio de entre 12 y 18°C. Por lo que se refiere a la temperatura del agua, ésta esta relacionada con las estaciones del año; la máxima es de 22°C llegando a los 28°C en la superficie, y de 20°C en el fondo, durante el periodo de calentamiento que va de marzo a junio, la temperatura mínima se presenta en enero y es de 14°C en la superficie y de 12.5°C en el fondo.<sup>3,5,6</sup>

El Lago es rico en plancton. El fitoplancton del lago esta representado por 113 géneros y 78 especies, siendo más abundante en la parte Oeste de la Isla de Janitzio, dentro de las especies más comunes se encuentran: *Monoraphidium sp.*, *Melosira granulata*, *Epithemia turgida*, *Epithemia zebra*, *Navicula pupula* y *Tetraedria gigas*. Dentro del zooplancton destaca el grupo de los rotíferos y las especies más abundantes son *Keratella cochlearis* y *Keratella stipitata*, le siguen en abundancia los copépodos y cladóceros sobre todo *Bosmia longirostris*. También existen larvas de insectos representadas por las órdenes: Ephemeroptera, Odonata, Hemiptera, Trichoptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera y Neuroptera. En total se reportan 13 géneros y la mayor densidad se encuentra en el noroeste de la isla La Pacanda. En las orillas existe un gran número de plantas palustres y emergentes como: *Nymphaea*, *Typha* y vegetación sumergida representada por *Chara* y *Potamogeton* principalmente.<sup>3,6</sup>

Desde el punto de vista ecológico se han llevado a cabo estudios sobre plancton, ictiofauna, vegetación, fisiografía, clima, asimismo existe información sobre aspectos de hidrología y meteorología.

En el año de 1937 se instaló en Pátzcuaro la primera Estación Limnológica del país, con el propósito de llevar a cabo estudios hidrobiológicos y de las especies nativas en los lagos de Pátzcuaro, Chapala, Zirahuén, y Cuitzeo. A partir de esta fecha, el Lago de Pátzcuaro ha sido objeto de estudios de diversa índole, tales como variaciones en los parámetros

químicos y físicos en las diferentes porciones lacustres y las especies predominantes del plancton de manera muy general.

En México los estudios limnológicos, en particular los referentes al plancton, han tenido poco desarrollo. Existe un Prospecto Biológico, realizado en 1940 por un grupo de investigadores del Instituto de Biología de la UNAM en el que se hace referencia al plancton, esponjas, hidrozoarios, hirudineos, moluscos, insectos, crustáceos, vertebrados y macrofitas, incluyendo el análisis químico del agua.<sup>14</sup>

En las últimas décadas ha disminuido considerablemente la población de pescado blanco en el lago, esta situación ha motivado el estudio exhaustivo de la biología del recurso con objeto de racionalizar la captura e iniciar prácticas acuícolas. Existen numerosos trabajos sobre el pez blanco, pero la mayoría se centra en aspectos taxonómicos, descriptivos y sobre su biología. También se han efectuado estudios con el fin de conocer sus requerimientos energéticos y poder predecir el campo de crecimiento, cuando se alimenta con dieta manufacturada comercial.<sup>15,16</sup>

En relación a los hábitos alimenticios, se ha visto que *Chirostoma estor* tolera el alimento manufacturado tanto en condiciones de laboratorio, como en piletas o tanques, en los que se mantiene para su cultivo en el Lago de Pátzcuaro.<sup>15</sup>

### 3. PEZ BLANCO (*Chirostoma estor*, Jordan 1880).

#### 3.1 DESCRIPCIÓN

*Chirostoma estor* (Jordan 1880), es un pez de tamaño mediano, de entre 30 y 42 cm de largo y de 200 a 540 g de peso; su cuerpo es elongado, fusiforme, esbelto y lateralmente comprimido, de cabeza grande, cubierta por escamas, mandíbula inferior proyectada por delante de la superior, boca terminal y oblicua, provista de dientes pequeños en las mandíbulas. Posee de 64 a 82 escamas en una serie longitudinal. Es de color blanco o amarillento uniforme, cuyo dorso va de color azul a verde olivo, con una banda longitudinal amplia y plateada que va desde la cabeza hasta el extremo del pedúnculo caudal, el vientre es translúcido y/o blanco iridiscente (Figura 2). Se le encuentra principalmente sobre fondos de arena y grava en las orillas con oleaje ligero.<sup>1,4,17</sup>

Figura 2. Pez blanco (*Chirostoma estor*, Jordan 1880).



### **3.2 DIETA**

Estudios realizados han demostrado que la dieta del pescado blanco varía en el transcurso de su vida, las pequeñas crías (larvas) son zooplancatófagas, se alimentan de protozoarios y rotíferos, posteriormente ingieren microcrustáceos. Los juveniles consumen insectos o sus larvas (dípteros) y complementan su dieta con crustáceos tales como cladóceros, ostrácodos, copépodos, anfípodos e isópodos, mientras que cuando alcanzan tallas superiores a los 15 cm en adelante, los adultos se alimentan de peces, como aterínidos y goodeidos, además de insectos, crustáceos (anfípodos y decápodos) medianos y grandes. La presencia de algas y restos de plantas acuáticas en el contenido estomacal se considera accidental, por lo que puede afirmarse que el fitoplancton no integra parte de su dieta.<sup>16,17</sup>

### **3.3 HÁBITAT Y REPRODUCCIÓN**

Es una especie ovípara que desova durante todo el año, principalmente en los meses de abril a junio, por lo regular se ubica en los lugares donde el agua es más clara y oxigenada como es al norte del lago de Pátzcuaro. Debido a que es una especie muy nerviosa, las posibilidades de reproducción son muy pocas, porque tarda de 4 a 5 años para crecer y los intentos que se han realizado han sido poco exitosos, pues su manejo no es fácil. Por esta razón, se ha realizado sólo a nivel de distribución de huevo fecundado más que a nivel de cría, ya que el primero es más resistente.<sup>5,16,17</sup>

## **4. REQUERIMIENTOS NUTRIMENTALES DE LOS PECES**

Los nutrientes requeridos por los peces para crecimiento, desarrollo, reproducción y otras funciones fisiológicas son semejantes a aquellos requeridos por las especies terrestres. Los peces necesitan consumir proteína, minerales, vitaminas y fuentes

---

energéticas, los cuales pueden venir desde fuentes acuáticas naturales o de dietas preparadas. Si los peces son mantenidos en confinamiento, como estanques, "raceways", balsas jaula, entre otros, donde los alimentos naturales son prácticamente inexistentes, sus dietas deberán ser nutrimentalmente completas. Sin embargo, donde existe disponibilidad de alimentos naturales, las dietas complementarias favorecen un crecimiento adicional por lo que no necesitan aportar todos los nutrimentos esenciales.

Los requerimientos nutrimentales varían de una especie a otra especie, aunque no significativamente. Dichas variaciones se dan en relación a la etapa del ciclo de vida, al sexo, a su estado reproductivo y al ambiente.<sup>18</sup>

#### 4.1 PROTEÍNAS

Las proteínas constituidas por aminoácidos, son consideradas el nutrimento más importante. En promedio, el cadáver del pez contiene 75% de agua, 16% de proteína, 6% de lípidos y 3% de cenizas. A la fecha los requerimientos dietéticos de muchas especies de peces se han obtenido de estudio experimentales de nutrición, llevados a cabo en especies cultivadas y los resultados muestran una gran uniformidad en cuanto a los requerimientos proteínicos en sus dietas, fluctuando en un rango de 24–57%, equivalente al 30–70% del contenido energético grueso de la dieta en forma de proteína.<sup>19,20</sup>

Los elevados requerimientos proteínicos en las dietas de peces se atribuyen, además de ser esenciales para el crecimiento, a sus hábitos alimenticios carnívoros/omnívoros y al uso preferencial de la proteína dietética como fuente energética ya que los peces son capaces de obtener más energía metabolizable a partir del catabolismo de proteínas que de hidratos de carbono, a diferencia de los organismos terrestres quienes utilizan estos últimos como fuente principal de energía.<sup>19</sup>

#### 4.1.1 AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son esenciales como fuente metabólica de energía, para el metabolismo lipídico y de hidratos de carbono, para la síntesis de proteína tisular y de otros compuestos no proteínicos muy importantes derivados de ellos, por ejemplo: porfirinas-hemoglobina, pirimidinas y purinas - ácidos nucleicos, ácidos, melanina, colina, ácido fólico, sales biliares, vitaminas, etc.<sup>19</sup>

Para propósitos nutricionales, los aminoácidos se pueden dividir en dos grupos; los aminoácidos esenciales o indispensables (AAE), y los no esenciales o dispensables (AANE). Los AAE son aquellos que no pueden ser sintetizados dentro del cuerpo animal, o bien no lo son a una velocidad adecuada que permita cubrir las necesidades fisiológicas del animal en crecimiento, y por lo tanto deben ser suministrados en la dieta, en una forma ya elaborada. Los AANE, son aquellos aminoácidos que pueden ser sintetizados en el cuerpo, a partir de una fuente de carbono adecuada y de los grupos amino provenientes de otros aminoácidos o de compuestos simples y consecuentemente no tienen que ser suministrados ya elaborados en la dieta.<sup>19,20</sup>

Los peces requieren de los mismos 10 aminoácidos dietéticamente esenciales que los animales de sangre caliente: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina.<sup>19,20,21</sup>

En la Tabla 1 se muestran los requerimientos de aminoácidos esenciales que se han reportado para especies de peces de agua dulce.

Tabla 1. Requerimientos de aminoácidos esenciales de algunas especies de peces de agua dulce (g aa/ 100 g de proteína en la dieta)

Aminoácido	Trucha arcoiris <sup>a</sup>	Carpa común <sup>a</sup>	Tilapia del nilo <sup>b</sup>
Arginina	3.1	4.3	4.2
Histidina	1.4	2.1	1.7
Isoleucina	2.1	2.5	3.1
Leucina	3.9	3.3	3.4
Lisina	4.7	5.7	5.1
Metionina	1.6	3.1	-
Cistina	0.8	-	3.2
Fenilalanina	2.8	6.5	-
Tirosina	1.9	-	5.7
Treonina	3.0	3.9	3.6
Triptofano	0.4	0.8	1.0
Valina	2.8	3.6	2.8

<sup>a</sup> Fuente: Tomado de Hephher 1993.<sup>21</sup>

<sup>b</sup> Fuente: Tomado de Lovell, 1989.<sup>20</sup>

La calidad de una proteína depende de la composición de aminoácidos que la caracterizan y de la disponibilidad biológica de los mismos. Una proteína de alta calidad contiene aminoácidos indispensables en proporciones aproximadas a las que se reportan necesarias para una determinada especie. En general, entre más se aproxime el patrón de AAE de la proteína a los requerimientos dietéticos de AAE de la especie en cuestión, mayor será su valor nutrimental y utilización.

La calidad de una proteína se puede estimar a través de varios indicadores, dentro de los cuales destaca la calificación química, la cual se basa en señalar la cantidad del aminoácido indispensable que está en mayor deficiencia en la proteína en estudio, al compararla con el nivel presente de una proteína de referencia, siempre y cuando las

cantidades de aminoácido estén expresadas en las mismas unidades. El AAE que se encuentre en menor cantidad es el que da la calificación química de la proteína a evaluar y es por tanto el aminoácido limitante.<sup>19,26</sup>

Un valor químico de 100 o superior indica que el nivel de algún AAE en particular presente en el alimento proteínico, es igual o superior al nivel de ese AAE en el patrón de aminoácidos requerido por el pez, cuando se expresa como porcentaje del total de aminoácidos esenciales (más la cistina y tirosina).<sup>19</sup>

## 4.2 LÍPIDOS

Los lípidos desempeñan muchas funciones en los tejidos; además de ser una fuente energética importante son fuente de esteroides esenciales, mismos que desempeñan una amplia gama de funciones biológicas importantes (p. ej. el colesterol, que se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo de los animales, es particularmente abundante en el tejido nervioso y cerebro, sangre, bilis, hígado y en la piel y el cual está involucrado en el mantenimiento de los sistemas de membrana, en el transporte lipídico y como precursor de la vitamina D<sub>3</sub>, los ácidos biliares y hormonas esteroides andrógenos, estrógenos, hormonas adrenales y corticosteroides), algunos son componentes esenciales de las membranas celulares y subcelulares (el tipo de lípidos involucrados incluye a los ácidos grasos poli-insaturados conteniendo fosfolípidos y ésteres del estero), otros sirven como vehículo biológico en la absorción de vitaminas liposolubles A, D, E y K y otros son fuente de ácidos grasos esenciales.<sup>19,22,27</sup>

La importancia de los ácidos grasos esenciales radica en que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares y dan origen a sustancias que tienen funciones reguladoras, como las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y otras.

Debido a que los animales no tienen la capacidad metabólica para sintetizar *de novo*, ácidos grasos de las series n-6 y n-3, dichos ácidos deberán ser incorporados en forma ya elaborada a la dieta. Los peces requieren en sus dietas ácidos grasos omega-3, ya que se considera que los ácidos grasos de estas series permiten un grado mayor de insaturación (requisito indispensable para una mayor fluidez de membranas, flexibilidad y permeabilidad a temperaturas bajas). Los ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) más abundantes en los tejidos de peces y crustáceos, tanto para especies dulceacuícolas como marinas, pertenecen a las series linolénicas (n-3). Mientras que los AGPI de las series n-6 se presentan a una concentración más baja.<sup>19</sup>

#### 4.3 HIDRATOS DE CARBONO

Los hidratos de carbono o carbohidratos son definidos como aquellas sustancias que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Son compuestos químicos almacenadores de energía y su función principal en la dieta es ser fuente de monosacáridos, especialmente de glucosa que constituye la sustancia de aprovechamiento más rápido. Los hidratos de carbono cumplen en el organismo funciones tanto energéticas como catalíticas y estructurales, pero sin lugar a dudas, su aporte energético es la característica más importante desde el punto de vista nutricional. La combustión de los hidratos de carbono genera 4 kcal/g.<sup>19,22</sup>

En peces no se ha establecido un requerimiento absoluto de hidratos de carbono en la dieta, en gran medida esto se debe a la habilidad de los peces para sintetizar hidratos de carbono (p. ej. glucosa) a partir de substratos que no sean hidratos de carbono, tales como proteínas y lípidos (proceso denominado gluconeogénesis), sin embargo, no existe duda que éstos realizan importantes funciones biológicas en el cuerpo del animal. Por ejemplo, la glucosa producto final de la digestión de hidratos de carbono en los animales, sirve

como la principal fuente energética para el tejido nervioso y cerebro y como intermediario metabólico para la síntesis de muchos compuestos biológicamente importantes como: los ácidos nucleicos ARN y ADN, y los mucopolisacáridos de las secreciones mucosas.

La habilidad de peces carnívoros para hidrolizar o digerir hidratos de carbono complejos es limitada debido a la debilidad en la actividad amilolítica en tracto digestivo. Se ha observado que elevados niveles de hidratos de carbono en la dieta, disminuyen el crecimiento, elevan los niveles de glicógeno en hígado y eventualmente causan mortalidad. Consecuentemente la celulosa o “fibra cruda” (el producto de la pérdida por ignición, después de la digestión de la muestra con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NaOH al 1.25%, en condiciones controladas) no tiene ningún valor energético para los peces, y un exceso en la dieta tiene un efecto deletéreo sobre la eficiencia alimenticia y el crecimiento.<sup>19</sup>

#### 4.4 MINERALES

Con excepción de los elementos orgánicamente ligados, hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxígeno, existen aproximadamente 20 ó más elementos minerales que son considerados como esenciales para la vida animal, incluyendo los peces. Algunos minerales son constituyentes esenciales de las estructuras esqueléticas, tales como huesos y dientes, como constituyentes esenciales de muchas enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos respiratorios, o como cofactores en el metabolismo, catálisis y como activadores enzimáticos, juegan un papel clave en el mantenimiento de la presión osmótica y consecuentemente, regulan el intercambio de agua y solutos dentro del cuerpo animal, para la transmisión de los impulsos nerviosos y para las contracciones musculares, regulan el pH de la sangre y otros fluidos corporales o como constituyentes de algunas macromoléculas.

Los elementos minerales esenciales, son clasificados en dos principales grupos, acorde a su concentración en el cuerpo animal; los macroelementos y los microelementos. Los macroelementos son: calcio, sodio, magnesio, potasio, fósforo, cloro y azufre y los microelementos o metales traza son: cobalto, níquel, estaño, selenio, hierro, vanadio, cobre, flúor, manganeso, molibdeno, silicio, zinc, cromo y yodo.<sup>19,22</sup>

Los peces pueden obtener minerales desde el agua a través de las branquias o, en el caso de los peces que viven en el mar, del agua ingerida por absorción desde el intestino. Los peces pueden satisfacer casi todo su requerimiento de calcio del agua y parte de sus necesidades nutrimentales en hierro, magnesio, potasio, cloro, sodio y zinc.<sup>18</sup>

En la tabla 2 se muestran resumidos los requerimientos de minerales para peces.

Tabla 2. Resumen de la información sobre requerimientos de minerales de los peces

<b>Mineral</b>	<b>Requerimiento (por kg de alimento seco)<sup>a</sup></b>
Calcio (Ca)	5g
Zinc (Zn)	30-100 mg
Sodio (Na)	1-3 g
Magnesio (Mg)	500 mg
Potasio (K)	1-3 g
Hierro (Fe)	50-100 mg

<sup>a</sup> Fuente: Tomado de Hephher (1993).<sup>21</sup>

#### 4.5 VITAMINAS

Las vitaminas, al igual que los minerales son llamados micronutrientes, debido a que son requeridas por el organismo en cantidades traza. Las vitaminas son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la vida animal. La mayoría de las vitaminas no son sintetizadas por el cuerpo de los

animales, o bien si lo son, es a una tasa muy inferior, que permita cubrir los requerimientos de los animales. Existen en cantidades muy pequeñas dentro de las materias alimenticias de origen animal y vegetal y pueden clasificarse en dos grandes grupos, dependiendo de su solubilidad, las hidrosolubles y las liposolubles.

Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) son absorbidas en el tracto gastrointestinal en presencia de grasas, y pueden ser almacenadas en las reservas lipídicas corporales, siempre y cuando la ingesta en la dieta exceda las demandas metabólicas. Por el contrario, las vitaminas hidrosolubles (Vit C, colina, inositol, etc.) no son almacenadas en cantidades significativas en el tejido; así, en ausencia de un suministro regular de vitaminas hidrosolubles, las reservas corporales son rápidamente agotadas.

De las vitaminas, la C o ácido ascórbico es un nutrimento crítico en la dieta para los peces, por la incapacidad que tienen éstos de sintetizarla, lo que no ocurre con la mayoría de los animales terrestres. La Vitamina C y su producto de oxidación, el ácido dehidro-L-ascórbico actúan como antioxidantes fisiológicos al facilitar el transporte de hidrógeno dentro de la célula animal, juega un papel vital en el mantenimiento de la integridad del tejido conectivo, vasos sanguíneos, tejido óseo y reparación del tejido dañado. También se requiere para la conversión del ácido fólico a su forma metabólicamente activa, el ácido tetrahidrofólico, para la conversión de triptofano a serotonina, para la síntesis de hormonas esteroides por la corteza adrenal y para numerosas reacciones de hidroxilación dentro del cuerpo, incluyendo la hidroxilación del triptofano, tirosina, lisina, fenilalanina y prolina.<sup>19,22</sup>

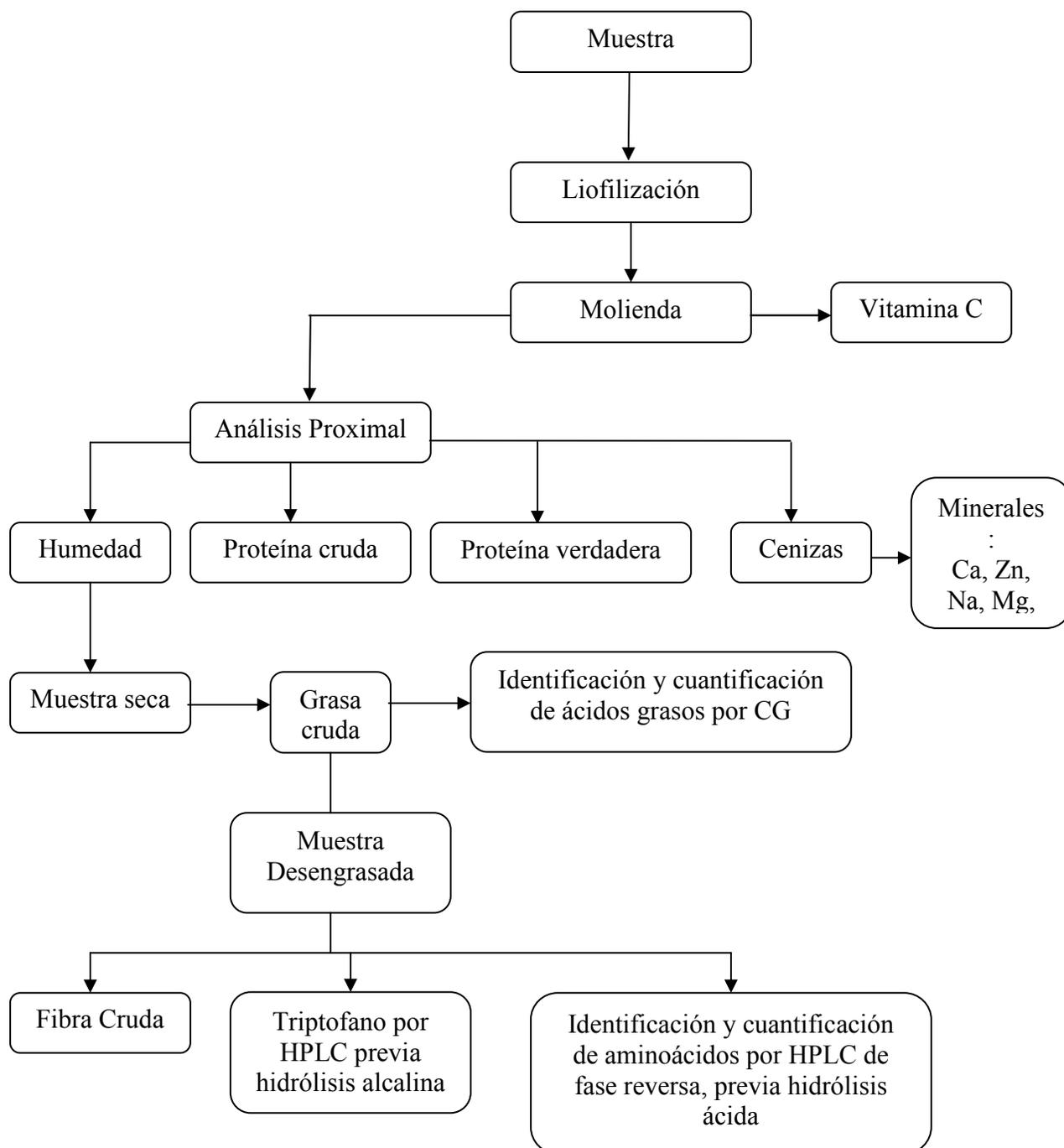
Los efectos de la deficiencia de ácido ascórbico en peces son bien conocidos y se caracterizan por crecimiento reducido, deformidades esqueléticas (escoliosis-lordosis), menor resistencia a las infecciones, mala curación de las heridas, anemia, filamentos

---

branquiales deformados, hemorragias internas y externas, erosión de aletas/cabeza, aumento de la mortalidad, disminución de la eclosión, coloración oscura, entre otras. Los requerimientos mínimos de Vitamina C para el crecimiento y la prevención de signos de deficiencia determinados para especies de peces de agua dulce, oscilan entre 30-500 mg/kg de dieta seca.<sup>19,21</sup>

## METODOLOGÍA

### 1. DIAGRAMA GENERAL DE INVESTIGACIÓN



## 2. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

MUESTRA: Plancton del Lago de Pátzcuaro

PROCEDENCIA DE LA MUESTRA: Recolectado con una red planctónica de 40µm de abertura de malla en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México; a una profundidad de aproximadamente un metro bajo el nivel del agua, durante el mes de Octubre del 2003.

PESO APROXIMADO DE LA MUESTRA: 552.8 g de plancton (congelado en nitrógeno)

La muestra obtenida en el lago fue inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y posteriormente enviada al D. F. para su análisis.

La muestra se mantuvo congelada antes del proceso de liofilización.

## 3. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

### 3.1 CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

#### *Liofilización*

Se realizó una liofilización de la muestra (Liofilizadora Labconco Freeze Dryer Modelo 4.5) por aproximadamente 5 días a temperatura no mayor a  $-50^{\circ}\text{C}$  y a baja presión, aproximadamente 10 micrones de mercurio.

#### *Molienda*

A la muestra liofilizada se le realizó una molienda en un mortero de porcelana con el fin de obtener un polvo más fino para facilitar las pruebas posteriores. Inmediatamente después de la molienda la muestra se colocó en un frasco de vidrio bien etiquetado y se conservó dentro de un desecador de vidrio a vacío, hasta su utilización.

Los estudios de análisis proximal, Vitamina C, minerales por absorción atómica y determinación de hierro, realizados a la muestra de plancton se hicieron de acuerdo a los métodos de la AOAC<sup>23,24</sup>. Los procedimientos completos de todas las determinaciones se muestran en el anexo.

### 3.2 ANÁLISIS PROXIMAL

El análisis proximal es la estimación porcentual de los componentes de un alimento. Este análisis incluye las determinaciones de humedad, grasa cruda, proteína cruda, proteína verdadera, cenizas, fibra cruda, y carbohidratos asimilables por diferencia.

#### **3.2.1 Determinación de humedad analítica**

##### *Fundamento*

Es un método que involucra la determinación de la pérdida de peso debida a la evaporación de agua en el punto de ebullición o temperaturas cercanas a él. La proporción de agua perdida aumenta al elevar la temperatura; por lo tanto, es importante comparar sólo los resultados obtenidos usando las mismas condiciones de secado, más aún, si es factible que ocurra alguna descomposición. A su vez la pérdida en peso depende de diversos factores como son: el tamaño de la partícula y el peso de la muestra, el tipo de cápsula de porcelana y las variaciones de temperatura entre una y otra charola del horno.

La determinación en la muestra se realizó en una estufa de vacío la cual mantuvo las siguientes condiciones: Presión no menor a 15 mm de Hg y temperatura de 60-65°C, por aproximadamente 96 horas, hasta alcanzar el peso constante.

### **3.2.2 Determinación de grasa cruda**

#### *Fundamento*

Los constituyentes grasos de las materias orgánicas son diversas sustancias lipídicas. El contenido de grasa, es aquel que puede ser extraído por los disolventes menos polares como lo son el éter de petróleo y éter etílico. La determinación se basa en la extracción con una fracción ligera de petróleo o éter etílico del material seco y molido en un aparato de extracción continua en el que las gotas condensadas de disolvente caen sobre la muestra contenida en un recipiente poroso o dedal, alrededor del cual pasan los vapores calientes del disolvente. El extracto seco sin disolvente obtenido se determina gravimétricamente.

La determinación se realizó en un aparato de extracción de Goldfish y el disolvente empleado fue éter de petróleo. La extracción se llevó a cabo con el control de calentamiento en la posición de LOW durante 2 horas.

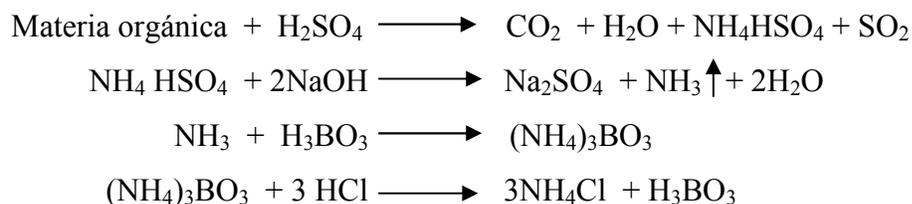
### **3.2.3 Determinación de Proteína cruda**

#### *Fundamento*

El método comúnmente utilizado para determinar proteína es el método Kjeldahl, que en realidad determina el nitrógeno total contenido en una matriz alimenticia, calculándose finalmente el contenido proteínico con ayuda de un factor de 6.25 ya que, por lo general, las proteínas tienen 16 % de nitrógeno. Este método se basa en el sometimiento de la muestra a un tratamiento oxidativo por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla de catalizadores metálicos para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta nitrógeno inorgánico en forma de sulfato ácido de amonio. Del sulfato ácido de amonio formado se libera el nitrógeno en forma de amoniaco por tratamiento alcalino el cual se destila directamente o por arrastre de vapor a un recipiente con una

solución de ácido bórico en donde es atrapado, formando borato de amonio y posteriormente titulado con ácido clorhídrico.

Las reacciones antes descritas se muestran a continuación:



### 3.2.4 Determinación de proteína verdadera

#### *Fundamento*

La técnica se basa en la solubilización del nitrógeno no proteínico así como de la proteína soluble y la posterior precipitación de dicha proteína con tungstato de sodio; con el fin de eliminar el nitrógeno no proteínico que puede interferir en la determinación del nitrógeno por medio de la técnica de micro-Kjeldahl.

Con este método la proteína no soluble también es tomada en cuenta ya que en la etapa de filtración ésta es incluida junto con la proteína soluble precipitada. La concentración de tungstato final de la solución precipitante fue de 0.34 M.

### **3.2.5 Determinación de ceniza**

#### *Fundamento*

El concepto de cenizas se refiere al residuo inorgánico que queda tras la combustión (incineración) completa de los componentes orgánicos contenidos en una matriz alimenticia en unas condiciones determinadas. La determinación de ceniza se basa en la destrucción de la materia orgánica, al someter la muestra a 500°C en una mufla. El residuo de incineración se calcula por diferencia de peso.

### **3.2.6 Determinación de fibra cruda**

#### *Fundamento*

La fibra cruda es el residuo orgánico insoluble y comestible que queda después de tratar la muestra en unas condiciones determinadas. Las condiciones más comunes son tratamientos consecutivos, ebullición con ácido sulfúrico diluido seguida de una ebullición con hidróxido de sodio diluido y una posterior incineración del material insoluble, de tal modo que por diferencia es posible obtener el contenido de hidratos de carbono no degradables. Este tratamiento empírico proporciona la fibra cruda, que consiste principalmente en celulosa y cierta proporción de lignina y hemicelulosa contenidas en la muestra original.

### **3.2.7 Cálculo de Hidratos de carbono digeribles**

El contenido de hidratos de carbono digeribles se obtiene teóricamente restando al 100% el resultado de la suma de los porcentajes de humedad, grasa cruda, proteína cruda, cenizas y fibra cruda contenidos en la muestra.

### *Cálculos*

$$\text{HCD} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ grasa cruda} + \% \text{ proteína} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ cenizas})$$

### 3.3 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS POR HPLC DE FASE REVERSA, PREVIA HIDRÓLISIS CON HCL 6 N EN FASE DE VAPOR, 4 HORAS A 145°C

#### *Fundamento*

La cromatografía en fase reversa (RPC) permite separar moléculas con base a su polaridad. El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en capa fina. Sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Debido a la polaridad de los aminoácidos y a la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, es necesaria la formación de un derivado antes del análisis por HPLC de fase reversa. Los derivados formados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato son estables y permiten incrementar la precisión del análisis rutinario de aminoácidos por derivatización pre columna dada, la relativamente menor manipulación de la muestra, durante la preparación de los derivados de los aminoácidos liberados, después de la hidrólisis de la proteína.

La hidrólisis ácida en fase de vapor (HCl 6N, 0.1% fenol), es otra adaptación que permite incrementar el rendimiento del proceso de hidrólisis, pues las pérdidas por oxidación de aminoácidos se reducen gracias a la combinación de Nitrógeno y vacío durante la

preparación de las muestras a hidrolizar, el contacto de HCl gaseoso con la muestra y un control eficiente de la temperatura y tiempo de hidrólisis.<sup>28, 39, 40</sup>

La determinación se realizó en un sistema cromatográfico 1100 Agilent Technology, la columna empleada fue una AccQ Tag Nova Pack C<sub>18</sub> y la fase móvil fue acetonitrilo:buffer de acetatos-ácido fosfórico 60:40, pH 5.02± 02. La detección se realizó a 254 nm.

### 3.4 DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO POR HPLC

#### *Fundamento*

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada para la determinación de aminoácidos. Las razones más importantes son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles.

La determinación del triptofano sólo es posible a través de una hidrólisis alcalina, ya que la hidrólisis ácida lo transforma en amonio afectando su estabilidad y la exactitud de la determinación. La muestra es hidrolizada en medio básico, seguidamente se realiza un ajuste de pH. El triptófano es separado por cromatografía líquida de intercambio iónico y determinado por un detector UV a 280 nm.<sup>30,31</sup>

Para la determinación de triptofano en la muestra se realizó una hidrólisis alcalina con LiOH 4N a 100 °C durante 4 horas. La detección espectrofotométrica se hizo a 280nm.

### 3.5 DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS POR CG-EM

#### *Fundamento*

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos después de un proceso de saponificación, son separados y determinados en un cromatógrafo de gases, donde son separados como consecuencia del reparto entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida contenida en una columna. Los ésteres metílicos individuales y por tanto los ácidos grasos se identifican de acuerdo a sus tiempos de retención.<sup>29,32,33</sup>

Para la determinación se empleó una columna cromatográfica Alltech Capillary 30 x 0.32 mm. Se empleó un detector de flama ionizada, se usó como gas acarreador, nitrógeno y como gases de combustión, hidrógeno y aire.

### 3.6 DETERMINACIÓN DE VITAMINA C

#### *Fundamento*

Un método muy utilizado en la determinación del ácido L-ascórbico en una matriz alimenticia es por una reacción, en la que el pigmento 2,6 diclorofenol-indofenol es reducido por la vitamina C a una forma incolora, mientras que ésta se transforma en ácido dehidroascórbico (ADA); por lo cual la determinación con este reactivo es una valoración volumétrica de óxido-reducción.

### 3.7 DETERMINACIÓN DE MINERALES

#### **3.7.1 Minerales por Absorción atómica**

##### *Fundamento*

La técnica de detección más habitual de minerales en los productos agroalimentarios es la espectrometría de absorción atómica (EAA). La técnica permite el análisis de un elemento dado a partir de la medida de la energía absorbida por los electrones de la capa externa de los átomos durante su excitación. El número de fotones absorbidos es proporcional a la cantidad de átomos presentes.

Se midieron por este método los siguientes elementos: calcio, zinc, sodio, magnesio y potasio. El análisis se realizó en un equipo Varian Spectr AA220, los gases de combustión empleados para la detección de Na, K y Zn fueron aire/acetileno y para Ca y Mg se emplearon acetileno/óxido nitroso. Las lecturas se realizaron a 213.9, 285.2, 422.7, 589.0 y 766.5nm para Zn, Mg, Ca, Na y K respectivamente.

#### **3.7.2 Determinación de Hierro total**

##### *Fundamento*

La ortofenantrolina reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$ , originando un complejo de color rojo característico que absorbe notablemente en las regiones del espectro visible de alrededor de 530 nm. El  $\text{Fe}^{3+}$  no presenta absorción a esa longitud de onda y debe ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante un agente reductor apropiado, como el clorhidrato de hidroxilamina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### COMPOSICIÓN PROXIMAL

El plancton estudiado aunque venía muy concentrado (en comparación de como se encuentra en el lago), traía un elevado contenido de agua. Después de la liofilización de la muestra se obtuvieron 21.7 g de polvo de plancton seco por lo que, la pérdida de peso fue de 531.09g, lo que representa una humedad del 96.07%. Posteriormente, todas las determinaciones fueron realizadas como se indicó en la muestra de plancton liofilizada y seca.

En la Tabla 3 se presentan los resultados del análisis proximal realizado a la muestra de plancton liofilizado. La humedad analítica de la muestra fue de 4.5 g/100g muestra. Los resultados de las demás determinaciones se expresan en base seca, ya que solo así se podría evaluar el valor nutritivo puesto que la humedad inicial de la muestra puede variar de acuerdo al método de recolección o por la serie de filtrados a la que es sometida para concentrarla después de obtenerla del lago.

Tabla 3. Análisis proximal del plancton del Lago de Pátzcuaro (g/100g muestra)

<b>ANÁLISIS PROXIMAL</b>	<b>BASE SECA</b>
PROTEÍNA CRUDA	68.54 ± 0.681
CENIZAS	9.07 ± 0.015
GRASA	3.52 ± 0.309
FIBRA	8.19 ± 0.163
HIDRATOS DE CARBONO <sup>b</sup>	10.68

<sup>a</sup> Promedio de triplicado ± D.E., C.V. < 5 %, excepto para grasa cuyo C.V. fue de 8.7%.

<sup>b</sup> Se calcularon por diferencia

Como se puede observar en la tabla anterior, los resultados del análisis proximal revelan que el plancton tiene un alto contenido de proteína cruda, seguido del valor de hidratos de carbono y cenizas, siendo de 68.54%, 10.68% y 9.07% respectivamente. Esto nos permite pensar que el plancton es una buena fuente de proteína, ya que como se puede ver en la Tabla 4, del 68.54% de proteína cruda, el 61.38% corresponde a proteína verdadera.

Tabla 4. Proteína total y proteína verdadera en plancton del Lago de Pátzcuaro (g/100g muestra)<sup>a</sup>

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>BASE SECA</b>
PROTEÍNA CRUDA	68.54 ± 0.681
PROTEÍNA VERDADERA	61.38 ± 1.697

<sup>a</sup> Promedio de triplicado ± D.E., C.V. < 5 %.

Sin embargo, hay que considerar que los porcentajes de estos nutrimentos y fibra se ven “diluidos” o “disminuidos” por la forma en que se encuentra disperso el plancton en el agua, por lo que es muy difícil que los peces lleguen ingerir esos porcentajes tan altos, debido a la cantidad tan pequeña de plancton que comen al día.

La cantidad de alimento ingerido por un pez (ya sea alimento vivo o comercial), varía de acuerdo a la edad, tamaño, especie, tipo de alimento, temperatura, etc. Con respecto al pez blanco, se ha observado que en peces alimentados con dietas comerciales de aproximadamente 0.3 g de peso vivo (3 meses de edad), la tasa de alimentación es alrededor del 10% (porcentaje de alimento del peso corporal al día), por lo que un pez de este peso consume alrededor de 0.03 g de alimento seco al día.

Aún cuando la cantidad de plancton ingerida por los peces es pequeña, es interesante el elevado contenido de proteína que tiene el plancton en base seca, en comparación con los valores recomendados en dietas comerciales para el cultivo de especies de agua dulce,

donde el porcentaje de proteína para un pez joven oscila entre un 25 y 50 %. Para el pez blanco apenas se están estableciendo los requerimientos de proteína en la dieta sin embargo, se ha visto que con porcentajes cercanos al 40 % se tiene un buen crecimiento de las larvas de este pez.

En la Tabla 5 se presentan los valores de nitrógeno total, proteínico y no proteínico. Como puede observarse, el nitrógeno proteínico, es decir, de proteína verdadera es el valor más elevado, pues solamente el 1.15% del nitrógeno total es no proteínico. Esto es importante ya que un bajo porcentaje de N pertenece a compuestos nitrogenados no proteínicos que podrían enmascarar el valor nutritivo del plancton.

Tabla 5. Nitrógeno total, nitrógeno proteínico y nitrógeno no proteínico en el plancton del Lago de Pátzcuaro (g/100 g muestra)

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>BASE SECA</b>
NITRÓGENO TOTAL	10.98 ± 0.127
NITRÓGENO PROTEÍNICÓ	9.83 ± 0.272
NITRÓGENO NO PROTEÍNICÓ <sup>a</sup>	1.15

<sup>a</sup> Determinado por diferencia

Continuando con el análisis, en los resultados de la composición proximal, se observa que los porcentajes de fibra e hidratos de carbono son muy similares, cosa que normalmente no ocurre en una matriz alimenticia, donde en general, cuando se tiene un alto contenido de alguno de estos nutrimentos, el valor del otro suele ser más bajo.

El porcentaje de hidratos de carbono en el plancton fue 10.68%; sin embargo, se sabe que los peces usan preferentemente la proteína dietética como fuente de energía (ya que son capaces de obtener más energía metabolizable a partir del catabolismo de proteínas), lo cual concuerda con el alto contenido de proteína encontrado en el plancton.

Aunado a esto, el porcentaje de hidratos de carbono es significativo ya que, la habilidad de peces carnívoros para hidrolizar o digerir carbohidratos complejos es limitada, debido a la deficiente actividad amilolítica en tracto digestivo y más aún el pez blanco ya que es una especie que no cuenta con un estómago verdadero y tiene un intestino muy corto.

Por otro lado, el contenido de fibra en el plancton fue de 8.19%. Se sabe que una porción importante del zooplancton de este lago la constituyen los microcrustáceos (copépodos, cladóceros y ostrácodos), por lo que se puede suponer, que una parte de esta fibra corresponde a quitina, que es un polisacárido que forma el exoesqueleto de estos artrópodos.

El porcentaje de fibra encontrado en el plancton es cercano al valor recomendado en dietas comerciales para peces, que de acuerdo con la literatura consultada es 10% como máximo. Esto es importante pues la fibra cruda no tiene ningún valor energético para los peces, y un exceso en la dieta puede tener un efecto deletéreo sobre la eficiencia alimenticia y el crecimiento de los peces porque provoca un rápido tránsito de los nutrientes por el tracto digestivo.

El porcentaje de cenizas en el plancton es elevado, lo cual se explica ya que, muchos minerales se encuentran formando parte de los compuestos orgánicos, que constituyen los organismos (autótrofos y heterótrofos) que lo componen.

El contenido de grasa en el plancton es bajo, solo 3.52%. De acuerdo al análisis proximal, es el nutriente que se encuentra en menor porcentaje, por lo que puede parecer que el plancton no es una fuente importante de grasa para los peces, sin embargo, es de ella donde los peces adquieren los ácidos grasos esenciales para su crecimiento, por lo que no

---

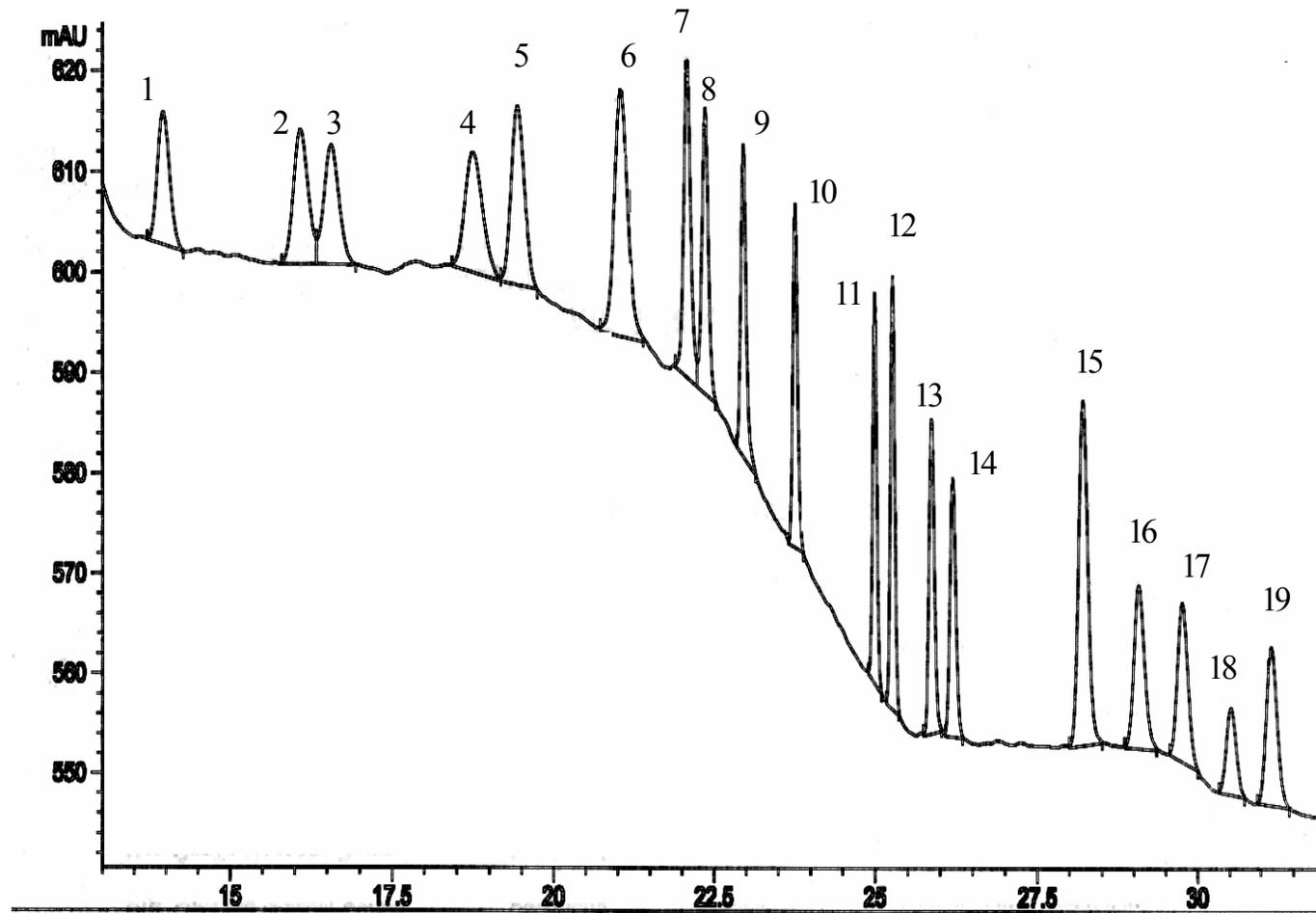
sería un error subestimar la calidad de esta grasa sólo por que se encuentra en cantidades bajas.

#### **PERFIL DE AMINOÁCIDOS**

Como ya se vio anteriormente, el plancton tiene un elevado porcentaje de proteína, sin embargo, el que una proteína se encuentre en gran proporción no garantiza que sea de alta calidad, por lo que se realizó un perfil de aminoácidos de la proteína para evaluar su calidad por medio de la calificación química.

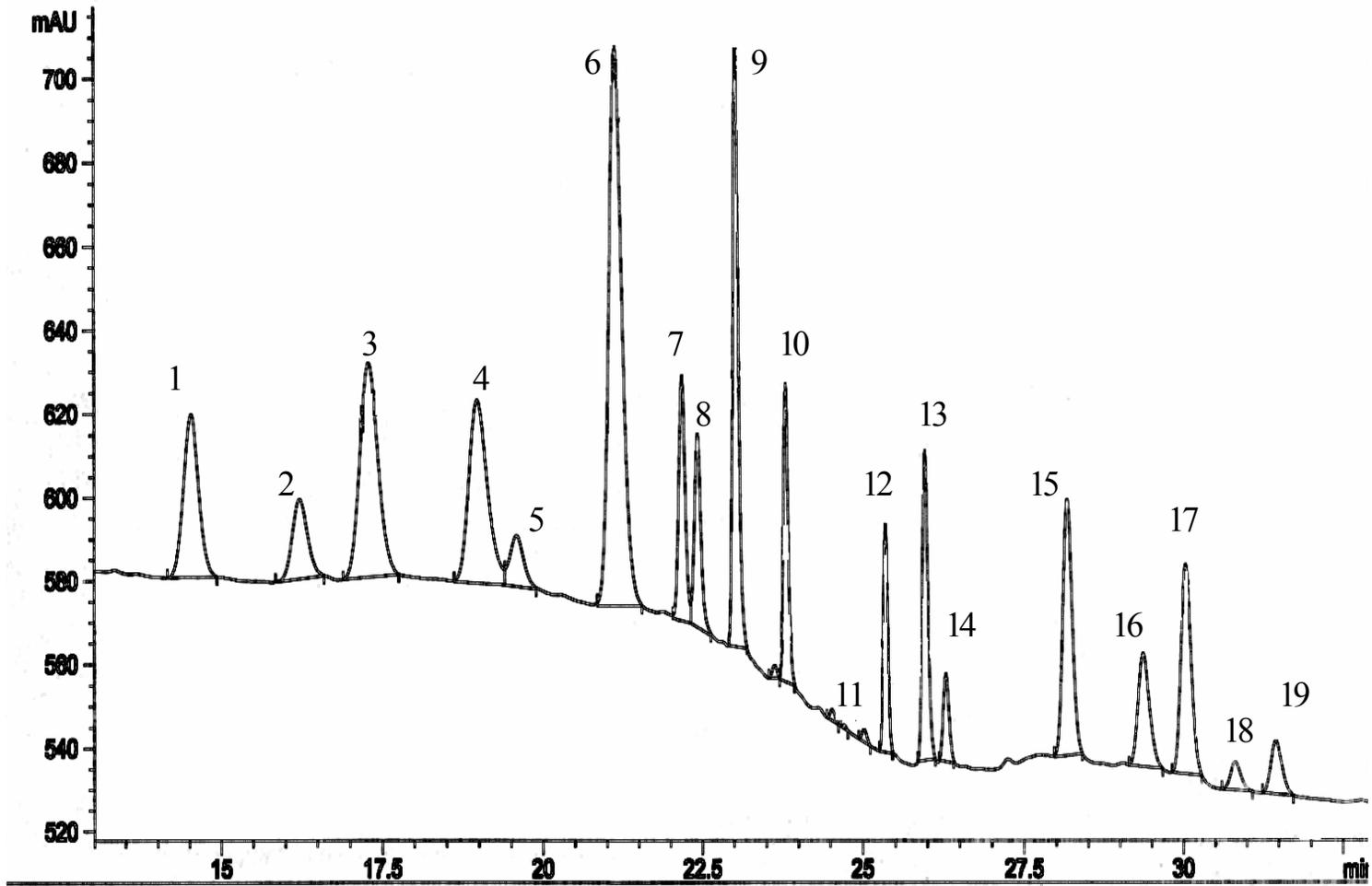
En la Figura 3 se presenta el cromatograma del estándar de aminoácidos utilizado en la obtención del perfil de aminoácidos, mientras que en la Figura 4 y Tabla 6 se muestra el contenido de aminoácidos presentes en la proteína del plancton del Lago de Pátzcuaro. Todos fueron determinados por HPLC previa hidrólisis ácida, a excepción del triptofano que fue determinado por HPLC previa hidrólisis alcalina.

Figura 3. Cromatograma del estándar de aminoácidos



1. Aspártico 2. Serina 3. Glutámico 4. Glicina 5. Histidina 6. Amoniaco 7. Arginina 8. Treonina 9. Alanina 10. Prolina  
11. Cistina 12. Tirosina 13. Valina 14. Metionina 15. Lisina 16. Isoleucina 17. Leucina 18. Norleucina 19. Fenilalanina

Figura 4. Cromatograma del perfil de aminoácidos en la muestra de plancton



1. Aspártico 2. Serina 3. Glutámico 4. Glicina 5. Histidina 6. Amoniaco 7. Arginina 8. Treonina 9. Alanina 10. Prolina  
11. Cistina 12. Tirosina 13. Valina 14. Metionina 15. Lisina 16. Isoleucina 17. Leucina 18. Norleucina 19. Fenilalanina

Tabla 6. Contenido de aminoácidos presentes en la proteína del plancton<sup>a</sup>

<b>AMINOÁCIDO</b>	<b>g aa / 100 g proteína</b>
Aspártico	8.54 ± 0.017
Serina	2.71 ± 0.021
Glutámico	13.12 ± 0.023
Glicina	4.96 ± 0.002
Histidina	1.94 ± 0.017
Arginina	5.15 ± 0.033
Treonina	3.41 ± 0.005
Alanina	7.13 ± 0.044
Prolina	4.23 ± 0.005
Cistina	0.16 ± 0.023
Tirosina	4.04 ± 0.010
Valina	5.01 ± 0.017
Metionina	2.09 ± 0.019
Lisina	4.46 ± 0.005
Isoleucina	3.96 ± 0.005
Leucina	6.99 ± 0.018
Fenilalanina	2.33 ± 0.018
Triptofano <sup>b</sup>	0.58 ± 0.014
<b>TOTAL</b>	<b>80.81</b>

<sup>a</sup> Promedio de triplicado ± D.E., C.V. < 5 %.<sup>b</sup> Determinado por HPLC previa hidrólisis alcalina.

No todos los aminoácidos de la proteína pudieron ser identificados, ya que no se tenían en el estándar por lo que una parte corresponde a éstos y la otra a amoniaco. De acuerdo a la tabla anterior, el perfil indica que el aminoácido que se encuentra en mayor cantidad en la proteína del plancton es el ácido glutámico, seguido del aspártico. Estos aminoácidos no son esenciales sin embargo, si son glucogénicos, lo que permite su utilización como fuente de energía ya que, por transaminación se transforman en cetoácidos, para posteriormente producir glucosa. Debido a que el plancton contiene mucha proteína, esto podría explicar cómo y/o por qué los peces utilizan preferentemente la proteína y no hidratos de carbono de la dieta como fuente de energía.<sup>19</sup>

Por el alto contenido de proteína encontrado en el plancton, puede afirmarse que la proporción de proteína en la dieta de un pez es relevante, por lo que en la elaboración de dietas comerciales, la calidad y cantidad de la proteína son fundamentales en el diseño de formulaciones para alimentación de peces, además de que es el nutrimento que se encuentra en mayor proporción en órganos y tejidos musculares.

Como se mencionó anteriormente, existen ciertos aminoácidos que los peces no pueden sintetizar, llamados esenciales, por lo que deben ser adquiridos a través de la dieta en cantidades apropiadas.

La calidad de una proteína depende de la composición de aminoácidos que la caracterizan y de la disponibilidad biológica de los mismos. Uno de los métodos más comunes para evaluar la calidad de una proteína es la calificación química, la cual es considerada como el porcentaje de aminoácido esencial en mayor déficit en relación al patrón de requerimientos dietéticos.

Debido a que existen muchos estudios de requerimientos de AAE para diversas especies de peces<sup>20,21,35</sup> y que éstos varían entre una especie y otra, se decidió tomar los requerimientos de una especie de agua dulce, con el fin de tener una referencia con la cual poder calcular la calificación química de la proteína del plancton.

La calificación química del plancton se calculó tomando como patrón de referencia los requerimientos de aminoácidos esenciales para tilapia. Se seleccionó esta especie porque también es de agua dulce y clima templado al igual que el pez blanco, además de que es una de las especies que fueron introducidas al Lago de Pátzcuaro y que por tanto habita en condiciones ambientales parecidas al pez blanco.

En la Tabla 7 se muestra la calificación química de la proteína del plancton del Lago de Pátzcuaro.

Tabla 7. Calificación química de la proteína del plancton del Lago de Pátzcuaro

AAE	Requerimientos para tilapia g/100g de proteína <sup>a</sup>	g/100g proteína del plancton	Calificación Química <sup>d</sup>
Arginina	4.2	5.15	>100
Histidina	1.7	1.94	96.14
Isoleucina	3.1	3.96	>100
Leucina	3.4	6.99	>100
Lisina	5.1	4.46	73.68
<b>Aminoácidos azufrados<sup>b</sup></b>	<b>3.2</b>	<b>2.25</b>	<b>59.24</b>
Aminoácidos aromáticos <sup>c</sup>	5.7	6.37	94.15
Treonina	3.6	3.41	>100
Valina	2.8	5.01	>100
<b>Triptofano</b>	<b>1.0</b>	<b>0.58</b>	<b>48.86</b>

<sup>a</sup> Fuente: Fuente: Tomado de Lovell, 1989.<sup>20</sup>

<sup>b</sup> Aminoácidos azufrados: Metionina + Cistina

<sup>c</sup> Aminoácidos aromáticos: Fenilalanina + Tirosina

<sup>d</sup> Calificación química =  $\frac{\text{gramos aa muestra} \times \text{total aas requeridos}}{\text{gramos aa requerido} \times \text{total aas muestra}} \times 100$

**CALIFICACIÓN QUÍMICA: 48.86**

En cuanto a los aminoácidos considerados esenciales para el pez, el que se encuentra en mayor proporción es la leucina (6.99g/100 g proteína), y en menor proporción el triptofano (0.58g/100 g proteína). Al calcular la calificación química se observa que el aminoácido limitante es el triptofano dando a la proteína del plancton una calificación química de

48.86, seguido de los aminoácidos azufrados: metionina y cistina con una calificación de 59.24.

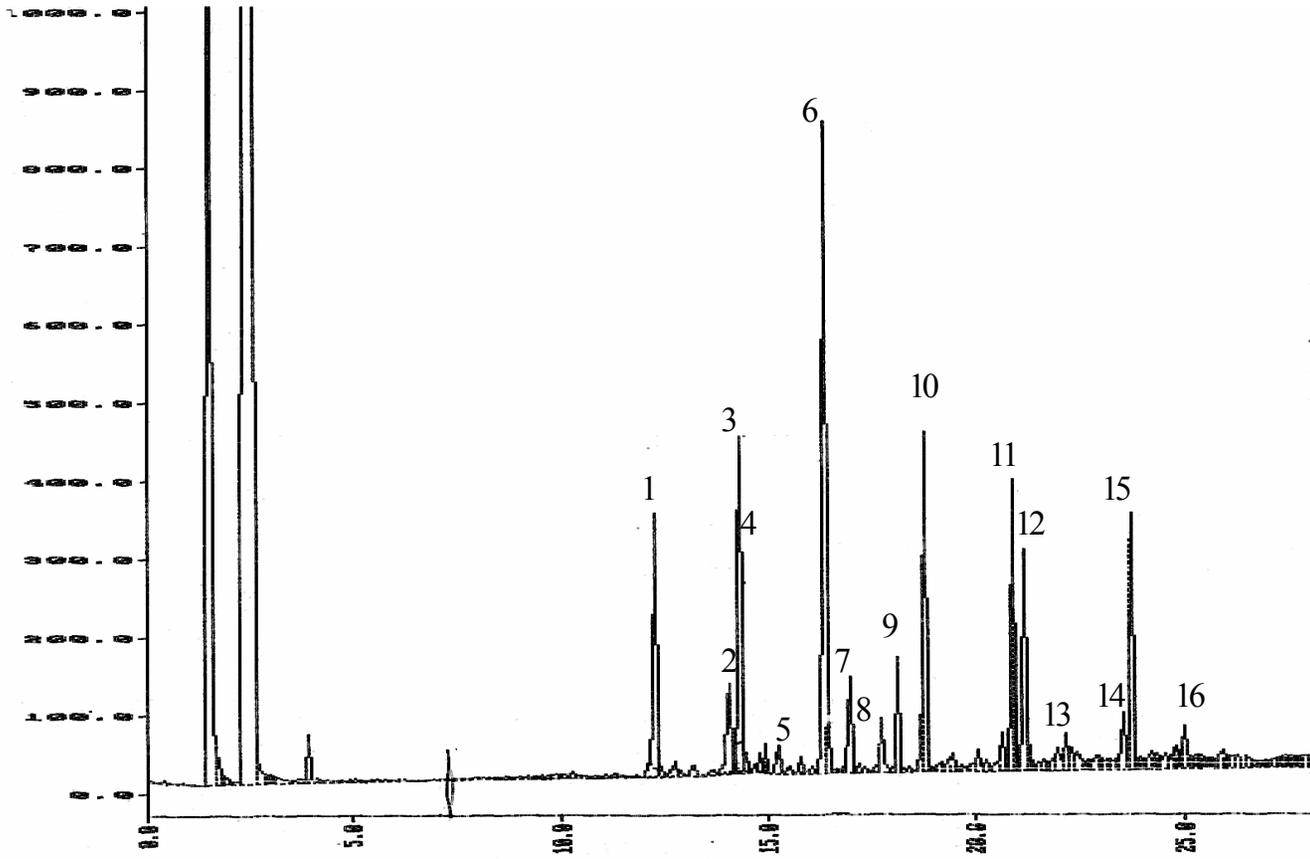
En general, la proteína del plancton constituye una buena fuente de aminoácidos esenciales y no esenciales para el pez blanco, por lo que se sugiere que de tomarse el perfil nutricional del plancton como modelo para el diseño y elaboración de dietas destinadas a la alimentación de larvas de este pez, éstas sean suplementadas con otras fuentes que proporcionen triptófano y aminoácidos azufrados para cubrir posibles deficiencias y evitar problemas en el desarrollo y crecimiento.

#### **PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y COLESTEROL**

Como se mencionó anteriormente, aunque el porcentaje de grasa en el plancton es bajo, es de ella donde los peces adquieren los ácidos grasos esenciales para su crecimiento, por ello se decidió realizar el perfil de ácidos grasos, con el fin de conocer qué ácidos grasos importantes ( $\omega 3$  y  $\omega 6$ ) aporta el plancton en mayor cantidad a los peces que lo consumen.

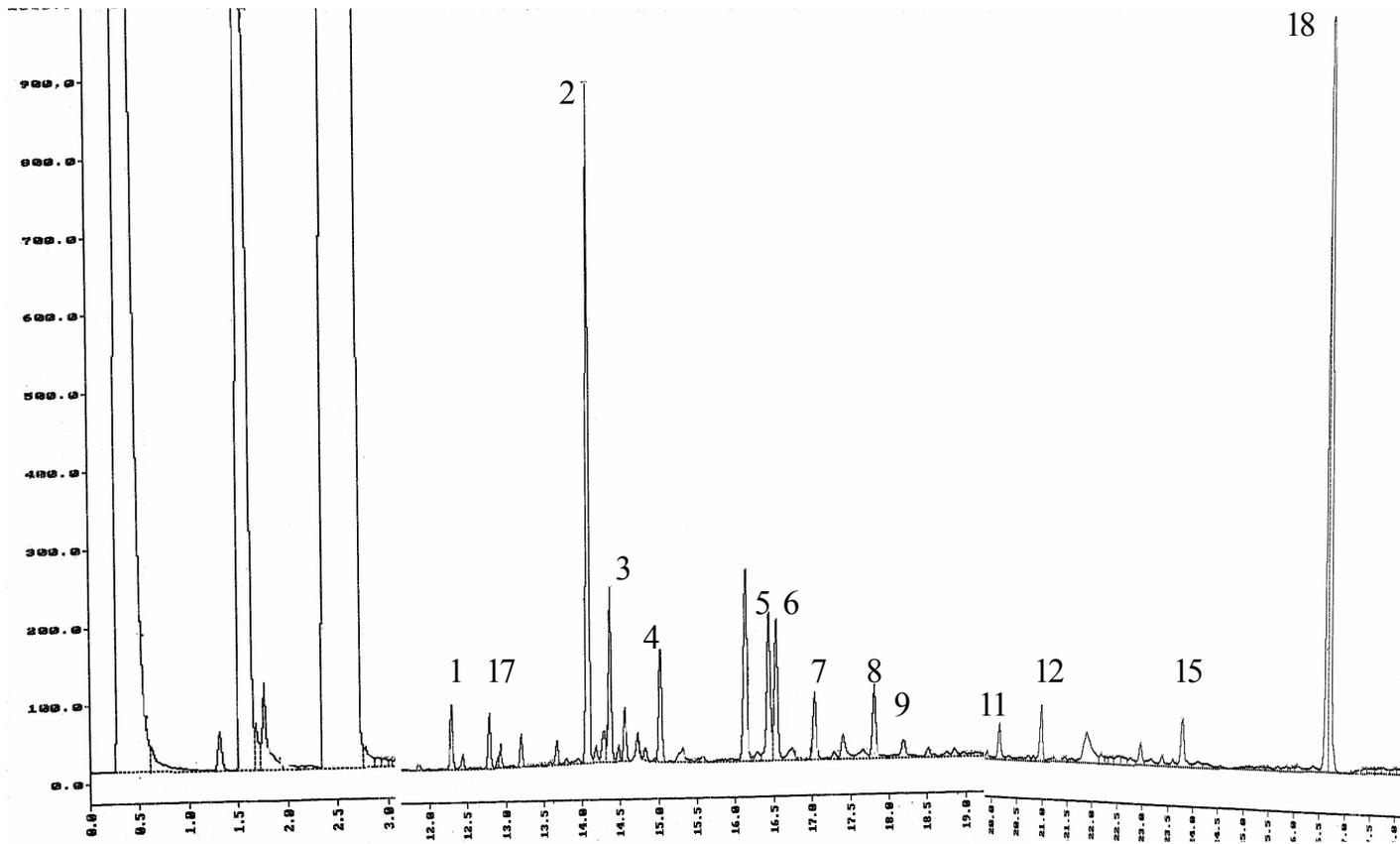
En la Figura 5 se muestra el estándar de ácidos grasos empleado en la determinación del perfil mientras que, en la Figura 6 y Tabla 8 se presentan los porcentajes de los ácidos grasos encontrados en la grasa del plancton del Lago de Pátzcuaro.

Figura 5. Cromatograma del estándar de ácidos grasos



1. mirístico 2. palmítico 3. palmítoleico 4. esteárico 5. oleico 6. eláidico 7. linoleico 8. linoléico 9. E18:4n3 10. E20:1n9  
11. araquidónico 12. eicosapentanoico 13. erúico 14. E22:5n3 15. decosahecanoico 16. E24:1n9

Figura 6. Cromatograma del perfil de lípidos de la muestra de plancton



1. mirístico 2. palmitico 3. palmitoleico 4. esteárico 5. oleico 6. elaidico 7. linoleico 8. linolénico 9. E18:4n3  
10. E20:1n9 11. araquidónico 12. eicosapentanoico 13. erúcico 14. E22:5n3 15. decosahecanoico 16. E24:1n9  
17. miristoleico 18. colesterol

Tabla 8. Contenido de ácidos grasos y colesterol presentes en la grasa del plancton del Lago de Pátzcuaro<sup>a</sup>

ÁCIDO GRASO	% DEL TOTAL DE LÍPIDOS	DESV. EST.
mirístico	1,27	0,05
palmítico	13,69	0,03
esteárico	5,61	0,04
<b>Σ saturados</b>	<b>20.57</b>	
miristoleico	1,16	0,03
palmitoleico	3,75	0,05
oleico	4,79	0,03
C18:1n7 (vacénico)	3,82	0,08
<b>Σ monoinsaturados</b>	<b>13.51</b>	
linoleico	2,04	0,10
linolénico	2,12	0,04
C18:4n3 (estearidónico)	0,94	0,04
araquidónico	1,28	0,01
eicosapentanoico (EPA)	1,99	0,03
decosahexaenoico (DHA)	2,25	0,01
<b>Σ poliinsaturados</b>	<b>10,62</b>	
<b>Colesterol<sup>b</sup></b> (colesterol -5-en-3β-ol)	<b>39.38</b>	5.4
<b>NI<sup>c</sup></b>	<b>15.92</b>	
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>	

<sup>a</sup> Promedio de triplicado ± D.E., C.V. < 0 = a 5 %.

<sup>b</sup> Determinado por CG-EM. Entre paréntesis se da el nombre propuesto por el EM para la estructura encontrada en dicho estudio.

<sup>c</sup> NI= No identificados

$$^d \text{ \% del lípido} = \frac{\text{Área}_{\text{lípido}}}{\sum \text{Área}_{\text{lípidos}}} \times 100$$

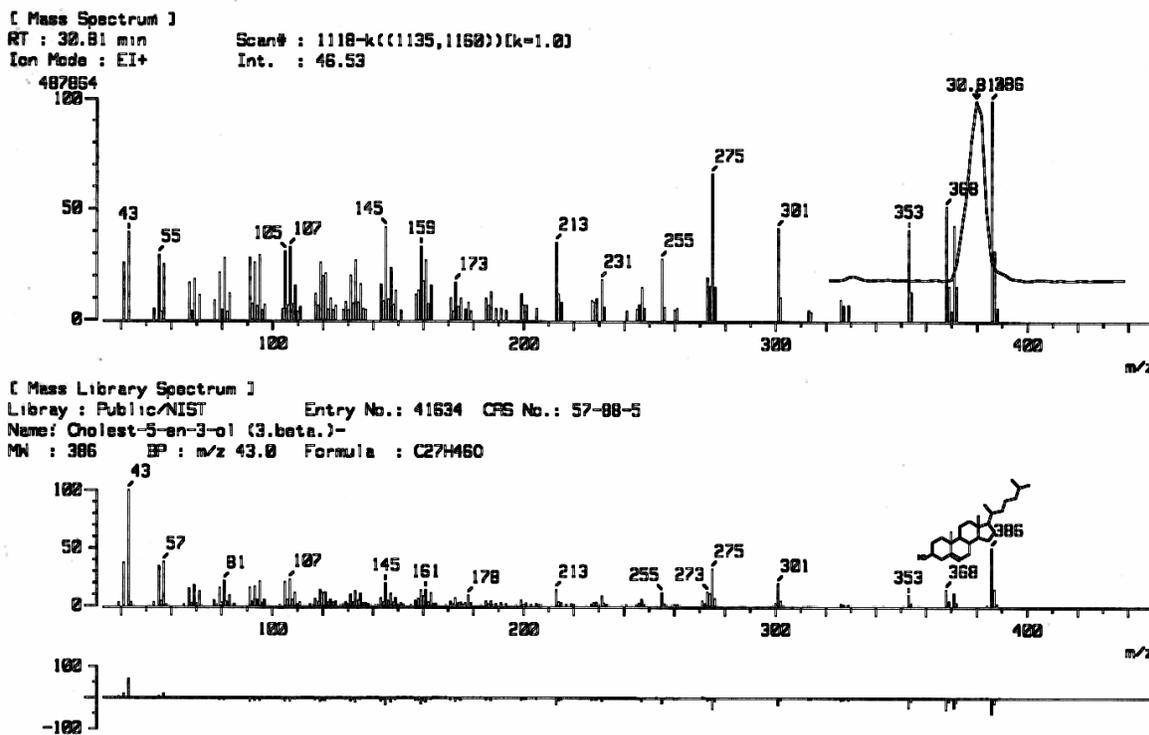
El porcentaje de ácidos grasos y colesterol se calculó en relación al total de las áreas de éstos en el cromatograma obtenido, es decir al total de lípidos.

Los resultados del perfil de lípidos por CG-EM indican que de los ácidos grasos identificados el 20.57% son saturados, siendo el palmítico el que se encuentra en mayor proporción; el 13.51% son monoinsaturados, siendo el oleico el de mayor proporción y el 10.62% son poliinsaturados, siendo el DHA el más abundante, seguido del linoléico y linolénico considerados ácidos grasos esenciales. Esto es relevante ya que, debido a que los peces no pueden sintetizar ácidos grasos de las series  $\omega 3$  y  $\omega 6$ , estos deben ser incorporados por la dieta en forma ya elaborada.

El 39.38% del extracto etéreo pertenece a colesterol. Esto es interesante porque de acuerdo a estudios realizados por Nelson y Mühlebach<sup>36,37</sup>, al parecer el colesterol proviene principalmente de las especies que conforman el zooplancton, específicamente de los microcrustáceos que lo acumulan por su incapacidad de producirlo. De acuerdo al de EM realizado a la grasa del plancton (Figura 7) y a lo que reportado por Mühlebach, el colesterol encontrado puede corresponder a colest-5-en-3 $\beta$ -ol el cual se ha observado es abundante en especies de microcrustáceos como los copépodos, organismos que abundan también en el zooplancton del Lago de Pátzcuaro.

El 15.92% restante de lípidos no fueron identificados, y debido a que es un porcentaje similar al de los ácidos grasos insaturados, es importante tratar de identificarlos empleando otros estándares, para así contar con un perfil lipídico más completo.

Figura 7. Estructura de colesterol encontrada en el plancton por EM



## CONTENIDO DE MINERALES

El contenido de cenizas encontrado (9.07%) indica que probablemente el plancton es una fuente rica en minerales, necesarios para el desarrollo y crecimiento de los peces; por ello se determinó el contenido de algunos minerales importantes en la dieta. Por absorción atómica se determinó el contenido de Ca, Zn, Na, Mg y K y por método colorimétrico el contenido de hierro. En la Tabla 9 se muestran los resultados de dichos análisis.

Tabla 9. Concentración de minerales en el plancton del Lago de Pátzcuaro

Mineral	(g/kg de plancton seco)	Requerimiento (g/kg de alimento seco) <sup>b</sup>
Calcio (Ca)	15.93	5
Zinc (Zn)	0.431	0.03-0.1
Sodio (Na)	0.943	1-3
Magnesio (Mg)	4.68	0.5
Potasio (K)	7.96	1-3
Fierro (Fe) <sup>a</sup>	0.445	0.05-0.1

<sup>a</sup> Determinado por método colorimétrico (AOAC). Ecuación de la curva patrón:

Abs = 10.122 [Fe] + 4.87x 10<sup>-3</sup> con un coeficiente de correlación de 0.998.

<sup>b</sup> Fuente: Tomado de Hepher (1993).<sup>21</sup>

Los valores de minerales encontrados en el plancton son altos en comparación con los requerimientos de minerales reportados para peces<sup>21,38</sup>, a excepción del sodio que se encuentra en menor cantidad a lo recomendado. Sin embargo, no hay que olvidar que el plancton no es la única fuente de minerales que tienen los peces para cubrir sus requerimientos, sino que también los pueden obtener del agua, cuando la “filtran” por medio de las membranas de sus branquias.

En el estudio de minerales realizado al plancton, destaca la concentración de calcio (15.93 g/kg) y magnesio (4.68 g/kg), lo cual es de esperarse, ya que siendo el plancton el principal alimento de los peces en sus etapas larvarias, éste debe ser una fuente rica de estos minerales fundamentales en la formación del esqueleto de los peces.

El contenido de hierro en el plancton es elevado y sobrepasa el requerimiento para peces. Cabe resaltar que del 9.07 % de cenizas que hay en la muestra, aproximadamente el 0.49% de éstas lo constituye el hierro. Esto es significativo ya que el hierro juega un papel muy importante en la fisiología vegetal, en este caso del fitoplancton (como catalizador en la producción de clorofila); y en el metabolismo de los peces, ya que es uno de los elementos

principales que constituyen la hemoglobina, molécula importante para la fijación y transporte de oxígeno.

#### **DETERMINACIÓN DE VITAMINA C**

El contenido de Vitamina C en la muestra de plancton fue elevado  $234.8 \pm 25.5$  mg/kg muestra, por lo que el plancton representa una buena fuente este micronutriente para los peces. Esto es importante pues los requerimientos de vitamina C han sido muy discutidos, debido a que varían mucho de acuerdo a la especie de pez en estudio, y es uno de los nutrientes que es necesario e importante añadir a las dietas comerciales, para cubrir las necesidades que tienen los peces de este vitamina.

El valor de vitamina C encontrado en el plancton puede servir como referencia en la elección de la cantidad de vitamina adecuada en dietas empleadas para el cultivo de las larvas de pez blanco.

## CONCLUSIONES

- Se determinó la composición nutrimental del plancton, destacándose en el análisis proximal el contenido de proteína el cual fue de 61.38% en base seca, por lo que es una buena fuente de proteína para los peces en el lago.
- El contenido de fibra en el plancton seco es considerable, sin embargo, no se ha establecido un requerimiento de fibra para peces, por lo que el contenido de este componente en dietas destinadas a la alimentación de peces, debe ser semejante a la del plancton para no producir un efecto negativo en el aprovechamiento de los demás nutrientes de la dieta.
- Se obtuvo el perfil de aminoácidos de la proteína del plancton, en él se pudieron identificar y cuantificar todos los aminoácidos esenciales para peces. De los aminoácidos identificados y cuantificados el de mayor proporción fue el ácido glutámico, de los esenciales es la leucina. El aminoácido limitante en la proteína es el triptofano cuyo porcentaje de abundancia en la proteína fue de 48.86.
- Se logró identificar y cuantificar en el perfil de ácidos grasos la mayor cantidad de estos. Se identificaron algunos ácidos grasos esenciales para peces ( $\omega 3$  y  $\omega 6$ ) destacando el contenido de ácidos grasos: linoleico, linolénico y DHA. También se cuantificó el contenido de colesterol el cual es de 39.38% del total del extracto etéreo.

- De los minerales analizados en este estudio destacan en el contenido de hierro y calcio, ya que su concentración en el plancton es alta por lo que el plancton representa una buena fuente de éstos en la dieta de los peces.
- El contenido de Vitamina C en el plancton es comparable con las cantidades recomendadas para dietas comerciales, por lo que puede tomarse como base en la selección de la cantidad de vitamina adecuada para alimentación de larvas del pez blanco.
- Es de gran importancia conocer la composición nutricia del plancton, sobre todo cuando se desea elaborar dietas para cultivo de peces. En este estudio se ha logrado conocer que el plancton del Lago de Pátzcuaro tiene una composición nutricia que puede servir de modelo para la elaboración de dietas que cubran los requerimientos nutrimentales del pez blanco, sobre todo en su etapa larvaria ya que es en ésta donde se presentan problemas -principalmente de tipo alimentario-, que impiden su reproducción por acuicultura.

### RECOMENDACIONES

- ✓ Dado que los tipos o concentraciones de especies que conforman tanto el fitoplancton como el zooplancton, cambia de acuerdo a las épocas del año, se recomienda determinar la composición nutricia del plancton en las diferentes estaciones del año, con el fin de conocer sus variaciones nutrimentales.
  
- ✓ Puesto que no existen estudios sobre los requerimientos nutricionales específicos para este pez, se recomienda realizar estudios en los que se determinen los valores recomendados de: proteína, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales, etc., para esta especie, de manera que en un futuro se puedan elaborar dietas que sean adecuadas sus necesidades alimenticias y se favorezca así su desarrollo y reproducción por acuicultura.

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Orbe, M.A. 2002. Limnología y biología pesquera del Lago de Pátzcuaro Mich, Méx. Tesis Doctora en ciencias, UNAM, p. 1-55, 88-97.
2. Sánchez, R. 1995. Selección del plancton por peces del género *Chirostoma*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. p. 2-6
3. Berlanga, C. 1993. Contribución al conocimiento de las comunidades de peces del Lago de Pátzcuaro, Mich. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. p. 2-18.
4. Aguirre, A. 1992. Estudio cariotípico del pescado blanco *Chirostoma estor*, Jordan. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. p. 6-12.
5. Martínez M, M. J. 1998. El pez blanco, una especie en peligro de extinción: (radioreportaje), Tesis profesional, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Aragón, UNAM, 88 p.
6. Rosas, M. 1967. Investigaciones relacionadas con el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor*, Jordan, 1879 (Pisces: Athetinidae). Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, pp. 1-12, 18, 19.
7. Torres, V. M. 1999. Evaluación de proteínas en plancton de sistemas acuáticos urbanos. Tesis profesional, Facultad de ciencias, UNAM, p. 5.
8. Rodríguez, N. 1999. Estudio del plancton en la presa Villa Victoria, Edo de México. Tesis profesional, Facultad de ciencias, UNAM, pp.2, 3.
9. Lora, V. 1998. Distribución y abundancia del zooplancton en un ciclo anual (1990-1991) en la Bahía de Banderas, México. Tesis profesional, Facultad de ciencias, UNAM, 60 p. (1,2)
10. Int I: <http://www.biologiamarina.com/dev/projects/plancton.asp>  
Santiago de Chile. Consulta: 25/04/2005, hora: 16:31 pm

11. Martínez C., L. R. 1998. Ecología de los Sistemas Acuícolas. AGT Editor, S. A. México. Pp. 77, 78, 86-88, 90, 91, 95, 96, 103, 104.
12. Int 2: <http://www.mgar.net/mar/plancton.htm>  
Santa Cruz de Tenerife, Consulta: 06/06/2005.
13. Margalef, R. 1983. Limnología. Editorial Omega, S. A., Barcelona, España, p. 197, 248, 275, 279, 331, 332.
14. Mazari, H.M. 1981. Evaluación de la calidad del agua desde el punto de vista bacteriológico y fisicoquímico en el Lago de Pátzcuaro Mich, Méx. Tesis Doctora en ciencias, UNAM, México, p. 1-4, 21-30.
15. Espina, S.; Latoumerie, J.; Sánchez, A.; Vega, M. E. 1988. Determinación de los elementos del balance energético en el pescado blanco adulto, *Chirostoma estor* J. (pisces, atherinidae). Anales del instituto de Ciencias del Mar y Limnología, México 15: No. 1. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/cienciasdelmar/instituto/1988-1/articulo292.html>
16. Martínez P., C. A.; Ríos-Durán, M. G.; Campos, A.; Toledo, M.; Aguilar-Valdez, M. C.; Ross, L. G. 2002. Progresos en el cultivo del Pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. Ciencia Nicolaita, México, No. 32, octubre p. 73-90.
17. Juárez, M. L. 1999. Fauna helmintológica del pescado blanco *Chirostoma estor* var. copandaro (Osteichthyes: Atherinidae) del Lago de Zirahuén, Michoacán, México, Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 62 p.
18. Dean Akiyama, 1995. Nutrición, alimentos y alimentación de los peces. Revista Soyanocticias, Uruguay, Abril-Junio, p. 22-25. Consulta: 13/04/2005. Hora: 13:14pm  
<http://www.auda.org.uy/arti/nutri/nutri.htm>

19. Tacon, A., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. FAO-ITALIA. Programa Cooperativo Gubernamental. Brasilia, Brasil. Consulta: 13/04/2005. Hora: 13:14 pm  
<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab492s/AB492S00.htm#TOC>
20. Lovell, T. 1989. Nutrition and Feeding of fish. Van Nostrand Reinhold. New York. p. 11-63.
21. Hephher, B. 1993. Nutrición de peces comerciales en estanques. Ed. Limusa, S. A., México, pp.193-266.
22. Badui, S. 1996. Química de los alimentos. Ed. Alambra Mexicana, México, pp. 45, 46, 213-221, 329-331.
23. a) AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of Association Official Analytical Chemists. Herlich, K., 15a. Ed., Arlinton, USA (1) p. 17, 42, 46, 69, 70, 79, 80, 1058.  
  
b) AOAC. 1975. Official Methods of Analysis of Association Official Analytical Chemists, 12a. Ed., Arlinton, Washington D.C. (1) p. 238.
24. Osborne, D. R. 1986. Análisis de los nutrientes de los alimentos. Acribia, Zaragoza, España, p. 112-113, 118-121, 125, 126-132, 162, 163, 170-177.
25. Matissek, R.; Schnepel, F.M.; Steiner, G. 1998. Análisis de los alimentos, fundamentos, métodos y aplicaciones. Acribia, Zaragoza, España, p. 11, 12, 15, 32-34, 93-98, 99, 100, 216-220, 234- 237.
26. Fisher, P. B; Bender, A. 1989. Valor nutritivo de los alimentos. Limusa, México D. F., p. 45-49, 52-55, 69-78.
27. Fennema, O. 1993. Química de alimentos. Acribia, 2ª. edición, Zaragoza, España, p. 11-19, 175-181.

28. Romero, C. J. 2003. Validación de un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC. Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, México, 20-23, 29-31, 35-44,67-69, 156-163.
29. Jacques, J. A.; Poiffait, A. 2000. Análisis nutricional de los alimentos. Acribia, Zaragoza, España, p. 41, 42, 47-49, 59- 62, 103, 104.
30. Lucas, B.; Sotelo, A. 1980. Effect of different alkalies, temperature and hydrolysis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. Analytical Biochemistry, 109. p. 192-197.
31. Yust, M.; Predroche, J.; Giron-Calle, J.; Vioque, J.; Millán, F.; Alaiz, M. 2004. Determination of tryptophan by high performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with espectometric detection Analytical Nutritional and Clinical Methods Section. Food Chemistry, 85. p. 317-320.
32. Laureles, L.R. 2002. Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) Hybrids and Their parentals, J. Agric.Food Chem, 50: 1581-1585.
33. Metcalfe, L.; Schmitz, A.; Pelka, J. 1966. Rapid preparation of fatty acids esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem, 38. p.514-515.
34. Harris, C.D. 1990. Análisis químico cuantitativo. Iberoamericana, 1ª. edición, México, D. F., p. 637-653.
35. Conceição, L.E.C.; Grasdalen, H.; Rønnestad, I. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings, Aquaculture 227: 221-232.
36. Nelson, M.; Phleger, C.; Mooney, B.; Nichols, P. 2000. Lipids of Gelatinous Antarctic Zooplankton: Cnidaria and Ctenophora, Lipids, 35(5): 551-559.
37. Mühlebach, A.; Albers, C.; Kattner, G. 1999. Differences in the sterol composition of dominant Antarctic zooplankton, Lipids, 34(1): 45-51.

38. Grabner, M., Wieser, W., Lackner, R. 1981. The suitability of frozen and freeze-dried zooplankton as food for fish larvae: a biochemical test program. *Aquaculture*, 26: 85-94.
39. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L. 1984. Rapid Analysis of Amino Acids using Pre Column Derivatization. *J. Chromtogr.*, 336: 93-104.
40. Cohen, S., Michaud, D. 1993. Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids Via High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochem.* 211: 271-287.

## ANEXO. MATERIALES Y MÉTODOS

### Determinación de humedad analítica. AOAC <sup>23a: 934.01</sup>

#### *Material*

- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- 3 charolas de aluminio
- Desecador de vidrio

#### *Procedimiento*

Las charolas de aluminio se colocaron en la estufa de vacío hasta que alcanzaron un peso constante el cual fue registrado. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 0.7 g de muestra y se introdujeron en la estufa de vacío la cual mantuvo las siguientes condiciones: Presión no menor a 15 mm de Hg y una temperatura de 60-65°C, por aproximadamente 96 horas.

Se realizaron pesadas periódicas de las charolas durante el tiempo que permanecieron en la estufa de vacío; sacándolas de la estufa y colocándolas inmediatamente en un desecador de vidrio donde pertenecían 30 minutos; después de este tiempo eran pesadas en una balanza analítica. Este procedimiento se realizó hasta que alcanzó peso constante, el cual fue registrado.

La determinación se realizó por triplicado.

#### *Cálculos*

$$\text{Contenido de humedad} = \text{peso}_{\text{muestra húmeda}} - \text{peso}_{\text{muestra seca}}$$
$$\% \text{ de humedad} = (\text{contenido de humedad} / \text{peso muestra húmeda}) \times 100$$

### **Determinación de grasa cruda. AOAC<sup>23a</sup>: 920.39**

#### *Material y reactivos*

- Aparato de extracción Goldfish (Labconco Mod 35001-00CV)
- 3 porta dedales de vidrio
- 3 anillos metálicos para extracción Goldfish
- 3 vasos de borde esmerilado (Labconco 35051)
- 3 cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- 3 tubos recuperadores de disolvente
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)
- Bomba de recirculación (Little Grant pump Mod. 1)
- Éter de petróleo

#### *Procedimiento*

Los vasos esmerilados se colocaron en la estufa de vacío hasta que alcanzaron peso constante el cual fue registrado.

En los cartuchos de celulosa se colocaron aproximadamente 2 g de muestra, posteriormente los cartuchos se introdujeron en los porta dedales de vidrio y se colocaron en el compartimiento de extracción de Goldfish.

En los vasos esmerilados se colocaron aproximadamente 40 mL de éter de petróleo y con ayuda del anillo metálico se colocaron en el aparato de extracción, el cual estaba conectado a una bomba de recirculación de agua helada.

Finalmente se subieron las parrillas de calentamiento del equipo y se trabajó con el control de calentamiento en la posición de LOW durante 2 horas. Después de este tiempo

se bajaron las parrillas de calentamiento, se sacaron los porta dedales y se sustituyeron por los tubos recuperadores de disolvente, se volvieron a colocar los vasos esmerilados y se subieron nuevamente las parrillas para iniciar el calentamiento. Cuando los vasos se encontraron casi libres de disolvente, fueron retirados del equipo y colocados por unos minutos en una campana de extracción, para asegurar la completa evaporación del disolvente. Posteriormente los vasos fueron colocados en la estufa de vacío hasta alcanzar peso constante, el cual también fue registrado.

La determinación se realizó por triplicado.

#### *Cálculos*

$$\text{Cantidad de grasa} = \text{peso}_{(\text{vaso} + \text{grasa})} - \text{peso}_{\text{vaso}}$$
$$\% \text{ de grasa} = (\text{cantidad de grasa} / \text{peso muestra}) \times 100$$

**Determinación de Proteína cruda (Nitrógeno total).** AOAC <sup>23a: 955.04</sup> Con modificaciones

#### *Material y reactivos*

- Digestor (Tecator 20-40)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto analyzer Tecator Mod 1030)
- 4 tubos de digestión de 75 mL (Tecator)
- Mezcla digestiva (3 g de CuSO<sub>4</sub>:5H<sub>2</sub>O, 50 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 430 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado)
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40% (p/v) (Se disolvieron 40 g de NaOH en 100 mL de agua destilada)

- Solución de ácido bórico al 1% con indicadores (Se pesaron 20 g de ácido bórico y se disolvieron en 1.8L de agua destilada. Posteriormente se añadieron 20 mL de verde bromocresol (100 mg en 100 mL de metanol) y 14 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 mL de metanol). Se agitó vigorosamente y se llevó al aforo con agua destilada a un volumen de 2 L. De ser necesario se ajustó con NaOH 0.1 N hasta que el color sea de un tono gris)
- Solución de HCl 0.01N valorada

#### *Procedimiento*

Se pesaron aproximadamente 20 mg de muestra seca y molida y 0.5 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se depositaron dentro de un tubo de digestión y se añadieron 3 mL de mezcla digestiva. Los tubos así preparados se colocaron en el digestor y después de 15 minutos a 340°C, se sacaron y mantuvieron a temperatura ambiente por 10 minutos. Se adicionaron 1.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y, se colocaron nuevamente en el digestor a 370°C hasta que se logró transparencia en la mezcla. Se realizó la destilación recibiendo el amoniaco liberado en ácido bórico con indicadores y valorando con HCl 0.01N. El objetivo de modificar la mezcla digestiva y utilizar peróxido de hidrógeno fue lograr la completa oxidación de la materia orgánica y reducir la pérdida de nitrógeno por formación de aminas o nitrógeno libre, favoreciendo la formación de sulfato de amonio. Se realizó el mismo tratamiento con caseína (88.88% de proteína) para corregir el valor obtenido.

La determinación se realizó por cuadruplicado.

#### *Cálculos*

$$\% \text{ de nitrógeno} = [(M - B) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times F$$

Donde:

M = mL de titulación de la muestra

B = mL de titulación del blanco

N = Normalidad del la solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra en gramos

F = factor de conversión de proteína. En este caso se empleó el valor de 6.25.

### **Determinación de Proteína verdadera. AOAC <sup>23b</sup>**

#### *Materiales y reactivos*

- Digestor (Tecator 20-40)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Equipo de microdestilación (Kjeltec Auto analyzer Tecator Mod 1030)
- 4 tubos de digestión de 75 mL (Tecator)
- Papel Whatman # 50 de 5 cm (poro cerrado) o equivalente
- Mezcla digestiva (Se mezclaron durante aprox. 30 minutos: 3 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 300 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 100 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 60% (p/v) (Se disolvieron 60 g de NaOH en 100 mL de agua destilada)
- Solución precipitante (Se disolvieron 5 g de tungstato de sodio y 1.51 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  en 20 mL de agua destilada, se añadieron 22 mL de HCl 2 N, se mezclaron y llevaron al aforo de 50 mL con agua destilada)
- Solución de ácido bórico al 1% con indicadores (Se pesaron y disolvieron 20 g de ácido bórico en 1.8L de agua destilada. Posteriormente se añadieron 20 mL de

verde bromocresol (100 mg en 100 mL de metanol) y 14 mL de rojo de metilo (100 mg en 100 mL de metanol). Se agitó y llevó al aforo con agua destilada a un volumen de 2L. De ser necesario se ajustó con NaOH 0.1 N hasta que el color sea de un tono gris)

- Solución de HCl 0.01N valorada

*Procedimiento:*

En un vaso de precipitados de 50 mL se pesaron 40 mg de muestra finamente molida y se agregaron 5 mL de agua caliente agitando mecánicamente por 15 minutos. Posteriormente se adicionaron 2 mL de solución precipitante, dejando reposar la mezcla por 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se filtró cuantitativamente la solución en papel (Whatman #50 o 542), utilizando 25 mL de agua destilada caliente y ligera succión con vacío.

En los tubos de digestión se colocaron el papel filtro con el precipitado, 0.5 g de  $K_2SO_4$  y 5 mL de mezcla digestiva. Se introdujeron en el digestor y se calentaron por aprox. 15 minutos. Se retiraron del digestor y se esperó a que se enfriaran para añadirles 3 mL de  $H_2O_2$  al 30%. Se introdujeron nuevamente al digestor y se calentaron hasta que la digestión fue completa (temperatura de digestión  $370^\circ C$ ).

Se realizó la destilación recibiendo el amoníaco en ácido bórico con indicadores y valorando con HCl 0.01N.

Se realizó el mismo tratamiento con caseína (88.88% de proteína) en donde se incluyó papel filtro para corregir el valor obtenido.

La determinación se realizó por triplicado.

### *Cálculos*

$$\% \text{ de nitrógeno} = [(M - B) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

$$\% \text{ de Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times F$$

Donde:

M = mL de titulación de la muestra

B = mL de titulación del blanco

N = Normalidad del la solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra en gramos

F = factor de conversión de proteína que en el cado del residuo se empleó el valor de 6.25.

### **Determinación de ceniza AOAC <sup>23a: 942.05</sup>**

#### *Material*

- Mufla (Heraew Hanau)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Mechero Bunsen
- Campana de extracción
- 3 crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio

### *Procedimiento*

Los crisoles se colocaron en la mufla a una temperatura de 500°C hasta alcanzar peso constante, el cual fue registrado. Posteriormente, en cada uno se pesó aproximadamente un gramo de muestra.

Los crisoles con muestra se colocaron en la flama de un mechero con el fin de carbonizar la muestra hasta que el desprendimiento de humo fue nulo o mínimo. Posteriormente los crisoles se introdujeron en la mufla, la cual mantuvo una temperatura constante de 500°C.

Después de aproximadamente 16 horas se sacaron los crisoles de la mufla, se colocaron en un desecador durante 45 minutos y se pesaron en la balanza analítica. Posteriormente se volvieron a introducir en la mufla y se realizaron pesadas periódicas de los crisoles hasta que alcanzaron peso constante, el cual fue registrado.

La determinación se realizó por duplicado.

### *Cálculos*

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de ceniza} &= \text{peso}_{(\text{crisol} + \text{ceniza})} - \text{peso}_{\text{crisol}} \\ \% \text{ de ceniza} &= (\text{cantidad de ceniza} / \text{peso muestra}) \times 100 \end{aligned}$$

### **Determinación de fibra cruda AOAC <sup>23a: 962.09</sup>**

#### *Material y reactivos*

- Aparato de digestión (Labconco)
- 3 vasos de Berzelius de 600 mL (Kimax)
- Balanza analítica (Sartorius analytic)
- Mufla (Heraew Hanau)
- Mechero Bunsen
- Estufa de vacío (Lab-Line Duo Vac Oven Mod. 3620)

- 3 crisoles de porcelana
- 3 matraces de vidrio Kitasato (Kimax)
- 3 embudos Buchner con alargadera
- Silicato de aluminio
- Filtro de lino
- Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.25% (m/v)
- Solución de NaOH al 1.25% (m/v)
- Solución antiespumante
- Alcohol etílico

#### *Procedimiento*

La muestra desengrasada obtenida en la determinación de grasa se pasó cuantitativamente a los vasos Berzelius a los que previamente se le añadió aproximadamente 0.5 g de silicato de aluminio.

A continuación, se adicionaron 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.25% (m/v) hirviendo, así como unas perlas de vidrio y gotas de antiespumante para controlar la ebullición.

Los vasos se colocaron inmediatamente en el aparato de digestión el cual fue previamente calentado, ahí permanecieron exactamente 30 minutos. Al término de este tiempo se vació el contenido sobre un embudo californiano con filtro de lino y se filtró con ayuda de vacío, lavando el residuo con agua (destilada) caliente hasta eliminar el ácido.

El residuo de nuevo fue transferido cuantitativamente al vaso Berzelius y se adicionaron 100 mL de NaOH al 1.25% (m/v) hirviendo y unas gotas de antiespumante. Los vasos se mantuvieron en el aparato de digestión por 30 minutos exactos. Transcurrido este tiempo se vació nuevamente el contenido de cada vaso sobre el embudo con el filtro de lino y se

filtró al vacío, lavando el residuo con agua destilada caliente hasta que se eliminó el álcali y finalmente se agregaron 12.5 mL de alcohol etílico.

El residuo se transfirió a un crisol de porcelana el cual estaba a peso constante, se colocó en la estufa de vacío para su secado hasta que alcanzó peso constante y se registró dicho peso.

Posteriormente se carbonizó el residuo en la flama de un mechero y se introdujo en la mufla para su incineración, los crisoles fueron pesados periódicamente hasta que alcanzaron peso constante y se registró ese valor.

La determinación se realizó por triplicado.

#### *Cálculos*

$$\% \text{ de fibra cruda} = \frac{[(\text{peso}_{\text{ crisol con residuo después de secado}} - \text{peso}_{\text{ crisol + cenizas}}) / \text{peso muestra}] \times 100}{100}$$

#### **Hidratos de Carbono digeribles**

El porcentaje de hidratos de carbono se calculó por diferencia, restando al 100% la suma de los porcentajes de humedad, grasa cruda, proteína cruda, cenizas y fibra.

#### *Cálculos*

$$\text{HCD} = 100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ grasa cruda} + \% \text{ proteína} + \% \text{ fibra cruda} + \% \text{ cenizas})$$

**Determinación del perfil de aminoácidos por HPLC de fase reversa, previa hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor, 4 horas a 145°C.** <sup>28, 39, 40</sup>

### *Materiales y reactivos*

#### Hidrólisis

- Estación de trabajo Pico Tag, WATERS
- Viales de reacción de la estación de trabajo Pico Tag
- Bomba de vacío RV8, EDWARDS
- Refrigerante tipo dedo frío
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Cortador de vidrio o marcador de tinta permanente
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 200- 1000  $\mu$ L, FINNPIPETTE
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Agua destilada y desionizada<sup>a</sup>
- Hielo seco
- Metanol (Q. P.)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%), INFRA
- HCl 6 N, 0.1% de fenol<sup>b</sup>

#### Preparación de la muestra

- Micro pipeta y puntas con capacidad de 50- 200  $\mu$ L, FINNPIPETTE
  - Pipetas Pasteur
  - Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
  - Matraces aforados de 5 mL
  - Jeringas de 10 mL
  - Acrodiscos de nylon, 0.2  $\mu$ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, GELMAN
  - Tubos de ensayo de 10 x 70 mm, PIREX
  - Cartucho Sep Pak C<sub>18</sub> Classic, WATERS
  - Agua destilada y desionizada<sup>a</sup>
  - Norleucina 5 mM- HCl 10 mM<sup>c</sup>
  - Acetonitrilo grado HPLC, JT-BAKER
-

- Acetonitrilo: Agua 20:80<sup>d</sup>

#### Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 5- 50  $\mu$ L, FINNPIPETTE
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 50- 200  $\mu$ L, FINNPIPETTE
- Micro pipeta y puntas con capacidad de 100- 1000  $\mu$ L, FINNPIPETTE
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Parrilla de calentamiento, Stirrer/Hot Plate CORNING, con baño de agua a 55°C
- Parafilm
- Estándar de aminoácidos H: 2.5 mM, Cistina: 1.25 mM, PIERCE
- Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilcarbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), WATERS<sup>e</sup>

#### Análisis cromatográfico

- Sistema HPLC, Agilent Technology, mod. 1100
- Horno y unidad de control de temperatura mod. 111, WATERS
- Columna cromatográfica (AccQ Tag Nova Pack C<sub>18</sub> tamaño de partícula 4  $\mu$ m, de 3.9 mm x 150 mm, WATERS)
- Sistema de filtración a vacío y filtros de 0.45 (tipo HA) y 0.22 (tipo (GV)  $\mu$ m de tamaño de poro, MILLIPORE
- AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos) de WATERS
- Acetonitrilo (grado HPLC), JT BAKER
- Agua destilada y desionizada<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Utilizar agua destilada y desionizada pasada por un filtro de 0.22  $\mu$ m o agua purificada de 18 Mohm de resistividad.

<sup>b</sup> Se puede utilizar HCl 6 N de punto de ebullición constante, agregando un cristal de fenol durante la preparación de la muestra a hidrolizar.

<sup>c</sup> Disolución de norleucina (c.b.p. 5 mM) en HCl 0.1 M suficiente para obtener 10 mM al final

<sup>d</sup> 200 mL de acetonitrilo grado HPLC más 800 mL de agua purificada (según a)

<sup>e</sup> AccQ Fluor Reagent Kit de WATERS

### *Procedimiento*

#### **Derivatización**

- *Reconstitución de AQC*

Se precalentó la parrilla con baño de agua a 55°C. Una vez que todo el reactivo de derivatización AQC (vial 2A) se encontró en la parte inferior del vial, se enjuagó la punta de una micro pipeta de 1000 µL y se cargó con 1000 µL del reactivo de dilución de AQC (vial 2B), y desechándolos para después transferir 1000 µL del mismo reactivo (vial 2B) para reconstituir el reactivo de derivatización AQC (vial 2A). Se cerró el vial 2A herméticamente y agitó (con Vortex) por 10 s. Se calentó (no más de 10 minutos) en la parrilla hasta la disolución del reactivo de derivatización AQC. El reactivo se almacenó en refrigeración cuando no fue utilizado, cuidando de exponerlo lo menos posible a la humedad del ambiente para evitar su degradación.

- *Preparación de un estándar de aminoácidos*

Se mezclaron 80 µL de la solución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20 µL de norleucina 5 mM-HCl 10 mM y 900 µL de agua purificada para obtener un estándar de 16 aminoácidos (Asp, Ser, Glu, Gly, Hys, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Mer, Lys, Ile, Leu y Phe) de concentración 0.2 mM (cistina, 0.1 mM) con 0.1 mM de norleucina como estándar interno.

- *Derivatización de aminoácidos*

Se depositaron en un tubo de ensayo de 4 x 50 mm, 10  $\mu$ L del estándar de aminoácidos, evitando que la punta de la pipeta tocara las paredes del tubo; se agregaron 70  $\mu$ L del buffer de boratos (vial 2B) y se agitó el tubo en un vórtex por 10 s. Finalmente se añadieron 20  $\mu$ L del reactivo de derivatización ya reconstituido, vial 2A y se agitó en el vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se lleva a cabo la reacción y se hidroliza el exceso de AQC. Se cubrió con parafilm la boca del tubo y se introdujo en el baño de agua a 55°C durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina.

### **Análisis cromatográfico**

- *Preparación de la fase móvil*

Buffer de acetatos-ácido fosfórico (fase A), pH  $5.02 \pm 0.02$

Se diluyeron 100 mL de concentrado A (AccQ Tag concentrado A) hasta 1000 mL con agua purificada utilizando un matraz volumétrico de 1000 mL. Se hizo pasar toda la fase a través de un sistema de filtración a vacío con un filtro de tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m tipo HA. La fase preparada se almacenó en refrigeración conservándose hasta por un mes, filtrándole y desgasificándole cuando no fue utilizada por más de dos días. El pH debió ser de 5.02, ajustándolo con ácido fosfórico concentrado o hidróxido de sodio 5 N, cuando fue necesario.

Acetonitrilo: agua 60:40 (fase B)

En una probeta de 1000 mL, se vertieron 600 mL de acetonitrilo grado HPLC y se añadieron 350 mL de agua purificada. Después de que hubo salido el aire en la probeta, se ajustó a 1000 mL con agua purificada. Se filtró y desgasificó la fase B de la misma forma que la A pero empleando un filtro de tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m tipo GV. Se almacenó en refrigeración para conservar su composición durante una semana, volviendo a filtrar y desgasificar al momento de emplearla.

- *Acondicionamiento del equipo*

Se encendió el equipo (computadora, bombas, desgasificador y detector, en ese orden), después de asegurar que había suficiente fase A y B para cada una de las bombas y que la columna se encontraba conectada en la dirección adecuada. El acondicionamiento del equipo se programó en la computadora como sigue:

<b>Acondicionamiento del equipo</b>			
Tiempo (min)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/min)
Inicio	0	100	0
5	0	100	1
40	0	100	1
45	100	0	1
60	100	0	1
65	100	0	0

El detector se programó a 254 nm de longitud de onda, ajustando a cero antes del tiempo en que empezara a fluir la fase A (amortiguador) pues de lo contrario, en el desarrollo del gradiente, de la línea base caería por debajo de cero al irse enriqueciendo con acetonitrilo al 60%, de modo que en la computadora no podría establecerse la línea base para la integración de cada uno de los picos.

- *Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos*

Cuando terminó el programa de acondicionamiento del equipo, se cambió el programa de acondicionamiento por el de gradiente (previamente grabado en la computadora). El programa de gradiente establecido en la técnica, tuvo que modificarse en algunos tiempos

y porcentajes de las fases, debido a que los tiempos de retención de algunos aminoácidos eran muy cercanos, lo que no permitía su separación y cuantificación. A continuación se presenta el programa de gradiente empleado para esta determinación. Las modificaciones realizadas se marcan con letra negra.

<b>Programa de gradiente</b>			
Tiempo	% A	% B	Flujo (ml/min)
inicio	100	0	1
0.5	98	2	1
<b>11</b>	93	7	1
19	<b>87</b>	<b>13</b>	<b>0.7</b>
<b>23</b>	<b>72</b>	<b>28</b>	1
<b>27</b>	<b>72</b>	<b>28</b>	1
<b>28</b>	<b>70</b>	<b>30</b>	1
<b>36</b>	<b>67</b>	<b>33</b>	1
<b>37</b>	0	100	1
41	0	100	1
42	100	0	1
43	100	0	1.2
64	100	0	1.2
65	100	0	1
66	0	100	1
100	0	100	1

Una vez cargado el programa en la computadora, se subió poco a poco el flujo hasta 1mL/minuto. Una vez estabilizado el flujo se inició el programa de gradiente con el cual se efectuó la separación de los derivados de los aminoácidos.

A partir del minuto 37, el gradiente ya no tiene influencia en la separación de los derivados de los aminoácidos. A partir del minuto 66, el gradiente se diseñó para lavar la columna al finalizar cada inyección.

El orden de elución de los aminoácidos es el siguiente:

---

1. Aminoquinolina (AMQ)	11. Prolina
2. Aspártico	12. Cistina
3. Serina	13. Tirosina
4. Glutámico	14. Valina
5. Glicina	15. Metionina
6. Histidina	16. Lisina
7. Amoniaco	17. Isoleucina
8. Arginina	18. Leucina
9. Treonina	19. Norleucina
10. Alanina	20. Fenilalanina

---

Se inyectaron 10  $\mu$ L de solución estándar de aminoácidos derivatizada, durante la etapa de adecuación y 10  $\mu$ L de hidrolizados de aminoácidos derivatizados en el análisis de la muestra.

### *Cálculos*

Previamente se debe correr una solución estándar que contenga 0.2 mM de cada aminoácido con 0.1 mM de norleucina como estándar interno, para obtener de este aminograma tanto el área de cada uno de los aminoácidos como el área de la norleucina y así poder hacer los cálculos con base a los llamados equivalentes de norleucina de cada uno de los aminoácidos.

Del aminograma del hidrolizado, se debe de calcular el área de cada uno de los aminoácidos, así como el área de la norleucina en el correspondiente. Para obtener el contenido en gramos del aminoácido por 16 gramos de nitrógeno (o 100 gramos de proteína) en la muestra se realiza el cálculo siguiente:

$$\text{g aminoácido/16gN} = \frac{1.6 \times A \times \text{respuesta}_{\text{muestra}} \times (1/\text{respuesta}_{\text{estándar}}) \times C_{\text{aa estándar}} \times \text{P.M.} \times C_{\text{norleucina muestra}}}{(\text{peso}_{\text{muestra}} \times \%N) \times C_{\text{norleucina estándar}}}$$

Donde:

A = volumen de aforo

1.6 = factor de conversión

respuesta<sub>muestra</sub> = relación de áreas aminoácido a norleucina en la muestra

respuesta<sub>estándar</sub> = relación de áreas aminoácido a norleucina en el estándar

C<sub>aa estándar</sub> = concentración del aminoácido en el estándar

C<sub>norleucina muestra</sub> = concentración de la norleucina en la muestra

C<sub>norleucina estándar</sub> = concentración de la norleucina en el estándar

PM. = peso molecular del aminoácido

peso<sub>muestra</sub> = peso de la muestra en mg

%N = porcentaje de nitrógeno en la muestra

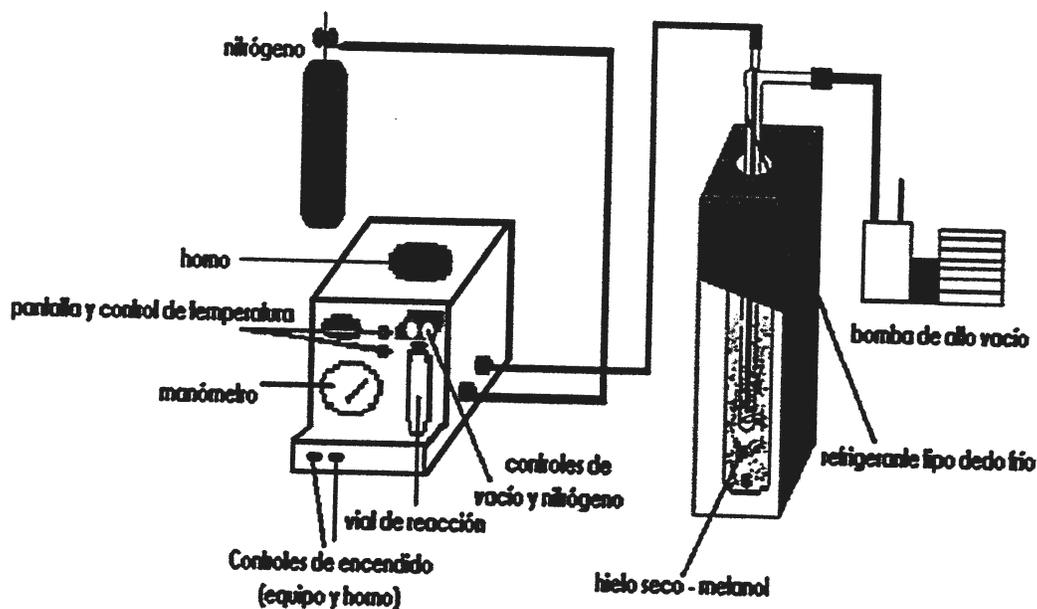
### **Hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor, por 4 horas a 145 °C**

- *Preparación de la estación de trabajo*

La estación de trabajo se preparó de acuerdo al diagrama (Figura 8). Se depositó hielo seco en el recipiente del refrigerante tipo dedo frío y se cubrió con metanol. Se verificó que los controles de vacío y de Nitrógeno se encontrarán cerrados y posteriormente se encendió la bomba de vacío, después de cinco minutos la lectura del manómetro de la

estación de trabajo era de 50-70 miliTorr y la presión de salida del nitrógeno no excedía  $0.3 \text{ kg/cm}^2$ .

Figura 8. Estación de trabajo Pico-Tag empleada en la determinación del perfil de aminoácidos



- *Secado*

Se pesaron 10 mg de muestra seca y desengrasada (15 mg en el caso de muestras con menos de 20% de proteína) en un tubo de 4 x 50 mm, previamente marcado con el cortador de vidrio o con marcador de tinta permanente. Se agregó una gota de agua (aproximadamente 50  $\mu\text{L}$ ) y se agitó unos segundos en el vórtex con el objeto de hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo para mejorar su exposición

a los vapores de HCl. El tubo se depositó en un vial de reacción seco, se le colocó la tapa y se deslizó el botón a la posición *abierto* (Figura 9).

Figura 9. Vial de reacción empleado en la preparación de muestras e hidrólisis en la determinación del perfil de aminoácidos

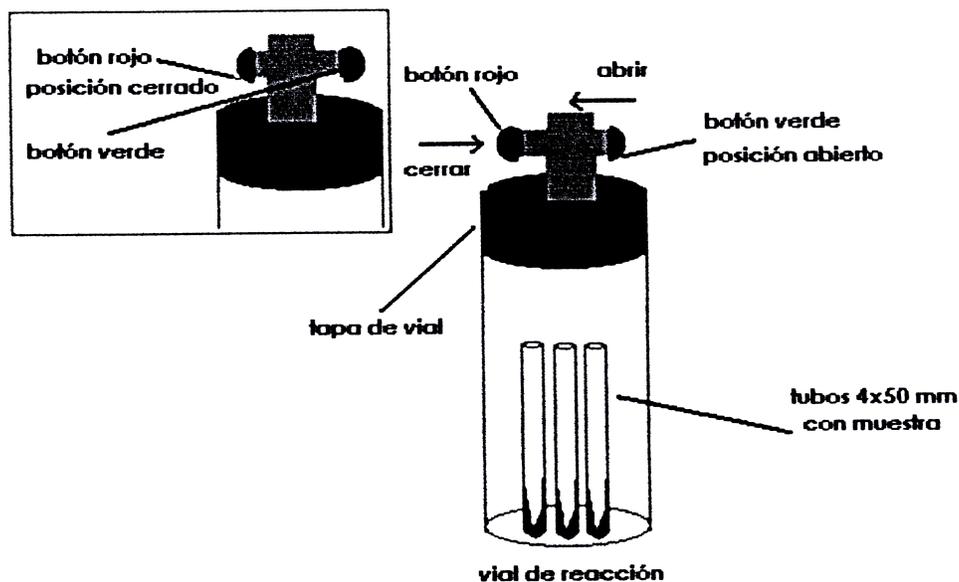
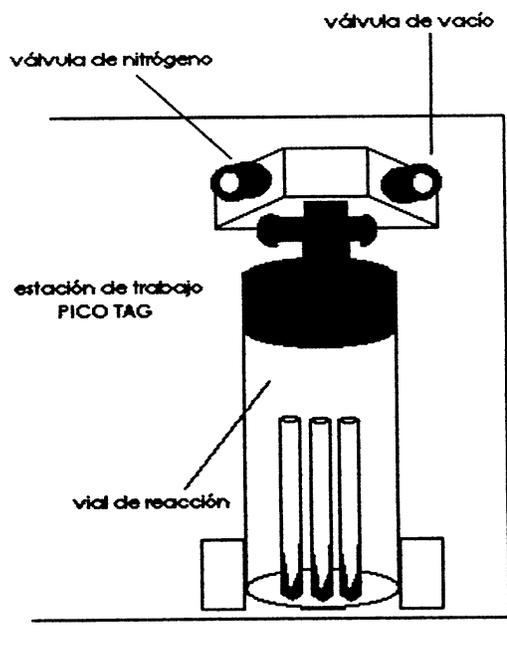


Figura 10. Vial de reacción en la estación de trabajo



El vial se colocó en la estación de trabajo (Figura 10), se abrió la válvula de nitrógeno durante 10-15 segundos, después se abrió lentamente la válvula de vacío hasta alcanzar una presión de 1-2 Torr. La espuma y ebullición de la mezcla con la muestra se controló abriendo y cerrando la válvula de nitrógeno, para evitar pérdidas por proyección del material al exterior del tubo. Una vez desaparecida la espuma, se cerró la válvula de nitrógeno y se mantuvo abierta la del vacío hasta secar las muestras (alcanzar presión de 50-70 miliTorr. Una vez seca se cerró la válvula de vacío y se retiró el vial de la estación de trabajo (Figura 9).

- *Purga con nitrógeno*

Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de HCl 6 N con 0.1% de fenol en el fondo del vial de reacción, cuidando no introducir ácido al interior de los tubos con muestra. Se cerró el vial y se introdujo nuevamente en la estación de trabajo (Figura 9 y 10). Para purgar el vial se abrió lentamente el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr de presión y se mantuvo abierto hasta que empezó la ebullición del HCl (cuando no ocurrió en 30 seg, se continuo con la purga); se cerró el vacío y se purgó el vial con nitrógeno durante 5 segundos; se cerró el

nitrógeno y se repitió este ciclo dos veces más. Al completar el tercer ciclo, se abrió el vacío del mismo modo y se mantuvo hasta que se alcanzó una presión ligeramente menor a 1 Torr. Se cerró el vial deslizando el botón verde a la posición de *cerrado*, se cerró el vacío y se sacó el vial de reacción de la estación de trabajo (Figura 9).

- *Hidrólisis en fase de vapor*

Una vez preparada la muestra, se introdujo el vial de reacción al horno de la estación de trabajo, previamente calentado a 145°C y se mantuvo ahí por 4 horas.

### **Preparación de hidrolizados**

- *Eliminación del exceso de HCl*

Una vez cumplido el tiempo, se sacó el vial del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción, deslizando el botón rojo a la posición abierto para dejar escapar el ácido y los vapores que se generaron durante el proceso.

Después se abrió el vial de reacción y se sacaron los tubos con los hidrolizados, se enjuagaron de la parte exterior con agua para quitar el ácido y se depositaron en un vial de reacción seco.

Ya limpios los tubos se procedió a eliminar el exceso de ácido del interior de éstos con ayuda de vacío. Para ello se tapó el vial asegurando que la tapa se encontrara en la posición de abierto, se introdujo en la estación de trabajo y se abrió el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr, se mantuvo abierto hasta que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fue de 50-70 miliTorr. Posteriormente se cerró el vial y el vacío, conservando así los hidrolizados en una atmósfera inerte hasta su posterior preparación.

- *Preparación de la muestra; re-hidratación del hidrolizado*

A cada tubo con hidrolizado se agregaron 100  $\mu$ L de norleucina 5 mM-HCl 10 mM, la norleucina se emplea como estándar interno y el ácido clorhídrico para rehidratar y extraer los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se agitó en vórtex durante un minuto y se dejó reposar un minuto para después agregar 100  $\mu$ L acetonitrilo 20%, agitando un minuto más en vórtex, para transferir después cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 o 5 mL con ayuda de una pipeta Pasteur, se lavó con acetonitrilo al 20% (en total, 400  $\mu$ L en el caso de aforo a 1 mL y hasta 2.5 mL en el caso de volumen de aforo de 5 mL; en adiciones de 100 en 100  $\mu$ L) y se agitó cuando fue necesario, hasta que la solución de lavado fue incolora, transfiriendo cuantitativamente el contenido de cada paso de lavado al matraz volumétrico de 5 o 1 mL, según el caso.

El lavado con acetonitrilo permitió mejorar la extracción de los aminoácidos menos polares. La elección del volumen de aforo es función del contenido de proteína; 1 mL para muestras con un porcentaje de proteína menor a 20% y 5 mL para muestras con porcentajes mayores.

Se llevó al aforo con agua purificada (concentración final de norleucina: 0.1 mM y 0.5 mM para volumen de aforo de 1 mL).

- *Preparación de las muestras: purificación y filtración*

La muestra se purificó con ayuda de un cartucho Sep Pak C<sub>18</sub>, el cual fue previamente activado de la siguiente manera:

Con ayuda de una jeringa conectada a la parte más larga, se hicieron pasar lentamente 6 mL de acetonitrilo grado HPLC por el cartucho (1-2 mL/minuto) e inmediatamente después se hicieron pasar 6 mL de agua purificada.

Una vez activado el cartucho y sin que se secase, se hicieron pasar 5 mL de la muestra, desechando los primeros 2 mL (para eliminar la mezcla de hidrolizado con el agua remanente de la activación) y recolectando en un tubo de ensayo el resto de la muestra que contiene los aminoácidos.

Ya purificada la muestra, se filtró a través de un acrodisco de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, conectado en la punta a una jeringa con la muestra purificada, desechándose las 3-5 primeras gotas y recuperándose el resto del cuál fue tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos. Las muestras con menos de 20% de proteína sólo fueron filtradas a través del acrodisco.

- *Análisis cromatográfico*

Una vez purificado y filtrado el hidrolizado de la muestra, se derivatizaron 10  $\mu\text{L}$  de éste de la forma ya descrita. Ya derivatizado se inyectaron en el cromatógrafo, con las condiciones ya indicadas, de 5 a 20  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{L}$  para muestras con porcentajes de proteína elevados y 20  $\mu\text{L}$  para muestras con porcentajes de proteína bajos), con el objeto de generar respuestas dentro del intervalo lineal, para todos los aminoácidos.

### **Determinación de Triptofano por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).<sup>30,31</sup>**

#### *Material y reactivos*

- Balanza analítica (Sartorius analytic)
  - Digestor (Tecator 20-40)
  - Tubos de vidrio con tapón de rosca de teflón (Kimax)
  - Potenciómetro (CORNING, mod 10)
  - Embudo de filtración rápida
  - Embudo de kitasato
-

- Agitador magnético
- Matraz Buchner
- Termómetro
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Sistema HPLC
- Solución estándar de triptofano (0.51 mg/mL). (Se pesaron 12.75 mg de triptofano, se disolvieron y aforaron a un volumen de 25 mL con buffer de boratos pH 9)
- Buffer de borato de sodio 0.06 N (pH 9) (Se pesaron 6 g de borato de sodio los cuales se disolvieron en 80 mL de agua desionizada caliente, para después ajustar el pH a 9 y aforar a 100 mL)
- Ácido clorhídrico 12 N
- Hidróxido de Litio 4 N
- Agua desionizada
- Nitrógeno gaseoso de alta pureza

#### Análisis cromatográfico

- Sistema de entrega de disolventes (WATERS mod. 510)
- Inyector con loop de 20  $\mu$ L (Rheodyne)
- Detector UV-Vis mod.486 Waters, WATERS
- Jeringa para HPLC de 25  $\mu$ L (Hamilton)
- Columna MILLENNIUM 32 PROGRAM A 300 x 3.5 mm I.D. Nova-Pack C<sub>18</sub> 4 $\mu$ m (Waters)
- Acetonitrilo grado HPLC
- Buffer de acetato de sodio 25 mM pH 6. (Se pesaron 3.402 g de CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O, se disolvieron en agua desionizada y se ajustó el pH a 6. Posteriormente se añadieron 0.2 g de azida de sodio como conservador y se llevó a un volumen de

1L con agua desionizada previamente filtrada a través de una membrana de 0.45 micras, con ayuda de vacío. Esta solución amortiguadora se filtró dos veces)

- *Elaboración de una curva estándar*

Se hizo una curva estándar a partir de una solución estándar de triptofano de 0.51 mg/mL. Para ello se midieron 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu$ L y cada uno se llevó a un volumen de 10 mL con buffer de boratos 0.06 N (pH 9). Cada punto de la curva se inyectó por triplicado.

- *Hidrólisis*

Se pesaron 0.2 g de muestra desengrasada dentro de un tubo de hidrólisis, se le adicionaron 6 mL de LiOH 4 N procurando que la muestra quedara humedecida con el álcali antes de iniciar la hidrólisis. Los tubos se insuflaron con nitrógeno de alta pureza y posteriormente se llevó a cabo la hidrólisis por 4 horas manteniendo la temperatura en 100°C.

Una vez transcurrido el tiempo, los hidrolizados se neutralizaron con HCl 12 N, hasta pH 7 y se aforaron a 25 mL con buffer de borato de sodio 0.06N. Finalmente los hidrolizados fueron filtrados en un filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m.

- *Análisis cromatográfico*

Se inyectaron 20  $\mu$ L de muestra hidrolizada en el cromatógrafo, manteniendo la temperatura de la columna a 18°C. Se utilizó un sistema isocrático con una fase móvil de buffer de acetato de sodio 25 mM y acetonitrilo en una proporción de 97:3 a un flujo de 1 mL/min. La lectura se hizo a 280 nm con un detector UV.

### *Cálculos*

El valor interpolado en la curva estándar esta dado en  $\mu$ g de triptofano por lo que se debió tomar en cuenta el aforo, el peso de la muestra y el porcentaje de proteína de la muestra

desengrasada para expresarlo en gramos de triptofano por 100 g de proteína (o 16 g de nitrógeno).

$$\text{mg Trp/100g proteína} = \frac{A * 25 * B}{P_m * C * 10}$$

Donde:

A =  $\mu$  g Trp / mL interpolado en la curva

25 = volumen de aforo (mL)

B = gramos de sólidos no grasos en 100 g de muestra

C = gramos de proteína verdadera en 100 g de muestra

P<sub>m</sub> = peso de la muestra (g)

10 = factor conversión a mg

### Calificación Química <sup>19</sup>

La calidad de la proteína se evalúa midiendo el contenido de aminoácidos y comparándolo con una proteína de referencia. El resultado de la comparación es expresado como un porcentaje lo cual permite conocer la abundancia de cada uno de los aminoácidos indispensables en la proteína.

*Cálculos:*

$$\text{Calificación química} = \frac{A_{am} \times T_{aar}}{A_{ar} \times T_{aam}} * 100$$

Donde:

A<sub>am</sub> = gramos de aminoácido en la proteína problema

A<sub>ar</sub> = gramos de aminoácido del patrón de referencia

Taar = total de aminoácidos indispensables del patrón de referencia

Taam = total de aminoácidos indispensables en la proteína problema

Para el cálculo de la calificación química se usó como referencia los requerimientos de AAE reportados para tilapia (determinado por Santiago, 1985).<sup>20</sup>

### **Determinación del perfil de ácidos grasos por CG-EM.** <sup>32, 33, 34</sup>

Para el estudio de Espectrometría de Masas (EM) se recurrió a la Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM.

#### *Material y reactivos*

- Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Auto System Gas Chromatograph, Integrator PE Nelson Mod. 1022)
- Columna cromatográfica (Alltech Capillary Column 30 x 0.32 mm ID x 0.25 µm AT<sup>(TM)</sup> – SILAR Serie no. 1303512H)
- Gases: Nitrógeno, Hidrógeno, Aire de alta pureza (99.997%)
- Baño a 80°C (POLYSTAT Instrument Company Mod. 12002)
- Tubos de vidrio con tapón de rosca de teflón (Kimax)
- Pipetas graduadas de 2 y 5 mL
- Matraces aforados de 5 mL
- Jeringa de 10 µL para inyección en el cromatógrafo (Hamilton)
- Vórtex (Lab-Line mod. 1290 super mixer)
- Pipetas Pasteur
- Solución de KOH al 5% en metanol
- Solución de HCl al 10% en metanol
- Estándar de ácidos grasos SUPELCO PUFA No. 1 Marine Source (Ésteres metílicos de mirístato, palmitato, palmitolato, oleato, linolato, dosahexaenoato)

- Mezcla de disolventes Tolueno: Hexano (80:20) (se colocaron 80 mL de tolueno en una probeta de 100 mL y se completó este volumen con hexano)

Nota: todo el material de vidrio se lavó perfectamente con agua destilada y posteriormente se lavó con los siguientes disolventes: tolueno, acetona, metanol y acetona, (en ese orden) antes de ser utilizado. Todos estos reactivos fueron de grado analítico.

### *Procedimiento*

- Esterificación de los ácidos grasos

En un tubo con tapón de rosca, se pesaron 20 mg de aceite extraído de la muestra liofilizada, el cual se extrajo con éter de petróleo en un equipo de extracción Goldfish (Labconco Mod 35001-00CV).

Al tubo con muestra se adicionaron 2 mL de KOH al 5% en metanol y se colocaron en un baño a 80°C por 1 hora.

Al término de este tiempo se dejó enfriar el tubo y se agregaron 2 mL de HCl al 10% en metanol y 100 µL de BF<sub>3</sub> y se volvió a introducir en el baño a 80°C por 1 hora.

Transcurrido el tiempo se sacó del baño y se dejó enfriar. Posteriormente se agregaron 4 mL de agua y 2 mL de mezcla Tolueno: Hexano (80:20), se agitó en un vórtex por espacio de 1 minuto y se separó la fase orgánica. Esto último se repite una vez más y se juntan las fases orgánicas.

Finalmente la fase orgánica se llevó a un volumen final de 5 mL, del cual se tomó 1 µL y se inyectó en el cromatógrafo de gases.

- Inyección de la muestra

Se encendió el cromatógrafo de gases junto con el integrador, posteriormente se abrió la válvula principal del gas acarreador (nitrógeno) y gases de combustión (hidrógeno y aire) y se ajustó la presión de salida de éstos a las siguientes condiciones:

80 psi para el nitrógeno

20 psi para el hidrógeno

40 psi para el aire seco

Se utilizó un programa de temperatura que dio las condiciones físicas adecuadas para la obtención del análisis de composición de los ácidos grasos, estas condiciones fueron las siguientes:

Temperatura inicial del horno: 50°C

Temperatura inicial del detector: 300°C

Temperatura inicial del inyector: 250°C

Presión de gas (flujo): 10 psi

Temperatura final del horno: 300°C

Finalmente se inyectó 1 µL de la muestra previamente esterificada y se llevó a cabo el análisis.

El estándar de ácidos grasos se utilizó con el fin de identificar los picos en los cromatogramas por su tiempo de retención, del estándar se inyectó 1 µL.

La esterificación se llevó a cabo por triplicado, y de cada esterificación se realizó una inyección.

### *Cálculos*

Se calculó el porcentaje de cada ácido graso y colesterol de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ del lípido} = \frac{\text{Área}_{\text{lípido}}}{\sum \text{Áreas}_{\text{lípidos}}} \times 100$$

### **Determinación de Vitamina C AOAC <sup>23a</sup>: 967.21, 25**

#### *Material y reactivos*

- Matraz aforado de 100 mL
- Balanza analítica (Sartorius analytical)
- Pipeta graduada de 10 mL
- Embudo de tallo corto
- Papel filtro de poro grueso
- Bureta graduada de 50 mL
- 3 matraz Erlenmeyer de 25 mL Kimax
- Solución de ácido acético al 5% (en un matraz aforado de 200 mL previamente con un poco de agua, se colocaron 10 mL de ácido acético glacial y se llevó al volumen con agua destilada)
- Solución estándar de vitamina C (1 mg/mL) (se pesaron con exactitud 50 mg de ácido ascórbico anhidro, se colocó en un matraz aforado de 50 mL y se llevó al volumen con ácido acético al 5%)
- Solución de diclorofenol-indofenol (se pesaron 20 mg de 2,6-diclorofenol-indofenol y 10 mg de bicarbonato de sodio, se disolvieron y aforó a un volumen de 200 mL. Para valorar esta solución se colocó un mL de solución estándar de vitamina C con 9 mL de ácido acético al 5 % en un matraz Erlenmeyer y se tituló con la solución de 2,6-diclorofenol-indofenol hasta que persistió el color rosado

por lo menos 10 segundos. La cantidad consumida en mililitros se considera como el título que equivale a 1 mg de vitamina C)

### *Procedimiento*

Se pesó 2 g de muestra y se transvasó a un matraz aforado de 100 mL. Posteriormente se añadió 50 mL de ácido acético al 5% (con el fin de inactivar a la ascorbato oxidasa endógena) y se homogeneizó inmediatamente. Se llevó al aforo con agua destilada, se dejó sedimentar el material insoluble y finalmente se filtró a través del papel filtro para eliminar el material insoluble y obtener el sobrenadante del cual se tomó una alícuota de 10 mL, se colocó en un matraz Erlenmeyer y se tituló con una solución valorada de diclorofenol-indofenol, hasta que persistió el color rosado por lo menos 10 segundos.

### *Cálculos*

$$A = \frac{V_m * 1\text{mg VitC}}{t_{\text{bco}}}$$

$$\text{mg Vit C/100g muestra} = \frac{A * 10 * 100\text{g muestra}}{P_m}$$

Donde:

A = mg de Vitamina C

V<sub>m</sub> = mL gastado al titular la muestra

t<sub>bco</sub> = mL gastados de 2,6-diclorofenol-indofenol al titular el estándar (equivalentes a 1 mg de Vitamina C)

10 = factor de dilución

P<sub>m</sub> = gramos de muestra empleada en la determinación

### **Minerales por absorción atómica AOAC** <sup>23a: 975.03, 24</sup>

Se empleó la técnica de absorción atómica para determinar el contenido de los minerales: sodio, potasio, calcio, magnesio y zinc en la muestra de plancton. Para este estudio se recurrió a la Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM. La determinación se realizó en un equipo Varian Spectr AA220, por triplicado. Las lecturas se realizaron a 213.9 nm, 285.2, 422.7nm, 589.0 nm y 766.5nm para Zn, Mg, Ca, Na y K respectivamente.

### **Determinación de hierro AOAC** <sup>23a: 937.03,25</sup>

#### *Materiales y reactivos*

- Crisoles de porcelana
- Desecador de vidrio
- Parrilla de calentamiento
- Pipetas graduadas de 1.5 y 10 mL
- Matraz aforado de 50 mL
- Embudo de tallo corto
- Pinzas para crisol
- Mufla (Heraew Hanau)
- Espectrofotómetro (Sequoia- Turner mod. 340)
- Solución de ortofenantrolina (se disolvió 0.1 g en 80 mL de agua destilada a 80°C, se dejó enfriar y se aforó a 100 mL con agua destilada)
- Solución de clorhidrato de hidroxilamina (se disolvió 10 g de clorhidrato de hidroxilamina en agua destilada y se aforó a un volumen de 100 mL)
- Buffer de acetatos (se pesó 8.3 g de acetato de sodio anhidro, se adicionó 12 mL de ácido acético y se aforó a 100 ml con agua destilada)

- Estándar de hierro (0.01 mg/mL) (se disolvió 0.3512 g de sulfato de hierro y amonio hexahidratado en agua con unas gotas de HCl y se aforó a 50 mL. De esta solución se tomó 1 mL y se llevó a un volumen de 100mL con agua destilada).

- Preparación de la curva patrón

Se tomaron 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0 mL de la solución estándar de hierro y se colocaron en tubos de ensayo. Los tubos se llevaron a un volumen de 10 mL con agua desionizada y se añadieron en el siguiente orden: 1 mL de clorhidrato de hidroxilamina, se agitó; 5 mL de buffer de acetatos, se agitó y 1 mL de ortofenantrolina y se volvió a agitar. Se dejaron reposar los tubos entre 10 y 15 minutos y después se leyeron a 530 nm. El tubo de cero mL se usó como blanco.

- Preparación de la muestra

Se utilizaron las cenizas obtenidas en la determinación del proximal de la muestra. Al crisol se añadieron con propipeta y en la campana, 2 mL de HCl concentrado para disolver las cenizas. Se dejó evaporar en la campana. Una vez frío se agregaron 1 mL de HCl concentrado y 3.5 mL de agua destilada y con un agitador de vidrio se trató disolver completamente las cenizas. El líquido se pasó cuantitativamente a un matraz aforado de 50 mL; el crisol se lavó con agua por 2 veces más transfiriendo el agua de lavado al matraz y posteriormente se llevó al aforo con agua desionizada. Se filtró la solución y de ella se tomaron alícuotas de 10 mL a las cuales se les desarrolló color de la misma forma que se hizo para la curva patrón. Se leyó la absorbancia a 530 nm.

La determinación se realizó por quintuplicado. La curva patrón se realizó al mismo tiempo que las muestras.

### *Cálculos*

La absorbancia de cada determinación se extrapoló en la curva patrón para obtener los mg de hierro contenidos en la alícuota de 10 mL. La ecuación de la recta fue:  $Abs = 10.122 [Fe] + 4.87 \times 10^{-3}$  con un coeficiente de correlación de 0.998.

$$\text{mg de hierro} = \frac{Abs - 4.873 \times 10^{-3}}{10.122} = A$$

$$\text{Fe ppm} = \text{mg Fe/kg muestra} = \frac{A * 5 * C_m * 10}{P_{cm}}$$

Donde:

A = mg de hierro interpolado en la curva

5 = Factor de dilución

$C_m$  = gramos de ceniza en 100 gramos de muestra

$P_{cm}$  = peso del residuo de ceniza en el crisol

10 = Factor de conversión a ppm