ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERIA MARITIMA Y CIENCIAS DEL MAR

“ Relación entre el ciclo de Muda y la actividad de las Enzimas digestivas y su efecto en la Tasa de alimentación y el Crecimiento del juvenil *Penaeus vannamei* ”

TESIS DE GRADO

Previa obtención del Título de:

ACUICULTOR

Presentada por :

EDUARDO CADENA LLOMITOA

GUAYAQUIL - ECUADOR

2001

DEDICATORIA

A DIOS, A MI MADRE Y HERMANOS POR CREER EN MI. ESTO ES PARA USTEDES POR SER FUNDAMENTALES DURANTE TODO ESTE AÑO.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por estar a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida.

A mi bendita MADRE, por su ayuda incansable y oportuna durante toda mi vida, por los grandes valores inculcados de lucha, sacrificio y honestidad, por sus consejos y cariño a través de su vida. Gracias Te quiero mucho madre

A mis hermanos Susana y Jorge, por apoyarme siempre en este duro y largo camino.

Al CENAIM y al Dr. Jorge Calderón, por haberme brindado la oportunidad de la realización de esta tesis.

A mi director de tesis M. Sc César Molina, por ayudarme, por su valiosa orientación y gran dedicación, responsabilidad y profesionalismo en el desarrollo de la investigación. Gracias por todo el apoyo y la amistad brindada.

A Yela Paredes, Químico-Farmaceutica, por su valiosa colaboración en los análisis de laboratorio.

A la M.Sc Julie Nieto por sus oportunos comentarios y ayuda en la obtención de material para terminar el documento.

A la camaronera Jesus del Gran Poder y Laboratorios F.C Marinos por la donación del material biológico.

A mis grandes amigos: Karina, Eduardo, Ruben, Marcos, Leonardo, Luis y demás tesistas que me acompañarón en mi estadía en CENAIM por su amistad y compañerismo, MUCHAS GRACIAS a pesar de todo.

A todos los operarios y cada una de las personas que conformaron el CENAIM durante mi estadía.

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad para los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y , el patrimonio intelectual de la misma, a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(Reglamento DE Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).

EDUARDO CADENA LLOMITOA

ESPOL
CIB - ESPOL

MSc. JERRY LANDIVAR ZAMBRANO
Presidente Tribunal

MSc. CESAR MOLINA POVEDA
Director de Tesis

MSc. VICTOR OSORIO CEVALLOS
Miembro Principal

TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido---------- I

Abreviaturas ---------- V

Indice de figuras ---------- VI

Indice de tablas----------VII

Resumen ----------IX

Introducción ---------- 11

I. ANTECEDENTES---------- 14

1.1. Ciclo de Muda ---------- 14

1.1.1. Generalidades---------- 14

1.1.1. Glándula sinusal---------- 14

1.1.1.2. Organo X---------- 15

1.1.1.3. Organo Y ---------- 16

1.1.2. Estadios de muda---------- 17

1.1.2.1. Descripción de los estadios de muda ---------- 18

1.1.2.1.1. Estadio A ---------- 19

1.1.2.1.2. Estadio B ---------- 20

1.1.2.1.3. Estadio C ---------- 21

1.1.2.1.4. Estadio Do---------- 22

1.1.2.1.5. Estadio D1---------- 22

1.1.2.1.6. Estadio D2---------- 23

1.1.2.1.7. Estadio D3---------- 24

1.1.3. Factores que afectan el ciclo de muda----------24

1.2. Sistema digestivo de los camarones peneidos----------26

1.2.1. Generalidades----------26

1.2.2. Morfología del tracto digestivo ----------27

1.2.2.1. Intestino anterior----------27

1.2.2.2. Intestino medio ----------29

1.2.2.3. Intestino posterior ----------31

1.2.3. Fisiología del sistema digestivo----------32

1.2.3.1. Digestión----------34

1.2.3.1.1. Digestión de proteína ----------34

1.2.3.1.2. Digestión de lípidos----------35

1.2.3.1.3. Digestión de carbohidratos----------35

1.2.3.2. Asimilación ----------36

1.2.3.2.1. Ciclo digestivo----------37

1.3. Enzimas digestivas ----------39

1.3.1. Generalidades----------39

1.3.2. Clasificación ----------40

1.3.3. Enzimas digestivas presentes en los camarones peneidos----------41

1.3.3.1. Factores que afectan la actividad enzimática----------44

1.3.4. Métodos para la detección de enzimas ----------48

1.3.3.4.1. Método del punto final ----------50

1.3.3.4.2. Método cinético ----------50

II. MATERIALES Y MÉTODOS ---------- 51

2.1. Ciclo de muda ---------- 51

2.1.1.Diseño experimental ---------- 51

2.2. Tasa de ingestión ---------- 52

2.3. Elaboración de la dieta ---------- 53

2.4. Análisis bioquímicos por estadio de muda ---------- 54

2.4.1. Preparación del suero enzimático ---------- 56

2.4.2. Análisis de nutrientes ---------- 56

2.4.2.1. Proteína soluble ---------- 56

2.4.2.2. Glicógeno ---------- 57

2.4.3. Actividad enzimática ---------- 58

2.4.3.1. Amilasa ---------- 58

2.4.3.2. Proteasa ---------- 60

2.4.3.3. Lipasa ---------- 61

2.5. Ensayo de crecimiento ---------- 62

2.6. Análisis estadístico ---------- 65

III. RESULTADOS ---------- 66

3.1.Duración del ciclo de muda ---------- 66

3.2.Tasa de ingestión ---------- 67

3.3. Indice hepatosomático ---------- 69

3.4. Análisis bioquímicos por estadio de muda ---------- 69

3.5. Ensayo de crecimiento ---------- 73

3.5.1. Conversión alimenticia ---------- 74

3.5.2. Supervivencia ---------- 75

IV. DISCUSION ---------- 76

4.1. Ciclo de muda ---------- 76

4.2. Tasa de ingestión ---------- 81

4.3. Actividad enzimática ---------- 82

4.4. Ensayo de crecimiento ---------- 87

CONCLUSIONES ---------- 90

RECOMENDACIONES ---------- 92

BIBLIOGRAFIA ---------- 93

ANEXOS ---------- 107

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama del complejo organo X-glándula sinusal

de los Brachyura ---------- 16

Figura 2: Estadio A ---------- 19

Figura 3: Estadio B ---------- 20

Figura 4: Estadio C ---------- 21

Figura 5: Estadio Do-D1 ---------- 22

Figura 6: Estadio D2-D3 ---------- 23

Figura 7: Sistema digestivo de los camarones peneidos ---------- 27

Figura 8: Vista ventral de los apéndices que conforman la boca ---------- 28

Figura 9: Proventrículo de los peneidos ---------- 28

Figura 10: Sección transversal de la región media de la cámara

posterior del proventrículo ---------- 29

Figura 11: Sección transversal de la región tubular del intestino medio ---------- 31

Figura 12: Recto y divertículo posterior ---------- 32

Figura 13: Proceso de digestión de la proteína ---------- 34

Figura 14: Camarones que mudan por fase de luna ---------- 67

Figura 15: Tasa de ingestión del *P. vannamei* por estadio de muda ---------- 68

Figura 16: Porcentaje de alimento recuperado al realizar el blanco ---------- 68

Figura 17: Indíce hepatosomático por estadio de muda ---------- 69

Figura 18: Actividad específica de amilasa ---------- 70

Figura 19: Actividad específica de proteasa ---------- 70

Figura 20: : Actividad específica de lipasa ---------- 71

Figura 21: Concentración de proteína ---------- 72

Figura 22:Concentración de Glicógeno----------72

Figura 23:Factor de conversión alimenticia para cada tratamiento al final del período de alimentación ----------74

Figura 24: Sala experimental del ensayo de tasa de ingestión ----------105

Figura 25: Observación del endópodo para determinación del estadio de muda en el camarón----------105

Figura 26: Sala experimental donde se realizó el ensayo de crecimiento----------106

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estadios de muda y su duración reportados en varias especies de camarones ---------- 18

Tabla 2: Características de los estadios de muda del juvenil *Penaeus* vannamei ---------- 24

Tabla 3: Ingredientes de la dieta experimental ---------- 53

Tabla 4: Características de las metodologías empleadas en los análisis de las enzimas y nutrientes a temperatura de 25ºC ---------- 55

Tabla 5: Duración del ciclo de muda en el juvenil *P. vannamei* ---------- 66

Tabla 6: Valores promedio después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei* ---------- 73

Tabla 7: Valores promedio de la calidad del agua en los acuarios---------- 75

ABREVIATURAS

LSD:	Prueba de la mínima diferencia
ml :	Mililitro
mM:	Milimolar
N:	Normal
M:	molar
STF:	Solución Tampón fosfato
TRIS:	Hidroximetil aminometano
rpm:	Revoluciones por minuto
?l:	Microlitro
?M:	Micromol
UV:	Ultravioleta
TCA:	Acido Tricloroacético
BSA:	Albúmina Bovina Sérica
NaOH:	Hidróxido de Sodio
IHS:	Indice Hepatosomático
pH:	Potencial de Hidrógeno
?C:	Grados Centígrados
?ps:	unidades prácticas de salinidad
TM:	Tonelada métrica

RESUMEN

En este estudio se investigó el efecto que tiene el ciclo de muda sobre la actividad enzimática y su relación con el crecimiento y conversión alimenticia del *P. vannamei*. Los resultados muestran una sincronización de la muda con el ciclo lunar, encontrándose en cuarto menguante aproximadamente el 50% de la población de camarones mudados, alcanzando el pico máximo en luna nueva (80%) que corresponden a los primeros 5 días de marea baja y alta, respectivamente.

Con respecto a la actividad enzimática se observó las mayores actividades específicas de amilasa y lipasa en los estadíos Do y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda. Mientras que para proteasas en los estadíos B, C y Do se encontró la mayor actvidad, coincidiendo con la etapa donde el camarón consume 18% más alimento. El glicógeno hepatopáncreatico presentó una alta concentración en los estadíos A, D1 y D3. Además, un índice hepatosomático (3,7%) significativamente ($P<0,05$) mayor fue establecido en los estadíos B, C, Do y D2.

Después de 60 días de alimentación, no se encontró diferencias estadísticas ($P>0,05$) en términos de biomasa ganada entre las 3 raciones alimenticias evaluadas (tabla de alimentación, 6% de la biomasa y de acuerdo al estadío de muda) a pesar de que los camarones alimentados en base a la tabla de alimentación crecieron 0,78 g significativamente ($P<0,05$) más que los otros dos tratamientos. Un aumento de la supervivencia del 7% fue observado en los animales que fueron alimentados en raciones acordes al ciclo de muda.

Así también las mejores tasas de conversión alimenticia y de eficiencia proteica fueron obtenidas por el grupo de camarones alimentados en función del estadío de muda. Una estrategia de alimentación adecuada al ciclo de muda, permitirá maximizar la eficiencia de utilización del alimento y reducir los excesos de alimentos no consumidos.

INTRODUCCION

Durante la última década, la acuacultura ha sido una de las industrias que mayor crecimiento ha tenido en el mundo. Es así que en 1984 la producción total de productos acuicolas incluido algas, fue de 87.000 TM mientras que en 1997 fue de 766.000 TM (De Silva, 2000). Sudamérica como continente, en 1997 produjo 150.000 TM, siendo el Ecuador quien aportó con el 17,3% del volúmen total de la región (Alceste-Oliviero, 2000).

Los balanceados o dietas frescas constituyen parte de los elementos principales en la cadena de producción del cultivo de camarón en cautiverio. De ahí que es necesario el uso de alimento artificial como complemento para el normal desarrollo del crustáceo. Anderson *et al.* (1987), encontraron que éste insumo llega a representar entre 30-40% del alimento ingerido en sistemas semi-intensivos; el consumo restante 60-70% corresponde al alimento natural, como microalgas, poliquetos y zooplancton, etc (Boddeke, 1983; Dall, 1992).

Actualmente la alimentación en las piscinas camaroneras está basada en cálculos de raciones a partir de tablas teóricas de crecimiento y supervivencia, las cuales no consideran la fisiología del camarón. Considerando que el costo del alimento balanceado puede llegar a representar hasta el 50%, del gasto de producción, dependiendo del sistema utilizado (extensivo, sin alimento o semi-intensivos con alimento) la especie, manejo, calidad de agua y tipo de alimento, es por lo tanto relevante encontrar nuevas

alternativas que permitan disminuir los gastos generados por éste rubro (Lawrence,1996; Csavas, 1998; Bador, 1998).

Para alcanzar éste objetivo es necesario estudiar al organismo en su capacidad de consumo de alimento, (factor importante en la supervivencia y crecimiento), en el cual la actividad enzimática cumple una acción de vital importancia (Sugai *et al.*,1998) y los procesos fisiológicos por los cuales estos atraviesan, como es el caso del ciclo de muda.

Muchos estudios se han realizado con el fin de determinar las enzimas digestivas endógenas presentes en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*, es así que se han encontrado enzimas tales como, tripsina, quimotripsina, aminopeptidasas, lipasas, carbohidrasas, carbopeptidasas A y B (Galgani, 1988; Van Hourmhoudt *et al.*, 1995; Van Hourmhoudt y Sellos,1996; Le Boulay *et al.*, 1996).

La tripsina representa ella sola hasta el 60% de la actividad proteolítica y el 6% de la proteína soluble del hepatopáncreas (Galgani *et al.*, 1985); en tanto que la α-amilasa representa el 1% de la proteína soluble siendo una importante glucosidasa del *P. vannamei* (Van Hourmhoud *et al.*,1996).

La importancia del proceso fisiológico del ciclo de muda en los crustáceos es indiscutible, ya que está relacionado con la mayoría de los sistemas que controlan los procesos metabólico y reproductivo del camarón, y si mencionamos que hay una reducción del consumo de alimento en los camarones en su preparación para la muda, es necesario determinar los estadios de muda para estimar el consumo de alimento y tener

en consideración ésta variable para cálculos en la tabla de alimentación usada en las camaroneras (Kuo y Lin, 1996; Nolasco, 1998).

La ración de alimento, y horarios de alimentación en función de la actividad de enzimas digestivas son tópicos de reciente investigación, seguidos con el fin de obtener una adecuada dosificación que permita reducir el costo de la producción y el factor de conversión alimenticia (Diaz-Granda, 1997; Nolasco, 1998).

El objetivo principal de este trabajo está enfocado en encontrar una estrategia que permita optimizar la cantidad de alimento a suministrar en los cultivos de camarón. La introducción de ajustes en la tabla de alimentación, en función de la actividad enzimática y estadios del ciclo de muda, podría ayudar a reducir el gasto innecesario de alimento en las camaroneras.

I. ANTECEDENTES

1. CICLO DE MUDA

1.1. GENERALIDADES

Los peneidos como otros crustáceos dependen de etapas para poder crecer, este acto lo pueden realizar mediante la exuvia, que no es más sino el desprendimiento del exoesqueleto viejo. El proceso por el cual camarón logra la exuvia es conocido como ciclo de muda. La muda influye en los crustáceos tanto en su morfología, fisiología y conducta, que se presenta en distintas fases de su reproducción (Skinner, 1985; Dall, 1990).

En crustáceos largos o grandes como algunas especies de cangrejos y langostas, la muda puede presentarse una o dos veces al año dependiendo del medio en que se encuentre, éstos tipos de organismos presentan un ciclo de muda conocido como anecdysis. En cambio los camarones peneidos presentan un ciclo de muda del tipo diecdysis, el cual es un proceso continuo de la muda, siendo de pocos días hasta semanas Dall, 1990).

1.1.1. Glándula sinusal

El ciclo de muda en los crustáceos comprende modificaciones de tipo estructural y fisiológico involucrando si no a todos los sistemas a la gran mayoría, como son el sistema nervioso periférico y central, regulación iónica, metabolismo general y celular, sistema excretor y sanguíneo (Cooke y Sullivan, 1982; Kuo y Lin, 1996).

La glándula sinusal en los crustáceos es uno de los centros de control neuroendocrino más conocido. Esta glándula contiene neuronas especializadas para la síntesis, almacenamiento y liberación de neurohormonas, que actúan como hormonas que son liberadas a la hemolinfa, los cuales regulan las varias funciones metabólicas. Estas funciones incluyen regulación del azúcar en la hemolinfa, concentraciones osmóticas e iónicas, ciclo de muda, adaptaciones a la luz y la presencia de ritmos circadianos y locomotores (Welsh, 1961; Cooke y Sullivan, 1982).

1.1.1.2. Organo-X

El órgano-X en los peneidos se encuentra ubicado en la superficie dorsal del ganglio óptico (Cooke y Sullivan, 1982; Skinner, 1985; Bell y Lightner, 1988). Este órgano produce la hormona inhibidora de la muda (HIM) a más de otras como la hormona inhibidora de las gónodas, hormona peptídicas y las cromatóforotropinas las cuales son almacenada en la glándula sinusal para luego ser secretada hacia la hemolinfa. La función de éste organo es la de inhibir la síntesis de ecdisona por parte del órgano-Y (Huberman, 1997).

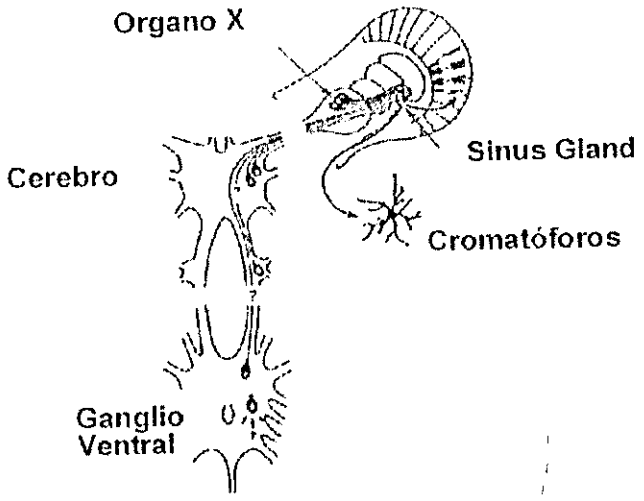

Figura. 1. Diagrama del complejo órgano X-glándula sinusal del Brachyuran (Reproducido de Welsh *et al.*,1961).

1.1.1.3. Organo-Y

El órgano-Y en los camarones peneidos se encuentra localizado bajo la hipodermis ventral cercano al músculo abductor mandibular externo (Bell y Lightner, 1988). Cuando el organo-X por razón aún desconocida deja de producir la HIM, el organo-Y puede secretar la hormona ecdisona que por hidroxilación se vuelve en una forma más activa conocida como la 20-hidroxi-ecdisona, la cual da la pauta para el inicio de los procesos fisiológicos de la muda (Cooke y Sullivan, 1982; Skinner, 1985).

1.1.2. ESTADIOS DE MUDA

Drach en 1939 dividió en cinco estadios principales a el ciclo de muda (A, B, C, D y E) con varias subdivisiones. "A" y "B" son estadios posteriores a la muda, C fase de intermuda, D fase de premuda y E muda o ecdysis, donde el animal se desprende del exoesqueleto completamente. Se han descrito dos tipos de intermuda en los crustáceos anecdysis y diecdysis, en el primero la fase de intermuda está definida por ser de período largo; en este grupo están incluídos crustáceos del suborden *Reptantia* tales como cangrejos, langostas y crayfish. La diecdysis, comprende un tiempo corto entre el término de la postmuda y el comienzo de la intermuda; en esté grupo están ubicados el suborden *Natantia*, que incluye a los camarones (Smith y Dall, 1985; Chan *et al.*,1988; Kuo y Lim, 1996).

Entre los métodos usados para determinar los estadios de muda existen examinaciones histológicas del integumento, la regeneración de los periópodos y la determinación del desarrollo setal (setogénesis) en los apéndices como son los uropódos y pleopódos (Stevenson, 1985; Smith y Dall, 1985; Sandifer y Smith, 1985; Anderson *et al.*, 1985; Chan *et al.*,1988).

El desarrollo setal o setogénesis fueron observados en urópodos de *P. esculentus* (Smith y Dall, 1985), *P. setiferus* y *P. stylirostris* (Robertson *et al.*, 1987), *P. vannamei* adulto (Betancourt *et al.*, 1993), *P. monodon* (Kuo y Lim, 1996), camarón marino *Crangon cragon* (Hunter y Uglow, 1998) y en pleopódos de juveniles *P. duorarum* (Schafer 1968), *P. indicus* (Read, 1977), *P. californiensis y P. stylirostris* (Huner y Colvin,

1979), *P. merguiensis* (Longmuir, 1983) y *P. vannamei* (Chan *et al.*, 1988). La duración de cada estadio y sus subdivisiones varían dependiendo de la especie y la edad (Tabla 1).

Tabla 1. Estadios de muda y su duración reportados en varias especies de camarones Kuo y Lim, 1996 (1); Betancourt *et al.*, 1993 (3); Chan *et al.*, 1988 (2); Robertson *et al.*, 1987(4,5); Smith y Dall, 1985(6); Sandifer, y Smith, 1985 (7)

Especie (Autor)	Etapa	A	B	C1	C2	C3	Do	D1'	D1''	D1'''	D2	D3	E
P. monodon (1)	Adulto	9 h	2 d	1-2 d			3 4 d	3 d	2 d	2 d	2 d	12 h	
P. vannamei (2)	Juvenil	18-28 h	23-40 h	1 5 d	6 8 d	4-7 d	3-6 d	8-10 d			2-3 d	1-2 d	2 m
P. vannamei (3)	Adulto	1 33 d	1 69 d	2 15 d			3 11 d				3 5 d		
P. stylirostris (4)	Adulto	1 d	2 d	2 d			3 d				3-4 d		1 m
P. setiferus (5)	Adulto	1 d	2 d	2-3 d			4 d				4 d		1 m
P. esculentus (6)	Juvenil	9 h	2 d	1-2 d			4 d	3 d	3 d	3 d	2-5 d	10 h	
M. rosenbregii (7)	Adulto	1 d	3 5 d	29-79 d			3-5				5 8 d		

1.1.2.1. Descripción de los estadios de muda

En la presente investigación se observó el desarrollo setal o setogénesis en los urópodos del *P. vannamei* por medio de estereomicroscopio 40 X y sus características principales se las resume en la (Tabla 2).

1.1.2.1.1 Estadio A.-

Este estadio empieza inmediatamente después de la muda del camarón. El exoesqueleto aún permanece suave, y la epidermis se la observa transparente y con poca pigmentación. La matriz celular (epidermis Ep) se encuentra cerca de las bases setales (BS).

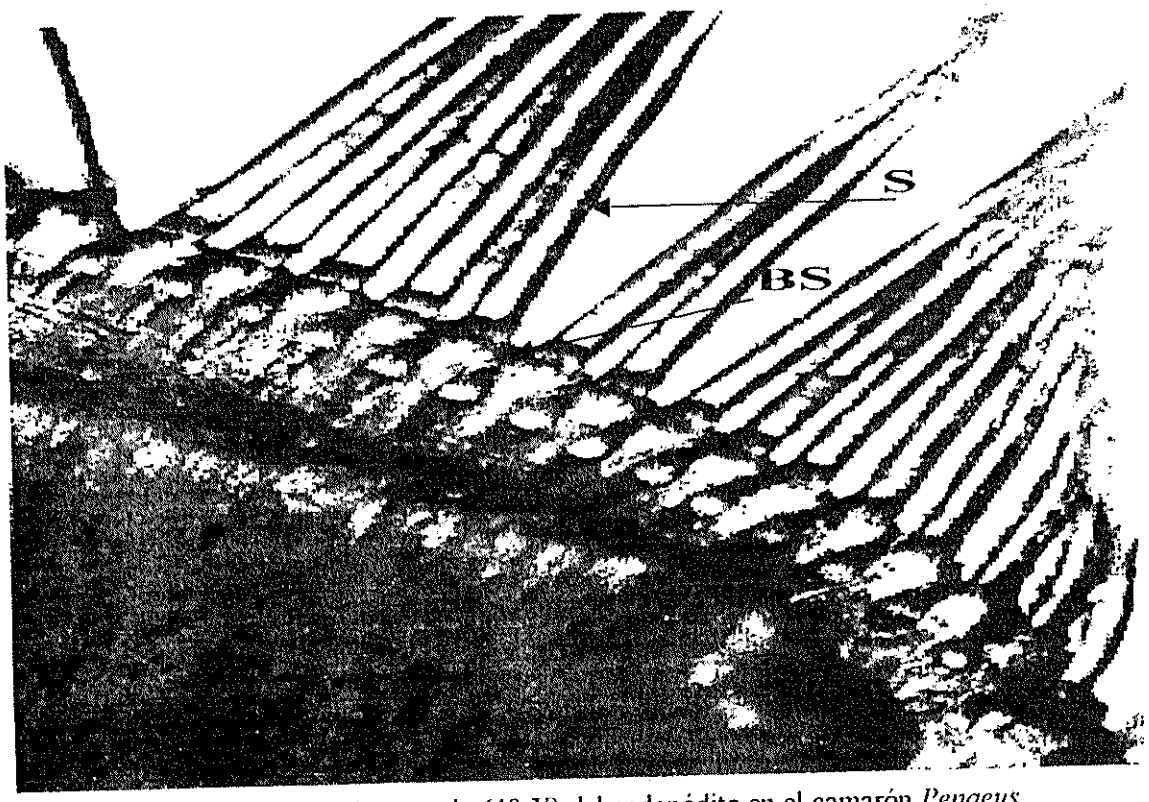

Figura 2. Observación al microscopio (40 X) del endopódito en el camarón *Penaeus Vannamei*. Fase de post muda (Estadio A). BS bases setal, S setas.

1.1.2.1.2.- Estadio B.- El exoesqueleto empieza a adquirir rígidez debido a los depósitos de calcio. Empieza la secreción de la endocutícula, la cual se completa en la intermuda (Chan *et al.*, 1988; Dall *et al.*, 1990), Figura 3. Además los conos setales son más visibles y la formación de estos (CS) continúan (Smith y Dall 1985; Chan *et al.*, 1988) .

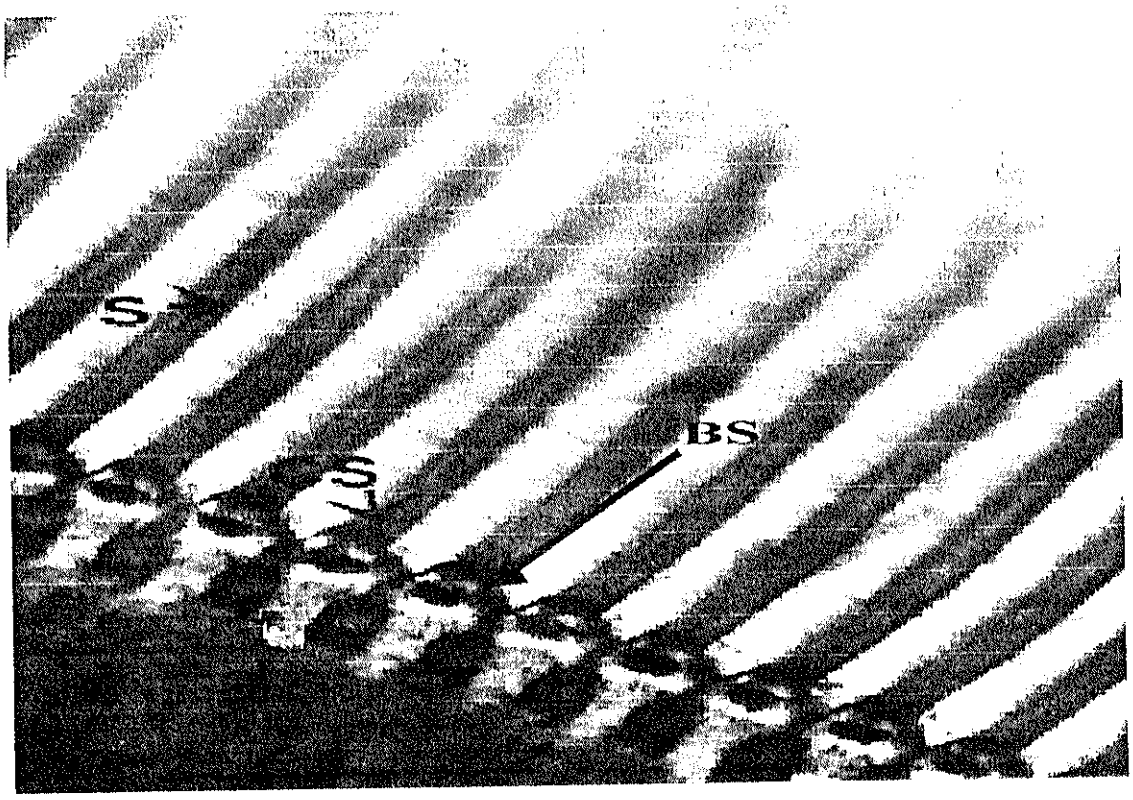

Figura 3. Observación al microscopio (40 X) del endopódito en el camarón *Penaeus Vannamei*. Fase de post muda (Estadio B). BS bases setal, S setas, CS cono setal.

1.1.2.1.3.- Estadio C.- La textura dura que toma el exoesqueleto es debido a una completa calcificación de éste (Smith y Dall, 1985; Chan *et al*, 1988). En la Figura. 4 se puede apreciar como la epidermis llena las bases de las setas (BS) y forma una línea a lo largo de las bases setales conocida como la linea epidermal (LEp) (Stevenson, 1985; Kuo y Lin 1996), en este estadio se completa la formación de los conos setales (CS).

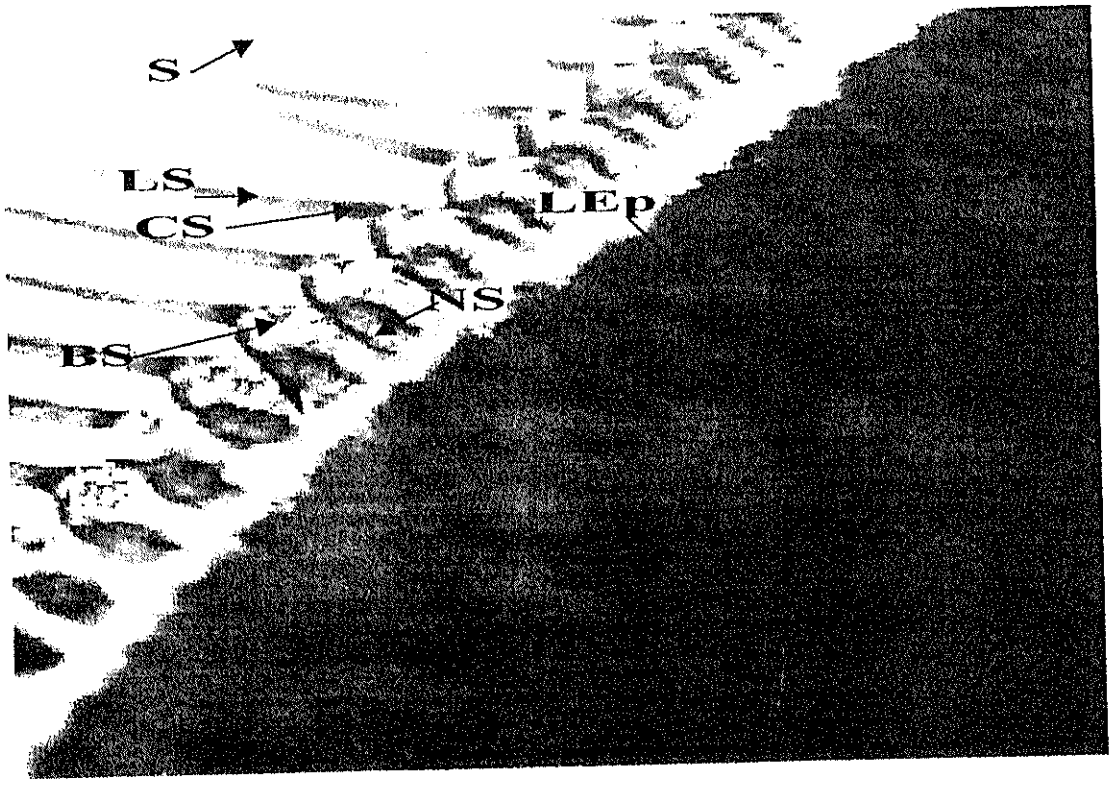

Figura 4. Observación al microscopio (40 X) del endopódito en el camarón *Penaeus Vannamei*. Fase de inter muda (Estadio C). BS bases setal, S setas, CS cono setal, LS lumen setal, NS nódulo setal, LEp línea epidermal.

1.1.2.1.4 Estadio Do.- Esta fase se divide en varios subestadios. El comienzo de ésta etapa lo define la apólisis (Smith y Dall, 1985; Chan *et al.*, 1988), que consiste en la retracción de la epidermis del exoesqueleto. La retracción de la epidermis termina cuando se recoge totalmente de las bases setales. En la figura 5 se puede observar como la epidermis forma una línea sinuosa y paralela a los nódulos setales.

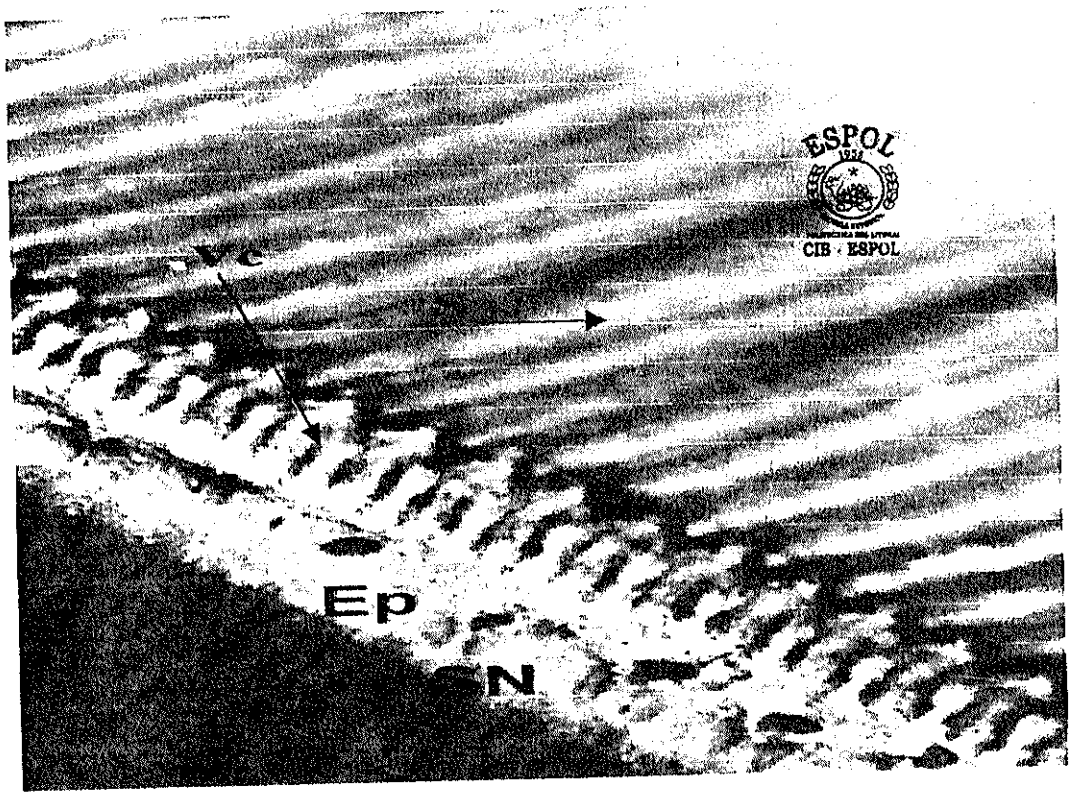

Figura 5. Observación al microscopio (40 X) del endópodito en el camarón *Penaeus Vannamei*. Fase de pre muda (Estadio Do-D1). Vc vía cutícula, S setas, EP epidermis y SN setas nuevas.

ESPOL CIB - ESPOL

1.1.2.1.5 Estadio D1.- El desarrollo de las nuevas setas (setogénesis) es la principal característica de este estadio en la que se pueden apreciar con cierta dificultad las nuevas setas (SN). En algunas especies de crustáceos desde cangrejos, jaibas y peneidos ésta etapa se subdivide en D1´, D1´´ y D1´´´, en éste trabajo se considerará solo como D1.

Así mismo, otro proceso que se manifiesta en esta fase es la invaginación de la epidermis que consiste en la retracción de la epidermis de las bases setales (Smith y Dall, 1985; Chan *et al.*, 1988).

1.1.2.1.6 Estadio D2.- La secreción de la nueva epicutícula se observa en éste estadio (Smith y Dall, 1985). Las nuevas setas (SN) se observan más formadas Fig. 6. Además el exoesqueleto, se encuentra frágil y blando.

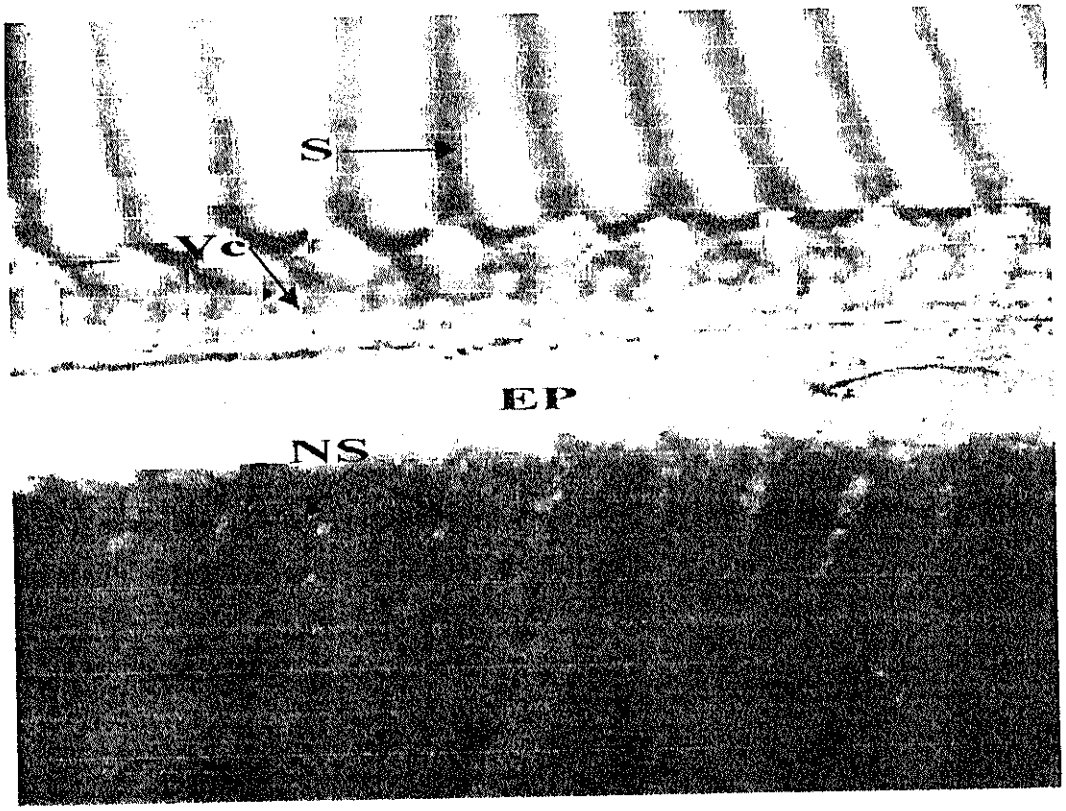

Figura 6. Observación al microscopio (40 X) del endópodito en el camarón *Penaeus Vannamei*. Fase de pre muda (Estadio D2-D3). Vc vieja cutícula, S setas, EP epidermis y NS nuevas setas.

1.1.2.1.7 Estadio D3.- Se caracteriza por ser el período en el cual se llega al máximo de reabsorción de los componentes que se encuentran en la vieja cutícula (Vc). El exoesqueleto se encuentra bastante frágil que puede romperse fácilmente. (Smith y Dall, 1985; Chan *et al.*, 1988).

Tabla 2. Características de los estadios de muda del juvenil *Penaeus vannamei* (Chan *et al.*, 1988)

Estadio	Duración	Exoesqueleto	Epidermis	Desarrollo setal
A	1dia	Suave	La epidermis es transparente y hay poca pigmentación	La epidermis empieza a llenar las bases setales
B	1 día	Se endurece,recupera actividad	La pigmentación empieza a incrementarse	Empieza formación de los conos setales
C	3-4 días	Es duro se la actividad del camarón incrementa	Las bases setales forman una línea epidermal	Se completa la formación de conos setales
Do	1 2 días	La dureza disminuye	Empieza la apólisis que es la retracción de la epidermis	
D1	1-2 días		Empieza invaginación de la epidermis	Observación de nuevas setas poco visibles
D2	2-3 días	Blando	La invaginación de la epidermis continua	Las setas se observan más desarrolladas
D3	1 día	Blando de contextura suave	La reabsorción del exoesqueleto es completa, la invaginación llega al máximo	
E	2 m	Se desprende el viejo exoesqueleto	Se lleva a cabo la absorción de agua por parte del camarón	

1.1.3. FACTORES QUE AFECTAN EL CICLO DE MUDA

Entre los factores externos que se conocen afectan la muda tenemos la intensidad de luz, fotoperíodo y parámetros de calidad del agua como concentración de oxígeno disuelto, pH, temperatura, y salinidad. Entre los factores intrínsecos, tenemos la etapa de desarrollo del animal (edad) y la especie.

La luz es un factor abiótico muy importante para el crecimiento, no solo para crustáceos sino de igual manera para los peces y demás especie acuáticas que se cultivan. El rol que desempeña la luz es importante en la conducta de los animales, estando impicada en

migraciones; en peces desempeña función de orientación, e influye en los hábitos de alimentación (Dowling Motheshill, 1999). El fotoperíodo y la intensidad de luz afecta el normal proceso de la muda, así tenemos que en el cangrejo *Gecarcinus*, una constante iluminación de aproximadamente 10 lux inhibió por meses el proceso de la muda (Passano, 1961).

De igual manera se ha notado en muchos experimentos que una reducción de la temperatura retrasa el proceso de la muda, mientras que elevadas temperaturas ayudan a la muda. En el crawfish *Cherax tenuimanus* y *P. setiferus* elevadas temperaturas incrementan el número de mudas (Dall, 1990; Rouse y Kartamulia, 1992). En temperaturas de 25-30 °C se observó un mejor crecimiento en los camarones *P. aztecus* y *P. stylirostris* (Rubino *et al.*, 1983).

Los cambios de salinidad no influyen directamente en el proceso de la muda, lo cual fue comprobado con el *M. bennettae* (Dall, 1990), y en el crawfish *Cherax tenuimanus*, la salinidad no afectó la muda pero si influyó en el éxito de mudar, encontrandose que salinidades de 20-30 ppt favorecieron el normal desarrollo del ciclo de muda. Estos resultados fueron comprobado en *P aztecus* y *P. setiferus* (Hysmith y Colura, 1976).

La calidad del agua es de igual manera importante y tiene mucho que ver en el buen desenvolvimiento del proceso de muda del camarón, en *P. semilsucatus* se comprobó que bajas concentraciones de oxígeno alargaron el ciclo de muda en 3 días más de lo normal (Dall, 1990).

1.2. SISTEMA DIGESTIVO DE LOS CAMARONES PENEIDOS

1.2.1. GENERALIDADES

Entre las funciones del tracto digestivo de los crustáceos está el transporte de nutrientes, ingestión, digestión mecánica, hidrólisis química y bioquímica, absorción celular, almacenamiento de nutrientes y expulsión del hilo fecal (Al-Mohanna y Nott, 1987; Ceccaldi, 1998). Varios estudios se han realizado sobre el tracto digestivo de los crustáceos decápodos en especial de los camarones peneidos (Dall y Moriarty, 1983; Dall, 1990; Ceccaldi, 1998).

Existen evidencias de que las preferencias alimenticias cambian con la edad y estado fisiológico del camarón. Lovett y Felder en 1990 encontraron actividad enzimática en diferentes regiones (estómago, intestino anterior y posterior y hepatopáncreas) del *Penaeus setiferus* desde larva hasta postlarva, en lo cual se basaron para demostrar las etapas de carnívoro y herbívoro del camarón.

El conocimiento de los cambios que ocurren en el sistema digestivo de los crustáceos ayuda a comprender la nutrición (para la formulación de dietas y hábitos alimenticios) y el crecimiento de los organismos en cultivo.

1.2.2. MORFOLOGÍA DEL TRACTO DIGESTIVO

En los decápodos el sistema digestivo está formado de un tubo que recorre la región anteroventral hasta el ano, presente en el extremo del último somito corporal (Dall y Moriarty, 1983). El sistema digestivo está dividido en tres partes principales: intestino anterior o estomodeo, intestino medio o mesentereo y el intestino posterior o proctodeo (Ceccaldi, 1998).

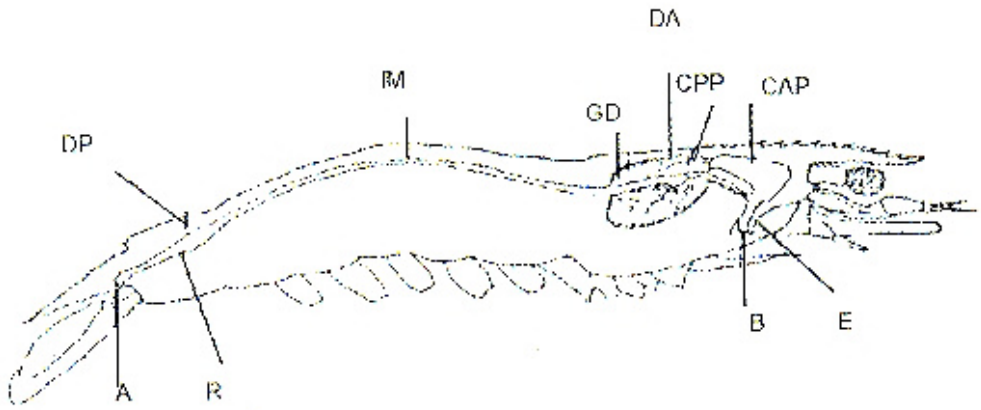

Fig. 7. El sistema digestivo del camarón. B, boca; E, esófago; CAP, cámara anterior del proventrículo; DA, divertículo anterior; CPP, cámara posterior del proventrículo; DA, divertículo anterior del intestino medio; GD, glándula digestiva; IM, intestino medio; DP, divertículo posterior del intestino medio; R, recto; A, Ano (Reproducido de Dall *et al*.,1990).

1.2.2.1 Intestino anterior

El intestino anterior, también conocido como aparato estomodeal, estómago o proventrículo, es de origen ectodérmico y está compuesto por la boca, esófago y proventrículo. Los apéndices masticadores en los peneidos son los maxilipedos, maxila, paragnathas, mandíbula y el labrum (Hunt *et al*., 1992).

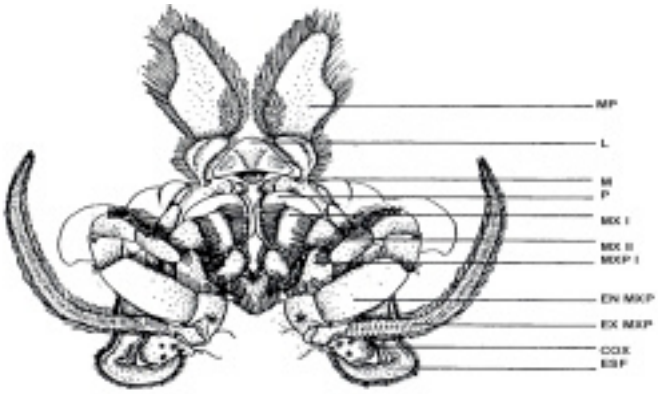

Figura. 3**.** Vista ventral de los apéndices que conforman la boca en los peneidos: EN MXP, endópodo de maxilipedo II; EX MXP, exópodo de maxilipedo II; L, labrun; M, mandibula; PM, Palpo mandibular; MX I, maxila I; MX II, maxila II; MXP I, maxilipedo I; P, paragnatha; ESF, escafonagtita de maxila II; COX, coxopodito de estimulación maxilipedo I (Reproducido de Hunt *et al*., 1992)

La boca está formada por el labrum o labio superior; un par de mandíbulas y un par de paragnathas, lo que constituyen el labio inferior. Esta conduce hacia un corto y recto esófago vertical, el cual presenta una estructura tubular que se abre hacia el lumen de la parte anterior del proventrículo (Gibson, 1981).

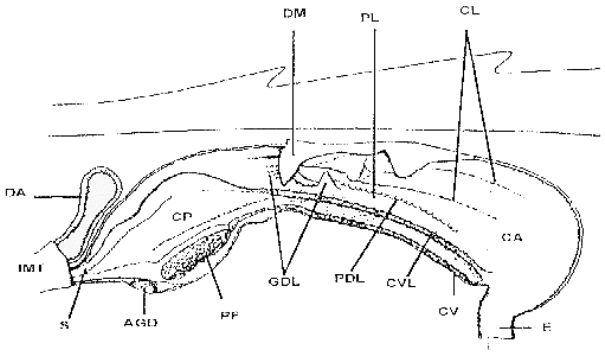

Figura 9. Proventrículo de los peneidos. E, esófago; CA, Cámara anterior; CL, canales laterales; CV, canal ventral; CVL, canal ventro-lateral; PDL, pequeños dientes laterales (dientes cardíaco); PL, placa lateral (placa cardíaca);GDL, grandes dientes laterales (oscículo); DM, dientes medios (osciculo prepilórico); PF, prensa-filtro (prensa pilórica); CP, cámara posterior; AGD abertura de la glándula digestiva; S, solapillas; IMT, región tubular del intestino medio; DA, diverticulo anterior (reproducido de Dall *et al*.,1990)

El proventrículo, es un término utilizado por su parecido al de los insectos, está dividido en dos cámaras principales, anterior y posterior. La cámara anterior también denominada saco alimenticio presenta un tejido que le permite ensancharse. Mientras que la cámara posterior está dividida en dos capas, una superior que sirve de paso al intestino medio, y una inferior que funciona como una prensa-filtro en forma de W comprimida en la sección transversa, la cual conduce los nutrientes a la glándula digestiva (Dall y Moriarty 1983)

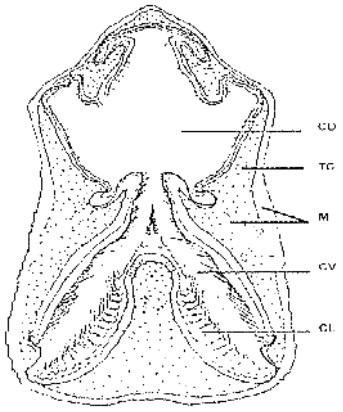

Figura 10. Sección transversal de la región media de la cámara posterior del proventrículo. CD, comportamiento dorsal; TC, tejido conectivo; M, músculo; CV, comportamiento ventral; CL, canal longitudinal (Reproducido de Dall *et al.,* 1990)

1.2.2.2. Intestino medio

El intestino medio a diferencia del instestino anterior, sus paredes no están recubiertas de quitina. Es de origen endodérmico, y está formado por la glándula digestiva y la región tubular simple. La glándula del instestino medio llamada también hepatopáncreas es el mayor órgano en los crustáceos decapodods, llegando a representar entre 2-6% del peso total del cuerpo del camarón y tiene funciones principales que incluyen la síntesis

y secreción de las enzimas digestivas, absorción de nutrientes, almacenamiento de minerales y otras sustancias orgánicas como lípidos y carbohidratos, y la distribución de las reservas durante la fase de intermuda (Dall, 1990; Ceccaldi, 1998)

El color del hapatopáncreas es variado pudiendo ser café, rojo, amarillo, verde, o azúl dependiendo del tipo de sustancias de reservas que contenga. El hepatopáncreas es un órgano bilobulado, compuesto de cientos de túbulos los cuales están formados de un epitelio simple con vellosidades y separadas por un fino tejido conectivo.

Los túbulos están formados de cinco tipos de células. En los extremos de los túbulos se encuentran las células E (Embrionalzellen o fibrilares) y R (Restezellen o absortivas), y en la región proximal del túbulo las células B (Blanzenzellen o secretoras) (Dall y moriaty, 1983; Dall, 1990; Ceccaldi, 1989, 1998). A partir de la célula E se desarrollan las células F y R en tanto que, de las células F se origina las células B (Gibson, 1981; Dall y Moriarty, 1983; Al-Mohanna y Nott, 1987; Ceccaldi, 1998).

El resto del intestino medio es un tubo recto que se distribuye dorsalmente por el cefalotórax a través del abdomen hasta el recto. El cual está recubierto por un simple epitelio con pliegues, rodeado de una capa de músculo longitudinal inmerso en tejido conectivo y numerosos espacios llenos de hemolinfa.

La membrana peritrófica es secretada por una anillo de células detrás de las aberturas de la glándula digestiva, en el intestino medio, ésta encierra el quimo (Bell y ligthtner, 1988). Esta membrana es de material delicado de baja densidad de electrones y

permeables a grandes moléculas aunque posiblemente también de partículas submicroscópicas, lo cual ayudaría a que la digestión y absorción prosigan en el intestino medio. La membrana peritrófica ayuda a proteger al intestino del material extraño de las heces y se la considera como un medio eficiente para la defecación (Dall y Moriarty, 1983). En los extremos del intestino medio se encuentran los divertículos anterior y posterior, respectivamente, los cuales sirven para incrementar el área de absorción.

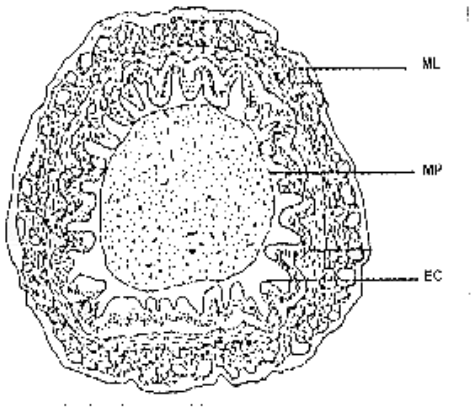

Figura 11. Sección transversal de la región tubular del intestino medio. ML, músculo longitudinal, MP, membrana peritrófica; EC, epitelio columnar (Reproducido de Dall *et al*., 1990)

1.2.2.3 Intestino posterior

El intestino posterior está ubicado en la mitad posterior del sexto segmento abdominal e incluye el recto y al ano, el cual está constituido internamente de seis almohadillas lisas y de aspecto esponjoso que llenan el lumen del intestino. Estas almohadillas presionan el material fecal en la membrana peritrófica y lo expulsan lentamente en tamaños iguales al del instestino (Dall y Moriarty, 1983; dall et al., 1990)

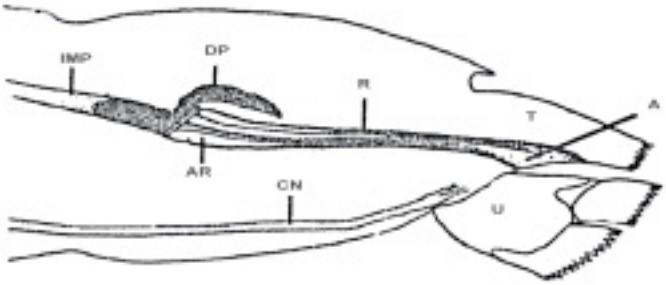

Figura 12. Recto y divertículo posterior de los peneidos.- IMP, intestino medio posterior; DP, divertículo posterior; AR, almohadilla rectal; R, recto; CN, cordón nervioso; T, telsón, A, ano; U, urópodo (Reproducido de Dall *et al*., 1990).

1.2.3. FISIOLOGIA DEL SISTEMA DIGESTIVO

La digestión en los peneidos se realiza por medio de una combinación de procesos mecánicos como la peristalsis y la trituración (Vonk, 1960), y químicos determinados principalmente por la acción de las enzimas presentes en los jugos digestivos. El alimento ingresa a la boca con la ayuda de los apéndices masticadores. Las partículas de mayor tamaño van directamente a la bolsa cardíaca y son dirigidos por movimiento musculares hacia la parte dorsal de ésta donde son tratadas por las piezas del molino gástrico (Suarez, 1999).

La masa alimenticia es impulsada a través del intestino medio y posterior por movimientos transversales y longitudinales (peristalsis), los cuales en algunas especies pueden ser vistos al microscopio. El estómago o proventrículo cumple dos funciones, reducir el alimento digerido a una masa o pasta con la finalidad de incrementar la

superficie para la acción de las enzimas digestivas y seleccionar las partículas más pequeñas para facilitar el ingreso de éstas a la glándula digestiva.

El alimento triturado en el estómago es mezclado con el jugo digestivo secretado por el hepatopáncreas que contiene diversos tipos de enzimas, las que por su efecto hidrolítico complementan el rompimiento mecánico realizado por el molinillo gástrico. El proventrículo es el centro de la digestión extracelular. El jugo digestivo por contener sustancias emulsificantes juega una parte importante en la absorción y digestión de las grasas.

Las partículas alimenticias se dirigen hacia la cámara anterior en donde se mezclan con los fluidos digestivos, pasan canales ventrales hacia la cámara anterior donde las partículas gruesas son excluidas por medio de abundantes setas. Las partículas finas se dirigen hacia la prensa-filtro, en donde se retendran partículas mayores de 1 µm. Finalmente ingresan a los túbulos de la glándula digestiva para que los nutrientes sean absorvidos (Dall y Moriarty, 1983; Dall *et al*., 1990).

Ya que la glándula digestiva está compuesta de cientos de túbulos de epitelio simple, el área interna es grande, por lo que la eficiencia y asimilación de nutrientes es rápida. Según pruebas realizadas por Dall y colaboradores en 1990, el alimento empieza aparecer en el tejido después de 1 hora de la ingestión del alimento y la absorción se completa entre 4-6 horas.

1.2.3.1. Digestión

El proceso de la digestión depende de la anatomía y fisiología del sistema digestivo de cada especie (García-Carreño y Hernández,1997) e incluye procesos mecánicos y bioquímicos. Entre los componentes que forman la dieta balanceada están las proteínas, carbohidratos y lípidos los cuales son atributos importantes en la palatabilidad del alimento, la digestibilidad (acceso de enzimas digestivas a sitios de hidrólisis en el alimento) y la absorción de los nutrientes.

1.2.3.1.1 Digestión de proteínas

La molécula de proteína es primeramente hidrolizada a fragmentos de polipéptidos por intermedio de las peptidasas, estas cadenas de polipéptidos serán luego hidrolizadas por la acción de la exopeptidasas, la cual actúan sobre los enlaces de aminos y carboxílos desdoblandolos a cadenas más cortas. Finalmente las dipeptidasas reducen las cadenas hasta aminoácidos.

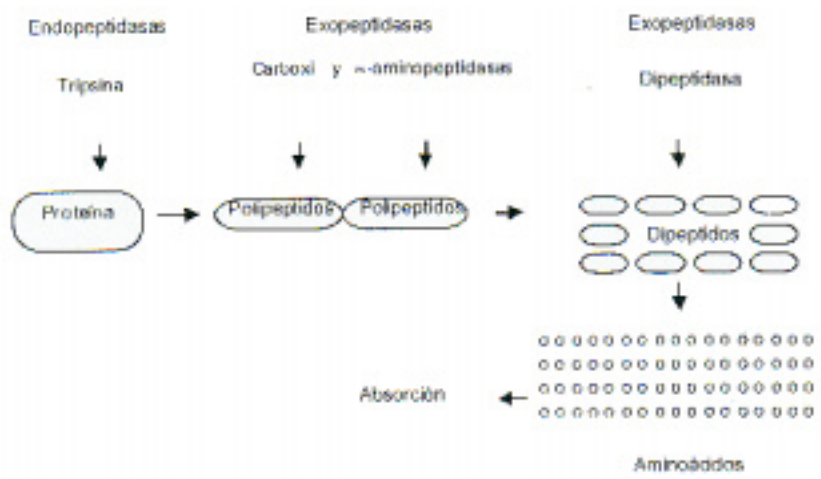

Figura 13. Proceso de digestión de la proteína (Reproducido de Dall, 1992).

1.2.3.1.2 Digestión de Lípidos

Las grasas son digestadas y absorvidas como ácidos grasos monogliceroles y digliceroles por la acción de la lipasa (Dall, 1992). Dada la característica hidrofóbica de las grasas éstas tienden a resistir la digestión, en vista de este inconveniente los animales usualmente sobrellevan el problema por medio de emulsificantes. En los crustáceos existe un emulsificante conocido como aciltaurina (Gibson, 1981; Dall, 1992). Hasta ese tiempo se consideraba que la glándula digestiva de los peneidos presentaba agentes emulsificantes que servían para ayudar a desdoblar el alimento ingerido. Actualmente se ha reportado que es la taurina junto con otro compuesto la que cumple dicha función (Ceccaldi, 1998).

1.2.3.1 Digestión de carbohidratos

Los carbohidratos ya sean como almidón o glicógeno requieren de al menos tres enzimas para su completa digestión (Dall, 1992). La primera es una glicosidasa (análoga de las endopeptidasas que fragmentan la molécula de proteína), usualmente una amilasa. Los oligosacaridos que se obtiene por la acción de la amilasa son reducidos a monosacáridos por otras glucosidasas como puede ser al maltasa o sucrasa.

Otro complejo de carbohidratos presentes en la dieta y que sirve como fuente de energía, pero que no son fácilmente digeribles por el camarón son la celulosa y la quitina. La celulosa compuesta principalmente por unidades de glucosa es uno de los mayores constituyentes de las plantas, y de poco valor energetico para los peneidos

debido a que tienen pobre actividad de celulasa que es la enzima que desdobla a la celulosa (Dall, 1992).

La quitina es otro carbohidrato estructural, encontrándose en la cutícula de los crustáceos formando un complejo con la proteína. Las enzimas quitinoliticas deben digestar este complejo quitina-proteína para que esta ultima sea utilizada. Una de las ultimas investigaciones sobre la presencia de esta enzima en el hepatopáncreas del *P. japonicus* fue realizada por (Kono *et al*., 1995), quienes señalaron que existe dos tipos de quitinasa una de tipo endógena que hidroliza la quitina a quito-oligosacaridos y otra exógena la cual rompe los polímetros producidos a N-acetilglucosaminas.

1.2.3.2 Asimilación

Absorción o asimilación es el paso de los nutrientes liberados por hidrólisis a través de la membrana intestinal, hacia el sistema circulatorio o hemolinfa. La principal función del hepatopáncreas es la asimilación del alimento, que se obtiene mediante una serie de procesos integrados que incluyen la secreción de enzimas digestivas, digestión y absorción, almacenamiento de nutrientes reservas y deposición de material no aprovechable como resultado del metabolismo del alimento ingerido, dicho proceso es conocido como ciclo digestivo interno (Al-Mohanna y Nott, 1987).

1.2.3.2.1 El ciclo digestivo

Primeramente las células F, sintetizan los gránulos de zimógenos los cuales son exocitosados en el interior del lumen de los túbulos y transportados al estómago (Vonk, 1960; Al-Mohanna y Nott, 1987; Vogt, 1993). El material soluble es absorvido por las células R, pero la función digestiva principal es llevada a cabo por la células B las cuales asimilan los nutrientes por endocitosis de sus vacuolas (Vonk, 1960; Al-Mohanna y Nott, 1987; Vogt, 1993). Estas observaciones difieren con las realizadas por Gibson y Baker (1979) y Loizzi (1971) quienes afirman que son la células B, la fuente de enzimas para la digestión extracelular.

La función de almacenamiento en el hepatopáncreas es llevado por las células M y R. Las células R almacenan lípidos y glicógeno y elementos trazas, mientras que la células M almacenan material de reserva como glicoproteínas y glicógeno pero en menor cantidad (Al-Mohanna y Nott, 1987; Vogt, 1993; Vonk, 1960; Ceccaldi, 1999). En la finalización del ciclo digestivo las células E se dividen por mitosis y regeneran la perdida de células B y células R (Al-Mohanna y Nott, 1987).

Las células B están implicadas en la deposición de material fecal por medio de secreción holocrina siguiendo la etapa de la digestión y asimilación intracelular (Gibson, 1981; Vogt, 1993). El ciclo digestivo en el hepatopancreas toma por lo menos 24 horas después de ingeridos los alimentos. Esto sugiere que un camarón bien alimentado tendrá la glándula con suficiente quimo para envolver a las partículas

producidas por la masticación o digestión primaria realizadas en el estómago, para ser digeridas y asimiladas (Al-Mohanna y Nott, 1987).

1.3. ENZIMAS DIGESTIVAS

1.3.1. GENERALIDADES

La enzimología se ha desarrollado rápidamente durante los últimos años debido a su importancia para un gran número de ciencias entre esas la nutrición. Se le ha dado mucha importancia al estudio de las proteinasas y peptidasas en los crustáceos, principalmente en las especies de importancia económica como el camarón. El avance en los conocimientos sobre el proceso de la digestión del camarón en los últimos años es indudable, sin embargo la aplicación de estos conocimientos en servicio de la mejora de la producción no ha tenido el mismo ritmo.

El páncreas y el estómago de los mamíferos han sido durante años fuente de enzimas que se comercializan con diversos fines. En la nutrición de los crustáceos la utilidad de las enzimas ha sido su empleo en técnicas para determinar *in vitro* la digestibilidad de dietas, como aditivos alimentarios y para estudiar el efecto de inhibidores de proteasas presentes en el alimento (Carrillo, 1998).

El conocimiento de las reacciones involucradas en el sistema digestivo es necesario para realizar mejores formulaciones, presentaciones de dietas, reducción de efectos indeseables como compuestos antifisiológicos presentes en los ingredientes de la dieta. Así por ejemplo, la inclusión de microencapsulados de enzimas como promotores de crecimiento harán que la acuacultura tenga un desarrollo más sustentable (García-Carreño *et al*., 1998).

1.3.2. CLASIFICACION

El sistema de clasificación se basa en la división de las enzimas de acuerdo a la reacción que realizan. Se conoce seis clases principales (Laguna, 1967; Cheetham, 1987).

1. Oxido reductasas
2. Transferasas
3. Hidrolasas
4. Liasas
5. Isomerasas
6. Ligasas

Cada grupo de enzimas tienen la capacidad de diferenciar entre los sustratos y se especializan en determinados compuestos, así tenemos que:

1. Catalizan reacciones de oxido reducción, reacciones que involucran la oxigenación, intercambio de átomos de hidrógeno.
2. Catalizan reacciones de transferencia de grupos tales como: aldehídos, cetonas, acil y azucares, además de una molécula a otra.
3. Catalizan reacciones hidrolíticas como las que ocurren entre esteres; amidas; peptidos; y otros compuestos C-N con funciones anhidras, glicósidos y otros.
4. Catalizan reacciones de extracción no hidrolíticas de grupos para la formación de dos enlaces, tales como C=C, C=O y C=N

5. Catalizan reacciones de isomerización.
6. Catalizan reacciones de formación de enlaces con la hidrólisis de nucleótidos fosfatos.

En el caso de los camarones peneidos las enzimas digestivas pertenecen al grupo de las hidrolasas, las que se dividen en proteasas, estas a su vez se sub-dividen en exopéptidasas y endopéptidasas, dentro del primer grupo están las aminopéptidasas y carbohidrasas y en el segundo grupo la tripsina y quimotripsina. La amilasa pertenece al grupo de las carbohidrasas, mientras que la lipasa al grupo de las Lipasas.

1.3.3. ENZIMAS DIGESTIVAS PRESENTES EN LOS CAMARONES PENEIDOS

El hepatopáncreas a diferencia de otros órganos (intestino, estómago), presenta una mayor actividad enzimática, esto sugiere la importancia de éste órgano en la síntesis y secreción de enzimas digestivas (Chuang *et al*., 1985; Tsai *et al*., 1986; Ceccaldi, 1989). El camarón al presentar características de omnívoro y carnívoro se alimenta de organismos invertebrados y plancton presentes en agua y suelo, con un alto contenido proteínico, requiriendo por lo tanto para su asimilación y digestión de enzimas digestivas (Dall, 1992).

En *P. vannamei* se han determinado la presencia de enzimas digestivas endógenas tales como: tripsina, quimotripsina, aminopeptidasa, lipasas, carbohidrasas, carbopeptidasa A

y B, β-glucosidasa y laminarasa (Galgani y Benyamin, 1985; Galgani, 1988, Dall, 1992; Omondi y Stark, 1995; Le Moullac *et al*., 1997). Así mismo se ha encontrado en otros decápodos enzimas como la dexosiribonucleasa, la ribonucleasa, y la fosfatasa alcalina (Suarez, 1999). Colagenasa, quitinasa y celulasa, son enzimas también identificadas pero se cree que son de fuente exógena (Ceccaldi, 1989; Dall, 1992; Carrillo y González, 1998). A diferencia de los peces el camarón carece de la enzima pepsina (Suarez, 1999).

La tripsina (E.C. 3.4.21.4), perteneciente a las serina-proteasas es la principal enzima, la cual representa hasta el 60% de la actividad proteolítica, y se encuentran en seis isoformas. Las investigaciones llevadas a cabo en esta enzima, sea en su forma activa, o forma inactiva (zimógeno) no están del todo claras (Tsai *et al.,* 1991). En los camarones la presencia de zimogenos de tripsina no es de mucha importancia, ya que en la composición de la tripsina encontramos aminoácidos más ácidos, como arginina y lisina (García-Carreño y Hernández, 1998) lo que reduce la posibilidad de una autocatálisis cuales necesitan más residuos de aminoácidos básicos.

La quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) ha sido aislada y estudiada en varios camarones peneidos (Galgani, 1988; Tsai *et al*., 1991; Van Worhmoudt *et al*., 1995; Fernandez *et al*., 1997; Lemos *et al*., 1999). Esta es una serina-proteasa que contiene 241 residuos de aminoácidos y tiene 3 grupos catalíticos que son serina (195), ácido aspártico (102) e histidina (57). Estos grupos reactivos más ciertos grupos hidroboficos exógenos (que están en la superficie) sirven como residuos de fijación. Esta enzima hidroliza enlaces

peptídicos formados por el grupo carboxílico de un aminoácido aromático como fenilalanina, tirosina y/o triptófano (Ceccaldi, 1998).

La acción de la tripsina y quimotripsina dejan polipeptidos pequeños, cuyos aminoácidos en el extremo carboxilo representan cerca de la mitad de los aminoácidos esenciales. Las carbohidrasas también presentes en el sistema digestivo de los decápodos y últimamente estudiadas son la maltasa, sacarosa, celulasa y la amilasa las cuales son las encargadas son encargadas de hidrolizar los glúcidos (Suarez, 1999).

La α-amilasa (E.C. 3.2.1.1) representa el 1% de la proteína soluble siendo la más importante glucosidasa del *P. vannamei* (Van Hourmhoudt *et al*.,1996). En el crawfish *procambarus clarkii* se ha encontrado actividad de la enzima endógena celulasa a pH de 4-5 por medio de cromatografía de intercambio iónico y filtración por gel (Xue *et al*., 1999). Asimismo se ha encontrado una α-glucosidasa en el hepatopáncreas del *P. vannamei* (Le Chevalier y Van Hourmhoudt, 1998). Omondi y Stark, 1995 probando diferentes temperaturas y pH encontraron presencia de varias carbohidrasas como la β-glucosidasa y una laminarasa en el *P. indicus* y *P. vannamei*.

La hidrólisis de los lípidos esta asegurada por las lipasas (E.C. 3.1.1.3) y esterasas. Los lípidos deben pasar por dos etapas previas para ser absorbidos, una emulsificación y una hidrólisis. La lipasa actúa sobre los lípidos emulsionados y la esterasa continúan la digestión enzimática sobre los productos hidrosolubles obtenidos.

1.3.3.1 Factores que afectan la actividad enzimática

La expresión de las enzimas digestivas esta rodeada de un serie de factores limitantes como son: parámetros físico-químicos del agua (pH, oxígeno, salinidad y temperatura), edad y tamaño del camarón, estado fisiológico de la muda, ingredientes que conforman la dieta, nivel y fuente proteína, nivel y tipo de aglutinantes, aditivos para promover el crecimiento y por la cantidad y frecuencia de alimentación. En vista que son muchas las causas que afecta la expresión de las enzimas, es importante maximizar la digestión y absorción de los nutrientes en las dietas tomando en cuenta todos los factores antes mencionados para aprovechar al máximo la capacidad de las enzimas digestivas.

Es así que se han llevado a cabo estudios para evaluar como afecta el tipo y nivel de proteína dietetica a las enzimas en diferentes peneidos (Kumlu *et al*., 1992; Le Vay *et al*., 1993; Rodriguez *et al*., 1994; Le Moullac *et al*., 1994; Kumlu y Jones, 1995; Van Wormhoudt *et al*., 1995; Hernadez-Cortez *et al*., 1998).

Los inhibidores presentes en la harina de soya, el cual es un ingrediente común en las dietas tanto de peces como de crustáceos (García-Carreño, 1996), son mayormente excluidos del balanceado por el proceso de calentamiento al que es sometido las materias primas, pero siempre quedan niveles insignificantes de inhibidores en la dieta. Estos inhibidores, atacan principalmente a las proteinasas digestivas como son la tripsina y quimotripsina, reduciendo la disponibilidad de los aminoácidos en la dieta.

Las enzimas es afectada también por la etapa de desarrollo del camarón. Lovett y Felder (1990), en estudios con postlarvas de *Penaeus setiferus* encontraron que la actividad específica de la amilasa presentarón niveles bajos desde nauplio 5 a mysis 2 incrementandose en los últimos estadios larvales. Estos resultados estan cercanos a los obtenidos por (Sugai *et al*., 1998a), para el *Penaeus paulensis*, ya que ellos observaron que la actividad de la maltosa y amilasa se incrementaba en PL60 y juveniles, más no en los estadios temprano de desarrollo.

Pero a diferencia de estas especies de peneidos se encuentran otras como *P. japonicus* y *P. monodon* en los cuales la actividad específica tanto de amilasa y maltosa no presentaba variaciones importantes en los estadios de postlarva (Chuang *et al*., 1985; Fang y Lee, 1992; Rodriguez *et al*.,1994) quizás reflejando sus hábitos alimenticios, los cuales son más carnívoros que herbívoros.

En el *Penaeus indicus* la actividad de tripsina fue menor en las primeras semanas de postlarva comparado con a actividad aminolitica y la relación amilasa:proteasa (Ribeiro y Jones, 2000). En la misma especie de camarón se llevaron a cabo investigaciones en postlarva, juveniles y adultos los cuales fueron alimentados a diferentes porcentajes de biomasa. Los resultados presentarón niveles bajos de actividad de tripsica en los juveniles, pero se incrementaba en adultos (Sidhar *et al*., 1995). Varias investigaciones se han realizado en vista de esclarecer el comportamiento de las enzimas digestivas en los camarones especialmente de la tripsina, que como mencionamos anteriormente es la más importante.

Lemos *et al*., (2000) en investigaciones con postlarva de *P. schmitti* observó una ausencia casi total de actividad de tripsina en huevos hasta nauplios, empezando a subir en zoea I, alcanzando el máximo en Zoea III, para disminuir desde Mysis I y mantenerse en niveles bajos en las primeras semanas postlarvales. Similares resultados se obtuvieron en el en *P. japonicus* (Galgani y Benyamin, 1985; Le Vay *et al*., 1993; Rodriguez *et al*., 1994), *P. monodon* (Kumlu y Jones, 1992) y en *P. indicus* (Kumlu y Jones, 1995).

Los resultados de actividad específica para la tripsina obtenidos en las diferentes especies de camarones no difieren mucho. Más se ésta buscando estandarización de los resultados en cuanto a las unidades en que son expresadas la actividad específica de las enzimas (UI/mg proteína) para de esta manera tener un patrón común de referencia y hacer menos difícil las comparaciones entre especies.

Otro de los factores mencionados anteriormente y que influyen en la concentración de las enzimas es la frecuencia alimenticia. En 1998b Sugai y colaboradores, encontraron una mayor actividad de amilasas y maltasas en dos horas de día (04h00 y 18h00) en juveniles *P. paulensis*. Y basándose en estos resultados sugiere usar frecuencias de alimentación cercanas a estos picos para tener un máximo aprovechamiento del alimento. En *P. vannamei* Hernandez-Cortez *et al.* (1998) encontraron que la presencia de tripsina y proteasas disminuían antes y después de las 18h00, justo antes que la ingestión de alimento se incremente.

La expresión de las enzimas también depende del tipo de alimento vivo (algas, artemias, rotíferos etc) o artificial (balanceado. En *P. vannamei* una mayor actividad de tripsina fue observada en las larvas (zoea I y III) alimentados solo con dietas comerciales comparadas con las alimentadas con algas y una combinación de dietas artificiales y algas (Puello-Cruz *et al*., 1996). Lo contrario fue presentado por Le Moullac y colaboradores en 1994 con la misma especie, cuando alimentaron postlarva con algas, artemia y dieta comercial, ellos obtuvieron una alta actividad de tripsina en las larvas alimentadas con algas, con un máximo en zoea III, mientras que la actividad de la amilasa disminuía con la dieta comercial desde zoea I a zoea III.

De igual manera se ha reportado varios trabajos en crustáceos donde se observa que la síntesis y secreción de enzimas varía de acuerdo a los estadios de muda. Por ejemplo, en la jaiba *Callinectes arcuatus*, se determinaron la actividad de amilasa, lipasa, proteasas y quitinasa. El ciclo de muda afectó la actividad enzimática de las enzimas mencionadas, especialmente de las proteasas y quitinasa ya que no se registro lecturas en la fase de muda, ocurriendo lo contrario con la actividad de lipasas y amilasas que si fuerón detectadas (Vega-Villasante *et al.,* 1999).

Así también, existen evidencias que el camarón es afectado por el proceso fisiólogico de la muda, Fernandez *et al*., en 1998 encontró que la actividad de las enzimas tales como amilasa, proteasa, carbopeptidasas y otras es mayor en la fase de intermuda en el *P. notialis*. En el *P. vannamei*, se han hecho varios estudios sobre como la actividad de las enzimas varía con la muda (Chan *et al*., 1988; Van Hourmhoud *et al*., 1995; Klein

et al., 1996; Le Boulay *et al*., 1996). De igual manera en otros peneidos como *Penaeus japonicus* y *P. monodon* (Galgani, 1985; Kuo *et al*., 1995; Kuo y Lin., 1996).

1.3.6. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ENZIMAS

La detección y caracterización de las enzimas se ha abordado de diferentes formas. En muy pocos casos, estos estudios se han realizado mediante la purificación de enzimas (Galgani *et al*., 1985; Tsai *et al*., 1991). En la mayoría, solo se ha detectado la presencia de las enzimas en extracto crudos utilizando sustratos sintéticos e inhibidores específicos para cada una de las enzimas.

La síntesis y producción de enzimas ha sido estudiada en los camarones peneidos mediante técnicas bioquímicas como:

Cromatografía de intercambio iónico

Espectrofotómetria

Electróforesis

Electroforesis de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Filtración en gel

Inmunoelectroforesis

Radioinmuniensayo (RIA)

Los métodos espectrofotométricos son los más utilizados por ser sencillos y exactos. Sin embargo hay una exigencia la cual deben cumplir, es que o bien el sustrato o bien el

producto de la reacción deben absorber la luz en una región del espectro en la que otros sustratos o productos no lo hagan. Una de las caracteristícas de los compuestos químicos más estudiados es el desarrollo de color que bajo determinadas condiciones pueden producir. La intensidad de color es la base de los procedimientos bioquímicos (Cooper, 1977, Mathew y Van Holder, 1998).

Las medidas espectofotométricas de concentración proteíca y enzimas utilizan un espectofotómetro, donde se coloca una cubeta de grosor , la cual contiene la solución problema de la cual se quiere conocer su concentración. Esta solución es sometida a un haz de luz de la región UV o visible. La intensidad del haz emergente disminuirá hasta un valor de I porque la solución absorbe parte de la radiación. La absorbancia a la longitud de onda ⇔ se define como A⇔ = log(Io/I) y esta relacionada con y la concentración *c* por la ley de Beer:

$$A\Leftrightarrow = \prod\Leftrightarrow /C$$

donde ∏⇔ es el coeficiente de extinción a una longitud de onda ⇔ para la sustancia de estudio. Las unidades en que se expresará las concentraciones dependerá del sistema que se este empleando. Si la concentración de proteína se mide en mg/cm^3 y I en cm, entonces ∏⇔ debe tener las dimensiones de cm^2/mg, dado que A es una magnitud sin unidades. En cambio cuando las concentraciones se expresan en molaridad (M), las unidades de ∏ pasan a ser M^{-1} cm^{-1}.

Una vez determinado el coeficiente de extinción de una proteína concreta (por ejemplo, midiendo la absorbancia, de una solución que contenga un peso conocido de la proteína) la concentración de cualquier otra solución de esa proteína puede calcularse a partir de una simple medida de absorbancia, utilizando la ecuación antes mencionada (Van Holde, 1998). Entre los tipos de ensayos espectrofotométricos tenemos los del método del punto final y métodos cinéticos.

1.3.6.1. Método del punto final

Este tipo de ensayos producen resultados precisos y exactos, ya que no son afectados por cambios como la temperatura, tiempo de medición etc. Una de las características importantes en ésta técnica es que el color producido debe ser estable por un periodo que permita el desarrollo de la reacción y la lectura en el equipo fotométrico (Harris, 1987).

1.3.6.2. Método cinético

Poco común debido a su baja precisión, la temperatura y periodo de incubación. La inclusión de partículas de interferencias en la muestra deben ser controlado. Esta técnica es usado cuando se pueden obtener una alta sensibilidad en los análisis a realizarse. Además este método con algunas modificaciones logran resultados más precisos, cual es caso con los métodos bioluminicentes. (Harris, 1987).

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. CICLO DE MUDA

2.1.1. Diseño experimental

Camarones juveniles *Penaeus vannamei* con peso promedio de 3,15±0,32 g, fueron obtenidos de los tanques de cultivo del CENAIM y colocados en (12), acuarios ubicando un camarón por acuario en las primeros seis acuarios. En los restantes seis se coloco 5 camarones por acuario en determidado estadio de muda. Este diseño experimental es el mismo para tasa de ingestión.

La observación del estadio de muda en el camarón se lo realizó en los urópodos, los cuales se dividen en endópoditos y exópoditos. La identificación de los estadios de muda se lo realizó de acuerdo a lo descrito por Smith y Dall (1985) y Chan *et al*. (1988) para *Penaeus esculentus* y *P. vannamei* respectivamente.

Durante un mes (aproximadamente 3 ciclos de muda) se hizo la revisión de los endópoditos, colocando al camarón en una caja petri con cantidad suficiente de agua de mar para cubrir los urópodos y facilitar la visibilidad a través del estereomicroscopio con aumento de 40X y de esta manera determinar el estadio de muda en menos de dos minutos por camarón.

2.2. **TASA DE INGESTIÓN**

Camarones juveniles provenientes de la camaronera OPUMARSA de la zona de Palmar (Península de Santa Elena, Guayas) fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio y del alimento por una semana. Juveniles con peso promedio de 2,69±0,30 g, n=30 fueron alimentados al equivalente del 10% de su biomasa con una dieta de 40% de proteína repartidas en dosis iguales a las 08h00 y 15h00. Durante el ensayo el fotoperíodo luz:oscuridad fue 11h:13h (08h00 19h00) y el agua de los acuarios recambiada continuamente a una tasa de 1200% diario. Los parámetros físicos del agua como temperatura y oxígeno disuelto fueron medidos semanalmente usando un oxigenómetro YSI 52 RS232®, pH con un pH meter 320 WTW® y la salinidad con refractómetro.

El alimento no consumido, después de 2 horas de haber sido suministrado, fue sifoneado sobre una malla previamente pesada. El alimento sobrante lavado primero con agua dulce y luego con agua destilada fue secado en una estufa ISUZU 2-2040 (Isuzu Seishakusho Co Ltda) por un período de 24 horas a 60˚C y pesado para determinar el porcentaje de alimento ingestado en base a la biomasa de cada acuario.

Adicionalmente un blanco (acuario sin camarón, solo pellet) fue realizado con el fin de determinar un factor de corrección por périda de alimento, movimiento de agua, aireación, sifoneo y lavado de los sobrantes. El mismo fue realizado en 6 acuarios que representaba cada uno el tiempo de permanencia (30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos) del pellet en contacto con el agua. Este procedimiento se lo realizó por tres ocasiones

secuencialmente. La tasa de ingestión se realizó durante 3 ciclos de muda utilizando 6 acuarios como unidades experimentales (réplicas) y fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de ingestión} = \frac{(\text{Alimento suministrado - Alimento no consumido) x (B)}}{\text{Biomasa del acuario}} \text{ x } 100$$

$$\text{Blanco} = \frac{\text{Alimento suministrado}}{\text{Alimento recuperado}}$$

2.3. ELABORACIÓN DE LA DIETA

La dieta fue elaborada en la planta piloto del CENAIM. Los ingredientes previamente pulverizados hasta un tamaño uniforme de partícula de 300 μm, fueron pesados cuidadosamente por separado de acuerdo a lo formulado en la (Tabla 3).

Tabla 3.- Ingredientes de la dieta experimental

Ingredientes	Porcentajes %
Harina de camarón	26.77
Harina de pescado	15.00
Harina de calamar	5.00
Pasta de soya	17.99
Polvillo de arroz	5.00
Gluten de trigo	5.00
Aceite de hígado de Bacalo	5.20
Aceite de soya	0.53
Lecitina líquida	1.00
Colesterol	0.50
Mezcla de Vitaminas	3.00
Mezcla de Minerales	2.00
Aglutinantes	0.08
Antioxidante	0.01
Antihongo	0.07
Almidón de maíz	12.85
Total	100.00

Las materias primas se mezclaron de manera conjunta, en primer lugar las de menor porcentaje de inclusión, adicionando progresivamente los ingredientes de mayor cantidad con la finalidad de conseguir una óptima homogenización al final del proceso de mezclado. El conjunto de ingredientes junto a una cantidad conocida de agua adicionada (45%) fueron mezclados a 300 rpm por 10 minutos en una mezcladora Kokusan hasta obtener una masa densa. Esta masa fue llevada a un molino de carne Oster® y pasada dos veces para permitir una mejor aglutinación de los ingredientes. Los pellets en formas de tallarines de 3 mm de diámetro y 10-15 cm de longitud fueron llevados a un horno con ventilador vertical NAKAYASU para ser secados a 60 °C durante 2 horas. Una vez secado y enfriado fue quebrado en trozos manualmente para darle la longitud apropiada y mantenerlo a 8 °C hasta su uso.

2.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS POR ESTADIO DE MUDA

Al final del experimento de tasa de ingestión (2.2) diez camarones por estadio de muda fueron disectados para extraer sus hepatopáncreas y almacenarlos en un congelador a -80 °C (Yamato CF-11) hasta la realización de los análisis. Antes de realizar éste experimento se aclimataron a los camarones al sistema de alimentación por 2 semanas. Quince horas previo al muestreo, el alimento no consumido y las heces fueron sifoneados. El muestreo se llevo a cabo entre las 09h00-11h00, para evitar cualquier efecto del ritmo circadiano en la actividad de las enzimas digestivas y nutrientes a analizar (Cuzon *et al*., 1982; Le Moullac *et al*., 1997).

La Tabla 4, resume los análisis realizados para la determinación de la actividad enzimática y nutrientes en el hepatopáncreas del camarón *P. vannamei*. Los resultados de las determinaciones enzimáticas estan expresados en actividad específica (cantidad de producto liberado/minuto/mg de proteína), la que se obtiene dividiendo la actividad enzimática total por la concentración de proteína (mg/ml) presente en el hepatopáncreas.

Tabla 4. Características de las metodologías empleadas en los análisis de las enzimas y nutrientes a temperatura de 25 °C. Dubbois *et al*., 1956 (1); Bradford, 1956 (2); Rick y Stegbauer, 1974 (3); Versaw *et al.,* 1989 (4) Garcia-Carreño y Haard, 1993 (5)

Enzima (Autor)	Substrato	Tampón y pH	Actividad específica	Longuitud de onda (nm)
Glicógeno (1)	Glucosa 0,01%		µg de glucosa/ml	485
Proteína (2)	Dye Reagent (1:4)		mg de proteína / g hepatopáncreas	595
Amilasa (3)	Almidón soluble, 1%	Fosfato de Sodio, pH 6,9	(mg maltosa/min/mg proteína	550
Lipasa (4)	β-Naftil caprilato 200 nM,	Tris-ClH 50 mM , pH 7,2	µM ácidos grasos /min/mg de proteína	540
Proteasas (5)	Azocaseina 2%	Tris-ClH 50 mM , pH 7,2	µM tyrosina/min/mg de proteína	440

Los camarones y hepatopáncreas respectivos se pesaron para estimar el índice hepatosomático (IHS).

$$\text{Indice hepatosomático} = \frac{\text{Peso del hepatopancreas}}{\text{Peso del camarón}} \text{ x } 100$$

2.4.1. **Preparación del suero enzimático**

Un micro homogenizador de téjido (Wheaton®) fue utilizado para macerar el hepatopáncreas en 0,5 ml de agua desionizada y enrasado hasta 1,5 ml con la misma calidad de agua. Tubos de microensayos (eppendorf®) fueron usados para mantener el hepatopáncreas homogenizado y sumergido en hielo picado hasta su inmediata centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos a 4 ºC en una centrífuga (Kokusan® 2000B). Alícuotas individuales del sobrenadante por cada análisis a realizar fueron transferidos a diferentes tubos y congeladas -80 ºC. El día anterior al análisis las muestras fueron transferidas a un congelador de –20 ºC por 24 horas y posteriormente mantenidos en el congelador de refrigeradora a 0 ºC.

2.4.2. **Análisis de nutrientes**

2.4.2.1. Determinación de proteína soluble

Procedimiento

- Preparar el reactivo de coloración por dilución de un volumen del reactivo de coloración concentrado (Cat. No. 500-0006 Bio Rad Laboratories Gmblt) con 4 volumenes de agua desionizada. Esta solución es filtrada a través de papel Whatman # 1 y almacenada a 8 ºC.

- Preparar la curva de calibración (50-150 µg/ml) diluyendo en 5 tubos de ensayo (13x100 mm) 100, 200, 400, 600 y 800 µl de solución Albúmina Bovina Sérica (Cat. No. 12018.0025 MercK) al 0,2 mg/ml hasta 2000 µl con agua desionizada y filtrada por 0,22 µm.
    - Pipetear 100 µl de cada una de estas soluciones, 100 µl de agua desionizada (blanco) y 100 µl del extracto crudo en tubos de ensayo (16x125 mm) limpios.
    - Adicionar 5ml de Dye reagent diluído a cada tubo.
    - Después de incubar a temperatura ambiente por 5 minutos leer la absorvancia en espectofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.
    - Las lecturas no deben hacerse pasado los 60 minutos, ya que la absorvancia incrementa con el tiempo.

2.4.2.2. <u>Determinación del glicógeno</u>

Curva de calibración (5-30 µg/ml)

- Disolver 0,01 g de glucosa en 20 ml de ATC (Acido tricloroacético, No. cat. 100.807.0250, MercK) al 20%, (solución madre).
- Tomar 2000 µl de la solución madre y diluir a 10 ml con ATC al 20%, obteniéndose una concentración de 100 µg/ml (solución de trabajo).
- Transferir 100, 200, 400, 600 y 800 µl de solución de trabajo (100 µg/ml) a tubos de ensayo (16x125 mm) y llevar hasta 2000 µl con agua desionizada y filtrada por 0,22 µm.
- El blanco se prepara solo con 2000 µl de agua desionizada y filtrada.

- Añadir a todos los tubos 500 µl de fenol (No. cat. 3351-7, Riedel-De Haën) al 80% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (No. Cat. UN 1830, Mallinckrodt). Agitar inmediatamente.
    - Transcurridos 30 minutos leer en el espectrofotómetro a 485 nm.

Muestra

- En tubos plásticos de centrífuga de 10 ml, adicionar 100 µl de suero enzimático a 2000 µl de ATC al 20% y agitar.
- El precipitado formado se descarta por centrifugación a 3000 rpm por 20 minutos y el sobrenadante se transfiere a otro tubo de centrífuga con 2000 µl de éter de petróleo (No. cat. E1010, Espectrum)
- Después de centrifugar a 3000 rpm por 20 minutos descartar la fase superior que contiene éter y ATC cuidadosamente con ayuda de una micropipeta pasteur.
- Pipetear 500 µl de la fase inferior hacia a un tubo de ensayo (16x125 mm).
- Adicionar a todos los tubos de ensayo 1500 µl de agua desionizada, 500 µl de fenol al 80% y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Seguidamente agitar.
- Transcurridos 30 minutos medir la absorvancia en un espectrofotómetro a 485 nm.

2.4.3. **Actividad enzimática**

2.4.3.1. **Determinación de amilasa**

Curva de calibración (190-950 µg/ml)

- Medir 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de la solución estándar de 100 mg maltosa/ml (No cat. 25048-30, Kanto Chemical) y diluir hasta un volumen final de 1050 µl con agua desionizada en tubos de ensayo (16x125 mm).
- El blanco para la curva de calibración se prepara con 1050 µl de la misma agua.
- Adicionar a todos los tubos 1000 µl de solución al 1% de almidón (No. cat. 191-03985, Wako Pure Chemical) y 2000 µl de ácido dinitrosalisílico al 1% (Anexo 1)(No. cat. 10415-30, Kanto Chemical). Después de la adición de cada solución homogenizar en un agitador de tubo vertical (MS1 Minishaker IKA®).
- Colocar los tubos en Baño María a 100 °C por 5 minutos.
- Enfriar y leer entre 20-60 minutos en espectrofotómetro a 550 nm.

Muestra

- Adicionar 50 µl de solución muestra y 1000 µl de solución de almidón a tubos de ensayos (16x125 mm) con un 1000 µl de solución tampón fosfato de sodio a pH 6,9 (Anexo 1).
- Un blanco es preparado con 1050 µl de solución tampón y 1000 µl de almidón al 1%.
- Se incuba en agua a 25 °C por 10 minutos exactamente.
- Transcurrido este tiempo adicionar a los tubos de ensayo 2000 µl de ácido dinitrosalisílico al 1%, agitar y poner los tubos en un Baño María a 100 °C por 5 minutos.
- Finalmente enfriar y leer entre 20-60 minutos en espectrofotómetro a 550 nm.

La fórmula para realizar los cálculos de la actividad enzimática, preparación del ácido dinitrosalisílico y de los tampones se presentan en el Anexo 1.

2.4.3.2. Determinación de proteasas

Blanco

- Colocar 240 µl del tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,2 (No. cat. T-1378, Sigma) (Anexo 1) en tubos plásticos de centrífuga limpios y secos.
- Dejar reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 500 µl de azocaseína (No. cat. A 2765, Sigma) al 2% disuelto en solución tampón Tris-ClH y agitar.
- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Seguidamente se agrega 500 µl de ATC al 20%.
- Añadir 10 µl de suero enzimático, agitar.
- Centrifugar por 5 minutos a 10000 rpm.
- Finalmente leer en espectrofotómetro a 440 nm.

Muestra

- Pipetear 240 µl de la solución tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,2 en tubos plásticos de centrífuga limpios y secos.
- Añadir 10 µl de suero enzimático, agitar.
- Dejar reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 500 µl de azocaseína 2% disuelta en solución tampón.

- Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Seguidamente se agrega 500 µl de ATC al 20%.
- Centrifugación por 5 minutos a 10000 rpm.
- Finalmente leer en espectrofotómetro a 440 nm.

2.4.3.3. <u>Determinación de lipasa</u>

Blanco

- Agregar 100 µl de taurocolato de sodio 100 mM (No. cat. T-0750, Sigma) en tubos de ensayos (16x125 mm) limpios y secos.
- Colocar 1900 µl de Tris-HCl (50 mM, pH 7,2), agitar.
- Preincubar, 5 minutos a temperatura ambiente
- Añadir 20 µl β-Naftil caprilato 100 mM (No. cat. N-4875, Sigma).
- Incubar, 30 minutos temperatura ambiente
- Adicionar 20 µl de Fast Blue 200 mM (No. cat. F-3378, Sigma).
- Incubar por 5 minutos temperatura ambiente
- Agregar 20 µl de ATC 0,72 N, 10 µl de extracto enzimático, 2,71 ml de etanol:acetato de etilo (1:1 v/v) (No. cat. 1096231000, MercK).
- Homogenizar en un agitador de tubo vertical (MS1 Minishaker IKA®) y leer la absorbancia a 540 nm.

Muestra

- Colocar 100 µl del taurocolato de sodio 100 mM en tubos de ensayos (16x125 mm) limpios y secos.
- Agregar 1900 µl de solución tampón Tris-ClH 50 mM a pH de 7,2.
- Añadir 10 µl del concentrado enzimático.
- Preincubar por cinco minutos a temperatura ambiente
- Añadir 20 µl β-Naftil caprilato 200 mM
- Incubar, 30 minutos temperatura ambiente
- Agregar 20 µl de Fast Blue 100 mM.
- Incubar, 5 minutos temperatura ambiente
- Agregar 200 µl de ATC 0,72 N, 2,71 ml de etanol:acetato de etilo (1:1 v/v), homogenizar en un agitador de tubo vertical (MS1 Minishaker IKA®) y medir la absorbancia a 540 nm.

Para realizar los cálculos de actividad enzimática de lipasa se consideró que una unidad de actividad es igual a 0,001 unidades de absorvancia.

2.5. ENSAYO DE CRECIMIENTO

Larvas de maduración en PL 13 provenientes del laboratorio "GC y F MARINO" ubicado en Mar Bravo (Península de Santa Elena, Guayas) fueron mantenidas por un mes en tanques de 10 toneladas con la finalidad de criarlos hasta obtener animales de 1 g aproximadamente.

Camarones con peso promedio de 1,58±0,17 g, fueron colocados en un número de ocho por acuarios (60x30x36 cm) de 50 litros. Tres métodos para estimar la ración de alimento fueron evaluados usando 8 acuarios (réplicas) por método (tratamiento). Los tratamientos A y B fueron alimentados, usando una tabla de alimentación comercial (Anexo 2) y al 6% de la biomasa respectivamente. Este último tratamiento fue escogido como una alternativa intermedia entre los tratamientos A y C y fue obtenido al promediar las tasa de ingestión de cada uno de los estadios de muda (literal 3.2) más el 1,5% producto de la pérdida de alimento reportada en el blanco.

En el tratamiento C los camarones se alimentaron en base a la regresión lineal obtenida del ensayo de tasa de ingestión (ver literal 3.2). El porcentaje de alimento suministrado a cada acuario fue calculado asumiendo y reeplazando en la ecuación el valor de X correspondiente a cada estadio (A=1, B=2, C=3, Do=4, D1=5, D2=6 y D3=7).

$$Y = ax^3 + bx^2 + mx$$

Una vez conocido el porcentaje de alimento en base a la biomasa correspondiente a cada estadio de muda, tenemos que calcular la cantidad de alimento a suministrar por acuario, para lo cual realizamos el siguiente cálculo:

$$\sum_{A\text{-}D3} = \left(\frac{Y_E}{100} \text{ x } NC_E \right) \text{x PP}$$

Donde:

Y = porcentaje de la biomasa correspondiente a cada estadio

NC = número de camarones en determinado estadio de muda

PP = peso promedio de la población presente en el acuario

E = estadio de muda

Los juveniles fueron alimentados a las 08h00 y 16h00 con una dieta al 40% de proteína. Diariamente, antes de proceder a alimentar, el fondo de los acuarios fue sifoneado con la finalidad de eliminar desechos, heces, mudas y organismos muertos.

Los camarones se pesaron cada semana con una balanza de 0,01 g de precisión, para ajustar la ración de alimento a suministrar. En el tratamiento C cada dos días el 50% de la población y durante el día del pesaje a todos los animales se identificaba los estadios de muda de cada acuario. La tasa de recambio de agua fue 1200% diario, y el agua de mar fue previamente filtrada por arena y filtro de piola y tratada con UV.

El fotoperíodo fue 12h luz y 12h oscuridad (07h00-19h00). Los parámetros físicos del agua como temperatura y oxígeno disuelto fueron medidos semanalmente usando un oxigenómetro YSI 52 RS232®, pH con un pH meter 320 WTW® y la salinidad con refractómetro. Además el último día se tomó muestra del agua de los acuarios para realizar análisis de fósforo, amonio, nitrito y nitrato.

El factor de conversión alimenticia fue calculado de acuerdo a la formula de Brand y Colvin (1979).

$$\text{F.C.A} = \frac{\text{Alimento sumistrado en materia seca}}{\text{Bf} + 1/2\,(\text{Bo} + \text{Bf})\ \text{x \# camarón muertos}}$$

Donde:

Bo: Biomasa inicial

Bf: Biomasa final

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prueba de Anderson-Darling fue realizada para establecer la normalidad de los datos y la prueba de Bartle para homogeneidad de varianza. Los resultados obtenidos fueron evaluados por análisis de varianza (ANOVA). Los datos expresados como porcentaje fueron transformados por arcoseno previo ANOVA. Una vez que se verificaron diferencias significativas ($p<0,05$) los datos fueron analizados por la prueba de mínima diferencia significativa (Least Significant Difference, LSD) para determinar cual tratamiento fue diferente de otro. El análisis de los datos fue realizado usando el programa estadístico Data Desk.

III. RESULTADOS

3.1 DURACIÓN DEL CICLO DE MUDA

Durante el período de estudio se pudo observar que el ciclo de muda en los juveniles *P. vannamei* con peso promedio de 2,69?0,30 g duró aproximadamente 11,03±1,13 días. En el cual la fase de premuda representó el 50%, intermuda 33,33% y la postmuda 18,66% de todo el proceso de muda (Tabla 5). Los parámetros físicos del agua temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad medidos semanalmente, tanto para ciclo de muda y tasa de ingestión fueron: 24±0,5°C (n=6), 8,36±0,02 (n=6), 5,08±0,53 ppm (n=6) 34±1µps (n=6) respectivamente.

Tabla 5. Duración del ciclo de muda en el juvenil *P. vannamei*. Valor promedio de 4 ciclos de muda (±error estándar)

	Estadios de Muda							
	A	B	C	Do	D1	D2	D3	E
Duración (días)	1	1	4±0,19	1±0,24	2±0,29	2±0,29	1	2-3 m

La figura 14 muestra un efecto de las fases lunares sobre el número de camarones mudados. En la fase de luna nueva aproximadamente el 80% de camarones mudan en los primeros 5 días contados desde el inicio del aguaje (marea alta cuya duración es de 8 días), mientras que en luna llena solo mudaron alrededor del 30% de la población en el mismo período de tiempo.

Durante los primeros 5 dias de quiebra (marea baja), en cuarto creciente un 30% de la población de camarones mudó, mientras que en cuarto menguante se incremento al 47% en el mismo lapso de tiempo (figura 14).

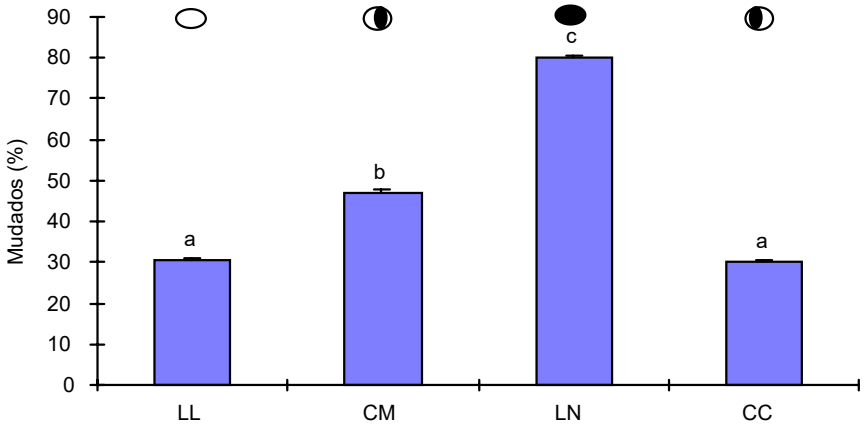

Figura 14. Camarones que mudan por fase de luna. Cuarto menguante (CM); Luna llena (LL); Cuarto creciente (CC); Luna nueva (LN). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$)

3.2. TASA DE INGESTIÓN

Los resultados de tasa de ingestión son expresados como porcentajes en relación a la biomasa de camarones y son el promedio obtenido de 3 ciclos de muda. Después de aplicar un ANOVA y encontrar diferencias estadísticas, la prueba de comparación de pares LSD (Least Significant Difference) mostró diferencias significativas ($p<0,05$) entre la fase de intermuda C, con todos los estadios de la fase de premuda D1, D2 y D3 a excepción del estadio Do (figura 15). Además el estadio C fue diferente ($p<0,05$) al estadio de postmuda temprana A más no para el estadio de postmuda tardía B.

La fase de premuda presento diferencias significativas ($p<0,05$) entre ellos. El estadio Do fue diferente con los sub-estadios de premuda D1, D2 y D3, así como también respecto al estadio de postmuda A. No se presentaron diferencias significativas entre Do, C y B. La figura 15 muestra desde premuda D1 hasta postmuda A, un período de

consumo de alimento inferior al 3% de la biomasa. Es a partir de postmuda tardía B que los camarones aumentan su ingestión de alimento alcanzando en intermuda (C) un consumo superior al 50% de lo observado durante premuda D1 a postmuda A.

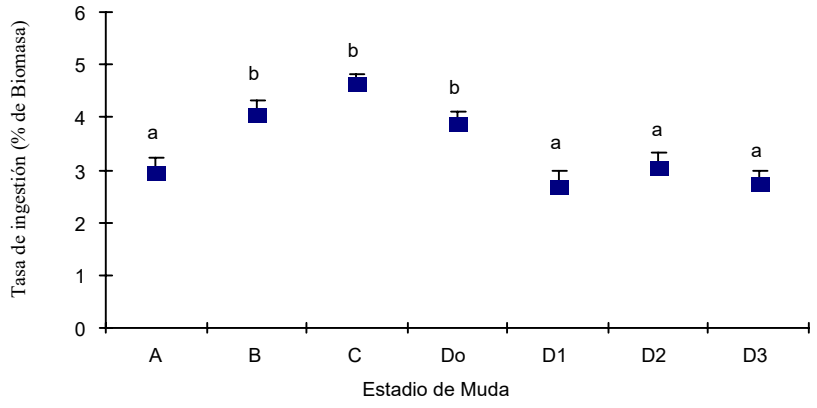

Figura 15. Tasa de ingestión del *P. vannamei* por estadio de muda después de un mes de alimentación. Las barras verticales indican el error estándar basado en 6 réplicas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$)

La figura 16 muestras el porcentaje de recuperación del alimento suministrado en los acuarios, por manipuleo del alimento. Se realizó tres pruebas donde se encontró un valor promedio de 1,5% de pérdida de alimento, éste valor fue usado en el ensayo de crecimiento.

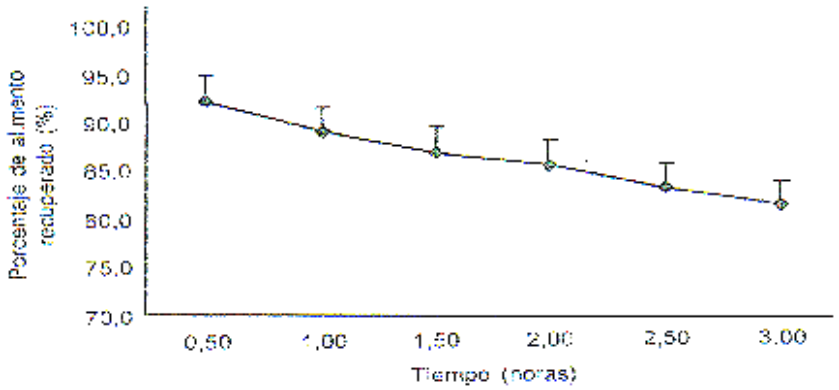

Figura 16. Porcentaje de alimento recuperado al realizar el blanco. Las barras verticales indican el error estándar basado en 3 réplicas.

3.3. INDICE HEPATOSOMÁTICO

Los resultados de índice hepatosamático por estadio de muda después de aplicar análisis de varianza mostró que existe diferencias significativas (p>0,05) entre el estadio de premuda tardía D2 e intermuda C, asimismo el estadio D2 presentó diferencias significativas con el estadio D3 (Figura 17).

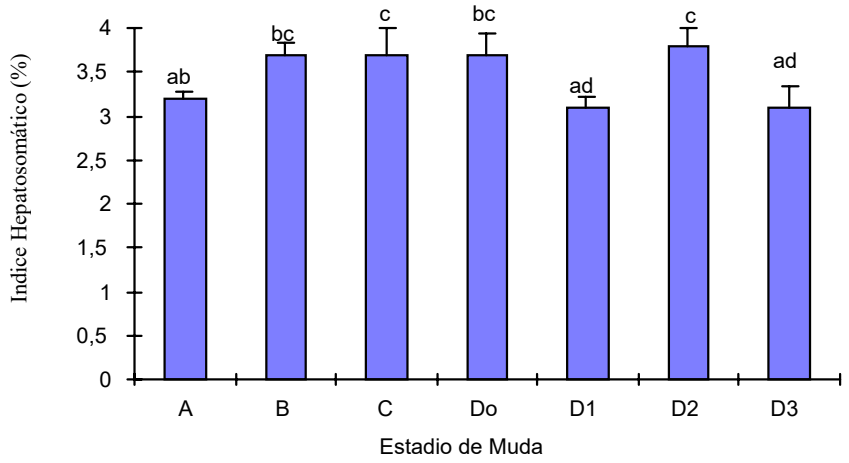

Figura 17. Índice hepatosomático por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar. Letras iguales no son diferentes estadísticamente (p<0,05).

3.4. ANÁLIS BIOQUÍMICOS POR ESTADIO DE MUDA

Los resultados obtenidos en los análisis de enzimas están expresados como actividad específica (U/mg de proteína). Después de aplicar ANOVA se encontró diferencias estadísticas (p<0,05), en la actividad de amilasa entre los estadios. El LSD mostró la mayor actividad de amilasa en los camarones en estadio Do el cual fue superior a D1, D3, A, B y C aunque no significativamente diferente (p>0,05) a D2. No hubo diferencias significativas entre la actividad de amilasa en el estadio D2 y los registrado en B y C pero si fue diferente con respecto a D3 y A.

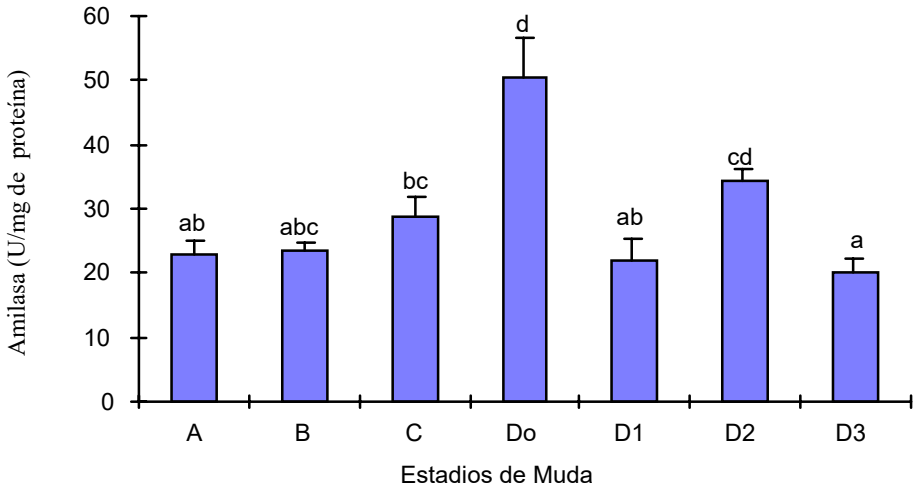

Figura 18. Actividad específica de amilasa por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (p<0,05).

La actividad específica de las proteasas figura 19 presentaron diferencias significativas (p<0,05) menor en los estadios A, D1 y D3 con los estadios B, C y Do. Además se observó que el estadio Do presentó junto al estadio B la mayor concentración de proteasas. Mientras que los demás estadios no mostraron ser diferentes estadísticamente (p<0,05) entre si.

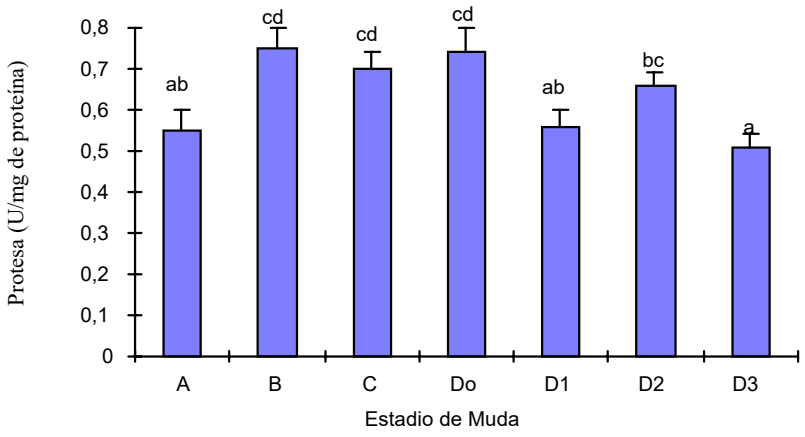

Figura 19. Actividad específica de proteasas por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (p<0,05).

La actividad específica de lipasa fue significativamente ($p<0,05$) menor en el estadio D3. La mayor actividad específica fue encontrada en el estadio Do siendo estadísticamente diferente ($p<0,05$) a los demás estadios a excepción de C y D2. La actividad de lipasa en los estadios D2, D1, A, B y C no mostraron ser diferentes estadísticamente ($p>0,05$) entre ellos.

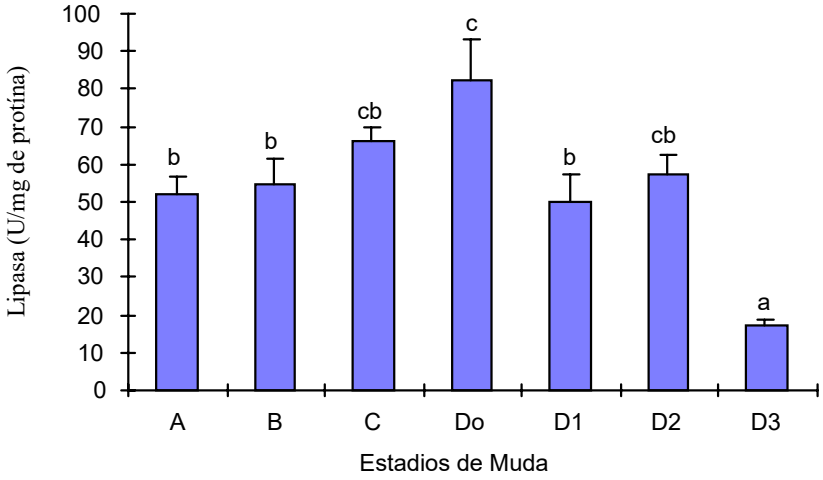

Figura 20. Actividad de lipasa por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($p<0,05$).

En lo referente a la concentración de proteína presente en el hepatopáncreas del camarón está mantenía los niveles casi iguales en todos los estadios. Al realizar ANOVA se encontró que no existía diferencias significativas entre los estadios.

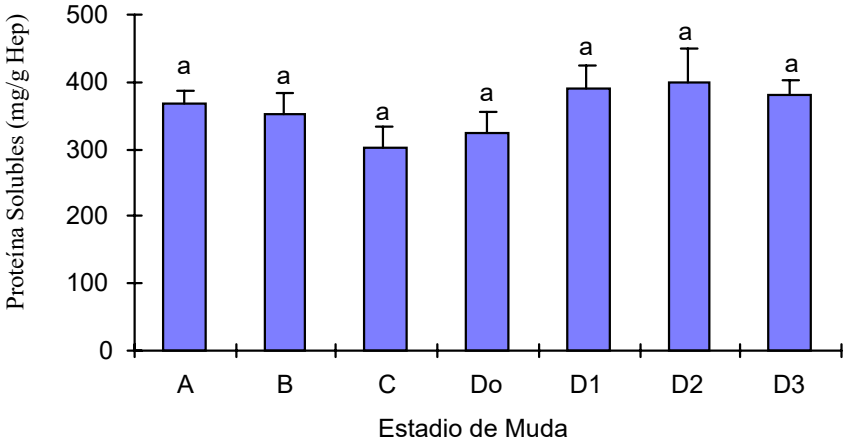

Figura 21. Concentraciones de proteína por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (p<0,05).

En lo que respecta a la concentración de glicógeno en el hepatopácreas del camarón, se encontró que existe una mayor cantidad de este nutriente en los estadios de premuda D1 y D3 los cuales fueron estadísticamente (p<0,05) diferentes al estadio de fase de postmuda B. Además se encontró que, entre los estadios A y B si existen deiferencias significativas (figura 22).

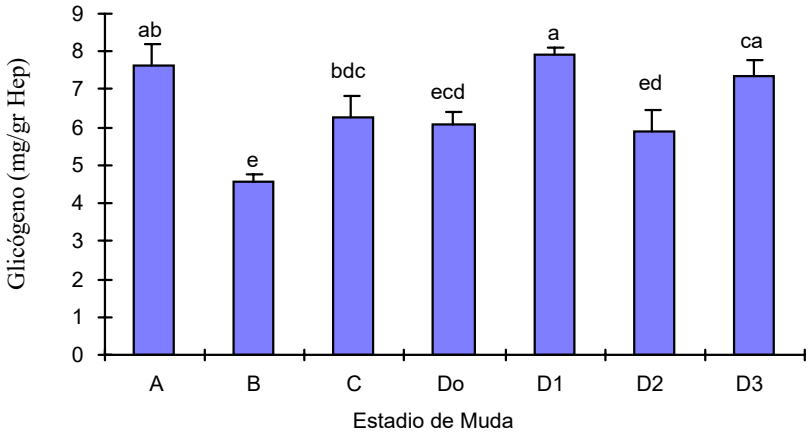

Figura 22. Concentración de glicógeno por estadio de muda. Las barras verticales indican el error estándar (n=10). Letras iguales no son diferentes estadísticamente (p<0,05).

3.5. ENSAYO DE CRECIMIENTO

Los resultados de peso ganado de los camarones fueron evaluados por medio de análisis de varianza a un nivel de significancia de 0,05. Después de 60 días de cultivo el análisis no reportó diferencias estadísticas ($p<0,05$) entre las biomasas ganadas y crecimientos específicos de los camarones alimentados con las 3 raciones alimenticias (Tabla 6). En tanto que si se observó una diferencia significativa ($p<0,05$) entre los pesos promedios al aplicar un ANOVA.

Mediante la prueba de LSD se pudo determinar que los camarones alimentados en base a la tabla de alimentación crecieron 0,78 g significativamente ($p<0,05$) más que los otros dos tratamientos. No se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos B y C (Tabla 6).

Tabla 6. Valores promedio (±error estándar) obtenidos después de 8 semanas de alimentación a juveniles *P. vannamei*.

Determinaciones	Tratamiento A	Tratamiento B	Tratamiento C
Peso corporal inicial (g)	1,56±0,01	1,56±0,02	1,63±0,03
Peso corporal final (g)	5,75±0,25a	4,97±0,26b	4,97±0,18b
Incremento semanal (g)	0,53±0,06	0,43±0,07	0,42±0,06
Biomasa inicial (g)	12,48±0,24	12,46±0,13	13,08±0,11
Biomasa final (g)	34,06±2,00a	32,14±2,31a	32,98±1,62a
Supervivencia (%)	75±5,27a	81,25±5,27a	82,81±2,29a
Total alimento suministrado (g)	112,15±0,44a	76,97±0,37ba	77,66±0,37ba
Intensidad de luz (Lux)	114,38±20,95a	128,13±16,45a	123,13±29,12a
Total de proteína suministrada (g)	41,16±0,025a	30,74±0,23a	30,89±0,16a
Eficiencia proteínica (E.P)	0,82±0,02a	1,21 ±0,01b	1,66±0,04c
Tasa de crecimiento específico (%)	1,77±0,10a	1,66±0,14a	1,64±0,07a

Letras iguales en una misma fila no son diferentes estadísticamente ($p<0,05$).

Tratamiento A= Alimentación en base a la tabla presentada por (Akiyama y Chuang, 1989).
Tratamiento B= Alimentación en base al 6% de la biomasa.
Tratamiento C= Alimentación en función de la regresión lineal y estadio de muda.

3.5.1. **Conversión alimenticia**

Al final de experimento de alimentación mediante un análisis de varianza se observó un efecto significativo ($p<0,05$) sobre el factor de conversión alimenticia (figura 22). Después de aplicar la prueba de LSD se pudo determinar que el grupo de camarones alimentados en función del estadio de muda presentaron un FCA significativamente menor ($p<0,05$) a los otros dos grupos de camarones alimentados siguiendo el régimen de la tabla de alimentación y al 6% de la biomasa. No se encontró diferencias estadísticas ($p>0,05$) entre estos dos últimos tratamientos (A y B).

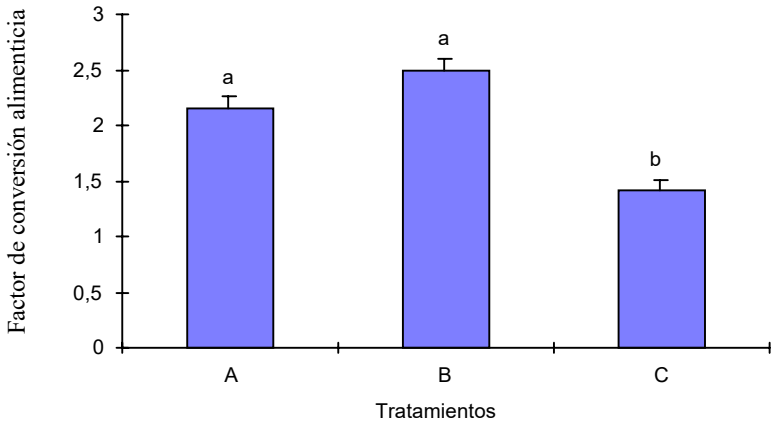

Figura 23. Factor de conversión alimenticia para cada tratamiento obtenido al final del período de alimentación. Las barras verticales indican el error estándar basado en 8 réplicas. Letras iguales no son diferentes estadísticamente ($p<0,05$).

3.5.2. **Supervivencia**

Los porcentajes de supervivencia fueron Arcoseno transformados (% de supervivencia/100) previo a la aplicación de cualquier prueba estadística. El análisis de varianza demostró que las supervivencias de los tres tratamientos no eran estadísticamente diferentes ($p<0,05$) entre ellos (Tabla 6). Es importante resaltar que la dosificación del alimento en función del estadio de muda presento una menor mortalidad y variabilidad entre sus réplicas en comparación con los demás tratamientos a pesar del continuo muestreo semanal que se realizó para observar el estadio de muda.

Los parámetros físicos del agua temperatura, pH, oxígeno disuelto y salinidad medidos semanalmente reportaron: 26,5±1°C (n=6), 8,05±0,02 (n=6), 4,75±0,53 ppm (n=6) 33±1µps (n=6) respectivamente. Además se realizó análisis de fósforo, nitrito, nitrato y amonio para los 2 ultimos días y se los resume en la (Tabla 7).

Tabla 7. Valores promedio (±error estándar) de la calidad del agua en los acuarios.

	Descripción de análisis			
	Fósforo (mg/l)	Amonio (mg/l)	Nitrito (mg/l)	Nitrato (mg/l)
A	0,12±0,01	0,17±0,03	0,008±0,003	1,20±0,14
B	0,14±0,01	0,19±0,01	0,007±0,001	1,28±0,04
C	0,08±0,01	0,12±0,01	0,009±0,001	1,39±0,01

IV. DISCUSIÓN

4.1 CICLO DE MUDA

Existen diferentes resultados entre los crustáceos respecto a la duración del ciclo de muda inclusive de los subestadios que involucran el proceso de la muda. Así tenemos que en crustáceos largos y grandes como los cangrejos y langostas, la muda se presenta una o dos veces al año un ejemplo de ello es el *Gecarcinus lateralis* donde el ciclo de muda tiene una duración de 150-200 días, ésta clase de crustáceos presentan un proceso de muda conocido como anecdysis. La diferencia con los camarones es que éstos últimos presentan un proceso de muda más continuo, llamado diecdysis en el cual la muda tiene una duración de días y hasta semanas (Dall,1990).

Algunos autores señalan que la duración del ciclo de muda difiere entre especies y aún dentro de la misma por tamaño y otros factores (ver capitulo dos). Así en *P. monodon* y *P. esculentus* la fase de postmuda temprana A, tuvo una duración de 9 horas según Smith y Dall (1985) y Kuo y Lim (1985), mientras que en *P. setiferus*, *P. styliirostris*, *Macrobranchiun rosembergii* y *Sicyonia ingentis* el tiempo de duración de la postmuda temprana fue de 1 día (Robertson *et al*., 1987; Sandifer y Smith, 1985; Anderson *et al*., 1985).

En otro trabajo con juveniles *P. vannamei* de 11,5-13 cm de longitud la postmuda temprana tuvo una duración de 18-28 horas (Chan *et al*., 1988), mientras que en adultos de 55 g, esta etapa se completó en 1,33 días (Betancourt *et al*., 1993). Estos últimos

resultados se asemejan a los obtenidos en la presente investigación donde la fase de postmuda temprana A, fue de 1 día de duración.

En cuanto a la postmuda tardía B, Smith y Dall, (1985) y Kuo y Lim, (1985) determinaron una duración de 2 días para *P. esculentus* y *P. monodon* respectivamente. Robertson *et al*. (1987) presentó iguales tiempos de duración de postmuda tardía B en *P. setiferus* y *P. stylirostris*, mientras que en el *Macrobranchiun rosembergii* éste estadio tuvó una duración de 3-5 días (Sandifer y Smith, 1985). Según Chan *et al.* (1988), en *P. vannamei* el estadio B se desarrolló entre 23-40 horas en otro estudio en *P. vannamei* adultos esta etapa se completó en 1,69 días (Betancourt *et al*., 1993). Los resultados obtenidos en la presente investigación señalan para la fase de postmuda tardía B, una duración de 1día.

El estadio C de intermuda según lo expuesto por Chan *et al.* (1988) se extiende de 10-15 días, resultados que varían con los hallados en este trabajo, en el cual se determinó para camarones de 2,69 g una duración 4±0,33 días, mientras que para *P. vannamei* reproductores de 55 g la etapa de intermuda tuvo lugar en 2,15 días (Betancourt *et al*., 1993). En otros peneidos como *P. setiferus* y *P. stylirostris* la fase de intermuda se desarrollo en un lapso de 2-3 días (Robertson *et al*., 1987), y en *P. monodon* y *P. esculentus* se completó en dos días (Smith y Dall, 1985; Kuo y Lim, 1985). Un período mucho más largo de 29 hasta 79 días ha sido reportado para la etapa de intermuda del *M. rosembergii* (Sandifer y Smith, 1985).

La fase de premuda temprana Do y D1 en el trabajo de Chan *et al.* (1988) se desarrolló en 16 días para *P. vannamei*, donde los estadios Do y D1 tuvieron una duración de 3-6 días y 8-10 días, respectivamente. En la presente investigación se encontró que el estadio Do tiene una duración de 1±0,41 días, y el estadio D1, 2±0,5 en total 3-4 días. Betancourt *et al*. (1993) en *P. vannamei* adultos reportaron que la etapa de premuda se cumplió en 3,11 días, al igual que en *P. setiferus* y *P. stylirostris* con una duración de 4 y 3 días, respectivamente (Robertson *et al*., 1987). Por el contrario en *P. monodon* solamente el estadio Do dura entre 3-4 días y el estadio D1 se completa en 7 días (Kuo y Lim, 1985). Algo parecido sucede en el *P. esculentus* donde los estadios Do y D1 se completó en 3-6 días y en 8-10 días, respectivamente (Smith y Dall, 1985). En el *M. rosembergii* adulto la etapa de premuda temprana tuvo una duración de 3-5 días (Sandifer y Smith, 1985).

La fase de premuda tardía D2 y D3 en éste trabajo se llevó a cabo en 3 días, el estadio D2 tuvo una duración de 2±0,51 días y D3 de 1 día. Estos resultados son similares a los presentados en la misma especie por Chan *et al.* (1988) y Betancourt *et al*. (1993). Los primeros reportan que el estadio D2 dura 2-3 días y D3 alrededor de 1-2 días. En tanto que el segundo grupo de autores señalan que la etapa de premuda tardía se cumple en 3,5 días. De igual manera en *P. setiferus* y *P. stylirostris* la fase de premuda tardía tomo entre 4 y 3 días respectivamente (Robertson *et al*., 1987). Mientras que para el *P. monodon* el estadio D2 se desarrolla en 2 días y el estadio D3 se cumple en 12 horas (Kuo y Lim, 1985) y en el *P. esculentus* se completo en 2,5 días y en 10 horas, respectivamente. Al igual que en intermuda para el *M. rosembergii* adulto la etapa de premuda tardía se prolongo en un lapso de 5-8 días (Sandifer y Smith, 1985).

Según Chan *et al.* (1988) la duración del ciclo de muda en *P. vannamei* (de 11,5-13 cm de longitud) fue 28-40 días. En la presente investigación se determinó para este mismo proceso un lapso de 11,03±1,13 días, Charmantier y colaboradores en (1994) estudiaron al *P. vannamei* de 10 g, midiendo la capacidad osmoregulatoria por estadio de muda, determinando una duración de aproximadamente 14 días para éste ciclo. Huner y Colvin en 1979 trabajando con *P. californiensis*, determinaron un tiempo equivalente al 50% del total del ciclo de muda para la fase de premuda, al igual que en éste estudio donde la premuda representó el 50% de éste, mientras que para Chan *et al.* (1988) está misma fase de premuda se extendió a un 53% en juveniles *P. vannamei*.

Las diferencias encontradas entre los resultados de este proyecto y los obtenidos por Chan *et al.* (1988) son varias y esto puede deberse a la baja temperatura del agua (20-22°C) en la que se realizó este último lo que produjo una reducción en el metabolismo con el consiguiente prolongamiento del ciclo de muda en los camarones. Similar respuesta fue obtenida en el camarón *P. aztecus* donde temperaturas de 17°C redujeron el número de mudas en un 56%, (Dall, 1990), mientras que en el Crawfish *Cherax tenuimanis* una temperatura de 24°C acortaba el ciclo de muda en 83% (Rouse y Kartamulia, 1992)

Quizás otro de los factores que pudo afectar la duración del ciclo de muda en el diseño experimental empleado por Chan *et al.* (1988) fue el colocar los camarones individualmente en recipientes pequeños (23x12,5x12 cm), lo que probablemente dificultó el normal desarrollo de los camarones. Esto podría ser sustentado por lo reportado en *M. Rosembergii* donde el desarrollo normal del crecimiento fue afectado

por la columna de agua, área de superficie de los acuarios y tasa de recambio de agua (D´Abramo *et al*;2000). En este trabajo la determinación del ciclo de muda se realizó con 1 y 5 camarones por acuario (60x30x36 cm) de una mayor superficie que los usados por Chan *et al*.(1998).

De esta manera se logró confirmar que el ciclo de la muda, tanto en acuarios con 5 ($28/m^2$) ó 1 ($6/m^2$) camarón es la misma. La diferencia con Chan et al. (1988) probablemente se deba a que su ensayo se realizó a una densidad de $34/m^2$, superior a la empleada aquí.

Es conocido que condiciones ambientales como las fases lunares ejercen influencia sobre la fisiología de los crustáceos originando respuestas diversas en éstos (De Coursey, 1983; Dall *et al*., 1990; Griffith y Wigglesworth, 1993). Así tenemos por ejemplo que una especie de foraminífero *Hastigerina pelagica* desova de acuerdo al horario lunar y, el proceso de la gametogénesis empieza entre los 3-7 días después de luna llena. Otra especie que comprueba la relación entre la luna y el comportamiento de los animales es el anfípodo *Talitrus saltator* el cual presenta una sincronización de la muda con la luna (De Coursey, 1985).

Los resultados de esta investigación muestran una ritmicidad lunar con el ciclo de muda, al encontrarse en el experimento que casi la mitad de la población de camarones mudaron durante cuarto menguante alcanzando el pico máximo en luna nueva (80%). Una sincronización lunar también fue establecida en *P. duorarun*, donde se observó que en luna llena un alto porcentaje de la población de camarones muda en comparación con

la luna nueva (Fuss y Ogren, 1966). Estas observaciones concuerdan con De Coursey, (1983) quien reporta que la captura de *M. macleauyi* y *P. plebejus* se redujo durante la luna llena, asumiendo que estaban enterrados en el fondo del estanque. Lo contrario ocurrió con el *Parapenaeus longirostris*, donde la mayor captura se observó en luna llena y la más baja en luna nueva (De Coursey, 1983).

4.2 TASA DE INGESTION

Existen diversos factores que influyen y repercuten en un buen aprovechamiento del alimento tales como la lixiviación (liberación de nutrientes al agua), tiempo de exposición del pellet en el agua, atractabilidad, palatibilidad, consistencia del pellet e intensidad lumínica (Sick *et al*., 1973). Varios investigadores afirman que existe alimentación rítmica en los camarones, que dependiendo de la especie, ésta se incrementa en horas de la tarde y/o noche (Cuzon *et al*., 1982; Taechanuruk y Stickney, 1982; Boddeke, 1983; Robertson y Lawrence, 1993) así como el estado fisiológico por el que atraviesa el camarón durante la muda (Van Wormhoudt *et al*. 1995a)

Después de determinar la tasa de ingestión durante 3 ciclos de muda, se pudo observar que desde el estadío de postmuda tardía B hasta premuda temprana Do hay un 18% más de consumo de alimento que en el comprendido entre D1 y A, aunque estos dos períodos tengan igual números de días de duración (6 días cada uno). Esta disminución del consumo de alimento para los estadíos previos a la muda también ha sido observado en *P. esculentus* (Dall, 1986) y en *P. vannamei* por (Chan *et al*., 1988) y ha sido recientemente relacionada en crustáceos con la presencia de receptores de ecdiesteroides

en el esófago anterior los cuales dilatan éste órgano afectando la ingestión del alimento (Guckler *et al*., 1999).

Esta relación podría tener validez si consideramos que en *P. japonicus* y *M. rosenbergii* la concentración total de ecdiesteroides alcanza su máximo nivel en premuda temprana D1´´´ y regresa a los valores basales en postmuda temprana A (Blais *et al*., 1994). Este último es justamente el periodo donde se observó una reducción del consumo de alimento en este trabajo.

La disminución de la ingestión del alimento en la etapa previa y posterior a la muda (D3-A) junto con el elevado número de camarones que mudan durante luna nueva reportados en el presente trabajo también ha sido observado en *P. brasiliensis* y *P. paulensis* por Brisson (1977) descrito por Dall *et al*. (1990) pero de manera distinta. Ellos señalan un efecto del ciclo lunar sobre la ingestión de alimento e indican el mas bajo consumo de alimento en luna llena, seguido de un incremento en cuarto menguante y luna nueva hasta alcanzar el máximo consumo en cuarto creciente.

4.3 ACTIVIDAD ENZIMATICA

Muchos estudios se han realizado con el fin de determinar las enzimas digestivas presentes en camarones (Carrillo y Gonzáles, 1998) pero pocos trabajos han evaluado el efecto que tiene el ciclo de muda en la actividad de estas enzimas y su incidencia en la utilización del alimento.

Es conocido que la proteína es un componente caro pero a su vez esencial en la dieta de los crustáceos, el cual es necesaria para el crecimiento y mantenimiento del organismo. La utilización de la proteína esta afectada por la fuente de proteína, nivel de proteína ingerido y la habilidad del organismo para utilizar otros componentes como fuente de energía (Capuzzo, 1981).

Para este efecto intervienen las enzimas proteolíticas que son las encargadas de desdoblar las proteína hacia polipéptidos de cadena corta para obtener un mejor aprovechamiento de la proteína suministrada al camarón. En este grupo enzimático la tripsina representa el 60% de la actividad proteolítica y el 6% de la proteína soluble del hepatopáncreas del camarón (Galgani *et al*., 1984). Por esta razón se ha puesto mucho énfasis en el estudio de las proteasas y como estas se ven afectadas por factores como la muda.

Fernández *et al*. (1997) en trabajos con reproductores *P. notialis* encontraron que la máxima actividad de las proteasas en el hepatopáncreas estaba en la fase de intermuda C1-C4 y las mínimas en los estadios Do y B1. Los resultados de estos autores, son algo similares con el presente estudio donde la máxima actividad específica de la enzima en el hepatopáncreas no solo apareció en el estadio C sino también en B y Do, coincidiendo con la etapa donde el camarón consume mas alimento (Figura 15).

Esta diferencia en respuestas puede deberse a la edad, tamaño del animal y a la especie como ha sido mencionado por Lee y Lawrence (1985). No obstante, los resultados presentados en este trabajo difieren aún más de los encontrados para la misma especie

por Van Wormhoudt *et al*. (1995a) y Klein *et al*. (1997), donde el primer autor señala una mayor actividad específica de quimotripsina medida con BAPNA (benzoyl-L-arginie-p-nitroanilide), en el estadío D2, mientras que el segundo autor reportó una mayor actividad específica de tripsina medida con SAPNA, en D1. Esta diferencia probablemente se debe a la naturaleza de estos substratos que son específicos, a diferencia de la azocaseína usada en el presente estudio, tal como lo demuestra Fernández *et al.* (1998) al analizar tripsina con 2 substratos diferentes, TAME (tosyl-L-arginine methyl ester) y BAPNA.

Otra de las enzimas que intervienen en el proceso de digestión del alimento es la lipasa. Inicialmente estudiada en *M. rosembergii* por Lee *et al*. (1984) no se reportó actividad probablemente por la inestabilidad del substrato utilizado. Mientras que en *P. setiferus* evaluando dietas con diferentes porcentajes de proteína (22, 30, 38 y 50%), se determinó una mayor actividad lipolítica en el grupo de camarones alimentados con la dieta de 22% (Lee y Lawrence, 1985).

Basados en el hecho de que el total de lípidos presente en el hepatopáncreas del camarón es mayormente utilizado como reserva de energía durante el ayuno y la muda (Barclay *et al*. 1983). Ando *et al*. (1977) y Teshima *et al*. (1977) reportaron en *P. japonicus* una mayor concentración de lípidos en el hepatopáncreas en Do y en todo el animal en D2, respectivamente. Teshima *et al*. (1977) también señalaron una caída del nivel de lípidos en el estadío de premuda tardía. Considerando que la enzima lipasa actúa sobre los lípidos, esto podría explicar por que en este estudio en el estadío Do se

produjo la máxima actividad de lipasa y en la etapa previa a la muda D3 la actividad mas baja.

Van Wormhoudt y colaboradores (1995b) al analizar la actividad de la enzima digestiva ∝-amilasa en varias especies de crustáceos, encontraron una mayor presencia de esta enzima en los Decápodos. En este grupo se reportó que los Peneidos (*P. stylirostyris, P. indicus* y *P. vannamei*) junto a los Brachyura (*Eriphia, Corystes*), Anomura (*Galathea, Porcellana*), Macrura (*Procambarus*) y Natantias con excepción del *M. rosembergii* presentaban mayor actividad de amilasa que otras especies de crustáceos como los Nephropsidae, Scyllaridae y Portunidae. Los resultados de la actividad amilolítica obtenidos por Van Wormhoudt *et al*. (1995b) señalaron al *P. vannamei* como uno de los peneidos con una cantidad de amilasa equivalente al 1% de la proteína soluble del hepatopáncreas y una actividad de 21,9 U/mg proteína, valor muy cercano al obtenido (28,9 U/mg proteína) al promediar los 7 estadios de muda en el presente trabajo.

La influencia del ciclo de muda en la actividad de amilasa ha sido demostrada en crustáceos tales como la jaiba *Callinectes arcuatus.* Vega-Villasante *et al*. (1999) reportaron en animales recién mudados una mayor actividad de amilasa, la cual empezaba a decrecer desde postmuda B hasta premuda D2, encontrandose en este último la menor actividad de amilasa. Por otra parte, Fernández *et al*. (1998), refiriéndose a estudios de Van Wormhoudt (1974), indicaron que el *Palaemon serratus* presentó picos de actividad máxima de amilasa en C1 y D1-D2 y el *P. kerathurus* en A2, C3-4 y D2. Mientras que en reproductores *P. notialis*, Fernández *et al*. (1998) determinaron la mayor actividad de amilasa en el hepatopáncreas durante la fase de intermuda, sucediendo lo contrario en el estómago donde se incrementó desde premuda

temprana alcanzando la máxima actividad en D1 y decreciendo hasta llegar al nivel mas bajo en D4. En el presente trabajo los juveniles *P. vannamei* alcanzan la mayor actividad específica de amilasa en Do y D2, y la menor en D3 durante el ciclo de muda.

Las tres enzimas evaluadas muestran 2 picos de actividad enzimática el primero es considerado como una respuesta al estímulo alimenticio, en este caso una determinada enzima digestiva se expresará en mayor o menor grado dependiendo de la cantidad y origen de los nutrientes (Le Moullac *et al*., 1994, 1997). En tanto que el segundo pico puede ser atribuido principalmente a una estimulación endocrina de la síntesis de enzimas digestivas, por la alta producción de ecdiesteroides observados en premuda D2 para la mayoría de especies de crustáceos decápodos (Skinner, 1985; Chan *et al*., 1988; Blais *et al*., 1994). Ceccaldi (1987) también mencionó la aparición de este segundo pico, solo durante las estaciones del año donde los crustáceos, están en un período de intenso crecimiento y por lo tanto mudando frecuentemente.

La concentración de proteína soluble en la hemolinfa del *P. vannamei* ha sido estudiada por Chan *et al.* (1988) quienes reportaron que la proteína empieza a decrecer desde postmuda A, para luego incrementarse gradualmente en los estadios subsiguientes alcanzando la mayor concentración en premuda Do, y manteniéndose constante hasta el estadio D3. Este comportamiento de la proteína soluble a través de los estadios de muda puede ser producto de la liberación de la proteína desde el hepatopáncreas hacia la hemolinfa lo que podría explicar los resultados encontrados en esta investigación y que son mostrados en la figura 21.

El nivel de glicógeno del hepatopáncreas estuvo alrededor de los 6 mg/g reportado para *Metapenaeus* por Dall (1965). Una mayor acumulación de glicógeno se observó, a excepción de D2, desde el estadío D1 hasta A en parte por el consumo de alimento y además probablemente por la reabsorción de la quitina presente en el viejo exoesqueleto. Esta última observación puede ser sustentada por el aumento de la actividad de la quitinasa en la fase de premuda tardía en *P. japonicus* (Kono *et al*., 1995). La menor concentración de glicógeno en el estadío D2 probablemente se debió a un aumento de actividad de la amilasa (Figura 18) o a una mayor concentración de la hormona crustacea hiperglicemiante (cHH) mecanismos por los cuales se generaría una cantidad adicional de glucosa para cubrir su requerimiento energético o de síntesis de quitina.

Los valores del índice hepatosomático obtenidos en este estudio indican que en premuda D1, D3 y postmuda A, estadios en los cuales disminuye el consumo de alimento, el volumen de la glándula digestiva es menor en comparación con los demás estadios. Este comportamiento fue también descrito por Cuzon *et al.* (1980) en *P. japonicus*, donde el hepatopáncreas de los camarones sin alimentar diminuía su volumen, mientras que se mantenía en los camarones alimentados normalmente.

4.4 ENSAYO DE CRECIMIENTO

Un aumento de la supervivencia del 7% fue observado en el grupo de camarones alimentados en raciones acordes al ciclo de muda. La causa fisiológica para este

incremento en la supervivencia no fue determinada, pero podría relacionarse al suministro de alimento en cantidades ajustadas a la capacidad de ingestión del camarón, promoviendo de este modo un mejor aprovechamiento del mismo. Ya que el camarón está recibiendo nutrientes en los estadíos de muda de mayor actividad enzimática y mayor consumo de alimento, tal como fue evidenciado por la mejor conversión alimenticia y eficiencia proteica obtenida en este trabajo.

Por otro lado ha sido sustentado que el nivel de proteína incluida en la dieta puede tener un efecto sobre la supervivencia. Estudios realizados por Sessa y Lim (1992) en *P. vannamei* y García *et al*. (1998) en *P. setiferus* y *P. duorarun* reportaron supervivencias de 90% y 80,6%, respectivamente cuando estos camarones fueron alimentados con una dieta de 40% de proteína, resultados similares a los obtenidos en los tratamientos B y C. Pero cuando Abdel-Rahman *et al*. (1979) y Fenucci (1980) suministraron dietas con 50% de proteína a *P. japonicus* y *P. setiferus*, respectivamente obtuvieron mortalidades del 50%, sugiriendo estos datos que el nivel de proteína incide en la supervivencia.

Los resultados conseguidos en los tratamiento B y C muestran que la tasa de alimentación o de ingestión de proteína diaria, no afectó la supervivencia logrando llegar al final del ensayo con una mortalidad del 17%, otra respuesta fue observada en el tratamiento A en donde, la elevada cantidad de alimento suministrado y por ende de proteína disponible, podría haber influido en la supervivencia final, descartando como causa de esta el estrés, considerando que la mitad de la población de lo camarones del tratamiento C fueron revisados cada 2 días para estadio de muda.

El porcentaje de proteína, tamaño del camarón, especie y cantidad de alimento suministrado son variables que influyen en el factor de conversión alimencia así lo indica Sugai *et al*. (1998a). En investigaciones realizadas en *P. vannamei* (Sessa y Lim 1992; Colvin y Brand, 1977) el factor de conversión alimenticia que ellos obtuvieron 1,68 y 1,3 en camarones medianos son valores similares 1,42 al tratamiento C para esta investigación, lo que explicaría que el uso de una correcta estrategia de alimentación optimizaría el suministro de alimento.

De las tres raciones alimenticias evaluadas, el mayor peso final fue observado en el tratamiento que seguía la tabla de alimentación, aunque no se encontró diferencias en términos de biomasa ganada entre las 3 raciones. Un ahorro del 30% en el consumo del alimento balanceado total usado se encontró en el tratamiento C en comparación al tratamiento A. Además proyectando los datos hacia una producción por hectárea vemos que no existe diferencias reales entre los dos tratamientos. Los ingresos por venta incluso, son mayores en el tratamiento C (alimentación por estadios de muda) que usando la tabla de alimentación comercial.

Por lo tanto, una estrategia de alimentación adecuada a los hábitos naturales de alimentación de la especie en cultivo, y las etapas fisiológicas por las que atraviesa este organismo, permitirá maximizar la eficiencia de utilización del alimento, reducir los excesos de alimentos no consumidos, disminuir el tiempo de exposición del alimento al agua evitando así la consiguiente pérdida de nutrientes por lixiviación y estabilidad física del balanceado.

CONCLUSIONES

Una sincronización de la muda de los camarones con las fases lunares fue observada. La aplicación de esta relación con el camarón a nivel de producción comercial son varias, uno de estos beneficios es que permitiría al productor planificar el mejor momento para cosechar las piscinas, y obteniendose un producto de mejor calidad y por ende más rentable. Además puede ayudar a simplificar y optimizar el suministro de alimento, con el consiguiente ahorro que implica el no proporcionar nutrientes en etapas donde el consumo por parte del camarón es menor.

El ciclo de muda para el juvenil *P. vannamei* en la presente investigación tuvo una duración de 11,03±1,03 días, siendo la fase de premuda (Do-D3) la etapa más larga del todo el ciclo de muda con un 50%, mientras que la fase postmuda temprana A y postmuda tardía B representa el 18,66% y la fase de intermuda con un 33,33%.

Con el ensayo de tasa de ingestión estadios de muda donde el camarón disminuye su capacidad de ingerir alimento. Una cantidad de 18% más de alimento fue consumido desde el estadio de postmuda tardía B hasta premuda temprana Do.

La actividad de las enzimas digestivas demostró que estan relacionadas con el ciclo de muda y que su grado de expresión depende del estadio en que se encuentre el camarón. Dos picos de actividad máxima fueron determinados. El primero es considerado como una respuesta del camarón al estimulo del alimento, y el segundo es atribuido principalmente a una estimulación endócrina para la sintesis de enzimas digestivas. El

conocimiento de los nutrientes presentes en el hepatopáncreas y de cual enzima se expresa en mayor actividad, sirven de referencia a tener en consideración en el momento de elegir el tipo y fuente de nutrientes para elaborar una determinada dieta. Cabe destacar que esto puede variar en el momento que se cambie de especie y del tamaño del animal.

Aunque, el peso final fue mayor en el tratamiento A debido al menor manipuleo de los animales. No se encontró diferencias de las biomasas finales entre las 3 raciones ensayadas.

El factor de conversión alimenticia, fue menor en el tratamiento donde se utilizó la ecuación para alimentar a los camarones de acuerdo a los estadios de muda. La tasa de alimentación usada en los tratamientos no afectó de manera significativa el crecimiento de los camarones. Con estos resultados podemos concluir que se pueden obtener resultados positivos cuando se aplica el alimento en cantidades óptimas para su crecimiento pero en las etapas donde el camarón lo pueda aprovechar al máximo y los requiera en mayor cantidad.

RECOMENDACIONES

Realizar ensayos dirigidos a confirmar que los camarones están relacionados con las fase de la luna Estos deben tener una duración de varios meses para ser más precisos y específicos. Además se tiene que realizarse ensayos en camaroneras.

Encaminar investigaciones para lograr en primer lugar aislar enzimas digestivas de importancia en el desarrollo del camarón, en función a la digestibilidad de los nutrientes, seguidamente realizar experimentos de crecimiento primeramente en labotarorio con suplementos enzimáticos y luego si existe respaldo del sector productivo llevar un estudio en piscinas comerciales a una escala menor.

Realizar una aplicación en piscinas comerciales de los resultados obtenidos usando la ecuación lineal como una alternativa para la alimentación de los camarones, de esta manera se podrá tener un apreciación más veraz de los hechos.

Realizar más investigaciones dirigidas a buscar nuevas estrategias con la finalidad de reducir el gasto innecesario del alimento en las piscinas camaroneras. Esto podría ser horario y frecuencias de alimentación, mejor distribución del alimento en las piscinas todo esto encaminadas para tener una industria más sustentable.

BIBLIOGRAFIA

ABDEL-RAHMAN, S., KANASAWA, A. AND TESHIMA, S. 1979. Effects of dietary carbohydrate on the growth and the levels of the hepatopancreatic glycogen and serun glucose of prawn. Bulletin of the Japanese Society of Scientific fisheries 45:1491-1494.

ALCESTE-OLIVIERO, C. 2000. Regional review of aquaculture status and development trends in the Latin America and the Caribbean. in Book of Synopses in the International Conference on Aquaculture on the third millenniun. Department of fisheries. Bangokok, Thailand. pp: 23-29.

ANDERSON, S. , CLARK, H. AND CHANG, E. 1985. Multiple.spawning and molt synchrony ina free spawning shrimp (sicynia ingentis:Penaeoidea). Biological Bulletin Vol. 168 (377-394).

ANDERSON, R. K. AND PARKER, P. 1987. A13 C/12 tracer study of the utilization of presented feed by a comercialially important shrimp Penaeus vannamei in a pond grow out system. J. of the World Aquacultu. Soc. Vol. 18, No 3: (148-155).

AKIYAMA, D AND CHUANG, J. 1989. Shrimp feed requirement and feed management. in Proceedings of the SE Asia shrimp farm Management Akiyama, D.M. (ed.). American Soybean Association Singapure. pp: 75-82.

Al-MOHANNA, S. AND NOOT, J. 1987. R-Cells and the digestive cycle in Penaeus semisulcatus (Crustacea: Decapoda). Marine Biology. 95(129- 137).

ANDO, T., KANASAWA, A., TESHIMA, S., 1977. Variation in the lipids of tissues during the molting cycle of prawn. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43: 1445-1449.

BADOR, R. F. 1998. Uso de las charolas de alimentación para el cultivo de camarón en Sudamérica en IV simposium de nutrición acuícola. La Paz. b.s.c. México.

BARCLAY, M.C., DALL., AND SMITH, D. M., 1983. Changes in lipids and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, Penaeus esculentus Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68: 229-244.

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

BRAND, C. AND COLVIN, L., 1977. Compouded diets for early postlarval penaeus californiensis Journal World Mariculture Society, pp: 811-820.

BELL, A. T. AND LIGHTNER, D. 1988. A Handbook Of Normal Penaeid Shrimp Histology, World Aquaculture Society

BETANCOURT, I., CALDERON, J. AND SAGI, A. 1993. Estadios de muda en hembras adultas de Penaeus vannamei . Aquaculture Tropical. Vol 1, 13:15

BLAIS, C., SEFIANI, M., TOULLEC, J. Y., AND SOYEZ, D., 1994. In vitro production of ecdyesteroids by Y-organs of Penaeus vannamei (Crustacea:Decapoda). Correlation with hemolymph titer . Invert. Reprod. Dev. 26:3-12.

BODDEKE, R. 1983. Survaivol strategies of peneid shrimp and their significance for shrimp culture. Proceedings of the first international conference in Warmwater aquaculture, Februry. 9 -11. Hawaii. I.(13-15).

CAPUZZO, J. 1981. The role of enviromental variables and dietary level of macronutrientes on energetic efficiencies. Proceedings of the second international conference on aquaculture Nutrition. pp

CARRILLO, O. 1998. Producto multienzimático del hepatopáncreas del camarón: reactivo y suplemento dietético. en Cruz-Suarez, L., Mendoza, R. y Ricque, D. (eds.) Segundo simposium internacional de Nutrición acuicola. Monterrey. pp:(21-27).

CECCALDI, H. 1989. Anatomy and Physiology of digestive tract of Crustacea Decapodos reared in Aquaculture. AQUACOP IFREMER. Actes de Colloque 9: (243-259).

CECCALDI, H. 1987. La digestión en los crustáceos. in, Espinosa de los Monteros, J. Labarta, U. (ed). Nutrición en Acuicultura Vol. I Industrias Gráficas España. pp: 67-84

CECCALDI, H. J. 1998. A Synopsis of Morphology and Physiology of Digestive System of Some Crustacean Species Studied in France. Reviews in Fisheries Science, 6(182). pp: (13-39)

CHARMANTIER,G., SOYEZ, C. AND AQUACOP, 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the pencid shrimp *Penaeus vannamei*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.178:233-246

CHAN, S. M., RANKIN, S. AND KEELEY, L. 1988. Characterization of the moult stages in *P. vannamei*: Setogenesis and Hemolymph levels of total protein, Ecdysteroids, and glucose. Bol. Bull 175: (185-192).

CHOE, S., 1971. Body increase during molt and molting cycle of the oriental brown shrimp *Penaeus* japonicus. Marine Biology. 9:31-37.

CHUANG, J., LEE, M. AND JENN, J. 1985. Compararicion of Digestive Enzymes activities of five species of shrimp cultured in Taiwan. J. Fish. Soc. Taiwan. 12(2) 43 -53.

COOKE, I. M. AND SULLIVAN R. E. 1982. Hormones And Neurosecretion. In The Biology Of Crustacea, Vol 3 (Eds) Atwood, L. and Sandeman, D, Academic Press pp:205-278

COOPER, T. G. 1977. The tools of biochemestry. A Wisley-Interscience. U.S.A. pp:413.

COOPER, T.G. 1977. The tools of biochemistry. A Wisley-Interscience. U.S.A..pp:413

CUZON, G., CAHU, C ALDRIN, F., MESSAGER, J. L., STÉFAN, G., MEVEL, M. 1980. Starvation effect on metabolism of *Penaeus japonicus* . Procc. World Mariculture Soc. 11,410-423.

CUZON, G., HEW, M., COGNIE, D. AND SOLETECHNIK, P. 1982. Time lag effect of feeding on growth of juvenile shrimp, *Penaeus japonicus* Bate Aquaculture 29: 33-44.

D' ABRAMO, L., DANIEL, W., GERAD, P., JUN, W. AND SUMMERLIN, C. 2000. Influence of water volume, surface area, and water replacement rate on weight gain of juvenile freshwater prawns, Macrobrachiun rosenbergii. Aquaculture. 182:161-171.

DALL, W. AND MORIARTY W. 1983. Funcional Aspect Of Nutrition And Digestion In The Biology Of Crustacea Vol 5 (Eds) Mantel, H. Academic Press. pp:215-251.

DALL, W. 1965. Studies of the physiology of a shrimp, Metapenaeus sp. (Crustacea: Decapoda: Penaeid). IV. Carbohydrate metabolism Aust. J. Mar. Freshwater Res. 16: 163-180.

DALL, W. 1990. The Biology of the Penaidae. in Blaxter, J. and Southward, A (eds.). Advances in Marine Biology. Vol 27 Academic press, San Diego. pp: 21-29.

DALL, W. 1992. Feeding, digestion and assimilation in Penaeidae. in Allan, G. and Dall, W..(eds.). Proc. of the Aquaculture Nutrition Workshop. Australia. pp: 57-63

DALL, W. 1986. Estimation of routine metabolic rate in a penaeid prwan, Penaeus esculentus. Haswell. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 96: 57-74

DE COURSEY, P. J. 1983. Biological timing. in Verberg, F. and Verberg, W (eds.). The Biology of crustacea. Vol. 7 Academic press, New York, pp: 107-162.

DE SILVA, S. 2000. A global perpestive of aquaculture in the new milleniun. en Book of Synopses in the International Conference on Aquaculture on the third millennium. Department of fisheries. Bangokok, Thailand. pp: 51-100.

DIAZ-GRANDA, E. 1997. Horario de alimentación del Penaeus Schmitti en condiciones de cultivo semi-intensivo., en Tesis de Maestría, Centro de Investigaciones Marinas, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., J. K. REBER, P. A. AND SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.

DOWLING, K. AND MOTHESILL, C. 1999. Use Of Rainbow Trout Primary Epidermal Cell Cultures As An Alternative To Inmortalized Cell Lines In Toxicity Assessment A Study With Monoxynol Enviroment Toxicology And Chemistry Vol 18(2):452-459.

FANG, L. AND LEE, B. 1992. Ontogenic change of Digestive Enzymes in the *Penaeus* monodon. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 103B No 4: 1033 - 1037.

FENUCCI, J., ZEIN-ELDIN. Z. AND LAWRENCE, A. 1980. The nutricional response of two penaeid species to various level of squid meal in a prepared feed. Journal World Mariculture Society. Vol 11, pp: 403-409.

FERNÁNDEZ, I., NOLASCO, H., VEGA, F., OLIVA, M. AND HORMHOUDT, A. 1998. Variación enzimatica digestiva en función del ciclo de muda en el camarón rosa Penaeus notialis. Resumen del IV Simposium de Nutrición acuícola, 15-18 Noviembre. La Paz, Baja California Sur México. II parte.

GALGANI, F. 1988. E tude comparative des protease digestives de cinq espéces de crevvetts peneides. biochem. systematics and ecology. vol.16 no 5.pp: 497-504

GALGANI, F. AND BENYAMIN, Y. 1985. Radioimmunoassay of shrimp trypsin aplication to the larval development of Penaeus japonicus Bate. J. Experi. Marin. Biolog. and Ecolog. Vol. 87: 145 -151.

GALGANI, F. AND BENYAMIN, Y., AND VAN HORMHOUDT, A. 1985. Purification, Properties and immunoassay of trypsin from the shrimp Penaeus japonicus Bate. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 81B: 447 - 452.

GALGANI, F. AND BENYAMIN, Y., CECCALDI, H. J. 1984. Identification of digestive proteinase of Penaeus Kerathurus (FORSKAL) A comparison with Penaeus japonicus Bate. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 78B No 2 : 355 - 361.

GARCIA, T., GAXIOLA, G, GARCIA, T., PEDROZA, R., SOTO, L., LÓPEZ, N. AND ROSAS, C. 1998. Influencia de la prtteínas dieteticas sobre el crecimiento, la

sobrevivencia y el rendimiento de las postlarvas del camarón blanco (Penaeus setiferus) y del camarón rosado (Penaeus duorarun) del golfo de Mexico. Aquatic. No 2.

GARCIA-CARREÑO, F. L., HAARD, N. F., 1993. Characterizacion of proteinase classes in langostilla (Pleurocondes Planipes) and Crayfish (Pacifastacus Astacus) extracts. J. Food Biochem. 17:97-113.

GARCIA-CARREÑO, F. L., NAVARRETE DEL TORO, M.A. HERNANDEZ-CORTEZ, P., EZQUERRA, M. J. SERVIERE, E. AND MAEDA, A., 1998. Tecnología Enzimática en Acuicultura. pp:251-265

GARCIA-CARREÑO, F. L., AND HERNANDEZ M.P. 1997 Enzimas del sistema digestivo del camaron, estado del arte y tendencias de investigación en digestión de proteínas, CYTED-CENAIM pp:13-19

GIBSON, R. 1981. Feeding and digestion in decapoda crustaceans. Proceedings of the Second International Conference on Aqualculture Nutrition. pp: (59-70).

GUCKLER, R., HEINZEL, H. G., AND TOMASCHKO, K. H. 1999. Menbrane-Associated ecdyesteroid receptors in decapods crustaceans. Ocurrence, Sensitivity and Neuronal Integration.

GRIFFITH, D. R. AND WIGGLESWORTH, J. M. 1993. Growth rhythms in the Shrimp Penaeus vannamei and Penaeus schmitti. Marine Biology 115: 295 299.

HERNANDEZ-CORTEZ, P., QUADROS-SEIFFERT, W., NAVARRETE DEL TORO, M. A., PORTILLO, G., COLADO, G. AND GARCIA CARREÑO, F. L. 1998. Time series in food ingestion and proteolytic activity of digestive system of juvenile white shrimp Penaeus vannamei.

HARRIS, D. 1987. Spectrophotometric assays. in Basford, C. y Harris, D. (eds.) Oxford. IRL press. capitulo 3, pp: 49-90.

HUBERMAN, A. 1997. Estado del arte de la investigación científica en Endocrinología de peneidos. en revista CYTED/CENAIM pp:9-11.

HUNER, J. AND COLVIN, B. 1977. A short term study on the effects of diets with varied calcium:phosphorous ratios on the growht of juvenile shrimp, (Penaeus californiensis) (PENAIDEA:CRUSTACEA) Journal world mariculture society. pp: 775-777.

HUNT, M., WINSOR, H. AND ALEXANDER, C. 1992. Feeding by penaeid prawn: role of the anterior mouthparts. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 160 (33-46).

HUNTER, D. H. AND UGLOW, R. F. 1998. Setal development and muolt staging in the shrimp Crangon Crangon (L) Crustacea: Decapoda: Crangonidae).

HYSMITH, B. AND COLURA, R. 1976. Effect of salinity on growth and survival of penaeid shrimp in ponds. Journal World Mariculture Society. Vol 14:289-303.

KONO, M., WILDER, M., MATSUI,T., FURUKAWA, K., KOGA, D. AND AIDA, K. 1995. Chitinolytic Enzymes activities in the hepatopancreas, Tail fan and Hemolymph of Kuruma Prawn P. japonicus during the Molt cycle. Fish. Sci. 61(4) 727- 728.

KUMLU, M. AND JONES, A.. 1995. The effect of live and artificial diets on growth survival, and trypsin activity in larvae of Penaeus indicus. J. World Aquaculture Society. Vol. 26 No. 4 pp:(406-415).

KUMLU, M. SARIHAN, E. AND TEKELIOGLU, N. 1992. Trypsin activity in larvae of Penaeus monodon Fabricius, 1789 (Crustacea; Decapoda ;Penaeidae) in relation to their diet. The israeli J. of aquaculture 44(4) pp: (103-110)

KUO, CHING-MING AND LIN, WEN-WEN. 1996. Changes In Morphological Characteristic And Ecdysteroids During The Molting Cycle Of Tiger Shrimp, Penaeus Monodon Fabricus, Zoological Studies 35(2): 118-127.

KLEIN, B., Le MOULLAC, G., SELLOS, D. AND VAN HORMHOUDT A. 1997. Molecular Cloning and Secuencing of trypsin cDNAs from Penaeus vannamei (Crustacea, Decapoda): Use in assessing gene expression during the moult cycle. Int. J. Biochem. Cell Biol. Vol. 28 No 5 pp: (551-563).

LAGUNA, J. 1967. Bioquímica, segunda edición Fournier. México. capitulo 3. pp: 38-81.

Le BOULAY, C., HORMHOUDT A.V., AND SELLOS, D. 1996. Cloning and expression of cathepsin l-like proteinasa in the hepatopancreas of the shrimp P. vannamei during the intermolt cycle. J. Comp. Physiol. 166: 310-318.

Le MOULLAC, G., KLEIN, B., SELLOS, D. AND VAN HORMHOUDT A. 1997. Adaptation of trypsin, chymiotrypsin and & - amylase to casein level and protein source in Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) J. Experi. Marin. Biolog. and Ecolog. 208: 107 -125.

Le MOULLAC, G., VAN HORMHOUDT, A. AND AQUACOP. 1994. Adaptation of digestive enzimes to dietary protein, carbohydrate and fibre levels and influence of protein and carbohydrate quality in Penaeus vannamei larvae (crustaceo, decapoda). Aquatic Living Resource, 7: 203-210

Le CHEVALIER, P., AND. VAN HORMHOUDT, A. 1998. ALPHA-GLUCOSIDASA FROM THE HEPATOPANCREAS OF THE SHRIMP Penaeus vannamei (Crustacea, Decapoda).J. Expo. Zool,280(6):384-394.

LEE, P. AND LAWRENCE, A. 1985. Effect of diet size on growth feed digestibility and digestive activities of the marine shrimp Penaeus setiferus Linnaeus. J. World Marin. Soc. 16:(275 - 287).

LEE, P. AND LAWRENCE, A. 1996. Feeding strategies to optimize production efficiency on Prawn farms. Marine Biomedical Institute. University of Texas Branch.

LEE, P., SMITH, L. AND LAWRENCE, A. 1984. Digestive proteases of Penaeus vannamei Boone: relationship between enzyme activity, size and diet. Aquaculture. 42:(225-239).

Le VAY, L., RODRIGUEZ, A., KAMARUNDIN, M. AND JONES, D. 1993. Influence of live and artificial diets on tissue composition and trypsin activity in Penaeus japonicus larvae. Aquaculture. 118: (287-297).

LEMOS, D., EZQUERRA, J. M. AND GARCIA-CARREÑO, F. L.,.2000. Protein Digestion in Penaeid shrimp: Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture (186): 89-105.

LEMOS, D., GARCIA-CARREÑO, F. L., HERNÁNDEZ-CORTEZ, P., NAVARRETE, A. AND PHAN, V. N. 1999. May proteolytic enzymes vary during the ontogenetic developent of penaeid shrimp? A case the study of Farfantepenaeus paulensis (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). abstract.

LOVETT, D. AND FELDER, D.1990. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp Penaeus setiferus (Crustacea, Decapoda, Penaeidae).

MATHEWS, C. AND VAN HOLDER, K. 1998. Bioquímica. MacGraw Hill. España. segunda edición. capitulo 11. pp: 398-455.

NOLASCO, H. 1998. Actividad enzimatica digestiva, ritmos circadianos y su relación con la alimentación de camarón. IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Parte I.

OMONDI, G., AND STARK, J. 1995. Some digestive carbohydrases from the midgut of Penaeus indicus and Penaeus vannamei Decapoda:Penaidae. Aquaculture. 134: 121-135.

PASANO, L. M. 1961. Molting and its Control en: The physiology of crustacea, Vol II. ed. Talbot Waterman. Academic Press. Cap 15. pp: 473-527.

PUELLO-CRUZ, A. C., SANGHA, R. S. AND JONES, D. A. 1998. Trypsin enzyme activity in protozoea I to postlarvae I Litopenaeus vannamei, fed artificial diets. Mazatlan Unit for Aquaculture on Enviromental Management, Sinaloa, Mexico.

RICK, W. AND STEGBAUER, H. 1974. α-amilasa en: Methods of enzymatic analysis. eds. Bergmeyer H. U. Academic Press Vol. 2. pp: 885-890

RODRIGUEZ, A., Le Vay, MOURENTE, G. AND JONES, D. 1994. Biochemical composition and digestive enzyme in larvae y postlarvae of Penaeus japonicus and carnivorous feeding.J. Marine Biology. 118:(45-51).

ROBERTSON, L., BRAY, W., LEUNG-TRUJILLO J. AND LAWRENCE, A. 1987. Practical Molt Staging of *Penaeus setiferus* and *Penaeus Stylirostris*. J. World Aquacult. Soc., 18(3): 180 - 185

RUBINO, A., LAWRENCE, A. AND ZEIN-ELDIN, P. 1983. The polyculture of Penaeus stylirostris STIMPSON and *Penaeus aztecus* IN TANKS J. World Mariculture Soc. 14:(96-108).

ROBERTSON, L., LAWRENCE, A. AND CASTILLE, F. L. 1993. Effect of feeding frequency and feeding time in growth of the *Penaeus vannamei* (Boone). Aquacul. and Fish. Manag. 24:(1-6).

ROUSE, D. AND KARTAMULIA, I. 1992. Influence of salinity and temeperature on molting and survival of the australian freshwater caryfish *(Cherax tenuimanus)*. Aquacultture. 105:47-52.

RIBERIO, F.A. AND JONES, D.A. 2000. Growth And Ontogenetic Change In Activities Of Digestive Enzyme In Fennerus *Penaeus Indicus* Postlarvae. Aquaculture Nutrition Vol 6(1):53-64.

SANDIFER, P. AND SMITH, T. 1985. Freshwater Prawn. in Huner, J. y Brown, E. (eds.) Crustacean and Mollusk Aquaculture in the United State. AVI Publishing Company. Connecticuct capitulo 2 pp: 63-125.

SESSA, J. AND LIM, C. 1992. Effect of feeding soy products with varying trypsin inhibitor activities on growth of shrimp. JAOCS. Vol 69, No 3, pp: 209-212.

SICK, L., WHITE, D. AND BAPTIST. 1973. The effect of duration of feeding amount of food, light intensity, and animal size on rate of ingestion of pelleted food by juvenile penacid shrimp. Prog. Fish Cult 35(1): 22-26.

SUAREZ, C. E. 1999. Digestion en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. en avances de nutrición III pp 207-231.

SHIDHAR, M., NAIR, R. AND SHIDHAR, N. 1995. Trypsin activity as a function of variation iin shrimp Penaeus indicus (Crustacea: Artropoda). Indian J. of Marin. Sci. Vol. 24, 110 - 112.

SMITH, D. AND DALL, W. 1985. Moult staging the tiger prawn *Penaeus esculentus* . in Second Australian National Seminar. PC. Rothlisberg, Hill, B. and Staple, D. (eds) Cleveland. Australia. pp: 85-95.

SUGAI, J. K., LÓPEZ, K. V. AND ORENHA, C. E. 1998. Determinación de la actividad amilolitica en postlarva y juveniles de camarón rosa *Penaeus paulensi* (Peréz Farfante, 1967). abstract.

SUGAI, J. K., ORENHA, C. E. AND LOPEZ, K. 1998. Variaciones circadianas de la actividad de la amilasa y maltasa en juveniles de camarón rosa *Penaeus paulensi* (Perez Farfante 1967) In IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Parte I. La Paz, B.S.C Mexico. abstract.

STEVENSON, J. R. 1985 Dynamics Of The Integument In The Biology Of Crustacea, Vol 9 (Eds) Bliss, D. And Mantel, L. Academic Press pp:2-32.

SKINNER, D. M. 1985. MOLTING AND REGENERATION. In The Biology Of Crustacea, Vol 9 (Eds) Bliss, D. And Mantel, L. Academic Press pp:43-128.

TAECHANURUK, S. AND STICKNEY, R. 1982. Effect of feeding rate and feeding frequency on protein digestibility in the freshwater shrimp (Macrobranchium rosembergii). Journal World Mariculture Society. Vol 13:63-72.

TESHIMA, K. AND OKAMOTO, H., 1977. Variation in lipids classes during the moulting cycle of the Penaeus japonicus, Mar. Biol. 39: 129-136.

TSAI, H., CHUANG, K. L. AND CHUANG, J. 1986. Chymiotrypsins in the digestive tracts of crustacean Decapods (shrimp). Comp. Physiol. Vol. 85B, No 1. pp: 235-239.

TSAI, I. H., LU, P. J. AND CHUANG, J. L. 1991. The midgut Chymiotrypsins of shrimps. (P. monodon, P. japonicus and P. penicillatus) Biochemic et Biophysica Acta, 1080: 59-67.

TOULLEC, J. 1992. In vitro protein synthesis and α-amylase activity in F cells from hepatopancreas of Palaemon serratus (Crustacea; Decapoda). Experentia. Vol. 48:(272-277).

VAN HORMHOUDT, A. AND SELLOS, D. 1996. Cloning and sequencing Analysis of three amylase cDNAs in the shrimp Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda) Evolutio. Aspect. J. Mol. Evol. 42: 543 - 551.

VAN HORMHOUDT, A., DANVAL, A. , PLAIRE-GOUX, S., LE MOULLAC, G AND SELLOS, D. 1995. Chymiotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp Penaeus vannamei (Crustacea: Decapoda). Experentia. Vol. 51: 159 - 163.

VAN HORMHOUDT, A., G. BOURREAU, AND LE MOULLAC. 1995. Amylase polymorfphism in (crustacea: Decapoda). ELECTROFORETIC AND IMMUNOLOGICAL STUDIES. BIOCHEMICAL SYSTEMATIC AND ECOLOGY, VOL 23 (2) 139 -149

VEGA-VILLASANTE, F., FERNÁNDEZ, I., PRECIADO, R. M., OLIVA, M. AND NOLASCO, H. 1999. The activity of digestive enzymes during the molting stages the arched swiming Callinectes arcuatus Orwey, 1863 (Crustacea, Decapoda, Portunidae).

VERSAW, W.K., AND R. L., METZENBERG. 1996. Activator indpendet gene expression in Neurospora Crassa. Genetic, 142:417-423.

VOGT, G. 1993. Differentation of B-cells in the hepatopancreas of the prawn Penaeus monodon. Acta zoologica (Stockholm), Vol. 74, No 1.,pp: 51-60.

VONK, H. J. 1960. Digestion y Metabolism. in Waterman, T. (ed). The Physiology of Crustacea. Vol I. Academic Press. Capitulo 8. pp: (291-311).

WELSH, J. H. 1961. Neurohumors and neurosecretion en: The physiology of crustacea, Vol II. ed. Talbot Waterman. Academic Press. Cap 8. pp: 281-305.
WISEMAN, A. 1985. Handbook of enzyme biotechnology. Secon edition. Halsted Press, New York.

WISEMAN, A 1985. handbook of enzyme biochnology. Secon Edition. Halsted Press, New York.

XUE, X.M, ANDERSON, A. RICHARDSON, N. ANDERSON, A.J., XUE, G. P. AND MATHER, P. B. 1999. Characterisation Of Cellulose Of The Redclaw Crayfish (Cherax Quadricarinatus), Aquaculture 180 (373-386).

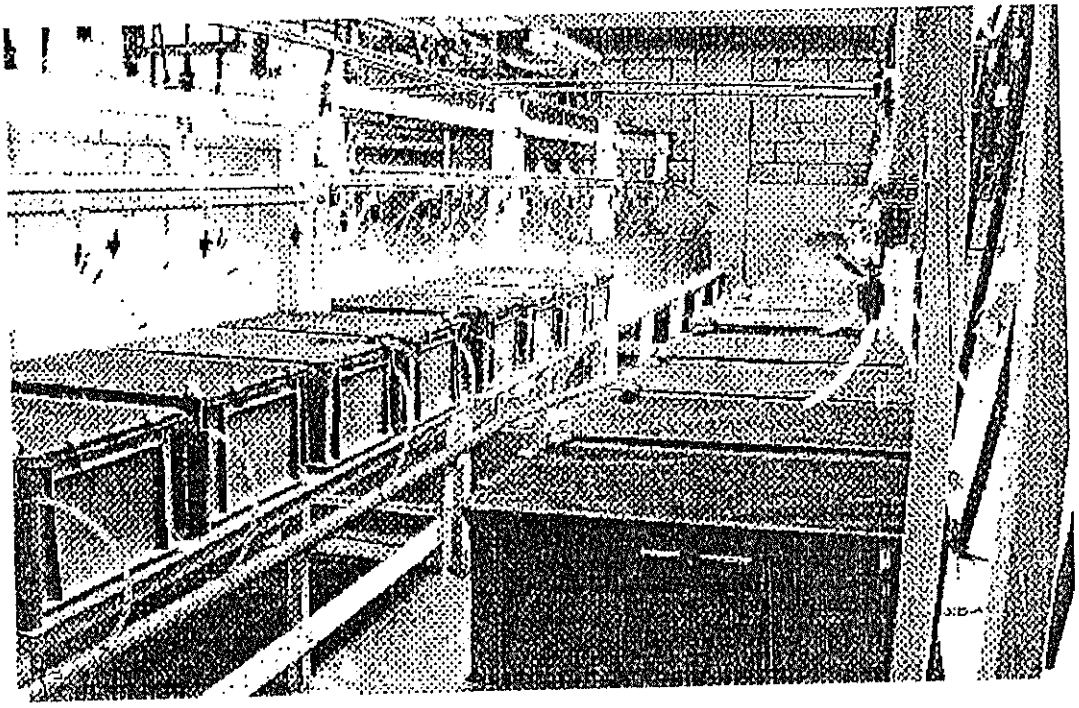

Figura 24: Sala experimental del ensayo de tasa de ingestión

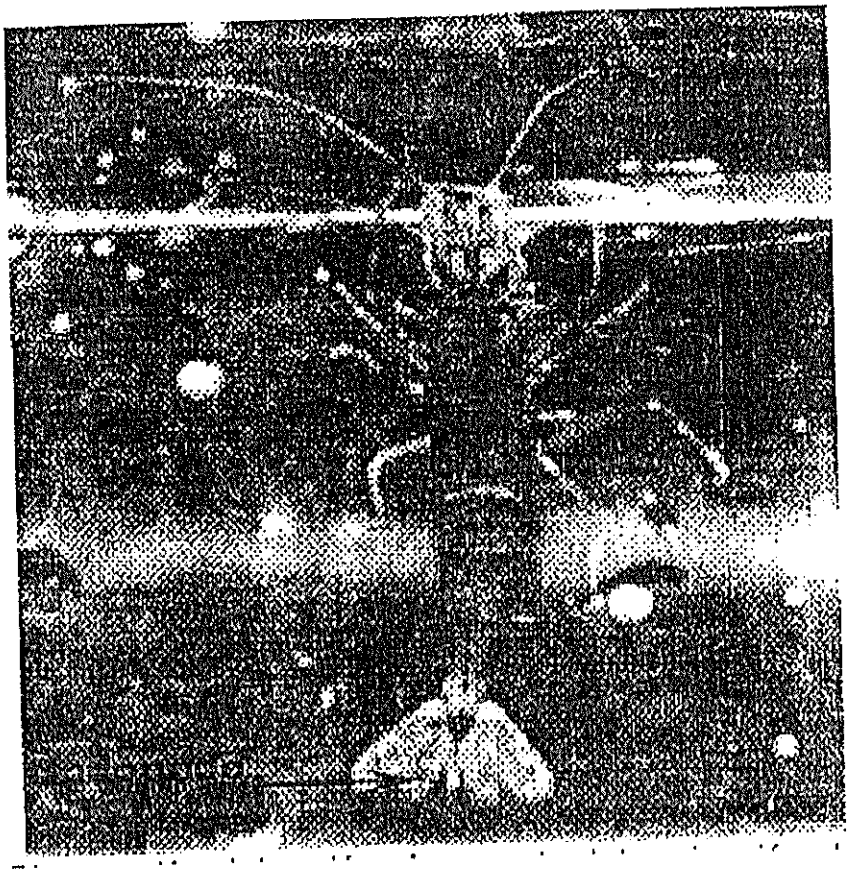

Figura 25: Observación del endópodo para la determinación del estadio de muda en el camarón

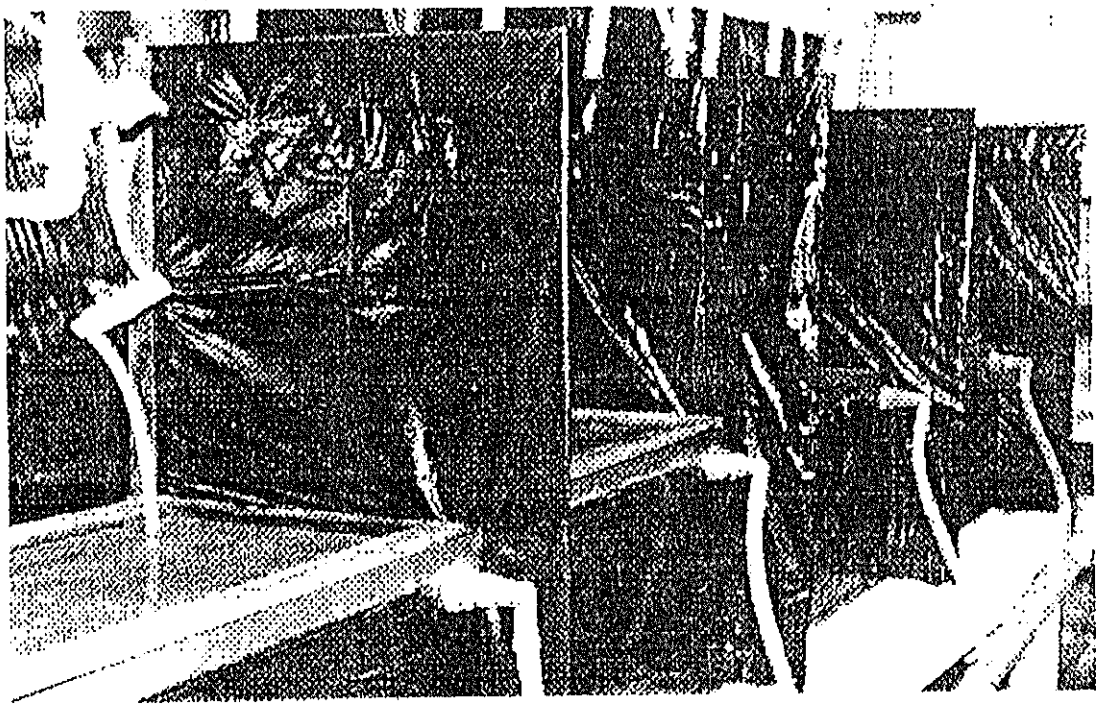

Figura 26: Sala experimental donde se realizó el ensayo de crecimiento

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del ácido dinitrosalisílico

Disolver 1 g de ácido 3-5 dinitrosalisílico y 30 g de tartrato de potasio en 40 ml de NaOH 0,04 N. Enrrasar a 100 ml con agua desionizada, reactivo estable por 6 meses en refrigeración a 0-4 °C).

Preparación de solución tampón fosfato de sodio

Disolver 1,97 g de fosfato disódico hidrogenado dihidratado ($Na_2HPO_4.2H_20$) y 1,23 g de fosfato de potasio dihidrogenado (KH_2P0_4) en 800 ml de agua desionizada, añadir 65 ml de NaCl 0,9%. El pH es ajustado a 6,9 adicionando NaOH 0,1 N y completar a 1000 ml con agua desionizada. La solución es estable en refrigeración (0-4 °C) hasta por un año.

Preparación de solución tampón Tris-ClH

Disolver 6,055 g de trishidroxiaminometano en agua desionizada y filtrada por 0,22 µm y completar a 1000 ml con la misma calidad de agua. Alcanzar un pH de 7,2 agregando ácido clorhídrico (ClH) 1 N.

Fórmula para determinar la actividad enzimática de amilasa y proteasas.

$$\text{Actividad específica} = \frac{V}{\varepsilon \text{ x } d \text{ x } v \text{ x} Cprot} \text{ x } \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

Donde:

V= Volumen total del ensayo.

E= Cambio de absorbancia

= Coeficiente de extinción [$cm^2/\mu mol$]

v= Volumen de muestra usada

t= Tiempo

t= tiempo de reacción entre sustrato y enzima

d= Paso de luz en la cubeta (1 cm)

Cprot= Concentración de proteína (mg/ml)

ANEXO 2

Tabla de alimentación para camarones a una densidad de $10/m^2$ (Akiyama y Chwang, 1989).

Semana de cultivo	Peso del camarón (g)	Supervivencia (%)	Tasa de alimentación (%)	Cantidad de alimento diario (Kg)
1	0.5	90.00	15	6.80
2	1.0	88.90	13	11.60
3	1.5	87.90	10	13.20
4	2.5	86.80	9.0	19.50
5	3.5	85.80	8.0	24.00
6	4.5	84.70	7.0	26.70
7	6.0	83.70	6.0	30.11
8	7.5	82.60	5.5	34.10
9	9.0	81.60	5.0	36.70
10	11.0	80.50	4.5	39.80
11	13.0	79.50	4.0	41.30
12	15.0	78.40	3.8	44.70
13	17.0	77.40	3.5	46.10
14	19.50	76.30	3.3	49.10
15	22.0	75.30	3.0	49.70
16	24.5	74.20	2.8	50.90
17	27	73.20	2.6	51.40
18	30	72.10	2.5	54.10
19	33	71.00	2.4	56.20
20	36	70.00	2.3	58.00