



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Determinación de los requerimientos de vitamina A,
utilizando carotenoides en trucha arcoíris, en dieta con altos
contenidos de origen vegetal”

Que para obtener el título de Biólogo

PRESENTA

Teresa Pérez Carbajal

Director de Tesis

Dr. Luis Héctor Hernández Hernández

Asesores:

M en C. Mario Alfredo Fernández Araiza

Biol. Omar Angeles López

M en C. Teresa Ramírez Pérez

Biol. Agustín Vargas Vera



Los reyes Iztacala, Edo. De México



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Quiero darles las gracias:

MUCHAS GRACIAS

Al Dr. Luis Héctor por su apoyo, su disposición, conocimiento y enorme paciencia, para la realización de este trabajo, al biol. Omar por su ayuda, sus correcciones, y por ir siempre en nuestra ayuda en horarios no laborales

M en C Mario por su conocimiento, por su ayuda en las dudas, y por su enorme esfuerzo en tratar de forjarme un pensamiento profesional y culto. M en C Teresa, por su tiempo y correcciones de la tesis, igual al Biol. Agustín por su apoyo en mis dudas de estadística.

A Yesell y Dan por su enorme ayuda y compañía, pero sobre todo por su amistad. Y a pesar de que pudimos habernos matado no lo hicimos, ¡los quiero mucho!, y por cierto dan lo de las tijeras aun no lo supero.

A Topacio, Gerardo, Omar J, y Santiago, por su compañía y ayuda en mis dudas de procesar datos, y sus asesorías, y por esos momentos que pasamos juntos.

En fin a Todo los del acuario

A mis amigos con los que me fui formando durante estos 5 años, que a pesar de mis múltiples inseguridades y cambios permanecieron a mi lado, diciendo lo que necesitaban decirme en su debido momento; Gracias Moni, Miguel, Omar, Isaac, y también a Jovani en los Primeros semestres

A mi familia por todo su apoyo y por no dejarme dar por vencida....

Índice

Agradecimiento.....	1
Introducción.....	3
Antecedentes.....	7
Justificación.....	8
Objetivos.....	9
Material y métodos.....	9
Resultados y discusión.....	12
Conclusiones.....	19
Anexos.....	24

Introducción

La Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), es un pez que se extiende de forma natural desde Alaska hasta México. Habita principalmente en ríos de aguas claras y frías, aunque también se pueden encontrar en lagos (Araneda, *et al* 2008). Fue en 1850 cuando se mostro un interés en su producción, para la pesca deportiva y la acuicultura, pero hasta 1950 se expandió grandemente, por la introducción de alimento peletizado en los cultivos. Los países que tiene una mayor producción de este organismo son Japón, Chile, América del Norte, y Europa (FAO, 2012).

En México por la creciente demanda de alimento con contenido proteínico, ha aumentando la actividad de cultivo de peces e invertebrados en los últimos años, principalmente en especies de agua dulce como lo son tilapia, carpas, y langostinos. También se ha iniciado el cultivo de trucha arcoíris. Sin embargo, los problemas que enfrenta México en el desarrollo del cultivo de la trucha es la falta de antecedentes y experiencia con este respecto (FAO, 1973).

El poder conocer los requerimientos nutricionales de la trucha, para una producción optima, ha desarrollado un potencial campo de estudio, que ha investigado principalmente las necesidades proteicas, y la realización de nuevas formulaciones de dietas que sean “amigables con el ambiente”. A pesar de todas las investigaciones ya realizadas, se ha dejado a un lado la importancia de determinar algunos micronutrientes tan importantes como lo son las vitaminas (Barrows *et al*, 2008). En específico la vitamina A (vitA) que sus componentes son particularmente relevantes en promover el rápido crecimiento durante las fases de cría y juvenil en peces. Y participando en otras funciones importantes dentro de estos vertebrados (Hernández *et al*, 2002).

La vitamina A (vitA), es un micronutriente liposoluble, y son todos aquellos compuestos que derivan de las características químicas del retinol (Combs, 1998) (Fig. 1).

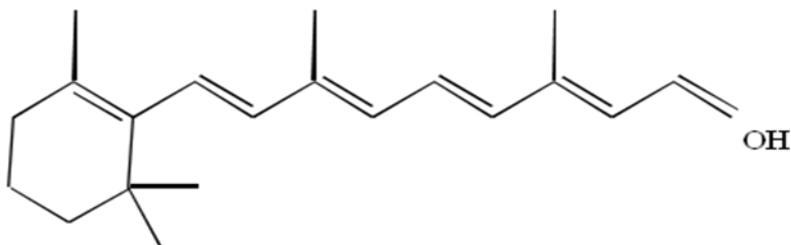


Fig. 1.- Estructura química del all-*trans*-retinol; Se compone de un anillo hexano, unido a una cadena compuesta por dos unidades de isoprenoides, conjugada por un sistema de doble enlace en los carbonos, y en el anillo, 5,6- carbono y un grupo terminal, alcohol.

Estos compuestos son conocidos como retinoides (figura 2). Los peces al igual que los demás vertebrados no son capaces de sintetizar la vitamina A, así que la obtienen a través de su alimentación en forma de retinil ésteres, retinal, y pequeñas cantidades de ácido retinoico. Sin embargo, también pueden obtenerla a partir de los carotenoides que tienen función de provitamina A (provitA).

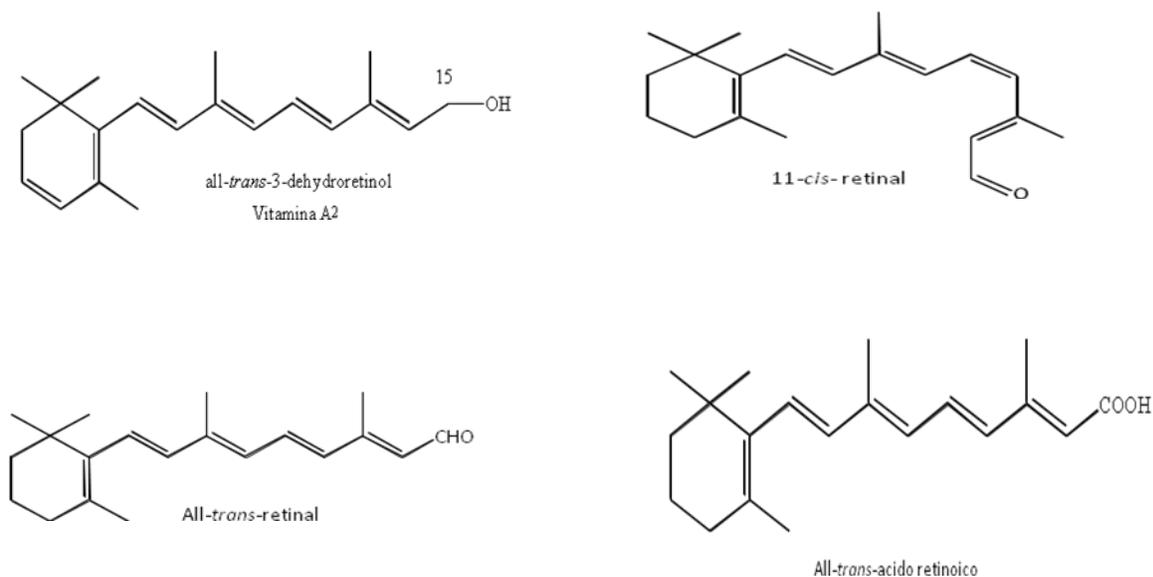


Figura 2. Estructura química de los retinoides

Seguido a la ingesta de estos componentes de vitA, se hidrolizan a través de enzimas, presentes en el intestino. Así los retinil ésteres son transformados a retinol y son absorbidos por los enterocitos para ser transportado por las proteínas RBT (retinol -biding- protein), que tienen la función básica de satisfacer los requerimientos de vitA dentro del organismo.

Cada metabolito del retinol tiene una función determinante en el organismo. El retinol puede ser oxidado a retinal, principalmente en varias formas *cis* y *trans* que participan en el proceso de la visión a través del 11- *cis*- retinal, que forma un grupo cromatóforo fotosensible dentro de las células de la retina. O también puede ser oxidado a ácido retinoico (AR), participando en varias funciones sistémicas, como all-*trans*-AR, que esta presente en el núcleo de las células para la regulación de la expresión de genes. O puede ser esterificado con ácidos orgánicos como ácido palmítico o ácido estereático para su reutilización o bien su almacenamiento dentro del hígado. La mismo ocurre con el retinal puede ser oxidado en AR, o bien puede ser reducido a retinol, donde tiene su participación en la reproducción aunque no se conocen bien las rutas metabólicas que

sigue. Mientras que AR puede ser esterificado con alcoholes orgánicos; Sin embargo, no puede ser reducido a la forma de retinal, ni retinol, esta es una de las causas de que algunos autores consideren que el AR no es vitamina A (Hernández, 2010; Bearer-Rogers *et al.* 2001).

La importancia de la vitA, es esencial ya que forma parte de varias funciones fisiológicas y sistémicas dentro de los peces y otros vertebrados, promueve el crecimiento de los organismos a través de la diferenciación y mantenimiento de las células epiteliales, participa grandemente en la visión a través de los pigmentos en los ojos (Combs, 1992), tiene una función fundamental en la transcripción de genes y división celular (Napoli, 1999), esta última semejante al de las hormonas y da resistencia al sistema inmune contra las infecciones (Weber, 1995).

Fue en 1950 cuando se le distinguió como un nutriente esencial para los peces, y que promovía funciones parecidas a las que tenía en los mamíferos (Woodward, 1994). Sin embargo, diferían en la metabolización de las provit A, con respecto a estos vertebrados, ya que los peces son capaces de metabolizar los carotenoides oxigenados (Xantofilas) así como los carotenos, a vitA (Christiansen *et al.*, 1994). De los aproximadamente 500 carotenoides disponibles de forma natural, solo 60 de ellos tienen función de provitA, esto es por la presencia de un anillo β -ion en la cadena del licopeno (figura 3), que lo hace vulnerable a reacciones oxidativas a través de una enzima para romper sus enlaces y formar moléculas de vitA (Ball, 1988).

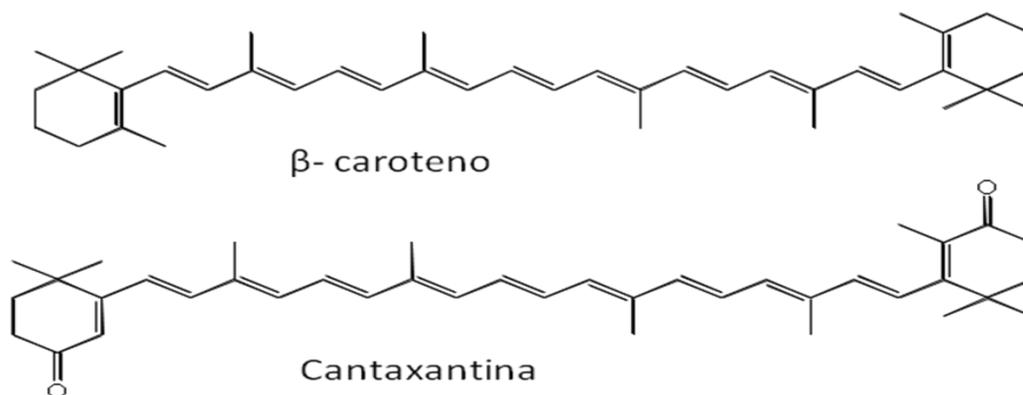


Figura 3. Estructura química de algunas provitaminas

La provitA más conocida es el β - caroteno (β C), y ha sido muy estudiada principalmente en mamíferos. Esta se puede romper por los enlaces centrales o laterales para convertirse en retinal (figura 4), (Meyers *et al.*, 1992). Sin embargo, no ha sido muy estudiada su propiedad de vitA en los peces.

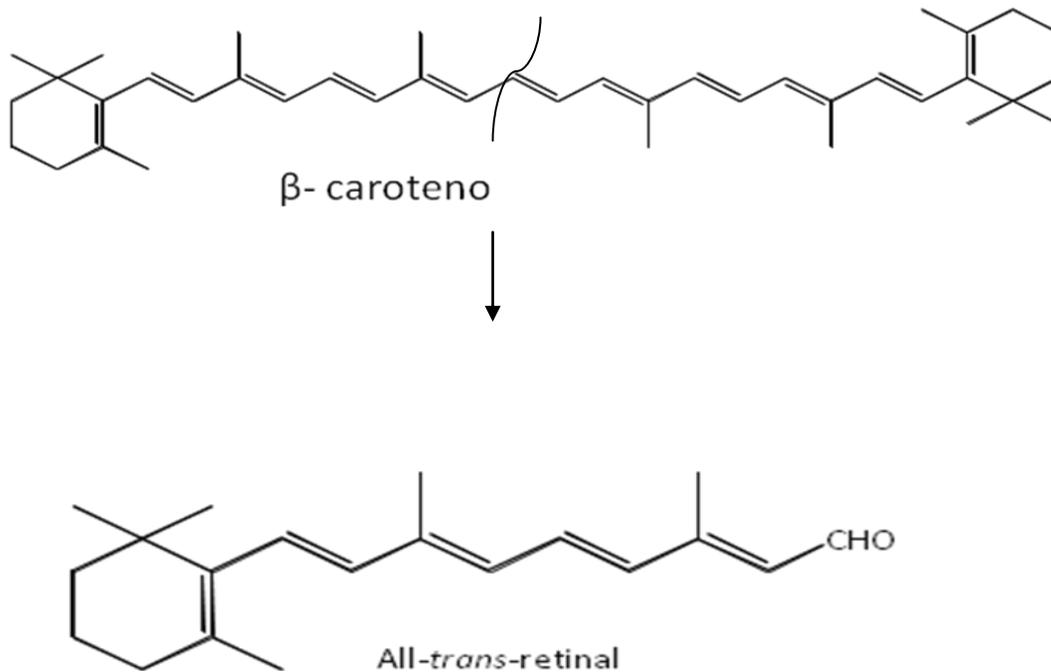


Figura 4. Conversión del β - caroteno a vitamina A

El metabolito 3,4 didehidroretinal (VitA₂) esta presente en peces de agua dulce, y parece ser sintetizado en altas cantidades a partir de los carotenoides (Gross y Budowski, 1966; Del tito, 1983) y su actividad esta en la formación de la molécula piropsina (Halver, 2002). Y se ha asegurado que diversas especies de peces incluyendo los salmónidos, son capaces de utilizar los carotenoides como origen de vitaA (Neilands, 1947; Gross y Budowski, 1966).

Para poder determinar los requerimientos de la vitamina A en peces, se basan en su crecimiento y características fisiológicas que van presentando los organismos, al variar la concentración de la vitamina en las pruebas experimentales (Woodard, 1994). Por lo tanto se sabe que la baja concentración de vitA causa un pobre crecimiento en la etapa de cría y juvenil. Mientras que en la etapa de adulto promueve la proliferación celular de las gonadas, como pasa en el pez cebra (*Cyprinus rerio*), (Hernandez *et al*, 2010). En el pez Hirame (*Paralichthys olivaceus*) presentan un periodo de desove mas corto ante concentraciones elevadas de vitA (Furuita, Tanaka, *et al*, 2003). Y en reproductores de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), altas suplementaciones de vitA causan mortalidades a los embriones (Dicharry *et al* 2010).

La siguiente tabla muestra los requerimientos de vitA de algunas especies de peces.

Especie	VitA UI/Kg	Referencia
Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	2 000 – 2 500	Kitamura <i>et al</i> , 1967

Lenguado japonés (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	9 000	Hernández <i>et al</i> , 2005
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	4 000 – 20 000	Aoe <i>et al</i> , 1968
Bagre (<i>Ictalurus punctatus</i>)	1 000 – 2 000	NRC, 1993
Tilapia híbrida <i>O. niloticus x O. aureus</i>	5 870 – 6 970	Hu <i>et al</i> , 2006
Guppy <i>Poecilia reticulata</i>	2 000 – 4 000	Shim <i>et al</i> , 1990

Tabla 1; Requerimientos de vitA en dieta, de diversas especies de peces.

Estos requerimientos van cambiando de acuerdo a la especie, etapa de desarrollo, sexo y ambiente en el que se encuentren los peces. Por ejemplo el salmón atlántico (*Salmo salar*) no es capaz de utilizar la provitA, si se encuentra a una temperatura de 9°C (Schiedt, 1989). La trucha arcoíris es probable que tenga un requerimiento mayor a las 2 500 UI de vitA/kg, en etapa cría y juvenil (Woodard, 1994). Además un factor importante que no se ha considerado en las necesidades de este micronutriente en los peces de cultivo, es el cambio a las nuevas formulaciones de dietas, pues se incorporan harinas vegetales como fuente de proteína, y es recomendable que se realicen nuevos estudios, para determinar los requerimientos vitamínicos con estas nuevas formulas (Cao *et al*, 2007).

La hipovitaminosis o deficiencia de vitamina se presenta cuando la suplementación de vitA esta por debajo de los requerimientos necesarios, causando severos trastornos metabólicos y físicos; como pobre crecimiento, xeroftalmia, queratinización del tejido epitelial, hemorragias en la parte anterior del ojo y aletas, en algunos casos causa la deformación de los huesos. Aunque debe pasar un periodo largo sin la ingesta de esta vitamina para que se presenten algunos de los signos mencionados, ya que esta vitamina se almacena en el hígado (Halver *et al*, 2002)

Por otro lado si se rebasan por mucho los requerimientos se presenta hipervitaminosis que provoca un ensanchamiento en el hígado, crecimiento anormal, lesiones en la mucosa, e hiperplasia en el cartílago de la cabeza, también hay deformación de huesos terminando en anquilosis y fusión de las vértebras, se ha reportado que esto se presenta a una concentración de 20 000 UI de vitA/kg, después de varios meses (Combs, 1998).

Antecedentes

Morton y Creed (1939), demostraron que algunas especies de peces son capaces de utilizar el β -caroteno como origen de vitA, mientras que otras son incapaces de romper la molécula del β -caroteno para transformarlo en vitA.

Glover J. (1960) propuso la posible ruta del β -caroteno para convertirse en vitA, a través de una enzima sistólica presente en el hígado de los peces, que rompe el enlace excéntrico o el enlace central del β -caroteno para transformarlo en retinal.

Del Tito (1983) Comprobó experimentalmente con pez dorado que alimentado con el β - caroteno, obtiene un mejor crecimiento que con retinol, luteína o sin la adición de vitamina A.

Katsuyama y Matsuno (1987) y Moren *et al.* (2002) mostraron que la astaxantina se convierte directamente en vitamina A₂, mientras que la canthaxantina se convierte primero en isoezaxantina, para convertirse a β -caroteno y finalmente a vitamina A₁.

Torrissen (1989) propone que la actividad específica de la vitamina A, en trucha arcoíris esta en la retina al encontrar altos niveles de vitA₁, seguidos por vitA₂, y concluye que la A₂ es un metabolito de A₁.

Woodward (1994) realizo una revisión de los requerimientos vitamínicos para salmónidos que son cultivados en etapa juvenil.

Christensen *et al.*, (1994) Trabajo con suplementaciones de astaxantina como provit A, y vitA, para medir su efecto en el crecimiento de crías en *Salmo salar*.

Thompson (1995) comparó el efecto que tiene la vitamina A y la astaxantina sobre el sistema inmune, encontró que si bien la vitamina A ayuda en el transporte de los linfocitos, la astaxantina no tiene ningún efecto sobre el sistema inmune.

Hu Chien *et al.* (2005) Determino que la tasa de conversión de β -caroteno a vitamina A en juveniles de tilapia hibrida es de 19:1 (β -caroteno – retinol).

Dicharry *et al.* (2010) determinaron que los efectos de altos niveles de vitamina A (7,000 UI/ Kg) causan mortalidad en reproductores y embriones de trucha arcoíris, pero no hay presencia de malformaciones en crías.

Justificación

El trabajo se fundamenta que para la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), la vitamina A es un importante promotor de crecimiento en etapa cría, por lo tanto es particularmente importante en el campo de producción de este organismo. Partiendo de esto se utiliza el β -caroteno como fuente de vitamina A. Proponiendo que este carotenoide es metabolizable para los organismos y su efecto, se vera reflejado en el crecimiento y composición proximal de las crías. Los resultados que se obtengan pueden determinar los requerimientos necesarios de β C, para que la trucha arcoíris crezca de forma normal, y así colaborar con referencias para la realización de dietas balanceadas utilizando carotenoides como fuente de vitA.

Objetivo general

Determinar los requerimientos de β -caroteno como precursor de vitamina A en crías de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

Objetivos particulares

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de β -caroteno en el crecimiento de las crías de trucha arco iris

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de β -caroteno en la composición proximal de las crías de trucha arco iris.

Material y métodos

Se adquirieron crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de una granja comercial, ubicada en Huasca de Ocampo, Hidalgo, y fueron transportadas al laboratorio de Producción Acuícola (acuario) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en donde se realizó todo el estudio. Para su aclimatación, los organismos se depositaron en tanques de 500 L, por un periodo de 10 días, a una temperatura de $15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, alimentándolos con una dieta libre de vitamina A (tabla 1), elaborado de acuerdo a la técnica propuesta por Hernández *et al* (2002).

Formulación de las Dietas

Se desarrollaron seis dietas con una composición basal de acuerdo a la Tabla 1, considerando los requerimientos nutricionales reportados previamente por NCR (1993). **1)** La primera dieta experimental no contenía vitA ni β C, **2)** La segunda dieta experimental se suplemento con 2 500 UI de palmitato de retinol/Kg y las siguientes cuatro dietas experimentales restantes se les incorporo diferentes suplementaciones de β -caroteno; **3)** 1 250 UI/Kg **4)** 2 500 UI/Kg. **5)** 5 000 UI/Kg. **6)** 10 000 UI/Kg , de acuerdo a la Tabla 2. Antes de la preparación de las dietas, se extrajeron los lípidos de las harinas con un equipo Soxlet, y la mezcla de vitaminas y minerales se realizo de acuerdo a la formulación propuesta por Hernández *et al* (2005) (Anexo 1).

Ingredientes	g/kg de dieta
Harina de pescado	400

Harina de soya	200
Aceite de hígado de bacalao	50
Soya de lecitina	50
Dextrina	100
Mezcla de vitaminas y minerales	40
Gluten	50
Celulosa	109.6
Fitasa	0.4

Tabla 2. Formulación base de las dietas experimentales

Tratamiento	UI/kg de dieta
Dieta control	0
Dieta retinol ¹	2,500
Dieta β -caroteno ¹²	1,250
Dieta β -caroteno ²²	2,500
Dieta β -caroteno ³²	5,000
Dieta β -caroteno ⁴²	10,000

Tabla 2.1. Suplementación de retinol o β -caroteno en las dietas experimentales.¹1 UI = 0.3 μ g all-*trans*-retinol, ²1 UI = 0.6 μ g β -caroteno

Las dietas se prepararon mezclando todos los ingredientes en polvo en una batidora y posteriormente, se agregaron los aceites con el retinol o β -caroteno previamente disuelto y se continuó mezclando. Por último, se agregó 40 % (peso/volumen) de agua. La masa resultante se paso por un molino de la marca, Nixtamatic, para obtener pellets de 2.5 mm de diámetro aproximadamente, que se secaron en un horno a 60 °C durante 24 horas.

Prueba de alimentación

Se formaron seis grupos experimentales (c/20 organismos cada grupo) con una replica para cada grupo experimental. Los organismos de cada grupo y de cada replica, fueron depositados en tanques de 100 litros. En total se utilizaron 12 tanques que contenía 20 organismos cada uno,

ubicado en un sistema de recirculación de agua. El peso inicial de las crías fue de 1.44 ± 0.02 g, la prueba de alimentación, se mantuvo bajo condiciones ambientales, temperatura 15°C, OD 6.5 mg/L, y amonio 0.815 mg/L, y fotoperiodo natural. Por un periodo de 60 días.

La cantidad de alimento suministrado diariamente por tanque fue del 7 % de la biomasa total distribuido en 2 raciones al día, pesando el alimento remanente de cada día para poder calcular TED y cada 10 días, los organismos eran pesados para poder calcular los parámetros de crecimiento.

Se inicio él trabajó con organismos con una longitud patrón de 1.2 cm y una longitud total de 1.4 cm al final del experimento también se determino la longitud final y patrón. Esto se realizó por unidad experimental. Con los datos de peso, se determinaron los siguientes parámetros de crecimiento.

Tasa de crecimiento específico TCE (%) (Refsties, *et al.*, 1997)

$$\text{TCE} = [(\ln \text{Peso Final} - \ln \text{peso inicial}) / \text{Número de días de alimentación}] * 100$$

Ganancias en peso GP (g) (Adelizi *et al*, 1998)

$$\text{GP} = [(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{Peso inicial}] * 100$$

Tasa de eficiencia de la dieta TED (Hernández *et al*, 2004)

$$\text{TED} = [\text{ganancia en peso (g)}/\text{total de dieta ingerida en base seca (g)}];$$

Factor de condición (K) (J, E Williams, 2000)

$$K = [(100,000)(\text{GP(g)}) / \text{Longitud total}^3]$$

Análisis Proximal (ver anexo 1)

Al final de los 60 días de experimentación se sacrificaron todos los organismos, y se les extirpo el hígado y se tomó una muestra de músculo para realizar los análisis proximales. El contenido de proteína en los organismos y en las dietas se determinó por la prueba de Lowry, ver anexo 2. El contenido de lípidos por medio de la técnica reportada por Blight y Dyer (1959) ver anexo 3, y los contenidos de ceniza y humedad a partir del método AOAC ver anexo 4.

Análisis estadístico

Para poder comprobar si había un efecto significativo en el crecimiento de los organismos y en su composición proximal debido a las diferentes dietas experimentales, se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia 0.05, debido a que no se realizó pruebas de normalidad a los datos, y la falta de repeticiones, partimos de que los datos se comportan de

manera no paramétrica y fue aplicada a los resultados de los parámetros de crecimiento y al contenido proximal.

Resultados y Discusión

Se puede observar en la figura 5, la ganancia en peso (GP) que tuvieron las crías alimentadas con las dietas experimentales. La suplementación de 10,000 UI de β C/kg, fue el valor más alto con 616%, por otro lado la menor ganancia se observa en los organismos que consumieron las dietas con 2 500 UI de VitA/kg y la dieta base, con 426% y 499% respectivamente.

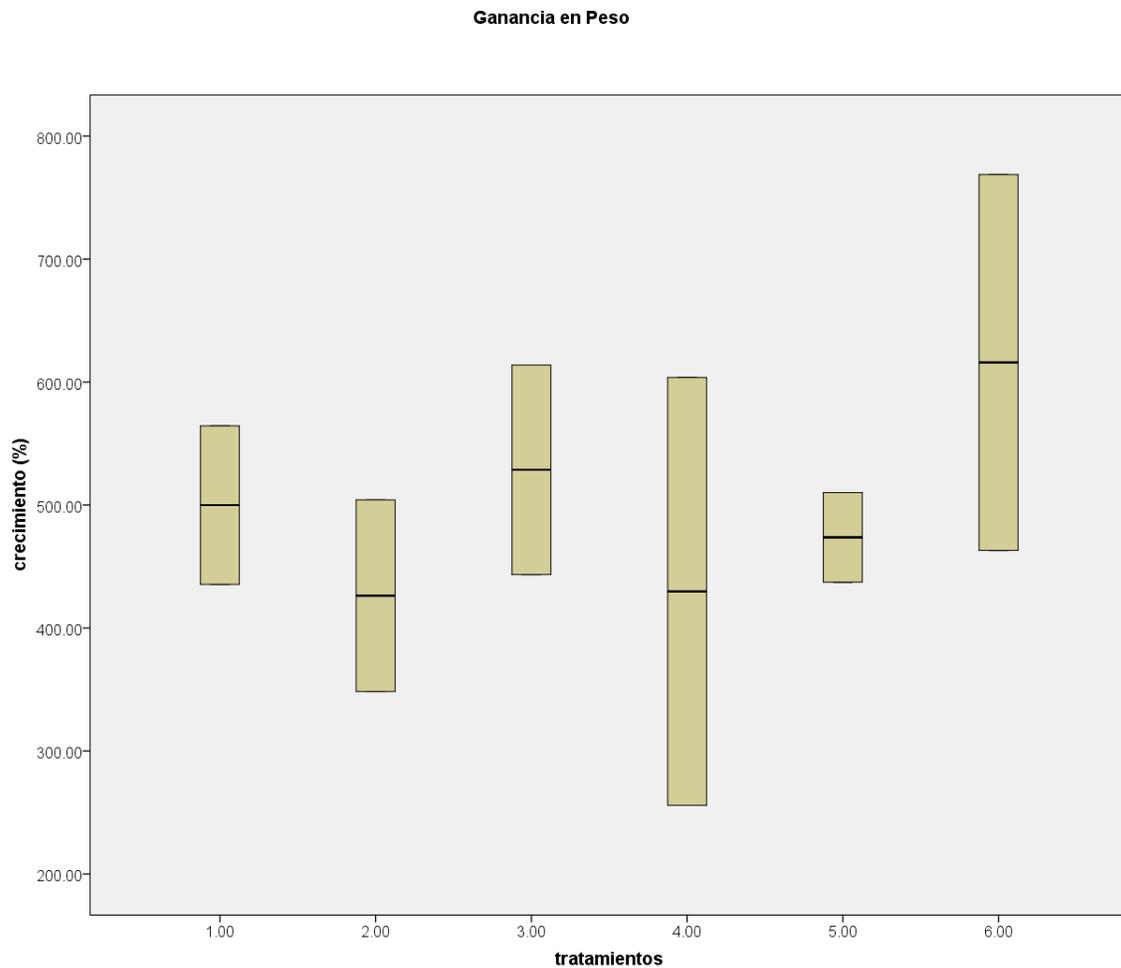


Figura 5. Ganancia en peso de las crías de trucha arcoíris por tratamiento, en un periodo de 60 días. Las barras representan las medianas de la muestra y 1 réplica.

La GP de las crías alimentadas con las diferentes dietas experimentales, no muestra ningún crecimiento significativo entre los organismos alimentados con los distintos tratamientos, inclusive para aquellos organismos que su dieta no contenía ninguna fuente de vitA. Debido a la naturaleza lipídica de esta vitamina, su almacenamiento y reciclaje puede abastecer al mínimo los requerimientos que necesite el organismo, sin presentar algún síntoma de deficiencia en varios meses (Halver, 1972). Por otra parte la menor ganancia se manifestó en el grupo de crías que se alimentaron con la suplementación de vitA. Christiansen *et al* (1994) obtuvo un comportamiento parecido en las crías de *Salmo salar*. Es probable que esto sea debido a que los requerimientos de vitA para los salmónidos mencionados por la NCR (1993), no sea suficiente para un desarrollo óptimo en etapa cría. Woodward (1994) y Kitamura (1967) concluyeron que la suplementación de vitA debe ser mayor a 2 500 UI/Kg.

En la tasa de crecimiento específico figura 6, el valor más alto lo alcanzaron los organismos alimentados con el tratamiento de mayor concentración de β C teniendo un porcentaje de 2.77 %, seguido por el tratamiento de 1,250 UI β C con 2.61%, mientras que el valor más bajo 2.30 fueron los organismos alimentados con el tratamiento que contenía 2,500 UI β C, mientras que 2.55% y 2.35 % lo obtuvieron las dietas base y de vitA respectivamente.

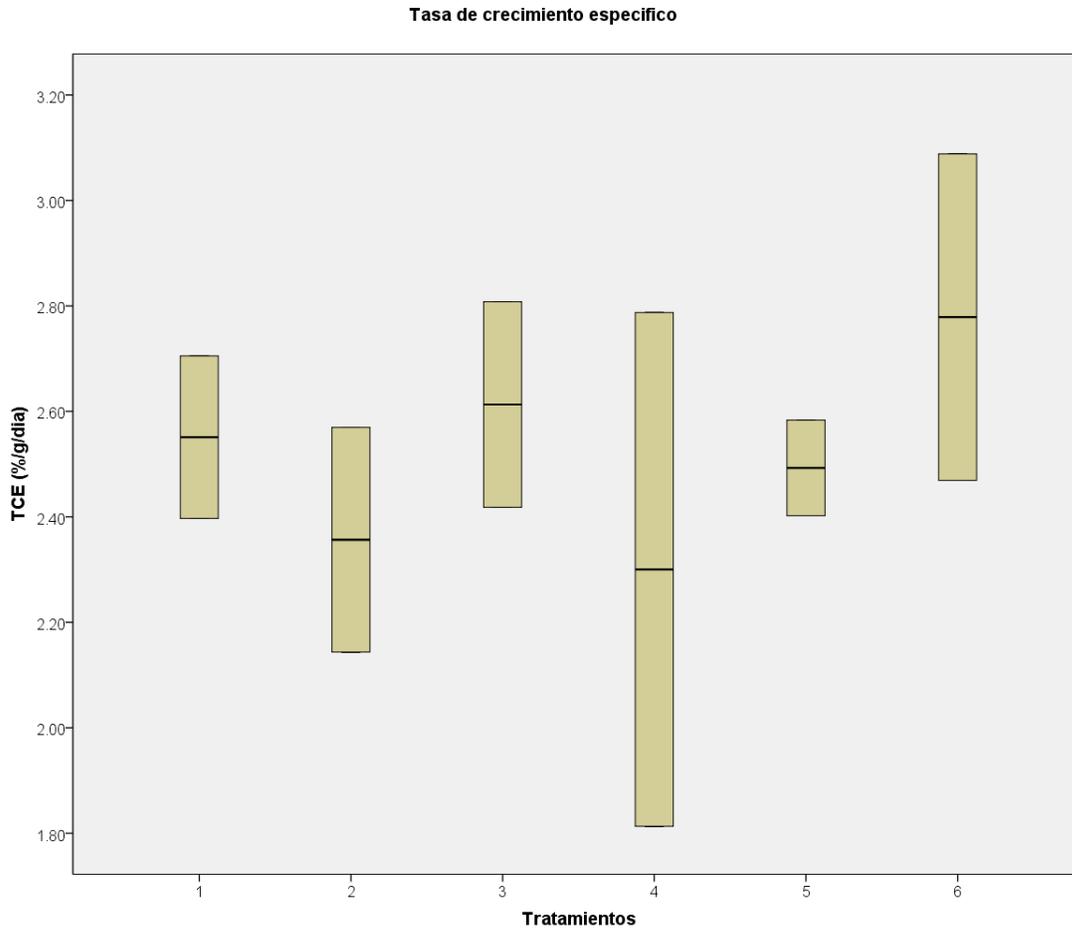


Figura 6. Tasa de crecimiento específico de las crías de trucha arcoíris por tratamiento, en un periodo de 60 días. Las barras representan las medianas de la muestra y 1 replica

En TED, se vuelve a notar que los organismos que están ligeramente por debajo, de los demás grupos, son aquellos alimentados por las 2 500 UI de vitA y β C respectivamente, de nuevo la dieta basal se encuentra por arriba. Y el tratamiento 3 representado en la grafica, está inclusive por arriba del tratamiento 5 siendo este ultimo de 5 000 UI de β C, debido a fallas en el sistema donde se mantenían a los organismos, hubo descensos de estos que no fueron reemplazados durante el experimento, esta variable se ve reflejada en los parámetros de crecimiento, ya que el grupo 5 tiene la supervivencia mas baja de los grupos (ver figura 9). También podemos considerar que el tiempo del periodo de alimentación no fue lo suficientemente prolongado para mostrar una tendencia marcada. Debido a que la utilización del β C requiere metabolización por parte de los organismos (Ball, 1988). Christiansen (1994) que tampoco presento una diferencia significativa en los primeros 60 días, pero si en los siguientes 60 días con el carotenoide astaxantina.

La tasa de eficiencia de la dieta figura 7, muestra que los organismos mas eficientes fueron el grupo de 10^4 UI β C, con un valor de 0.511, igual que en TCE la dieta con 2,500 UI de β C/Kg, fue el valor más bajo con 0.34 y las dietas de vitA y base 0.36 y 0.39 respectivamente.

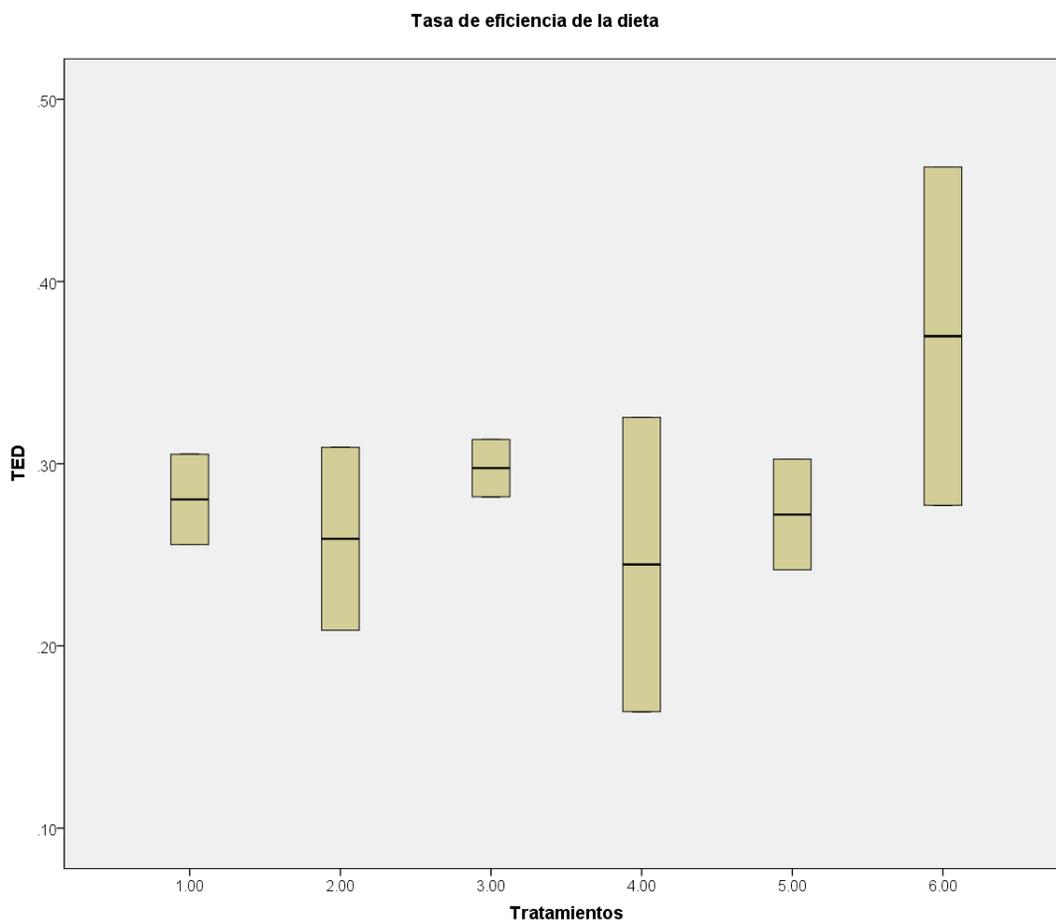


Figura 7. Tasa de eficiencia de la dieta de las crías de trucha arcoíris por tratamiento, en un periodo de 60 días. Las barras representan las medianas, de la muestra y 1 replica

La presencia del β C en las dietas, y los resultados en la asimilación de la dieta, y en el crecimiento muestran que no hay un efecto nutricional negativo en los organismos. Y que los juveniles de trucha arcoíris aprovechan este nutriente para su metabolización a vitA. Así Torrinsen y Olson (1989), sugieren que los peces cuentan con la presencia de una ruta metabólica, que es capaz de romper la molécula del β C y gracias a eso pueden aprovecharlo, a través de las células presentes en el tracto gastrointestinal (Bjerckeng, 1997). No obstante al contrario de nuestros resultados, en el trabajo de Chien Hu (2005) pasa lo contrario va disminuyendo TED conforme aumenta el β C, a lo que podría atribuirse a las altas cantidades de suplementación que utilizo.

En factor de condición figura 8, muestra comportamiento de respuesta similar que en GP, TCE, TED. El valor de 1.19 fue el mas bajo con los organismos alimentados con la dieta de vitA, y el valor más alto de 1.55 con los organismos alimentados con la dieta que contenía una suplementación de 10 000 UI β C.

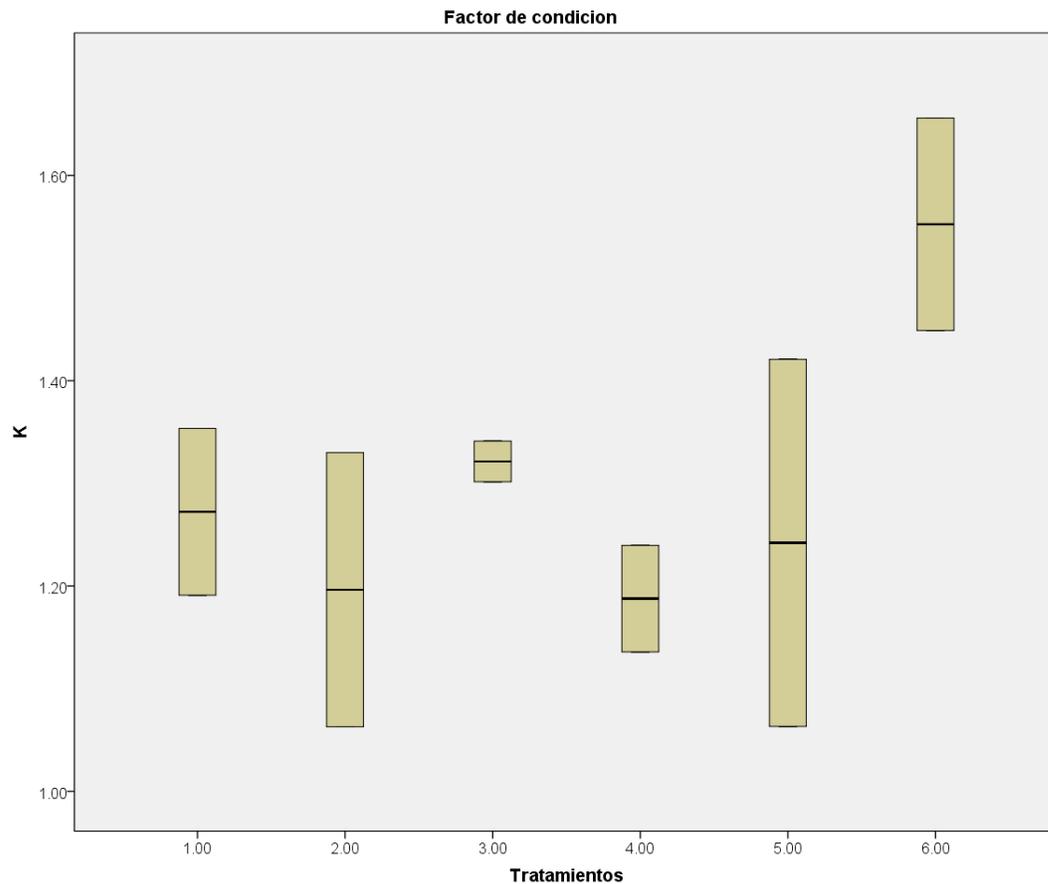


Figura 8. Factor de condición (K) de las crías de trucha arcoíris, las barras representan las medianas, de la muestra y una replica.

Al poder observar todos los parámetros de crecimientos evaluados entre los distintos tratamientos, si bien se puede ver un comportamiento similar en todas las figuras. Y es que los organismos alimentados con la dieta de 10 000 UI de β C son los que dentro del rango crecieron mas. Chien Hu (2005), observo la misma tendencia en los parámetros de crecimiento en juveniles de tilapia hibrida alimentados con suplementaciones de β C. Sin embargo, es probable que se necesitaran mayores concentraciones de β C para poder definir las diferencias significativas en los demás tratamientos, a parte de ampliar el lapso de tiempo, como ocurrió con Schiedt (1989); Christiansen (1994); Del tito (1983); Chien Hu (2005) que utilizaron mas de 15 mg/Kg en sus suplementaciones de algún carotenoide. Así que se necesitan elevadas cantidades de β C para

poder ver su efecto en el crecimiento como se muestra en el factor de condición, que es determinante que los organismos con mayor robustez fueron aquellos que se alimentaron con una concentración elevada del β C. Hay factores que intervienen en la metabolización y absorción de β C a vitA, como lo es en la etapa de desarrollo en la que se encuentren (Thompson 1964; Torrinsen 1989). Así que las crías de la trucha arcoíris al igual que lo demás peces destinan todos los nutrientes y gastos energéticos a promover su crecimiento (Thompson, 1964). También factores ambientales que influyen son la temperatura, que a 9°C los salmónidos no son capaces de metabolizar los carotenoides, pero a 12°C si pueden (Benjamin, 1965). La temperatura a la que se encontraba la prueba experimental de este trabajo fue alrededor de los 13°C, por lo que la temperatura no pudo haber presentado algún problema en la conversión.

La supervivencia figura 9, de los organismos parece no estar afectada por los tratamientos experimentales, sino por las condiciones técnicas en las que se trabajó.

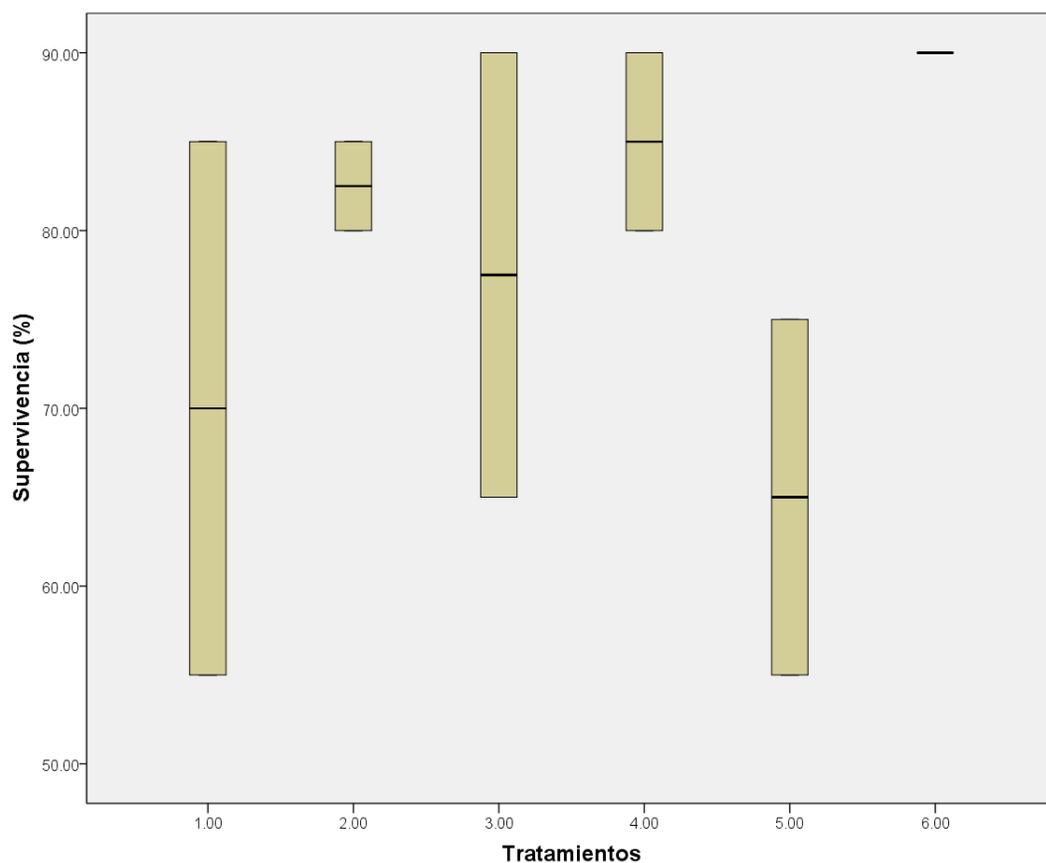


Figura 9. Supervivencia de los organismos por tratamiento, en un periodo de 60 días.

Los resultados del porcentaje en el contenido de lípidos y proteína en el hígado de las crías se muestran en la tabla 3.

Tratamiento	Lípidos %	Proteína %
Basal	3.5 ± 0.27	16.8 ± 0.94
Retinol 2 500UI	3.6 ± 0.18	13.9 ± 0.31
βC – 1 500UI	3.9 ± 0.67	15.7 ± 0.97
βC – 2 500UI	3.0 ± 0.25	16.7 ± 0.56
βC – 5 000UI	3.6 ± 0.57	14.0 ± 3.1
βC – 10 000UI	4.7 ± 0.05	18.8 ± 1.4

Tabla 3.- Concentración de lípidos y proteínas en hígado de juveniles de trucha arcoíris, valores en porcentaje.

La concentración de lípidos en hígado se muestra mayor en los organismos que consumieron la dieta con 10 000 UI de βC, con 4.7 % seguido por los organismos alimentados con el tratamiento de 1 250 UI de βC con 3.9 %, mientras que la dieta de vitA contenía 3.6 % y los organismos alimentados con la dieta base tenían 3.5 % de lípidos en hígado. Esto es relevante ya que se ha vinculado la cantidad de vitA, con la concentración de lípidos, presente en el hígado, porque éste es el órgano de almacenaje de este micronutriente (Ørnsrud, 2002). Chien Hu, (2005) también mostró que la suplementación del βC, es directamente proporcional a la concentración de lípidos, en hígado, y así también a la concentración de vitA presente en este órgano. Posiblemente esto también ocurre en la trucha arcoíris, puesto que aquellos que tienen una elevada concentración de lípidos, presentan un crecimiento ligeramente mayor. Con respecto a los organismos del grupo de vitA, parece estar almacenando la vitA en hígado puesto que fueron aquellos que presentaron un menor crecimiento. Al contrario los organismos alimentados con 2 500 UI de βC parecía estar utilizando parte de vitA pero no tenía un efecto en el crecimiento como los demás grupos que consumieron este carotenoide. Sin embargo, se necesitarían mas pruebas para poder corroborar esto de manera determinante.

Proteína en el hígado también tiene valores elevados en el grupo de mayor suplementación de βC, a que este órgano es el almacén de la vitA también es el mayor productor de proteínas RBT, que están asociadas a la presencia de retinol que pueda haber, ya que se activan con este para iniciar su transporte al aparato de Golgi o bien al suero de la sangre y distribuirse en los tejidos (Noy, 2000).

La composición proximal del musculo, en base seca, se muestra en la Tabla 4.

Tratamiento	Humedad %	Lípidos %	Proteína %	Cenizas %
Basal	77.1±10	8.4 ± 1.2	9.0 ± 3	11.1 ±
Retinol 2 500UI	77.8 ±9.5	9.0 ± 1.4	11.6 ± 3.9	11.1 ±
βC – 1 500UI	77.8 ±9	9.4 ± 0.4	11.5 ± 1.6	9.35 ±
βC – 2 500	77.6 ±9.4	9.3 ± 0.1	8.8 ± .07	11.3 ±
βC – 5 000	76.4±9	9.8 ± 2	10.8 ± 2.6	8.5 ±
βC – 10 000	75.9 ±8.5	10.9 ± 1.3	12.7 ± 3.3	10.0 ±

Tabla 4.- Análisis proximales en músculo de juveniles de trucha arcoíris, valores en porcentaje, en base seca

Comenzaremos con la concentración de lípidos en músculo, el tratamiento que contenía 5 000 UI de βC/Kg, presento una concentración de lípidos con 9.8 %, la dieta con 10 000 UI de βC sus organismos presentaron una mayor concentración, de 10.9 % y los organismos alimentados con la dieta base tenían una concentración de 8.4 %, el contenido lipídico de los organismos, aumenta conforme la suplementación de βC se eleva. También Schied et al (1989) reportó que la deposición de la tasa de carotenoides, esta correlacionada con el contenido lipídico en el musculo del salmón atlántico, conforme aumentan los lípidos aumenta la concentración de carotenoides. Sin embargo, el retinal también esta involucrado en la pigmentación (Noy, 2000), y el acido retinoico tiene una participación fundamental en la división celular epitelial. El rango de humedad permanece en los rangos normales entre 77 % y 75 %, los resultados de ceniza se mostraron en un rango de 11- 8 %, las dietas base y de vitA fueron de 11% y la dieta con suplementación de 5 000 UI de βC/kg tuvo un valor más bajo 8.5 %. Las suplementaciones de βC y vitA no influyen en humedad y ceniza, lo mismo reporta Hernández (2005), en la composición del lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*), que trabajo con dietas suplementadas con palmitato de retinol.

El porcentaje de proteína presente en el organismo es menor para el grupo que se alimentó con la de 2 500 UI de βC, y mayor para el grupo alimentado con 10 000 βC, debido a las concentraciones de βC han influenciado a las concentraciones de proteína en musculo, ya que los carotenoides se asocian a proteínas presentes en el musculo, para formar el complejo actiomiosina (Henmi, 1987). Thompson (1995) que trabajo con astaxantina, que también es una provitamina, obtuvo un efecto similar en la concentración de proteína, en sus organismos. También las proteínas RBT están presentes en el musculo, pero su concentración es menor a las que puede haber en el hígado. Esta puede ser también una de las razones de que para aquellos organismos con crecimiento elevado con respecto a los demás grupos, presenten una mayor concentración de proteína en hígado y musculo, por la capacidad de metabolizar el βC a VitA.

Conclusiones

Se necesitan elevadas cantidades de carotenoides para ver su efecto en el crecimiento de las crías de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). En conclusión la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) no es muy eficiente en la obtención de vitA, a partir del βC.

Los resultados en los parámetros de crecimiento también proponen que es probable que los requerimientos de vitA, sean un poco mas elevados de los que se han propuesto, y el lapso de experimentación debe durar un poco mas de 60 días.

Las crías de trucha arcoíris sin ninguna fuente de vitA, la reutilizan por un periodo mayor a 70 días, mientras que las que solo obtienen las 2 500 UI de vitA, parece que guarda reservas y utiliza lo mínimo para mantenerse.

Referencias

- Adelizi, P; Rosati , R., *et al.* 1998. Evaluation of fish-meal free diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Nutrition*. 4: 255-262.
- Ball, J. F. 1988. Fat-soluble vitamin assays in food analysis, a comprehensive review. Elsevier applied Science. London, England. 326 pp.
- Barrows F, T, *et al.* 2008. The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Beare-Rogers J. *et al.* 2001. *Lexicon Of Lipid Nutrition*. In Hernandez, L, H *et al.* 2010. *Vitamin A in organisms acuatics*. X symposium of aquaculture nutrition. Monterrey, Mexico.
- Del Tito. Benjamin, Jr. 1983. Role of Beta-caroteno y lutein in the synthesis of vitamin A in Goldfish. *Department of biology. University Western Kentucky*. 45 (2). Pp 94-97.
- Bethan W, Davies and Brian H. 1986. Retinol and 3,4- dehydroretinol formation from xantophylls in the goldfish, *Carassius auratus*.
- Bjerckeng, B. 2008. Carotenoids in Aquaculture: fish and crustaceans. *Natural Funcions*. Vol 4.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Cao, *et al.* 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial technology* 40: 497-507.
- Combs G.F. (1998) *The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press. San Diego, USA. 618 pp
- Dicharry, F, S, Lataillade, E. *et al.* 2010. Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
- FAO. 1974. Capacitación en Acuicultura: México. *Progr. de Invest. y Fom. Pesq. México*. <http://www.fao.org/docrep/field/003/ac596s/AC596S00.htm#TOC>. En línea 2012
- FAO. 2012. Departamento de pesca y acuicultura. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oncorhynchus_mykiss/es. En línea 2012
- Furuita, H. Tanaka, H. Yamamoto, T. Suzuki, N. & Takeuchi, T. (2003) Supplemental effect of vitamin A in diet on the reproductive performance and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T & S). *Aquaculture Research* 34, 461-467
- Grangaud, R., Vignais, P., *et al.* 1956. *C.R Acad. Sci. Paris* 243, 1170-1172

GLOVER J. The conversion of beta-carotene into vitamin A. *Vitam Horm.* 1960;**18**:371–386.

Gross, J. y Budowski, P. 1966. Conversion of carotenoids into vitamin A₁ y A₂ in two species of fresh water fish. *Biochem*, 101: 747-754.

Halver, J.E., 1972. The vitamins. In Ole J. Torrissen. Biological activities of carotenoids in fishes. 1989. pp 387

Halver, J. E, 2002. The vitamins. In fish nutrition (ed. por J.E. Halver & R.W. Hardy), pp. 61-141. Academic Press. San Diego, USA.

H. Henmi, T. Iwata, M. Hata and M. Hata, *Tohoku J. Agric. Res.*, 37, 101 (1987)

Hernandez, H, L. Teshima, S, I. et al. 2005. Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*. 11. Pp 3-9. Laboratory of Aquatic Animal Nutrition, Faculty of Fisheries, Kagoshima University. Japan.

Hernandez, H, L.2002. Effects of excess and optimum levels of dietary vitamin A on red seabream. (*Pargus major*). Laboratory of aquatic animal nutrition. Faculty of fisheries. University Kagoshima. Japan.

Hernandez, H, L et al.2004. effects the vitamin A on juvenile red sea bream. *J. World aquacult. Soc*, 35:436-444

Hernández, H, L. et al. 2010. Vitamin A: requirements and functions on aquatic organisms. Facultad de estudios superiores Iztacala, UNAM. México.

Hu J, C, Chen, S, M *et al.*2005. Effects of dietary vitamin A or β -carotene concentrations on growth of juvenile, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*.

J, E, Williams. 2000. Manual of fisheries survey methods. Chapter 13: factor condition.

Katsuyama, M., Matsuno, T. 1988. Carotenoid and vitamin A, and metabolism of carotenoids, β -carotene, canthaxanthin, astaxanthin, zeaxanthin, lutein, and tuxanthin in *Tilapia nilotica*.

Kitamura, S., Suwa, T., Ohara, S., Nakagawa, K., 1967. Studies on vitamin requirements of rainbow trout-III. Requirement of vitamin A and deficiency symptoms. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 33,1126–1131.

Lehninger, A, L.1982. Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª edición. Ediciones Omega, S. A, Barcelona. España.

Morton and Creed. 1939. The conversion of carotene to vitamin A₂ by some fresh – water fishes. *Biochem J.* March 33 (3); 318-324.

Meyers, S, P. Lastcha, T.1992. Carotenoides. Pp 164-186.

Moren, M. Naess, T. Hamre, K. 2002. Conversion of B-carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) juveniles. Fish physiology and Biochemistry. 27 Pp 71-80.

Neilands J, B. 1947. The conversion of carotene to vitamin A in the fish. Biochem, 13: 415-419

Noy N. 2000. Retinoids-Binding Proteins: mediators of retinoid action. Biochem 308; 481-495 pp.

NRC. (1993). Nutrient Requirements of Fish. National Academic Press, Washington D.C. USA, pp. 21-25.

Ørnsrud, R., Graff I, E et al. 2002. Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture Nutrition, 25, 7-13Pp.

Refstie, S., Stile J. y Trond S. 1997. Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 153: 263-272.

Schiedt, K., Foss, P et al. 1989. Metabolism of carotenoids in salmonids, idoxathin a metabolite of astaxanthin in flesh of atlantic salmon (*Salmo salar*) under varying external conditions. Comp. Biochem. Physiol 92B 2 pp. 277-281.

Thompson S, Y. 1964. Factors affecting the absorption of carotene and its conversion into vitamin A. Exp. Eye Res, 3, 392-404.

Thompson, *et al.* 1995. The effect of dietary A and Astaxathina on the immunocompetence of rainbow trout. Aquaculture. 133 Pp 91-102. France

Torrissen, O, J. 1989. Biological activities of carotenoids in fishes. Institute of marine Research, Matre Aquaculture Station. Proc. Third Int. Symp. On Feeding and Nutr. In Fish. Japan. Pp.387 – 399.

Weber, G, G. 1995. Micronutrientes e inmunidad II. XI curso de especialización FEDNA. Barcelona

Woodwar, B. Dietary vitamin requirements of cultured young fish with emphasis on quantitative estimates for salmonids, Aquaculture 124:133-168

Anexo 1

Extracción de lípidos por el método de soxleth

- 1.- Se tamizan 50g de harina de pescado
- 2.- Se pesa el papel filtro y se llena con la harina de pescado
- 3.- El papel filtro es colocado dentro de la capsula del enfriador
- 4.- Al matraz de bola se le agregan 600 ml de éter de petróleo
- 5.- Se coloca el enfriador en la boquilla del matraz y se conectan las mangueras de recirculación de agua fría para que condense el gas de éter y caiga sobre la harina de pescado y remueva los lípidos de la harina
- 6.- El matraz es colocado en baño maría para que caliente el éter y pase por el condensador
- 7.- Se deja recircular hasta que el éter de petróleo después de pasar por la harina, sale transparente.
- 8.- Para sacar la harina apagamos el baño maría esperamos que se enfríe y en una charola la vaciamos esperando a que se seque
- 9.- Cuando está seca se mete en bolsas y se refrigera hasta su uso

Anexo 2

Determinación de proteínas por solución Lowry

Solución estándar de proteínas

1.- Se elabora una curva patrón con la solución estándar

Solución proteína estándar	Agua destilada	Concentración de proteína (µg/ml)
0.125	0.875	50
0.250	0.750	100
0.500	0.500	200
0.750	0.250	300
1.000	0	400

*las unidades manejadas son en ml

2.- se prepara un tubo blanco con agua destilada

3.- se toma 0.1g de muestra y se vacía a un tubo de ensaye con 1 ml de agua destilada y se homogeniza durante 2 minutos

4.- posteriormente se agrega 1 ml de solución lowry a los tubos de la curva patrón; a los tubos muestra y al blanco, se mezcla cuidadosamente para que no se forme espuma

5.- la solución se deja reposar durante 20 minutos, para posteriormente agregar 0.5 ml de la solución fenol folin y Ciocalteu's (cada tubo).

- 6.- se deja reposar durante 30 minutos pasado este tiempo se aforan los tubos a 10 ml con agua destilada, y son medidas en un espectro fotómetro a una longitud de 450nm calibrando con el blanco primeramente (la cantidad de proteína se determina por espectrofotometría pero la solución solo dura 10 minutos después de ser aforada, pasado este tiempo las soluciones se descomponen).
- 7.- se registran las absorbancias
- 8.- los resultados de las absorbancias son extrapoladas en la curva patrón para determinar la concentración de proteína en la solución, los resultados están en porcentaje.

Anexo 3

Determinación de lípidos por el método de Bling y Dyer.

- 1.- se toma una muestra de 0.2g (en peso seco)
- 2.- se coloca en un tubo de ensaye con 3 ml de metanol y 1.5 ml de cloroformo
- 3.- se homogeniza durante 2 minutos
- 4.- después se vuelve agregar 1.5 ml de cloroformo y se homogeniza durante 2 minutos
- 5.- Los tubos se centrifugan a 5000 rpm durante 10 minutos
- 6.- el sobrenadante se vacía en matraces de separación, y se le agregan 0.8 ml de agua destilada hasta que se formen 2 capas, sino se forma la capa se va agregando agua destilada gota a gota (si se llegan a formar 3 capas se prepara una solución de cloroformo-metanol 1:1, si se forma una capa lechosa también se agrega esta solución gota a gota).
- 7.- ya formadas las dos capas se deja pasar la capa inferior a un tubo de ensaye y se pone en aireación para que el cloroformo se evapore y nos quede la capa de lípidos
- 8.- se pesa un frasco vial
- 9.- cuando en el tubo nos queden los lípidos solamente se vuelven a diluir con 1 ml de la solución cloroformo-metanol y se vacían al frasco vial
- 10.- se ponen a secar de nuevo y cuando se evapore la solución completamente se vuelve a pesar, sacando con los datos el porcentaje de lípidos de la muestra.

Anexo 4

Determinación de humedad

- 1.- se utilizan crisoles de metal previamente lavados, se pesan
- 2.- se colocan en el horno a una temperatura de 110°C durante 2 horas, y se vuelven a pesar (dejándolos enfriar en un desecador)
- 3.- se colocan en el horno a la misma temperatura media hora más y se vuelven a pesar, se repite esto hasta que los crisoles estén en peso constante
- 4.- una vez que los crisoles se encuentren en peso constante, se agrega 5g de muestra y se vuelve a pesar el crisol con la muestra
- 5.- se coloca durante 2:30 hrs en el horno a la misma temperatura, pasado este tiempo se repite el paso 3.
- 6.- cuando el crisol con la muestra alcance el peso constante se registra ese peso y se aplica la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = (1 - \text{peso seco}^* / \text{peso húmedo}^*) \times 100$$

*peso de la muestra

Anexo 5

Determinación de cenizas

- 1.- se utilizan crisoles de porcelana previamente lavados
- 2.- se coloca en el crisol 0.5g (en peso seco) de muestra
- 3.- los crisoles son colocados en la mufla a 500 °C durante 5 horas, pasado el lapso de tiempo se baja la temperatura a 100°C
- 4.- cuando la mufla llega a esa temperatura se sacan los crisoles y se ponen en un desecador para que se enfríen posteriormente se pesan
- 5.- para sacar el porcentaje de cenizas se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = (\text{peso de la muestra en ceniza} / \text{peso de la muestra húmeda}) \times 100$$