UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

ESCUELA DE BIOLOGIA

Efecto del tipo y concentración de aglutinantes sobre la estabilidad del alimento preparado, tasa de ingestión y desarrollo gonadal de *Litopenaeus vannamei*

TESIS DE GRADO

Previa a la Obtención del Título de

BIOLOGO

AUTOR:

Wilfrido Argüello Guevara

Director: **Blgo. Iván Zambrano Alcívar**

Co-Director: **M.Sc. César Molina Poveda**

2003

DECLARACION EXPRESA

El autor se responsabiliza por los resultados, ideas y conclusiones interpretadas en esta tesis.

Wilfrido Ernesto Argüello Guevara

El TRIBUNAL EXAMINADOR

Blga. Ruth Choez de Quezada PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	MIEMBRO DEL TRIBUNAL
MIEMBRO DEL TRIBUNAL	Blgo. Iván Zambrano Alcivar DIRECTOR DE TESIS

Otorga a esta Tesis la calificación de : ______________________________

Fecha : ____

DEDICATORIA

“ Hay tardes en las que uno desearía
embarcarse y partir sin rumbo cierto,
y silenciosamente desde algún puerto
irse alejando mientras muere el día,
emprender una larga travesía
y perderse después…………….”

Y al regresar, encontrar los brazos abiertos
de los seres que siempre te han esperado
para decirte Te quiero.
A mis padres Wilfrido y Angelita
y hermanas May y Romy.

Con todo mi amor
Wilfrido

AGRADECIMIENTO

A DIOS fuente de mi vida e inteligencia, por las bendiciones recibidas.

A quienes son para mi ejemplo de amor, trabajo, esfuerzo y superación, mi familia.

A Jorge Calderón Ph. D. director del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M." por permitirme desarrollar mi tesis en tan prestigiosa institución.

A quien acertadamente supervisó mi trabajo e hizo oportunas correcciones Blgo. Ivan Zambrano Alcívar.

A quien me enseñó que sobresalir significa ir mas allá de lo que avanzan los demás, es trabajar mientras los otros descansan, M. Sc. César Molina, gracias por su confianza y motivación.

A quienes desinteresadamente contribuyeron con mi trabajo Yela, Cecilia, Adriana, Karla, Mervin, María Fernanda, Ivan, y Victor.

A quienes compartieron conmigo la alegría de ver realizados nuestros proyectos, me brindaron apoyo y con paciencia afrontamos este reto, Geovanny, Jose Luis, Danny, *"el body"* Luis Alberto, Mónica, Jodie, Jacqueline y María Alicia.

A quienes de una u otra manera colaboraron con el desarrollo de éste trabajo.

Wilfrido

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	:	absorbancia
ANOVA		analysis of variance
CENAIM		Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
DAMS:		digestibilidad aparente de materia seca
DAP	:	digestibilidad aparente de proteína
DHA	:	docosahexaenoic acid (22: 6n-3)
HUFA	:	highly unsaturated fatty acid
IGS	:	índice gonadosomático
IHS	:	índice hepatosomático
LSD	:	least significant diference
N.C.	:	nombre científico
nm	:	nanómetros
N.V.	:	nombre vulgar
pH	:	potencial hidrogenion
PVC	:	polivinil cloruro
RMS	:	retención de materia seca
rpm	:	revoluciones por minuto
ups	:	unidades prácticas de salinidad

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

RESUMEN

Se evaluó el efecto de 6 aglutinantes (agar, alginato de sodio, almidón de yuca, gelatina, gluten de trigo y harina de kelp), en dos concentraciones (3% y 5%) sobre la calidad física de alimentos peletizados para camarón *Litopenaeus vannamei*, después de 15, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos de inmersión en agua. Los mejores tratamientos en términos de estabilidad, hidroabsorción y lixiviación de componentes hidrosolubles se obtuvieron con alginato de sodio y gluten de trigo al 5%, se determinó la tasa de ingestión de éstos aglutinantes utilizando como control harina de trigo al 5%, y adicionalmente una combinación de alginato y gluten. No existieron diferencias significativas ($p<0.05$) en la tasa de ingestión diaria: alginato de sodio 2.61±0.49; gluten de trigo 3.00±0.53; alginato + gluten 2.39±0.70 y control 3.33±0.90. Los valores mas representativos de DAP y DAMS fueron alcanzados con las dietas que contenían como aglutinante al gluten de trigo y la combinación gluten+alginato. Mientras que los más altos índices gonadosomático y hepatosomático los registró la dieta con alginato de sodio 5%. Hembras ablacionadas no alcanzaron la maduración completa con ninguno de los tratamientos, sin embargo, con el alginato de sodio llegaron a un estadío de maduración gonadal medio (Estadío 2).

ABSTRACT

The effect of six different binders (agar, sodium alginate, cassava starch, gelatine, wheat gluten and kelp meal) in two concentrations (3% - 5%) were evaluated with respect to physical quality of shrimp *Litopenaeus vannamei* pelleted feeds, after 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes of water immersion. The best treatments in terms of water stability, water absorption and nutrient leaching were obtained with sodium alginate and wheat gluten 5%. The ingestion rate were determinated using wheat flour 5% lilke control, in addition a mixture of alginate/gluten. There were no differences in ingestion rate daily: sodium alginate 2.61±0.49; wheat gluten 3.00±0.53; alginate/gluten 2.39±0.70 and control 3.33±0.90. The values more representatives of apparent protein digestibility (APD) and apparent dry matter digestibility (ADMD) were achieved with diets containing like binders wheat gluten and mixture alginate/gluten. Whereas, more high gonadosomatic and hepatosomatic index were registered with sodium alginate 5%. Ablated female no achieved the complete maturarion with treatments. However, with sodium alginate attained to stage middle of ovarian maturation (stage 2).

1. INTRODUCCION

En la actualidad la nutrición de crustáceos, es una de las áreas mas estudiadas dentro de la acuicultura, cuyos esfuerzos se han centrado en la evaluación y preparación de dietas con niveles nutricionales requeridos por el organismo, de bajos costos y características como: palatabilidad, textura, estabilidad en el agua y digestibilidad óptimas que maximicen entre otros parámetros el crecimiento y las funciones reproductivas especialmente de especies comerciales como el "camarón blanco" *Litopenaeus vannamei.*

Alcanzar la retención de la integridad física con mínima desintegración y lixiviación de nutrientes en el agua de un alimento no es fácil, especialmente para especies bentónicas como el camarón que posee hábitos lentos de consumo y requieren roer el alimento antes de la ingestión. No solo por lo complicado de los procesos de manufactura, almacenamiento, manejo y transporte, sino por lo difícil que resulta mantenerlo compacto, por tiempo suficiente como para ser consumido por la especie en cultivo.

Según Chamberlain (1994), los alimentos acuícolas difieren de los típicos alimentos porque necesitan un nivel alto de gelatinización de los almidones para asegurar su estabilidad en el agua, esto se logra con una molienda de los ingredientes en un tamaño de partículas mas fino, y con la acción de elevadas temperaturas propias del procesamiento. Este mismo autor resalta que en los alimentos como los del camarón, al ser sumergidos y permanecer por mas de una hora en el agua antes de su consumo, los nutrientes hidrosolubles tales como: vitaminas, minerales y aminoácidos libres difunden afuera del pellet reduciendo su valor nutricional.

Los pellets que se rompen en pequeñas partículas y lixivian rápidamente sus nutrientes pueden producir la eutrofización del agua del ambiente de cultivo, conducir a un pobre crecimiento del animal, ineficiente conversión del alimento y baja supervivencia (Obaldo *et al.*, 2002).

Los aglutinantes en forma directa mejoran la calidad física del concentrado y reducen la lixiviación de nutrientes solubles en agua, minimizando el riesgo de polución del ambiente de cultivo, promoviendo la atracción y la aceptabilidad de las dietas por parte de los expandirse en un alimento laxo y suave, o caso contrario, duro y difícil de roer proporcionando poco o ningún beneficio nutricional al camarón.

- **Objetivo general**

Determinar tipos y concentraciones de aglutinantes adecuados, que permitan alcanzar una buena estabilidad física del balanceado en el agua, una reducida pérdida de nutrientes hidrosolubles por lixiviación acompañado de una mejorada texturización y aceptabilidad que aumenten el consumo del alimento por parte de los reproductores lo cual representaría grandes ventajas pues con ello se lograría suplir o sustituir la dieta fresca garantizando así una alimentación optimizada sin variaciones nutricionales.

- **Objetivos específicos**

- Evaluar la calidad física de las dietas.
- Determinar la tasa de ingestión de las dietas evaluadas.
- Determinar la digestibilidad aparente de proteína y de materia seca.
- Evaluar el desarrollo gonadal, índices gonadosomático y hepatosomático de hembras *Litopenaeus vannamei*.

2. ANTECEDENTES

2.1. CALIDAD DE DIETAS ARTIFICIALES

La calidad de un pellet para camarón está determinada no solo por su composición química sino también por sus propiedades físicas. Su evaluación se hace necesaria para asegurar el mantenimiento de los nutrientes en el balanceado hasta ser consumidos por el animal y evitar la eutrofización del agua por la exposición prolongada de material orgánico particulado,

Tacon (1989), considera que el principio del éxito de una estrategia de alimentación basada en una dieta completa a partir del uso de alimentos peletizados semi-húmedos o secos es dependiente de cinco factores importantes :

a) Las características nutricionales de la dieta formulada.
b) Los procesos de manufactura usados para producir las raciones alimenticias y las características físicas de la dieta resultante.
c) El manejo y almacenamiento de las dietas manufacturadas antes de ser usada en la granja.
d) El método de alimentación empleado.
e) La calidad de agua del sistema de cultivo.

Cada uno de los factores mencionados anteriormente tienen la misma importancia, la falla en cualquiera de uno de ellos reduce la efectividad de cualquiera de los otros.

Obviamente, aunque el perfil nutricional de una dieta parezca bueno ésta debe poseer algunas características necesarias para asegurar el aprovechamiento por parte del animal.

Según Cruz *et al*. (1999), el valor nutricional verdadero de un alimento depende de la disponibilidad y calidad de sus nutrientes y no simplemente de su cantidad de proteínas, grasa, ceniza y carbohidratos. Además Akiyama *et al*. (1989) y Cruz (2001), resaltan la importancia de características del alimento como: palatabilidad, fuente y nivel de proteína, relación con otros ingredientes, proporción de micro y macro nutrientes, nivel y tipo de aglutinante, pH del alimento, uso de enzimas exógenas, presencia de sustancias antinutricionales, procesos tecnológicos como molienda, extrusión, peletizado, expansión a los que fueron sometidos los ingredientes tamaño del pellet, etc.

Entre los parámetros empleados para determinar la calidad física de las dietas se encuentran; la densidad de las dietas, tasa de sedimentación, fracturabilidad, siendo las mas importantes estabilidad en el agua, pérdida de compuestos hidrosolubles por lixiviación y la rápida absorción de agua por parte del pellet.

2.2.CONDICIONES DE PROCESAMIENTO

La proporción de alimento no aprovechado puede variar en función de la frecuencia de distribución, así como de la correcta manipulación del balanceado. La optimización de las características físicas de una dieta para reproductores involucra a más de la selección de ingredientes de alta calidad, los procesos de manufactura que dependen de las necesidades y hábitos alimenticios del camarón, sin olvidar lo indispensable de elaborar alimentos balanceados al menor costo económico posible.

Las condiciones de procesamiento tales como el tamaño de la partícula, tiempo y temperatura de acondicionamiento, el tamaño y grosor del agujero del dado, tiempo y temperatura de cocción y los ingredientes actúan entre sí para producir un alimento estable en el agua (Akiyama *et al*., 1989).

Cuzon *et al*. (1994) aseveran que el molido, secado, la mezcla y el almacenamiento también son factores de consideración en relación a la formulación de un alimento balanceado. La eficiencia de un proceso de manufactura dependerá fundamentalmente del molido inicial, y consecuentemente del tamaño de partícula de los materiales básicos crudos utilizados. El molido también facilita la destrucción de los factores antinutricionales termolábiles invariablemente presentes y mejora la digestibilidad de los nutrientes al incrementar el área superficial de las partículas alimenticias (Tacon, 1989).

2.3. ESTABILIDAD Y LIXIVIACION

La estabilidad es la propiedad del alimento para mantener intacta su forma en el agua durante un periodo de tiempo, lo que permite que el animal lo ingiera en su totalidad y sin el riesgo de pérdida de nutrientes. El grado de estabilidad dada a un alimento depende directamente de la especie que se va a alimentar, teniendo en cuenta su hábito alimenticio (Dorado, 1996). Por otro lado, la lixiviación es el proceso mediante el cual los componentes hidrosolubles de una dieta artificial se disuelven en un medio acuoso. Según Lim y Cuzon (1994), la tasa de lixiviación de las dietas es un indicativo de su calidad.

La desintegración del pellet y la lixiviación de nutrientes son mas importantes en camarones que en peces u otros organismos acuáticos, esto se debe a sus intermitentes hábitos alimenticios, por razones obvias el alimento debe tener suficiente estabilidad luego de ser sumergido en el agua, para que mantenga su valor nutricional y sea atractivo para el camarón (Darryl, 2001).

Entre los factores que se relacionan con la estabilidad del alimento en el agua se encuentran; el tamaño de partículas (Dorado, 1996; Obaldo y Tacon, 2001; Obaldo *et al*., 2002), materias primas, aglutinantes, ingredientes que no permiten una fácil cohesión y proceso de peletización (Dorado, 1996). Adicionalmente, se requieren componentes químicos y/o naturales que actúen como atractantes altamente palatables que ayuden a un rápido consumo del alimento (Rivero y Viana, 1996; Hamre *et al*., 2001; Obaldo *et al*., 2002; Pearce *et al*., 2002).

Según Obaldo *et al*. (1998), la reducción del tamaño de la partícula reduce la cantidad de espacios de aire entre las partículas e incrementa el contacto de la superficie de los ingredientes, permite aumentar el ligamiento, por lo tanto, el pellet alcanza mayor compactación. Como la densidad se incrementa por la reducción en el tamaño de la partícula, el número de puntos de rompimiento en el alimento causado por partículas grandes es reducido, así, con más superficie de contacto, compactación y menos puntos de rompimiento, los finos tamaños de partículas de los ingredientes alcanzarían mayor estabilidad en el agua.

La estabilidad del pellet, adicionalmente depende, de las condiciones del medio de cultivo. Altas temperaturas y baja salinidad reducen significativamente la retención de materia seca en alimentos para camarón (Obaldo *et al*., 2002)

Las ventajas de una ración de alimento con mínima desintegración son muchas, incluyendo reducida eutrofización del agua y más eficiente tasa de conversión debido a la reducida pérdida y conservación del alimento en aceptable forma física o textura (Meyers *et al*., 1972).

2.3.1. Aglutinantes

Como se ha establecido, el hecho de que los camarones son lentos comedores hace necesario la formulación de pellets estables en el agua por periodos largos de tiempo (Pascual y Sumalangcay, 1983). La correcta selección de ingredientes y las condiciones de procesamiento óptimos pueden no ser suficientes para producir un pellet satisfactorio para usarlo. Los aglutinantes pueden ser necesarios para mejorar la calidad física del pellet (Dominy *et al*., en prensa), dado que ellos previenen la desintegración del pellet y la lixiviación de nutrientes hidrosolubles al exponerlo al agua. Adicionalmente reducen la producción de finos durante la manipulación y después de colocar el alimento en el agua (Sickney, 2000).

En varias investigaciones utilizando dietas formuladas se mencionan aglutinantes en concentraciones de hasta 5% (Forster, 1972; Koshio *et al*., 1989; Dominy y Lim, 1991; Partridge y Southgate, 1999; Cruz, 2001; Pearce *et al*., 2002). Cuzon *et al*. (1994) presenta una tabla con los aglutinantes comúnmente usados en alimentos de crustáceos y su nivel de inclusión.

2.3.1.1. Aglutinantes sintéticos

Agentes aglutinantes tales como, polimetilcarbamida y mezclas de urea formaldehído-sulfato de calcio con propiedades de aglutinación dobles, pueden ser utilizadas junto con peletizado al vapor (estos aglutinantes son activados por la acción del vapor propio del proceso).

Lo que limita el uso de aglutinantes urea formaldehído, es que reacciona con un gran numero de componentes del alimento. El efecto de estos aglutinantes en la disponibilidad de nutrientes como lisina o vitaminas no es aun clara, por lo que deben realizarse mas trabajos, para asegurar que estos ligantes no reducen significativamente la disponibilidad de componentes fundamentales en los alimentos (Devresse, 1998).

Por otro lado, los aglutinantes sintéticos poseen urea como compuesto fundamental, la urea es muy higroscópica, por esta razón se humedecen y pierden actividad aglutinante cuando están expuestos a altas temperaturas y humedades ambientales (Bortone, 2001).

Otro problema adicionado a su utilización, es la reducida capacidad del pellet de absorber agua (Cruz *et al*., 2002). Aglutinantes naturales no presentan estas desventajas.

2.3.1.2. Aglutinantes naturales

Agar

El agar es un producto mucilaginoso proveniente de diversas algas Florideas del Extremo Oriente. Agar es el nombre dado en Malasia a una o varias algas que en cantidades considerables son desde largo tiempo importadas de China para la confección de jaleas alimenticias.

El agar se presenta en tiras delgadas translúcidas de unos 60 cm de largo, o en fragmentos amarillos de 30 a 35 cm y de 3 a 5 mm de diámetro, es inodoro y de sabor mucilaginoso, retiene agua (se hincha) ligeramente en agua fría y de manera considerable en agua en ebullición.

Examinando al microscopio un fragmento de agar montado en agua, se observa que adquiere mayor transparencia, presentando estructura granulosa y apreciándose valvas silíceas de algunas diatomeas. Utilizado como aglutinante en dietas para abalone presenta los mejores resultados de retención de materia seca a un nivel de inclusión de 13.5% (Knauer *et al*., 1993). Contiene aproximadamente 65% de gelosa, 3.5% de celulosa, =5% de cenizas, tamaño de partícula (<315 μm) = 97%, 20% de agua (Merck, 2000).

Alginato de sodio

Los alginatos son extractos de algas pardas de la clase Phaeophycaeae, las principales especies usadas industrialmente son de las familias Fucaceas, Laminareaceas, Alariaceas y Lessoniaceas. Se trata de macromoléculas lineales constituidas por dos tipos de monómeros unidos en (1-4) el ácido β-D manurónico y el ácido α-L gulurónico (Storebakken, 1985). Estas macromoléculas tienen un peso molecular comprendido entre 20000 y 200000. La relación ponderal manurónico – gulurónico a lo largo de la cadena varían de un extracto a otro, y determinan las propiedades del polímero. Los grupos

–OH y –COOH de las moléculas están activos en la aglutinación resultando su propiedad gelificante.

Los procedimientos de preparación están basados en las propiedades de solubilidad de los alginatos, según su estado iónico y su poder complejante con el calcio (Pozo, 2002). Los alginatos han sido modificados para utilizar la relativamente única capacidad de éstos hidrocoloides de reaccionar con iones metales polivalentes y formar geles o soluciones con alta viscosidad (Meyers *et al*., 1972), así por ejemplo, es capaz de formar geles termo-irreversibles en la presencia de iones de calcio (Montejano *et al*., 1998).

Almidón de yuca

La yuca es una de las más importantes fuentes de energía metabólica para 500 millones de personas en los trópicos y también un importante material crudo para uso industrial. En las Filipinas, por ejemplo, la yuca es usada como alimento humano y como ingrediente en alimentos de animales, esta planta es una buena fuente de carbohidratos y es de fácil crecimiento bajo condiciones adversas (Bombeo *et al*., 1995).

La composición química del almidón de yuca básicamente es amilosa y amilopectina que le dan las propiedades funcionales al almidón, es insoluble en agua fría, sin embargo, cuando son calentados en agua mas allá de una temperatura crítica, los gránulos absorben una gran cantidad de agua y se hinchan más veces de su tamaño original y sufre un proceso irreversible conocido como gelatinización (Sriburi *et al*., 1999).

Gelatina

La gelatina es una sustancia de origen animal formada por proteínas y usada en la alimentación. Se extrae de pieles, huesos y otros tejidos animales mediante tratamientos con álcalis o ácidos. Es muy fácil de digerir y aunque sea 100% proteína su valor nutritivo es incompleto al ser deficiente en ciertos aminoácidos esenciales. La composición de la gelatina natural sin aditivos ni conservantes es la siguiente: 84 – 90% de proteína; 1 – 2% de sales minerales; 8 – 15% de agua (Pozo, 2002).

Uno de los factores más importantes a la hora de establecer la calidad de la gelatina es el grado de firmeza y fuerza del gel una vez cuajado. La gelatina seca al ponerla en contacto con un líquido lo absorbe y se hincha, al calentar el líquido se forma un fluido coloidal, y esta a medida que se enfría la viscosidad del fluido aumenta solidificándose.

Entra las principales funciones que desempeña la gelatina tenemos las siguientes : gelificar, espesar, emulsionar, retener humedad, mejorar la consistencia de alimentos, conseguir adherencia, recubrir, etc. (Pozo, 2002).

Harina de kelp

Kelp es un nombre genérico utilizado para denominar a las algas cafés feofitas de los órdenes Fucales (*Ascophyllum nodosum, Sargassum spp. y Pelvetia spp.*) y Laminariales (*Laminaria hyperbórea, Macrocystis pyrífera y Nereocystis luetkaena*).

La harina de kelp deshidratado es un ingrediente bajo en calorías, contiene vitaminas, proteínas, carbohidratos complejos poco digestibles, fibra y bajo contenido en lípidos, así como también, una alta concentración de minerales Mg, Ca, P, K, I (Rivera *et al*., 2002). El uso directo de harina de kelp sin la extracción de los alginatos, como aglutinante, ciertamente permite una disminución de costos y una nueva forma de aplicación que además permite aprovechar el recurso de otras propiedades nutricionales.

Considerando que el efecto aglutinante y texturizante de la harina de kelp se debe principalmente al contenido de carbohidratos ficocoloides cuya concentración varía en función de diferentes factores (estación del año, lugar de distribución geográfica y especie) el conocimiento de su concentración en la harina de "algas kelp" es importante para eficientizar su uso (Cruz, 2001).

Productos de trigo

Algunos estudios indican que la alta proteína del trigo puede ser usada exitosamente en dietas para camarón blanco, sin embargo, es también posible que otros comunes y fácilmente disponibles variedades de trigo y sus productos (como el gluten), puede ser usado en mezclas de proteínas para reemplazar las harinas marinas en alimentos de camarones (Bortone *et al*., 1995).

Los productos de trigo, usualmente son suplementados como aglutinantes o relleno. El gluten de trigo posee una especial propiedad viscosa y elástica contribuyendo a la característica reológica de masa, tiene una apariencia blanca, a la luz polvo marrón y olor no desagradable.

La harina de trigo es el aglutinante usado con mas frecuencia en los alimentos para camarón (Peñaflorida y Golez, 1996), debido a su efectividad de costo. La fuerza de aglutinamiento del trigo depende de su contenido de gluten, la harina de trigo debe tener un mínimo de 12% de proteína y 30% en gluten húmedo.

Usualmente, los niveles de gluten y harina de trigo en los alimentos comerciales abarcan entre 0 – 5% y de 20 – 30% respectivamente. No se utilizan otros productos de trigo tales como salvado de trigo, afrechos y harinillas, debido a su alto contenido de fibra, resultando difícil molerla finamente, por consiguiente, puede actuar como conductos de entrada de agua al pellet (Akiyama *et al*., 1989).

2.4. DIETAS PARA MADURACIÓN

2.4.1. Importancia

La nutrición y alimentación de especies cultivadas en ambientes acuáticos son de trascendental importancia, ya que constituyen los factores más representativos entre los costos de producción. El éxito a largo plazo y la estabilidad de una industria acuacultora de crustáceos requeriría una completa domesticación de cada especie, incluyendo la alimentación y mantenimiento en cautiverio, selección de reproductores y reproducción controlada (Harrison, 1997).

Encontrar una dieta para crustáceos reproductores ha sido el objetivo de muchos trabajos de investigación para poder determinar los requerimientos nutricionales maternos. En la misma línea, desarrollar una dieta comercial para reproductores que permita : 1) promover o inducir la maduración; 2) realzar la fertilidad y promover el apareamiento y 3) aumentar la fecundidad para el mejoramiento de la calidad y cantidad de huevos y viabilidad de los descendientes han sido los objetivos primordiales planteados por años (Harrison, 1990).

Aunque los requerimientos nutricionales de crustáceos reproductores son largamente especulados, las dietas comerciales de maduración para camarones han sido manufacturadas desde mediados de la década de los 80. Los progresos en la formulación de una nutricionalmente completa y altamente efectiva dieta de maduración han sido limitados (Harrison, 1997).

Por mucho tiempo se ha considerado la suplementación de dietas artificiales con alimentos frescos tratando de garantizar una reproducción exitosa en ambientes de cultivo intensivos o semi-intensivos, aunque el alimento vivo ha probado tener éxito para una normal maduración y reproducción de camarones peneidos como *L. vannamei* tienen serias desventajas en contraposición con las dietas formuladas, esto incluye los problemas de composición y disponibilidad variable de nutrientes, introducción potencial de patógenos en el sistema de cultivo, una alta labor requerida para la preparación, se descomponen rápidamente en agua, son caros y presentan cierto grado de no digestibilidad (Briggs *et al*., 1997; Kovalenko *et al*., 2002). Estas afirmaciones concuerdan con Marsden *et al*. (1997) quienes aseguran que las dietas artificiales húmedas o dietas artificiales conteniendo alimentos frescos picados han sido usados exitosamente para una substitución total del alimento vivo, sin embargo éstas dietas tienen una corta vida en el estanque y una baja estabilidad en el agua restringiendo su aplicación comercial.

En cambio que, las dietas artificiales secas para Wouters *et al*. (2001a) tienen un costo estable, disponibilidad constante, valor nutricional controlado, larga duración en los estanques, fácil uso, bajo riesgo de contaminación y la posibilidad de que nutrientes esenciales, hormonas y terapéuticos pueden ser fácilmente adicionados. Bruce *et al*. (1999), también concuerda al señalar que las dietas fabricadas comercialmente permiten aumentar el control sobre la composición de componentes bioquímicos y reducir el riesgo de introducir enfermedades. Datos confiables sobre la composición específica y completa de una dieta artificial que asegure una exitosa maduración y reproducción de camarones peneidos son escasos e incompletos.

2.4.2. Requerimientos nutricionales

Aún cuando los principios nutricionales sean iguales para todos los animales, las cantidades de los nutrientes requeridos varían con la especie. Hay aproximadamente unos 40 nutrientes esenciales en la dieta de peces y otros animales terrestres, se sospecha que éstos nutrientes esenciales son similares para los camarones (Akiyama *et al*., 1989).

Determinando el papel de nutrientes específicos en reproducción, los movimientos en las dinámicas de deposición, movilización y utilización de los nutrientes, se avanzaría en la comprensión de la fisiología reproductiva y del ciclo de vida de crustáceos (Harrison, 1990).

Según Tacon (1989), con excepción del agua y la energía, los requerimientos nutricionales en la dieta de todas las especies acuáticas cultivadas, se pueden considerar bajo cinco diferentes grupos de nutrientes; proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales.

2.4.2.1. Proteínas y aminoácidos

Todas las células vivas contienen proteínas que están íntimamente relacionadas con los procesos activos que constituyen la vida de la célula, cada especie animal tiene su proteína específica y en un solo organismo se puede presentar gran número de diferentes proteínas, que pueden llegar a constituir del 65 al 75% del peso total del animal en base seca (Akiyama *et al*., 1989; Soler, 1996).

Está asumido que los requerimientos proteínicos son muy altos durante la maduración y reproducción de animales, comparados con estados no reproductores, las dietas artificiales para crustáceos corrientemente contienen alrededor de 50% de proteínas (Wouters *et al*., 2001b).

Según Harrison (1997), los niveles de proteína dietética y los aminoácidos esenciales requeridos en las dietas de reproductores para la maduración gonadal y producción de descendientes sanos son probablemente más altos que los niveles requeridos para el crecimiento, porque la maduración es una época de síntesis intensa de proteína. Los aminoácidos esenciales y no esenciales son necesarios para fabricar las proteínas de la yema de huevo, hormonas, enzimas, tejido gonadal y gametos.

El papel crítico de las proteínas en maduración está reflejado en los cambios en la composición proximal del hepatopáncreas y ovarios durante la vitelogenesis. Los posibles cambios en los requerimientos de proteínas asociados con la reproducción no han sido investigados (Harrison, 1990).

Los aminoácidos considerados esenciales en la dieta del camarón son: metionina, arginina, treonina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina y fenilalanina (Akiyama *et al*., 1989). Estos autores indican que los aminoácidos libres y los pequeños péptidos sirven como estimulantes al sabor para el camarón, éstos productos están naturalmente en las harinas de pescado, camarón, calamar, cangrejo y almeja. Para Devresse (1999), las harinas de pescado, crustáceos, etc., contienen una fracción de proteínas solubles que desempeñan un papel desconocido, pero fundamentalmente en la percepción del alimento por parte del camarón en los estanques de cultivo.

2.4.2.2. Carbohidratos

Los carbohidratos que incluyen azúcares, almidones y fibras, están constituidos solamente por Carbono, Hidrógeno y Oxígeno, son considerados la forma de energía de menor costo en la dieta para animales, pero, en los camarones, la utilización y metabolismo son limitados y el proceso requiere de más estudios (Akiyama *et al*., 1989). Wouters *et al*. (2001b), del mismo modo indican, que los carbohidratos no son esenciales para camarones reproductores, sin embargo, pueden ser una útil y económica fuente de energía con efectos en las reservas de proteínas y lípidos, y excelentes aglutinantes en dietas formuladas. Además, según Harrison (1997), contribuyen a la acumulación de glicógeno almacenado en el hepatopáncreas, lo cual puede ser una importante fuente de energía para sostener la biosíntesis durante la maduración.

Adicionalmente los carbohidratos tienen un rol crítico en la producción de glucosamina, el precursor en la síntesis de quitina, el principal componente del exoesqueleto (Harrison, 1990).

2.4.2.3. Lípidos

Los lípidos son una fuente imprescindible de energía y también son nutrientes esenciales que solamente pueden ser sintetizados *de novo* por el camarón a un grado muy limitado, ejemplo: ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, por sus siglas en inglés), o no pueden ser sintetizados *de novo* por ejemplo: los esteroles (D'Abramo, 1997).

Según Akiyama *et al*. (1989), los lípidos dietéticos sirven también como atractantes y pueden afectar la textura del alimento. La concentración total de lípidos en dietas artificiales para reproductores está en un promedio del 10%, aunque algunas dietas para reproductores contienen niveles de lípidos de 14% o mas, lo cual puede afectar la tasa de ingestión (Wouters *et al*., 2001b). El alto requerimiento de lípidos por parte de los reproductores es atribuido a la alta acumulación de éstos en el ovario previo al desove (Marsden *et al*., 1997).

2.4.2.4. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la vida animal. La mayoría de las vitaminas no son sintetizadas por el cuerpo de los animales, o bien si lo son, es a una tasa muy inferior, que permita cubrir los requerimientos de los animales. Las vitaminas difieren de los otros nutrientes principales (proteínas, lípidos y carbohidratos) en que éstas no están químicamente relacionadas unas con otras, y son requeridas por los animales en cantidades traza (Tacon, 1989). Los requerimientos vitamínicos para camarones reproductores aún no están definidos, por lo que las dietas artificiales para reproductores son generalmente suplementadas con una completa mezcla de vitaminas. Wouters *et al.* (2001b), reportaron las concentraciones de vitaminas en dietas artificiales para camarones reproductores empleadas por varios autores en sus estudios nutricionales. En dicha recopilación se observa que el ácido ascórbico, inositol, colina, niacina y vitamina E son empleadas en mayor concentración.

2.4.2.5. Minerales

Los minerales son elementos químicos constituyentes de los animales, necesarios para su buen desarrollo y funcionamiento. Los requerimientos de minerales en los peces y camarones es similar a la de los animales superiores, con la diferencia de que el agua contribuye a abastecer la demanda diaria. Entre las principales funciones de los minerales se encuentra la de formar parte del esqueleto y exoesqueleto, contribuyen al balance de la presión osmótica, son constituyentes de tejidos estructurales, intervienen en la transmisión de impulsos nerviosos y contracciones de músculos (Tacon, 1989; Soler, 1996). Muchos estudios con dietas artificiales con mezclas de minerales fueron formulados especialmente fortificados con Ca, P, Mg, Na, Fe, Mn y Zn (Wouters *et al*., 2001b). De acuerdo con Harrison (1990), una deficiencia o desbalance de minerales pueden afectar la reproducción de crustáceos negativamente, causar estrés fisiológico, provocar reabsorción de oocitos o reducir la capacidad reproductiva, adicionalmente, la mal nutrición mineral puede causar composición alterada y calidad de los huevos.

2.4.2.6. Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que no pueden ser biosintetizados por los animales y deben ser tomados de la dieta, en camarones juveniles son importantes para la pigmentación, así como, también juegan un papel vital en larvas y reproductores (Wouters *et al*., 2001a) La adición de páprika en dietas de maduración ha demostrado incrementar la supervivencia larval, esto probablemente se deba a las propiedades antioxidantes de los carotenoides (Wyban *et al*., 1997). Harrison (1990), sugiere determinar las funciones, especificidad y cantidad de carotenoides usados durante el desarrollo de los oocitos y embriones de diferentes especies de crustáceos, así como la eficacia de fuentes alimenticias de carotenoides.

2.4.2.7. Aditivos alimenticios

El éxito o fracaso de una dieta formulada no solo dependerá de los nutrientes que ésta proporcione y que sean aprovechados por el animal, lo cual se puede alcanzar si el alimento suministrado es ingerido, sino también del suministrado de ciertos aditivos.

Los aditivos alimenticios son substancias las cuales se adicionan en cantidades traza a las dietas o a los ingredientes de las dietas a) para preservar sus características nutricionales antes de alimentar (antioxidantes e inhibidores de crecimiento de hongos), b) para facilitar la dispersión de los ingredientes, el peletizado o granulado de los alimentos (emulsificantes, estabilizadores y aglutinantes), c) para facilitar el crecimiento (promotores, los cuales incluyen antibióticos y hormonas), d) para facilitar la ingestión del alimento y la aceptación del producto por el consumidor (estimulantes de consumo y colorantes alimenticios), o e) para suplir los nutrientes esenciales en forma purificada (vitaminas, minerales, aminoácidos, colesterol y fosfolípidos) (Tacon, 1989).

2.5. ASPECTOS BIOLÓGICOS

2.5.1. **Escala zoológica**

Reino: Animal

Sub-reino: Metazoa

Phylum: Arthropoda

Clase: Crustacea

Sub-clase: Malacostraca

Infra-clase: Eumalacostraca

Super-orden: Eucarida

Orden : Decapoda

Sub-orden: Natantia

Infra-orden: Penaeidea

Super-familia: Penaeoidea

Familia: Penaeidae

Genero: Litopenaeus

Especie: vannamei

N. C. : *Litopeneus vannamei*

N. V.: Camarón blanco

(Dore y Frimodt, 1987: Perez-Farfante y Kensley, 1997).

Litopenaeus vannamei es el más importante camarón cultivado en el hemisferio occidental y está ampliamente distribuido a los largo de la costa del Pacífico cuyo hábitat natural son las áreas estuarinas y bahías, abundantes en países como Ecuador y Panamá (Wouters *et al*., 2001c). Siendo ésta especie una de las más representativas de la industria camaronícola de nuestro país, se hace necesario no solo el suministro de una dieta adecuada, sino el seguimiento de parámetros biológicos como crecimiento y reproducción, los cuales dependen generalmente de la utilización de los nutrientes ingeridos por parte del animal.

2.5.2. Tasa de ingestión y digestibilidad

La ingestión refiere al acto de tomar materiales dentro del cuerpo, así, por estricta definición el término puede ser usado para abarcar todos los procesos envueltos en la alimentación, digestión y la absorción de los nutrientes digeridos (Jobling, 1994).

Después de ser ingerido el alimento sufre una digestión mecánica en el molino gástrico y una digestión química en el hepatopáncreas con la acción de las enzimas digestivas que cortan, hidrolizan o desdoblan los macronutrientes en moléculas simples que puedan ser absorbidas a través de la hepatopáncreas hacia la hemolinfa. El alimento que no es retenido, digerido y absorbido se pierde en forma de excreciones fecales junto con excreciones endógenas (enzimas, hormonas, células muertas, etc) (Cruz *et al*., 1999). Es aquí donde nace el término digestibilidad, que no es otra cosa que una forma de medir la disponibilidad de nutrientes de un ingrediente o de un alimento, dicho de otra manera, es la facilidad con que el alimento es convertido en el aparato digestivo en sustancias útiles para la nutrición.

Para determinar la digestibilidad de los nutrientes es necesario incluir se un material inerte en la dieta basal que no sea digestible, y que pase a través del camarón al mismo tiempo que el alimento. La concentración de éste material indicador se mide en el alimento y también en las heces (Hardy, 1999). Los investigadores comúnmente usan el óxido de cromo, óxido de itrio o sal sílica. Las conclusiones obtenidas por Smith *et al.* (2001), confirman que existe el nivel cercano a la cero absorción del óxido de cromo, por lo tanto, es recomendable su uso como marcador de digestibilidad en el camarón.

En camarones los hilos fecales son envueltos por la membrana peritrófica la cual evita el colapso de heces y pérdida de nutrientes, siempre que los hilos fecales no estén dañados físicamente por manipulación. Combinando las heces colectadas por unos pocos días, puede proporcionar un buen promedio de la composición de las heces en caso de un lento tránsito del indicador a través del canal alimenticio.

Evaluar la digestibilidad de un nutriente específico, análisis químicos de la dieta y heces son necesarios, pero puede llevar a un considerable error si compuestos no deseados son considerados en el procedimiento químico (Cousin *et al*., 1996).

2.5.3. <u>Desarrollo gonadal</u>

En decápodos, los sexos están usualmente separados y las gónadas pareadas, localizadas dorso-lateralmente al intestino, estos están a menudo rodeados por el intestino medio o lóbulos del hepatopáncreas, cada ovario o testículo tiene un oviducto o vaso deferente destinados a separar los gonoporos. La reproducción de crustáceos y maduración ovárica están reguladas por esteroides, péptidos y hormonas terpenoide. La maduración sexual conlleva varios procesos incluyendo la gonadogenesis (desarrollo de tejido gonadal), gametogenesis (producción de oocitos o espermatocitos) y en hembras vitelogenesis (producción endógena y exógena de proteínas de la yema del huevo). Se han descrito 3 estados de maduración ovárica en camarones peneidos basados en exámenes histológicos de ovarios desarrollados, la fase juvenil corresponde al principio del desarrollo de tejido ovárico, prepubescencia está caracterizada por la oogenesis y vitelogenesis primaria, y la pubertad distinguida por la vitelogenesis secundaria (Kanazawa *et al*., 1998 *fide* Harrison, 1990).

El índice gonadosomático (IGS), también llamado índice gonadal o índice del ovario o testículos, es una medida estándar del grado de maduración gonadal en crustáceos.

Cuando la maduración es inducida por ablación del pedúnculo ocular ocurren drásticos cambios hormonales, metabólicos y el desarrollo ovárico puede ser estimulado, dependiendo en parte de los estados de ecdisis y la predisposición de la hembra

(Harrison, 1990). La ablación incrementa fuertemente la maduración de los ovarios (Chamberlain y Lawrence, 1981). El suministro oral de tratamientos hormonales para inducir la maduración puede ser usada como una alternativa a la ablación del pedúnculo ocular (Harrison, 1997).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. HIPOTESIS

La estabilidad en el agua y la pérdida de nutrientes hidrosolubles en alimentos para camarones, son sin duda, aspectos importantes considerados para elaborar dietas de buena calidad, la gelatinización de los almidones presentes en las materias primas utilizada para elaborar balanceados, puede ser suficiente para mantener un pellet altamente estable asegurando la permanencia de los nutrientes en la dieta hasta ser consumidos por el animal (*Ho*). La adición de sustancias aglutinantes mejora la estabilidad del pellet en el agua produciendo un alimento que mantiene su valor nutricional hasta el aprovechamiento por parte de la especie en cultivo (*Ha*).

3.2. DIETAS ARTIFICIALES

El presente estudio fue desarrollado en las instalaciones del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M." (Fundación CENAIM-ESPOL) ubicado en San Pedro de Manglaralto, Península de Santa Elena.

Agar (A), alginato de sodio (B), almidón de yuca (C), gelatina (D), gluten de trigo (E) y harina de kelp (F) fueron evaluados como aglutinantes en concentraciones de 3% y 5%, harina de trigo al 5% fue empleado como aglutinante control (Kumar y Bandyopadhyay, 1999).

3.2.1. <u>Composición y elaboración de la dieta seca</u>

La dieta base CENAIM 54 – 1 (tabla 1) tuvo como únicas variantes el tipo y concentración de aglutinantes cuyas formulas fueron ajustadas con la inclusión del relleno (maicena).

Tabla 1. Composición nutricional de la dieta CENAIM 54 - 1

Ingredientes	$g.100\ g^{-1}$	
Harina de pescado	30	
Harina de calamar	20	
Concentrado Proteína de soya	19.72	
Aceite de pescado	2.81	
Lecitina líquida	1	
Colesterol	0.5	
Mezcla Vitaminas MAD[a]	2	
Mezcla Minerales MAD[b]	2	
Antioxidante	0.002	
Antihongo	0.1	
Mezcla Atractantes MAD[c]	1.5	
Astaxantina	0.25	
Pond HUFA	2	
DHA	1	
Oxido de cromo	1	
Aglutinante	3	5
Maicena	13.12	11.12
Agua	40	

[a] (mg.kg^{-1} dieta): Stay C 2857; biotina 5; pantotenato de calcio 500; calciferol 12.7; colina 3500; cianocobalamina 0.3; ácido fólico 15; inositol 4000; menadiona 40; niacina 750; ácido ρ-amino benzoico 100; piridoxina HCl 120; riboflavina 200; tiamina 120; vitamina A-acetato 41.93; Acetato de α-tocoferol 1831.5; α-celulosa 5906.6.

[b] (mg.kg^{-1} dieta): Cloruro de cobalto hexahidratado 0.456; sulfato de cobre 7.7; citrato de hierro 681.074; KH_2PO_4 7998; KIO_3 0.747; sulfato de manganeso 44.768; NaH_2PO_4-$2H_2O$ 5953.1; selenato de sodio 0.249; sulfato de zinc heptahidratado 577.03; α-celulosa 4736.88.

[c] (mg.kg^{-1} dieta): Taurina 7500; Glicina 7500.

Las dietas fueron elaboradas con ingredientes que fueron pulverizados a un tamaño de partícula de 212 μ. Estos se mezclaron a mano de menor a mayor concentración con el fin de lograr una buena homogenización. Una vez que todos los ingredientes secos incluyendo 50% de la mezcla de atractantes fueron incorporados a la mezcla, se adicionó la lecitina de soya y el aceite de pescado y finalmente se agregó el porcentaje de agua destilada fría calculado con anterioridad.

Los aglutinantes fueron disueltos con agua destilada en ebullición a diferencia de la harina de kelp que se realizó con agua destilada fría. La otra parte de la mezcla de atractantes (50%) se incorporó a la dieta junto con los aglutinantes. La masa húmeda fue extruída en frío en un molino de carne LIEME Model 2062 a través de una matriz de 3 mm. Para lograr una mayor aglomeración de los ingredientes este proceso se repitió 4 veces. El pellet recogido en mallas de aluminio fue colocado a 90 °C por 5 minutos en un horno ISUZU Model 2-2132, y de ahí secado en una estufa ISUZU Type MNS 1155 a 60 °C hasta alcanzar una humedad del 8% al 10% en las dietas. El alimento se colocó en fundas plásticas rotuladas y luego almacenado a –20 °C hasta el día de su utilización.

3.3. CALIDAD DE LAS DIETAS

3.3.1. **Estructura del pellet después de inmersión en agua**

Se realizaron observaciones directas de los pellets inmersos en agua clasificándolos de acuerdo a la forma que presentaban después de 60, 120 y 180 minutos de inmersión. Estas observaciones se separaron en 5 grupos tomando como criterios subjetivos de clasificación la disgregación del pellet, apariencia y la turbidez del agua (Dominy y Lim, 1991).

3.3.2. **Estabilidad de las dietas en el agua**

La estabilidad del pellet en el agua se determinó mediante los métodos descritos por Obaldo *et al*. (2002) y Wouters *et al*. (2001d).

3.3.2.1. Estabilidad según Obaldo *et al*. (2002)

Para esta prueba 2 g de pellets de la misma longitud (aproximadamente 1.5 cm) fueron pesados y colocados en botellas de vidrio (área del fondo: 28.27 cm^2) de 250 ml, que contenían 100 ml de agua de mar 35 ups. Las dietas fueron mantenidas a 28 ^oC y 70 rpm en un agitador horizontal EYELA NTS – 1300.

Las muestras en triplicado fueron sumergidas y agitadas en el agua por 15, 30, 60, 90, 120, 150, y 180 minutos. Luego de la inmersión pasaron a un sistema de filtración BUCHNER con un papel filtro MFS (micro filtration systems) con poros de 5.0 μ, que había sido previamente secado a 60 ^oC por 24 horas y pesado. Transcurrido un minuto se detuvo la filtración para tomar alícuotas del agua (10 ml) que sirvieron para las pruebas de lixiviación. Se continuó con el filtrado hasta que no hubo gotas de agua cayendo por el embudo.

Una vez filtrado toda el agua, el papel filtro que contenía la dieta fue llevado a la estufa a 60 ^{o}C y después de 24 horas, fueron pesados.

3.3.2.2. Estabilidad según Wouters *et al*. (2001d)

La variante de ésta prueba fue al momento de colectar el pellet luego de la inmersión. Para esto se utilizaron canastillas con ojo de malla de 600 µ, que habían sido pesadas previamente. Las mallas y el pellet recogido fueron secados a 60 ^{o}C por 24 horas. Luego de este tiempo se registró el peso.

La estabilidad del alimento en ambas pruebas fue calculada en términos de Retención de materia seca (RMS) usando la siguiente fórmula :

$$\%RMS = 100 - \left[\frac{PD_{ai} - PD_{ds}}{PD_{ai}}\right] x\,100$$

Donde: PD_{ai} = Peso seco de la dieta antes de la inmersión.

PD_{ds} = Peso seco de la dieta después del secado.

3.3.3. Hidroabsorción

El peso registrado después del filtrado en la prueba de estabilidad sirvió para calcular el porcentaje de absorción de agua por diferencia gravimétrica, entre el peso a un determinado tiempo y el peso inicial, calculando y expresando el resultado como porcentaje de acuerdo a la siguiente formula :

$$\%\text{Hidroabsorción} = \frac{PD_{di} - Pb - Pf - PI}{PI}\; x\,100$$

Donde:

PD_{di} = Peso de la dieta después de la inmersión.

Pb = Peso del recipiente de aluminio

Pf = Peso del papel filtro con agua.

PI = Peso inicial de la dieta.

3.3.4. Lixiviación de compuestos hidrosolubles

Las alícuotas tomadas del agua luego del minuto de filtración fueron utilizadas para determinar la lixiviación de proteínas y aminoácidos.

3.3.4.1. Proteínas

Un volumen de Dye Reagent (Bio-rad) concentrado fue diluido con 4 volúmenes de agua destilada y pasado a través de un papel filtro Whatman No. 1 En un tubo de ensayo seco y limpio se colocó 0.1 ml de la muestra y 5.0 ml del diluido Dye reagent, para ser homogenizado y después de 5 minutos leída la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro SHIMADZU UV- 2100. Como blanco se utilizó 0.1 ml de agua de mar en vez de la muestra (Bradfor, 1994).

Para calcular el porcentaje de pérdida de proteínas por lixiviación se transformaron primero las absorbancias a $\mu g.ml^{-1}$, para esto se preparó una curva de calibración disolviendo 100 mg de BSA (Albumina sérica bovina) en 50 ml de agua de mar y de esta solución (200 $\mu gBSA.ml^{-1}$) se prepararon diferentes concentraciones (20µg, 40µg, 120µg y 140µg).

3.3.4.2. Aminoácidos

Alícuotas de 2.5 ml del filtrado fueron diluidas (1:10) con agua destilada.

Las muestras diluidas fueron leídas en un espectrofotómetro a 260 nm (medida de aminoácidos aromáticos), utilizando como blanco agua de mar (Hamre *et al*. 2001).

3.4. ANÁLISIS BROMATOLOGICOS

Muestras de las materias primas y dietas fueron analizadas para determinar proteína cruda, extracto etéreo, cenizas, calcio y fósforo total según las técnicas descritas por Molina y Paredes (1997). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

3.4.1. Determinación de humedad

Para determinar este parámetro, se colocaron pequeños recipientes de aluminio en una estufa a 60 ^oC por 30 minutos. Las dietas fueron pulverizadas y pasadas por un tamiz de 500 μ, posteriormente se pesaron 2.5 g de las muestras y se colocaron en la estufa a 105 ^oC por 2 horas. Después de este tiempo se colocaron las muestras por 15 minutos en el desecador para seguidamente ser pesadas en una balanza analítica METTLER AE240. A continuación las dietas fueron llevadas a la estufa nuevamente por intervalos de 30 minutos, y enfriadas por 15 minutos en un desecador y registrado el peso. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar una diferencia de 0.0002 g entre el penúltimo y ultimo peso (Molina y Paredes, 1997).

El porcentaje de humedad fue calculado con la fórmula :

$$\%Humedad = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W} \text{ x } 100$$

Donde:

W = Peso del recipiente de aluminio.

W_1 = Peso del recipiente con la muestra.

W_2 = Peso del recipiente con la muestra seca.

3.4.2. <u>Determinación de proteína cruda</u>

Se pesó aproximadamente 0.300 g de muestra, sobre un pedazo de papel libre de nitrógeno. La muestra colocada en un tubo Kjeldahl, junto con 3.5 g de sulfato de potasio y 0.4 g de sulfato de cobre pentahidratado, fue digerida con 10 ml de la mezcla ácida, en la unidad digestora BÜCHI-430 a 400 ^{o}C por una hora y 10 minutos.

El tubo Kjeldahl que contenía la muestra digestada fue conectado al destilador BÜCHI-323 donde se adicionó 25 ml de agua destilada y 40 ml de soda al 40%. Para proceder a la destilación por 10 minutos el destilado recogido en una fiola de 500 ml que contenía 20 ml de ácido bórico al 4% con 25 gotas de la solución indicadora (rojo metilo : verde de bromocresol), fue titulado con ácido clorhídrico 0.1 N, hasta el viraje del indicador de color verde claro a rojo claro que fue el punto final.

El volumen de ácido clorhídrico consumido permitió establecer el contenido de nitrógeno presente en la muestra. Para la preparación de soluciones y cálculos véase Anexo I.

3.4.3. <u>Determinación de extracto etéreo</u>

Una muestra de 2.5 g fue pesada sobre papel filtro Whatman No. 42 y depositado en un capuchón de nitrocelulosa. El capuchón junto con la muestra fue secado a 100 ^{o}C, después de 2 horas se puso el capuchón dentro del extractor y se adicionó 80 ml de éter etílico. Algodón absorbente fue ubicado por encima y debajo del sobre que contenía la muestra dentro del capuchón de extracción presionando ligeramente, esto se realizo con el fin de evitar perdidas de muestra. La grasa extraída de la muestra por el éter durante 4 horas fue recogida en un balón previamente pesado. El balón fue puesto en una estufa a 100 ^{o}C por 60 minutos con el propósito de volatilizar el éter residual. Al termino de este periodo se colocó el balón en el desecador y posteriormente se pesó. Esta operación se repitió con periodos de 30 minutos en la estufa hasta la estabilización del peso del balón con la grasa. Los cálculos y notas importantes de éste análisis véase Anexo II.

3.4.4. Determinación de cenizas

En un crisol de porcelana pesado y que había sido previamente mantenido a 550 ^{o}C durante 30 minutos, se pesó 2 g de muestra. El crisol con la muestra fue puesto sobre un plato de calentamiento regulando la temperatura para evitar pérdidas por proyección del material. De esta manera se lograba eliminar el humo dentro de una campana extractora de gases. Seguidamente el crisol fue introducido en la mufla a 550 ^{o}C por 4 horas, después se sacó cuidadosamente de la mufla el crisol con las cenizas, se dejó enfriar en el desecador y se pesó con aproximación de 0.1 mg. La incineración fue repetida por varios periodos de 30 minutos enfriando y pesando hasta que no hubo disminución en el peso. Para los cálculos y notas véase Anexo III.

3.4.5. Determinación de Calcio y fósforo total

A las cenizas de 2 g de muestra que fueron tratadas a 550 ^{o}C por 4 horas, se añadió 40 ml de ácido clorhídrico y varias gotas de ácido nítrico y se llevó hasta ebullición en un vaso de precipitación.

Luego de enfriar, se transfirió a un matráz de 200 ml y se diluyó a volumen con agua destilada, se homogenizó y filtró a través de papel filtro Whatman No 42.

Calcio

Del liquido filtrado se tomó 20 ml de la solución filtrada en un vaso de precipitación de 250 ml, se diluyó con agua destilada hasta 150 ml y se adicionó 10 ml de oxalato de amonio 4.2%. El pH fue ajustado entre 4.4 – 4.6 por medio de soluciones 0.1M de hidróxido de amonio y 0.1M de ácido clorhídrico. La solución fue calentada por 5 minutos y dejada luego en reposo.

El precipitado obtenido se lo filtró a través de papel filtro Whatman No. 42, posteriormente se lo lavó con 50 ml de solución de hidróxido de amonio y finalmente con agua destilada hasta que el agua del lavado no se enturbie en presencia de una solución de nitrato de plata. El precipitado fue transferido cuantitativamente desde el papel filtro con 130 ml de solución de ácido sulfúrico (5:125) a un vaso de precipitación. La solución fue titulada con permanganato de potasio 0.02N a una temperatura entre 70 y 80 ^{o}C. Para la preparación de soluciones y cálculos véase Anexo IV.

Fósforo total

Ocho mililitros del liquido de filtrado se pusieron en un matráz de 100 ml, donde se añadió 20 ml de reactivo molibdovanadato y suficiente cantidad de agua destilada para llegar a 100 ml. Después de 10 minutos se leyó en el espectrofotómetro la absorbancia a 400 nm utilizando como blanco el estándar de 5 ml de la curva de calibración. La preparación de la curva estándar y de las soluciones véase Anexo V.

3.5. ENSAYOS BIOLOGICOS

Reproductores *L. vannamei* fueron trasladados desde la camaronera Expofruto ubicada en Engunga (Prov. del Guayas) hasta el set de maduración del CENAIM, transportados individualmente en tubos de PVC de 5 cm de diámetro y 2.5 cm de largo, en 2 tanques de 2 toneladas con agua de mar a 34 ^{o}C y 28.9 ups.
Camarones (16 machos y 16 hembras) en estadío de post-muda tardía B, fueron seleccionados y colocados en 4 tanques azules de 2 toneladas con 4 compartimentos individuales cada uno. La asignación de los animales se hizo aleatoriamente manteniendo la relación macho – hembra de 1:1. El sistema de cultivo fue mantenido a 28^{o}C, 35±0.33 ups con una aireación constante, recambio de agua continuo de 200%, fotoperiodo natural y alimentados a las 03h00 y 12h00 a razón del 5% de la biomasa. Las exuvias y las heces fueron removidas diariamente.

3.5.1. Determinación de la tasa de ingestión

Este ensayo duró 15 días, los pesos de los animales se registraron antes y después del experimento. Los camarones fueron alimentados a las 03h00 utilizando una linterna con luz azul, y a las 12h00. Dos horas después (05h00 y 14h00) se recolectó con un sifón el alimento no consumido, sobre canastas con ojo de malla de 500 μ pesadas y rotuladas previamente. El pellet recogido sin materia fecal fue secado a 60 ºC por 24 horas, pasado este tiempo las mallas conteniendo el pellet seco fueron pesadas.

La cantidad de alimento suministrado diariamente fue calculado con la siguiente fórmula :

$$\frac{\#\ \text{animales} \times W_{promedio} \times \%\ \text{alimentación}}{100}$$

Los cálculos para determinar el consumo de alimento se hicieron en base seca de la siguiente manera:

El peso real del alimento proporcionado se obtuvo multiplicando el peso del alimento dado por el factor de estabilidad (RMS) a 120 minutos.

$$W_{real} = W_{dado} \times RMS_{120'}$$

Del peso total después del secado se restó el peso de la malla vacía para obtener el peso del alimento sobrante después de 2 horas.

$$W_{sobrante} = W_{total} - W_{malla}$$

El peso del alimento ingerido fue calculado como:

$$W_{ingerido} = W_{real} - W_{sobrante}$$

Se determinó la tasa de ingestión diaria por animal mediante la fórmula:

$$\text{Tasa de ingestión} = \frac{W_{ingerido}}{W_{animal}} \times 100$$

3.5.2. Determinación de digestibilidad

Durante el ensayo de determinación de la tasa de ingestión las heces fueron colectadas 4 horas después (07h00 y 16h00) de cada alimentación mediante sifoneo del fondo del tanque. El material fecal recogido en mallas fue suavemente lavado con agua destilada y almacenados en tubos eppendorf de 1.5 ml a – 20 ºC.

Después del periodo de colección, las heces fueron centrifugadas y liofilizadas, así como, cuidadosamente homogenizadas y almacenadas a – 20 ºC hasta el análisis.

Las muestras de dietas y heces fueron analizadas para establecer el contenido de proteína y óxido de cromo de acuerdo a Forster y Gabbot (1971) y Mc. Ginnis y Kasting (1964) respectivamente, (Anexos VI y VII).

La digestibilidad aparente de proteína (DAP) y la digestibilidad aparente de materia seca (DAMS) fueron calculadas por las ecuaciones :

$$\%DAP = 100 - 100 \text{ x} \left[\frac{\%Cr_2O_3 \text{ dietas}}{\%Cr_2O_3 \text{ heces}} \text{ x } \frac{\%\text{Prote'na heces}}{\%\text{Prote'na dietas}} \right]$$

$$\%DAMS = \left[1 - \frac{\%Cr_2O_3 \text{ dietas}}{\%Cr_2O_3 \text{ heces}} \right] \text{x } 100$$

3.5.3. Determinación del desarrollo gonadal

Concluidos los ensayos de tasa de ingestión y de digestibilidad, las hembras fueron pesadas y extirpadas el pedúnculo del ojo que se observaba más afectado. La herida fue cicatrizada con una pinza esterilizada caliente.

Las hembras ablacionadas fueron externamente examinadas a diario por 12 días, para establecer estadío de maduración ovárica de acuerdo a la clasificación descrita por Wouters *et al.* (2001a).

Estadío 0 (inmaduro) = ovarios delgados y translúcidos, no visibles a través del exoesqueleto.

Estadío 1 (maduración temprana) = ovarios blanco – amarillos, lóbulo medio no visibles.

Estadío 2 (maduración media) = ovarios gris – amarillos, lóbulos anterior y posterior con mayor diámetro que en el estado precedente.

Estadío 3 (maduración tardía) = ovarios anaranjados, el lóbulo medio se hace visible.

Estadío 4 (maduración completa) = ovarios verde – rojos, lóbulos anterior, medio y posterior largos.

Al final de este periodo de seguimiento se determinó el peso y supervivencia y se sacrificaron las hembras para disectar y pesar las gónadas y el hepatopáncreas. depositándolos en pequeñas bandejas de aluminio taradas previamente. Mediante las siguientes fórmulas se determinó el :

$$IGS = \frac{W_{\text{g—nada}}}{W_{\text{animal}}} \text{x } 100 \qquad\qquad IHS = \frac{W_{\text{hepatop‡ncreas}}}{W_{\text{animal}}} \text{x } 100$$

Adicionalmente, el contenido de materia seca se determinó con los pesos obtenidos después de secar las gónadas y hepatopáncreas en una estufa a 60 ^{o}C por 24 horas.

3.6. ANALISIS ESTADISTICOS

Los resultados obtenidos de cada experimento fueron sometidos a la prueba de Bartlett para verificar homogeneidad de varianzas. Cuando los datos no pasaron la prueba, según el caso, fueron ajustados mediante transformaciones arcoseno Y (estabilidad, DAP, DAMS), Log. Y (lixiviación de aminoácidos, hidroabsorción). Y^{x} (lixiviación de proteínas). Los datos fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías, para ver el efecto del tipo y concentración de aglutinantes sobre los parámetros evaluados, las diferencias significativas entre tratamientos fueron determinadas mediante la prueba de rango múltiple de Fisher o LSD a un nivel de

Se usaron los programas estadísticos Data desk 6.1 y STATISTICA 4.1.

4. RESULTADOS

4.1 CALIDAD DE LAS DIETAS

En la tabla 2 se presentan los niveles de humedad obtenidos con las dietas experimentales, los mismos que fluctúan en un rango de 8 a 10%.

Tabla 2. Contenido de humedad de las dietas empleadas en las diferentes pruebas de calidad física

Aglutinantes	Código[1]	Humedad (%)[2]
Agar	A3	9.20±0.00
Alginato de sodio	B3	9.98±0.03
Almidón de yuca	C3	9.20±0.00
Gelatina	D3	10.38±0.03
Gluten de trigo	E3	9.58±0.03
Harina de kelp	F3	9.38±0.26
Agar	A5	8.80±0.00
Alginato de Sodio	B5	9.58±0.03
Almidón de yuca	C5	9.56±0.00
Gelatina	D5	10.98±0.31
Gluten de trigo	E5	10.38±0.03
Harina de kelp	F5	10.00±0.01

[1] 3 y 5 representan el porcentaje de inclusión del respectivo aglutinante de la dieta
[2] Medias de los valores ± Desviación estándar

Los resultados de la apreciación visual de la forma del pellet (tabla 3), demostraron que las dietas B3, B5 y E5 se mantuvieron compactos después de la inmersión en el agua (28 ^{o}C; 35 ups) por 180 minutos, y una agitación constante a 70 rpm, mientras que, las que presentaron mayor disgregación y por lo tanto, mayor turbidez del agua fueron A3 y A5.

Tabla 3. Apreciación visual de la estabilidad de los pellets en el agua

Clasificación	Dietas
Grupo 1	B3 - B5 - E5
Grupo 2	D3 - E3 - D5 - F5
Grupo 3	F3 - C5
Grupo 4	C3
Grupo 5	A3 - A5

* Los grupos fueron clasificados del mas al menos compacto

En la estabilidad siguiendo el método descrito por Obaldo *et al*. (2002), se determinó que las dietas A3, B3, C5 y D5 no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) en cuanto a pérdida de materia seca a partir de los 90 minutos de inmersión, que alcanzó un ˜16% (figura 1a). En las dietas C3 y D3,a las 2 horas, la pérdida fue de ˜20% manteniéndose sin diferencias por 1 hora mas, mientras que en éste mismo tiempo, la dieta F5 registró una pérdida de ˜15%. Los aglutinantes E3 y F3 presentaron una pérdida continua de materia seca hasta los 120 y 90 minutos de inmersión respectivamente, produciéndose nuevamente un significativo aumento a los 180 (17.83) y 150 (18.43) minutos. Por otra parte, la dieta A5 muestra la mayor perdida de materia seca a la hora y de ahí en adelante no se reporta una significativa ($p>0.05$) disminución de la estabilidad.

En general, los aglutinantes ensayados al 3 y 5% presentaron una retención de materia seca de hasta ˜78% a los 180 minutos de inmersión, a excepción de los tratamientos con alginato de sodio (B5) y gluten de trigo (E5) al 5% que registraron una estabilidad por encima del 88.7 y 86.7% respectivamente. Los aglutinantes, agar, almidón de yuca y gelatina en los dos niveles de inclusión dietética mostraron tener la menor capacidad para mantener cohesionados a los ingredientes que conformaban la dieta. A las 3 horas de inmersión las dietas que contenían éstos aglutinantes tuvieron una pérdida acumulada de aproximadamente 20%.

Los resultados obtenidos en la prueba de estabilidad descrita por Wouters *et al*. (2001), (figura 1b) mostraron que la capacidad de retener materia seca de los aglutinantes A3, B3 y D3 fue reduciéndose significativamente ($p<0.05$) hasta las 2 horas de inmersión en agua, y en E3 y F3 desde los 90 minutos produciéndose una ligera disminución a las 2 horas. Por otra parte, A5 alcanzó una similar retención de materia seca desde los 150 minutos en adelante. En la mayoría de las dietas se evidenció una similar tendencia de reducir significativamente la estabilidad a medida que el pellet permanece por mas tiempo inmerso en agua. En términos generales, las dietas B5 y E5 presentaron una pérdida de materia seca no mayor al 20%, mientras que en los otros aglutinantes éste valor fue de hasta 55% aproximadamente, luego de 3 horas de evaluación.

La tabla 4a muestra los resultados de la prueba de estabilidad de las dietas en el agua comparando las 2 concentraciones en cada uno de los tiempos evaluados.

Mediante el método de LSD se determinó que la inclusión de 5% de aglutinantes produjo una significativa ($p<0.05$) mayor estabilidad que las dietas con 3% de los respectivos aglutinantes en el minuto 120 (*según la prueba de Obaldo et al., 2002*). El gluten de trigo (E) en las dos concentraciones, a pesar de ser estadísticamente diferente solo a 30 y 120 minutos de inmersión, la inclusión al 5% mostró una mayor capacidad de aglutinación.

Las diferencias en el porcentaje de inclusión del agar (A) y harina de kelp (F) se reflejó únicamente a los 120 y 90 minutos respectivamente, alcanzando la mejor estabilidad en estos tiempos la dietas con el 5%. Por otro lado, un aumento de inclusión del 3% al 5% de almidón de yuca (C) no significa una mayor retención de materia

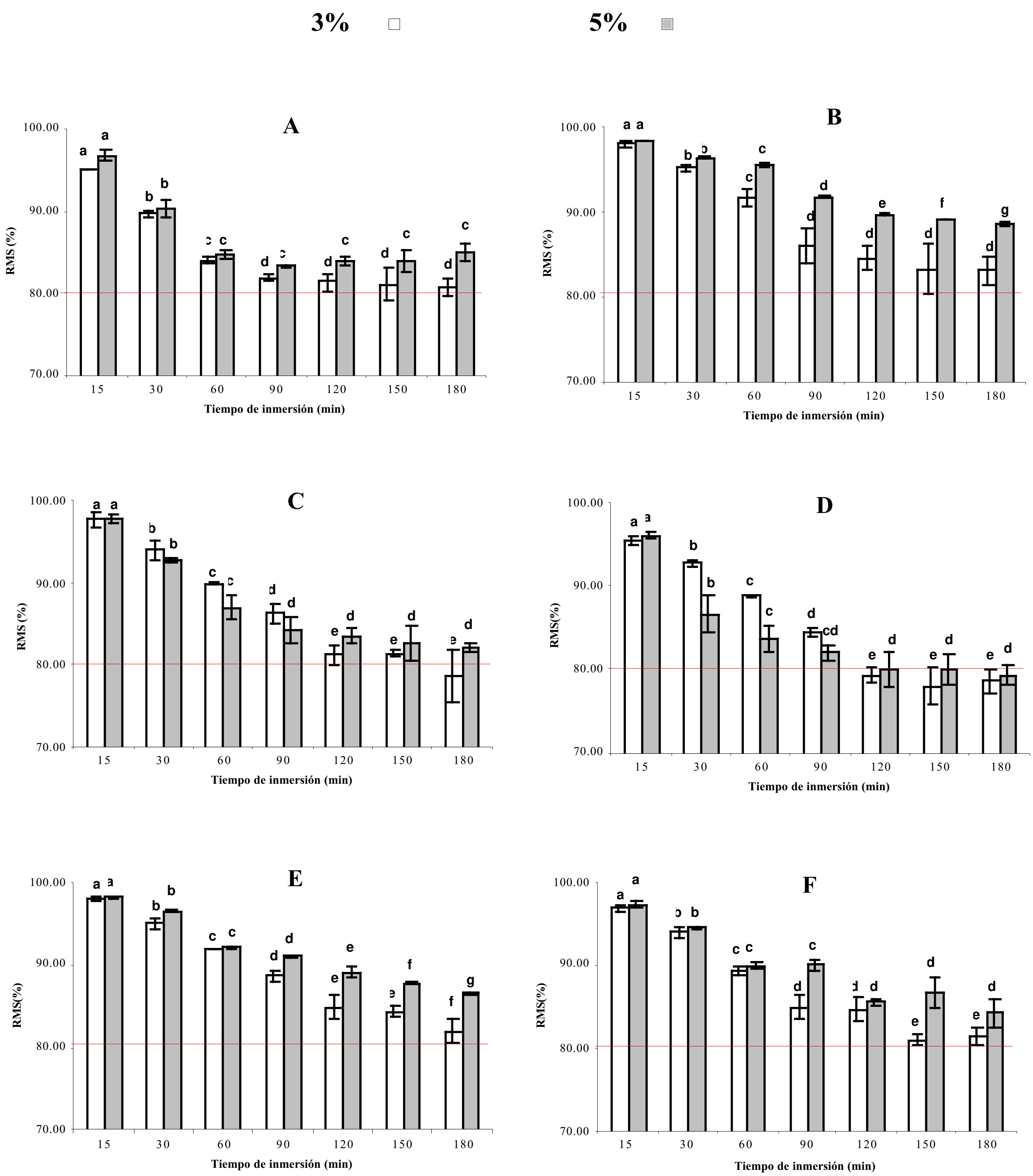

Figura 1a. Retención de materia seca de las dietas con inclusión de aglutinantes al 3 y 5% en función del tiempo de inmersión (según el método descrito por Obaldo *et al*., 2002)

* letras iguales en barras del mismo color no son significativamente diferentes (p<0.05)

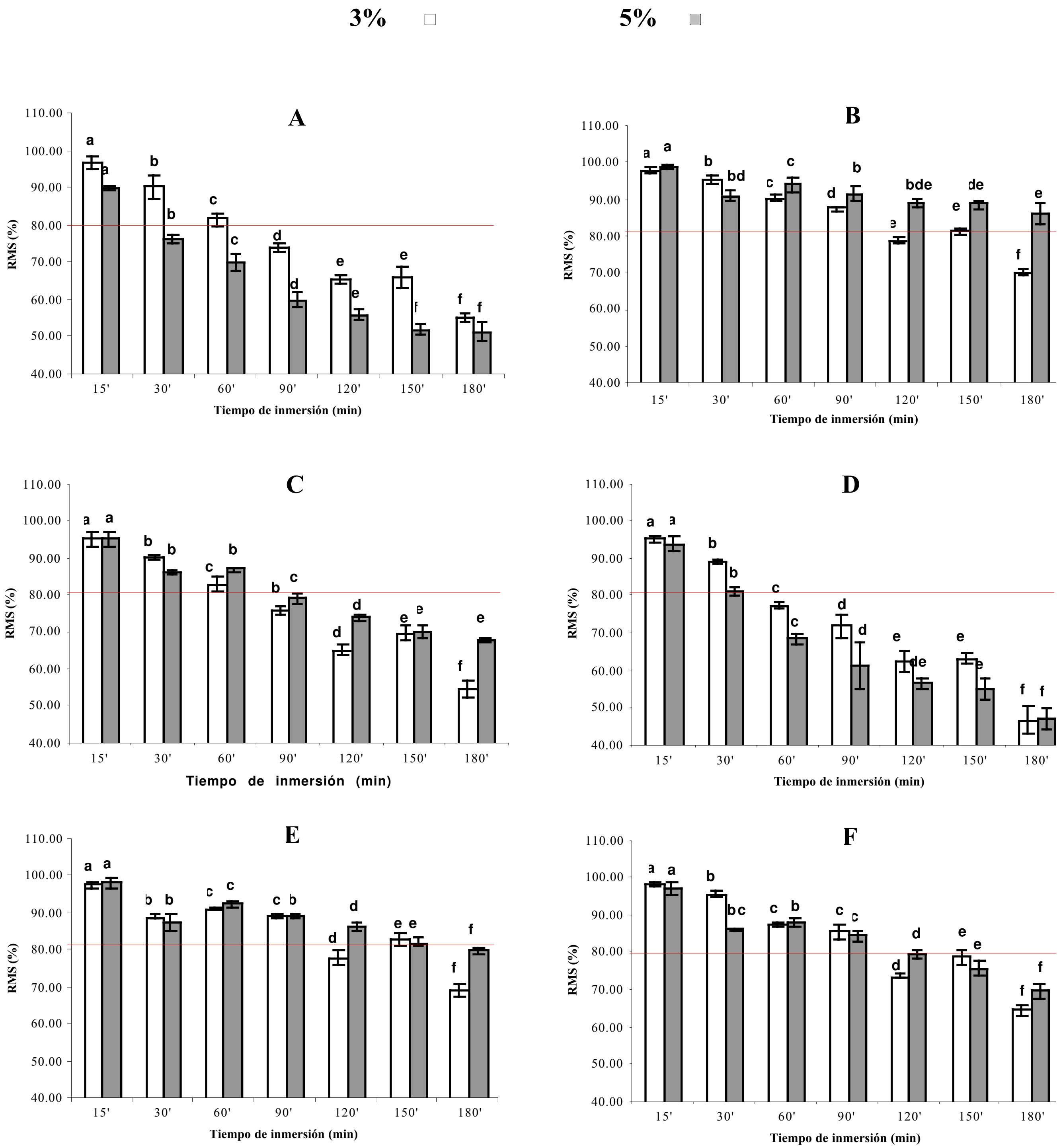

Figura 1b. Retención de materia seca de las dietas con inclusión de aglutinantes al 3 y 5% en función del tiempo de inmersión (según el método reportado por Wouters *et al*., 2001d)

* letras iguales en barras del mismo color no son significativamente diferentes (p<0.05)

La tabla 4b (*estabilidad según Wouters et al., 2001d*) indica que adición de un 5% de agar (A) y gelatina (D) no representa un aumento significativo ($p<0.05$) de la estabilidad de las dietas en todos los tiempos evaluados, comparando con las dietas que tuvieron 3% de inclusión de éstos aglutinantes.

Siendo además, éstos aglutinantes al 5% los que presentaron la más pobre retención de materia del presente estudio. Así mismo, la dieta con almidón de yuca al 5% produce una menor estabilidad a los 30 minutos frente a la dieta con inclusión de 3%. Los valores más representativos en términos de estabilidad se alcanzaron con alginato de sodio y gluten de trigo. No se registraron diferencias significativas en el nivel de inclusión de éstos aglutinantes en los primeros 15 minutos, a los 30 minutos de inmersión se produjo una mayor pérdida de materia seca con el 5% de inclusión, y a partir de 1 hora en adelante, la retención de materia seca del alginato de sodio y gluten de trigo fue significativamente mayor ($p<0.05$) al 5% comparando con las dietas con 3%.

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos en términos de hidroabsorción. La mayoría de los aglutinantes alcanzaron porcentajes de absorción de agua en forma variable en función del tiempo, indistintamente del nivel de inclusión. Sin embargo, en las dietas A3 y D5 no se produjeron incrementos significativos ($p>0.05$) de hidroabsorción desde los primeros 15 minutos hasta el término del periodo evaluado, siendo ésta última dieta la que menos agua absorbió. En tanto que, en la dieta B5 el porcentaje de hidroabsorción fue aumentando significativamente ($p<0.05$) hasta los 150 minutos, tiempo en el que registró un incremento de peso del 100% en agua. Del mismo modo, las dietas A5 y B3 registraron la más alta absorción de agua después de 3 horas de inmersión, duplicando aproximadamente su peso inicial. En los otros tratamientos se alcanzaron valores entre 50 y 86% de hidroabsorción después de permanecer 180 minutos en agua.

Los porcentajes de hidroabsorción del aglutinante en las 2 concentraciones, en función del tiempo de inmersión en agua, presentaron valores que variaron de 41 a 130 (tabla 5).

Tabla 4a. Estabilidad del pellet en el agua evaluada en función del porcentaje de inclusión del aglutinante y del tiempo de inmersión (según método descrito por Obaldo *et al*., 2002)

Dietas	Tiempos de inmersión en agua (min)						
	15	30	60	90	120	150	180
A3	95.34±0.00a	89.71±0.35b	84.19±0.34a	82.05±0.41a	81.47±1.10b	81.19±2.00a	80.84±0.94a
B3	98.19±0.33a	95.32±0.36e	91.77±1.11d	86.01±2.11cd	84.65±1.46c	83.41±2.93a	83.21±1.74a
C3	97.85±0.86a	94.15±1.21de	90.03±0.15c	86.36±1.18ad	81.33±1.09ab	81.43±0.41a	78.79±3.18a
D3	95.46±0.57a	92.92±0.45c	88.93±0.11c	84.56±0.52bc	79.36±0.94a	78.13±2.23a	78.76±1.45a
E3	98.14±0.25a	95.11±0.74de	92.01±0.05d	88.84±0.72e	85.05±1.51c	84.54±0.69a	82.17±1.59a
F3	97.01±0.39a	94.04±0.67cd	89.48±0.58c	85.10±1.46cd	84.81±1.41c	81.08±0.68a	81.57±1.17a
A5	96.83±0.78a	90.41±1.10b	84.86±0.54a	83.46±0.14ab	84.05±0.55c	83.99±1.23a	85.14±1.15a
B5	98.53±0.09a	96.59±0.16f	95.68±0.23c	91.86±0.23f	89.79±0.10d	89.24±0.00a	88.66±0.13a
C5	97.86±0.52a	92.81±0.28c	87.04±1.47b	84.34±1.51bci	83.62±0.97c	82.24±2.10a	82.25±0.63a
D5	96.13±0.48a	86.78±2.16a	83.75±1.55a	82.12±0.94a	80.13±1.96b	80.09±1.81a	79.40±1.09a
E5	98.35±0.10a	96.69±0.11f	92.28±0.15d	91.18±0.15ef	89.15±0.67d	87.87±0.18a	86.72±0.12a
F5	97.38±0.46a	94.66±0.09de	90.09±0.38c	90.29±0.64ei	85.68±0.43c	86.91±1.87a	84.38±1.74a

* Porcentajes (medias±DS) en las columnas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

Tabla 4b. Estabilidad del pellet en el agua evaluada en función del porcentaje de inclusión del aglutinante y del tiempo de inmersión (según método reportado por Wouters *et al*., 2001d)

Dietas	Tiempo de inmesión en agua (min)						
	15	30	60	90	120	150	180
A3	97.27±1.44cd	90.66±3.34e	81.97±1.54c	74.22±1.04b	65.87±1.08c	66.29±2.52b	55.68±1.38c
B3	98.33±0.98d	95.60±0.95f	90.68±0.92e	87.84±0.63de	79.27±0.75e	81.68±0.82f	70.56±1.04e
C3	95.41±1.94bc	90.51±0.78de	83.15±1.88c	76.09±0.90bc	65.26±1.53c	70.14±2.09c	54.70±2.41bc
D3	95.40±0.64bc	89.32±0.77de	77.67±0.96b	72.04±3.06b	62.38±2.79b	63.29±1.59b	46.78±3.76a
E3	97.81±0.84d	89.29±0.65f	91.51±0.31ef	89.68±0.74ef	78.15±2.00e	83.27±1.57f	69.42±1.91e
F3	98.35±0.55d	95.79±0.86f	87.68±0.62d	85.74±2.20d	73.85±0.76d	78.86±2.22e	64.77±1.40d
A5	90.22±0.52a	76.68±1.36a	70.30±1.99a	60.37±2.04a	56.27±1.40a	52.44±1.43a	51.62±2.74b
B5	99.08±0.32d	91.53±1.69e	94.48±1.99g	91.89±1.96f	89.30±0.82g	88.93±0.59g	86.35±0.85g
C5	95.21±1.96bc	86.24±0.51c	87.16±0.60d	79.07±1.40c	74.08±0.88d	70.25±1.71c	68.26±0.75e
D5	94.07±2.10b	81.67±1.11b	68.69±1.40a	61.52±6.39a	56.90±1.47a	55.35±2.57a	47.25±2.52a
E5	98.54±1.38d	87.94±2.34cd	92.87±0.96f	89.62±0.55ef	86.52±1.16f	82.47±1.34f	80.04±0.84f
F5	97.42±1.40cd	86.48±0.32c	88.14±1.13d	84.71±1.60d	79.81±1.30e	75.92±1.82d	69.85±1.76e

* Porcentajes (medias±DS) en las columnas con las mismas letras no son significativamente diferentes (p>0.05)

El almidón de yuca (C) y gelatina (D) fueron los únicos 2 aglutinantes que mostraron una mayor capacidad para absorber agua cuando fueron incluidos al 3%. De manera general, la mayor absorción de agua se produce al menor porcentaje de inclusión (3%).
Así, las dietas A3 y B3 absorbieron más agua hasta los 30, frente a las dietas A5 y B5, de esto, las dietas A5 y B5 fueron las de mayor hidroabsorción después de 180 minutos de inmersión, no existiendo diferencias estadísticas ($p>0.05$). La dieta con harina de kelp (F) no registró diferencias significativas con relación al nivel de inclusión, las dietas E3 y E5 fueron significativamente diferentes ($p<0.05$) solo a los 60 minutos de estar sumergido el pellet en agua, del mismo modo, B3 y B5 registraron diferencias únicamente en los primeros 15 minutos de inmersión.

En la lixiviación de componentes hidrosolubles, la figura 3 muestra que la pérdida de proteínas es directamente proporcional al tiempo de inmersión.

Cada uno de los tratamientos presentaron diferencias ($p<0.05$) variables en los tiempos evaluados. Sin embargo, un ligero aumento en la pérdida de proteína se evidenció entre los 60 y 90 minutos de inmersión para casi todas las dietas.

La inclusión al 5% del gluten de trigo produjo significativamente ($p<0.05$) las menores lixiviaciones de proteína en cualquiera de los tiempos evaluados al comparar con las dietas con 3% de éste aglutinante, siendo no más del 1% luego de 3 horas de inmersión (tabla 6). Por otro lado, las dietas A y C evidenciaron una menor pérdida por lixiviación hasta los 120 minutos, cuando el aglutinante fue incluido al 3%. Del mismo modo, la lixiviación de las dietas B5 y D5 fue mayor a los 30 y 90 minutos de inmersión respectivamente frente a B3 y D3.

La pérdida de aminoácidos aromáticos por lixiviación en este estudio, se relacionó con la absorbancia leída a 260 nm. En todos los tratamientos se evidenció un aumento significativo de la absorbancia ($p<0.05$) hasta los 120 minutos, y desde ese momento,

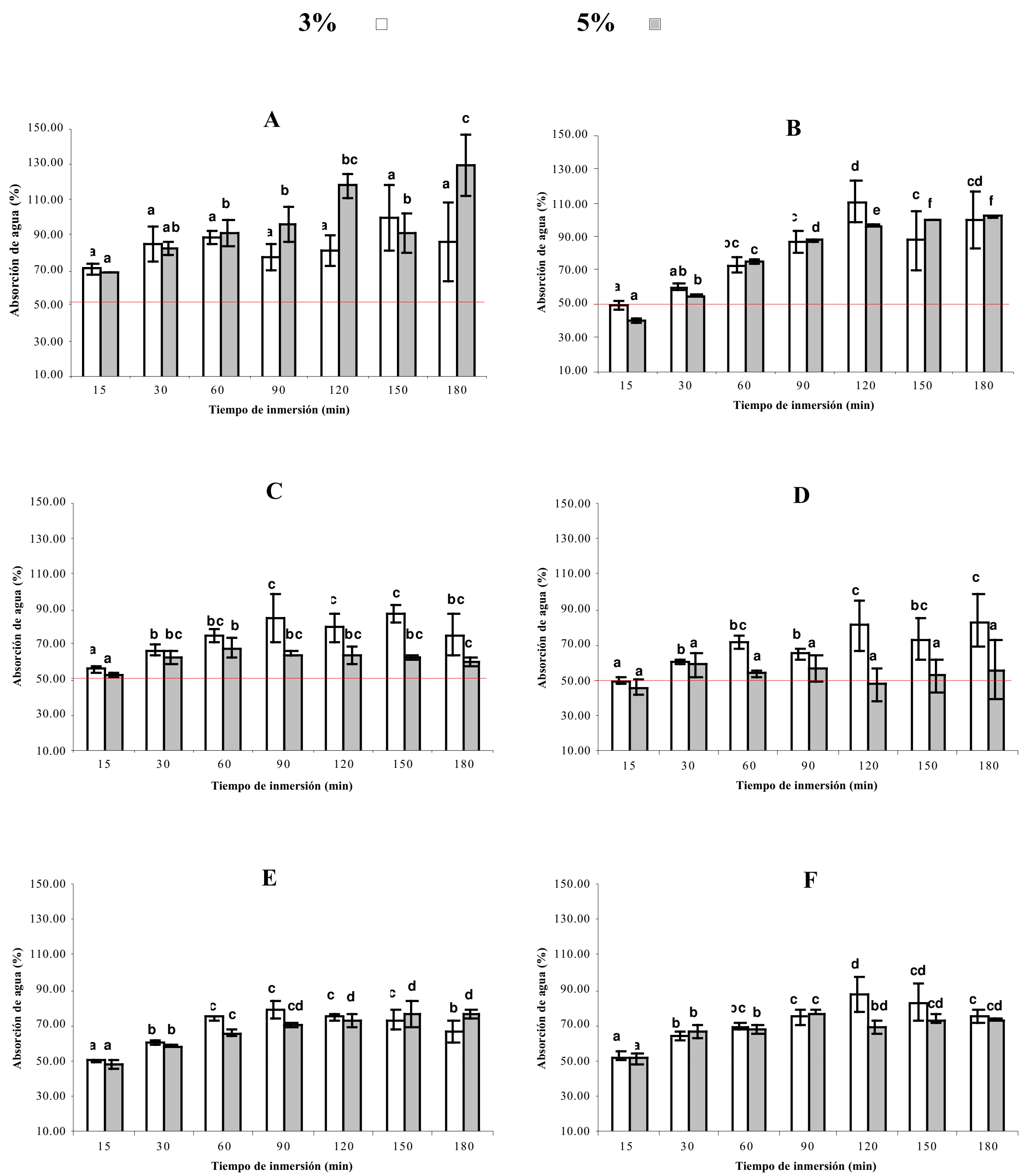

Figura 2. Absorción de agua, de las dietas evaluadas con aglutinantes al 3 y 5% en función del tiempo de inmersión

* letras iguales en barras del mismo color no son significativamente diferentes (p<0.05)

Tabla 5. Hidroabsorción de las dietas evaluadas en función del porcentaje de inclusión del aglutinante y del tiempo de inmersión

* Porcentajes (medias±DS) en las columnas con las mismas letras no son significativamente diferentes (p>0.05)

Dietas	Tiempos de inmersión en agua (min)						
	15	30	60	90	120	150	180
A3	71.14±3.26f	84.78±9.92a	89.28±3.55e	77.49±7.28bcd	81.91±8.37cde	110.18±18.36eg	86.21±22.27cd
B3	49.74±2.38bcd	59.93±1.94a	73.35±4.37cd	87.30±6.84de	111.43±12.80f	88.56±17.37cef	99.95±16.70d
C3	56.55±2.13e	66.98±2.90a	75.51±3.88d	85.52±12.97cde	80.10±7.97bcde	87.86±5.04cef	76.30±11.90bc
D3	49.92±1.89bcd	61.09±1.43a	72.29±3.73bcd	65.58±3.13ab	81.58±14.54bcde	73.95±11.18bc	83.82±14.64cd
E3	50.50±0.43cd	61.13±1.61a	75.29±1.29d	79.84±4.85bcd	75.56±2.28bcd	75.31±5.75cd	67.00±6.08abc
F3	53.15±2.52ce	64.54±2.41a	70.07±2.10bcd	75.48±4.80bc	88.41±9.90ce	84.06±10.51cef	75.58±3.77bc
A5	69.85±0.23f	83.11±3.30a	91.39±7.04e	96.59±10.17e	117.99±6.94f	91.43±10.71efg	130.32±17.27e
B5	41.00±1.35a	55.43±0.49a	75.66±0.62d	88.16±0.47de	97.03±0.50ef	100.50±0.50efg	102.48±0.48de
C5	53.53±1.62e	63.73±3.69a	68.18±5.56bc	65.08±1.07ab	64.52±5.12b	63.69±1.63abd	63.69±1.63ab
D5	46.94±3.61bc	59.90±6.90a	54.51±1.65a	57.55±7.65a	48.14±9.48a	53.32±9.24a	53.32±9.24a
E5	48.77±2.44bc	58.98±0.67a	66.71±2.18b	71.00±1.81b	73.81±4.25ec	77.27±7.49cd	77.40±2.43bc
F5	51.88±2.64cd	67.11±3.98a	68.42±2.70bc	78.11±0.86bc	70.16±3.48e	74.25±2.53cd	74.14±0.42bc

manteniéndose constante hasta los 150 minutos de inmersión (figura 4). Solo la dieta A5 registró un incremento de absorbancia hasta los 60 minutos (0.593±0.048), hasta 180 minutos. Todas las dietas sufrieron un significativo aumento a las 3 horas de estar sumergido en agua.

En esta prueba, (tabla 7) a pesar de no existir diferencias significativas ($p>0.05$) en el nivel de inclusión del aglutinante entre los tratamientos a partir de los 60 minutos de inmersión en agua, al 5% se registraron las mas altas absorbancias hasta los 90 y 120 minutos de inmersión, excepto las dietas E5 y B5. La dieta con alginato de sodio (B) fue estadísticamente diferente ($p<0.05$) entre los 2 niveles de inclusión hasta los 30 minutos, siendo B5 la que registró la menor absorbancia a 260 nm.

En general, las dietas que contenían como aglutinantes alginato de sodio y gluten de trigo al 5% (B5 y E5 respectivamente), mostraron ser las mejores.

Tanto los análisis estadísticos como los de apreciación visual indican, que éstas dietas retienen mayor cantidad de materia seca, los compuestos hidrosolubles lixivian en menor proporción y en el caso de la dieta B5 absorbe la mayor cantidad de agua. Adicionalmente, estas dietas conservan su forma o estructura intacta después de 180 minutos de inmersión, poseen escasa disgregación de materia produciendo una menor turbidez del agua.

Estos criterios sirvieron para elegir las dietas que se utilizaron en los ensayos de aceptabilidad del alimento por parte de los reproductores, resultando: alginato de sodio 5%, gluten de trigo 5%, una combinación de 2.5% alginato de sodio y 2.5% gluten de trigo, y como control harina de trigo 5%.

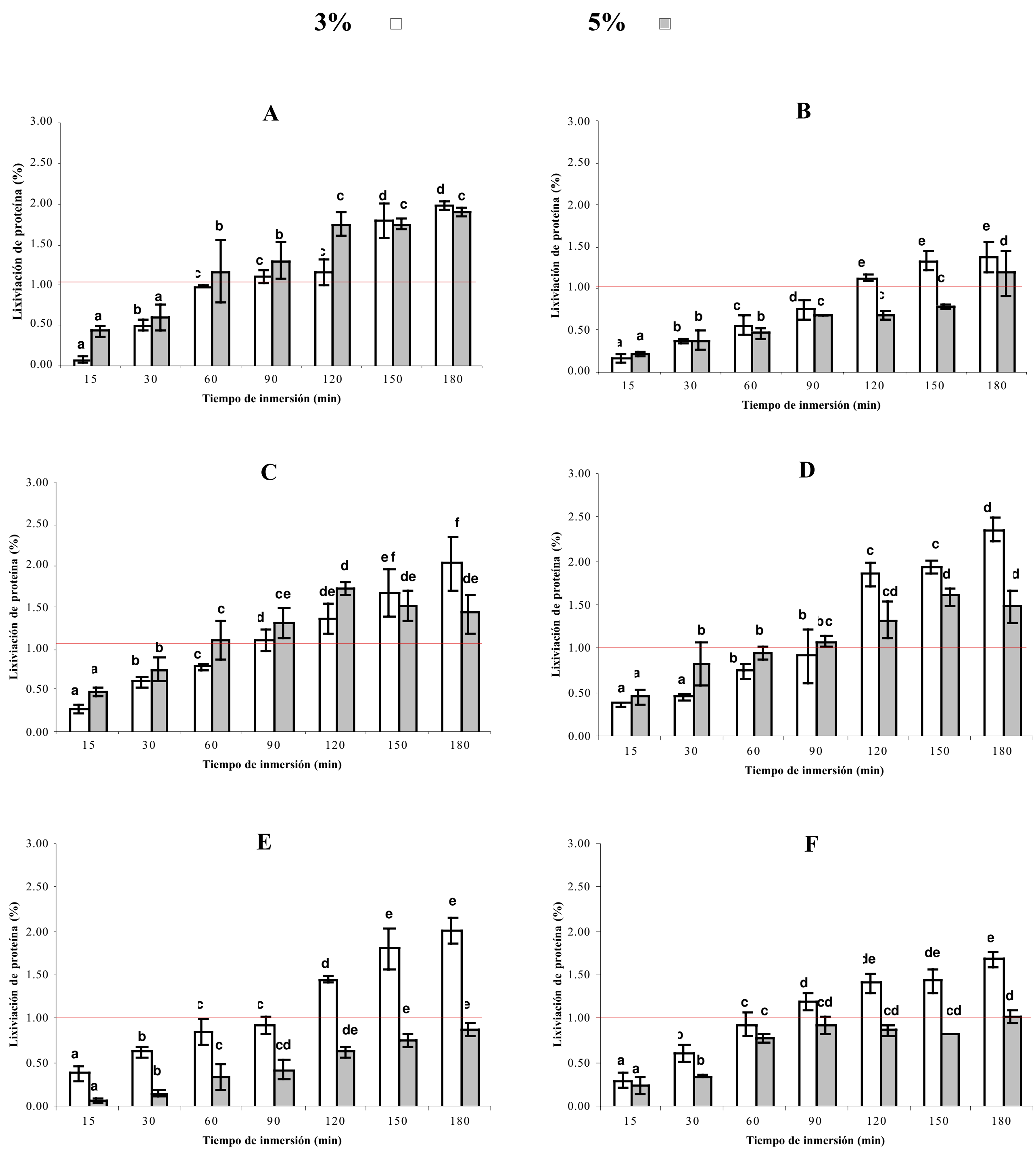

Figura 3. Pérdidas de proteínas por lixiviación de las dietas con inclusión de aglutinantes al 3 y 5% en función del tiempo de inmersión
* letras iguales en barras del mismo color no son significativamente diferentes (p<0.05)

Tabla 6. Lixiviación de proteínas en las dietas evaluadas en función del porcentaje de inclusión del aglutinante y del tiempo de inmersión

	Tiempo de inmersión en agua (min)						
Dietas	15	30	60	90	120	150	180
A3	0.09±0.05a	0.51±0.07c	0.99±0.02cd	1.11±0.09de	1.17±0.17c	1.80±0.21cde	1.98±0.05ef
B3	0.17±0.06bc	0.37±0.02b	0.55±0.11b	0.75±0.12bc	1.13±0.05c	1.34±0.11b	1.39±0.18cd
C3	0.29±0.07cd	0.61±0.06cd	0.80±0.05c	1.12±0.13de	1.37±0.17d	1.68±0.29cd	2.04±0.32ef
D3	0.38±0.02def	0.46±0.04bc	0.77±0.09c	0.93±0.30cd	1.87±0.14e	1.95±0.08e	2.37±0.13f
E3	0.39±0.09def	0.64±0.07ce	0.87±0.14cd	0.94±0.09cd	1.47±0.05d	1.83±0.23de	2.02±0.15ef
F3	0.32±0.09cdf	0.63±0.10ce	0.95±0.13cd	1.21±0.10e	1.43±0.10d	1.46±0.13bc	1.69±0.09de
A5	0.43±0.05df	0.61±0.16cd	1.17±0.38d	1.30±0.23e	1.75±0.15e	1.75±0.06cde	1.92±0.05e
B5	0.22±0.03c	0.38±0.11b	0.47±0.06ab	0.68±0.01b	0.69±0.05a	0.79±0.02a	1.20±0.27bc
C5	0.49±0.06f	0.76±0.14de	1.12±0.24d	1.32±0.18e	1.74±0.08e	1.53±0.17c	1.43±0.23cd
D5	0.47±0.09f	0.84±0.24e	0.98±0.08cd	1.10±0.06de	1.34±0.20d	1.61±0.10cd	1.50±0.18d
E5	0.08±0.03a	0.16±0.03a	0.34±0.15a	0.44±0.11a	0.65±0.06a	0.77±0.07a	0.89±0.07a
F5	0.26±0.10ce	0.36±0.02b	0.80±0.06cd	0.94±0.11cd	0.88±0.05b	0.84±0.00a	1.04±0.07ab

* Porcentajes (medias±DS) en las columnas con las mismas letras no son significativamente diferentes (p>0.05)

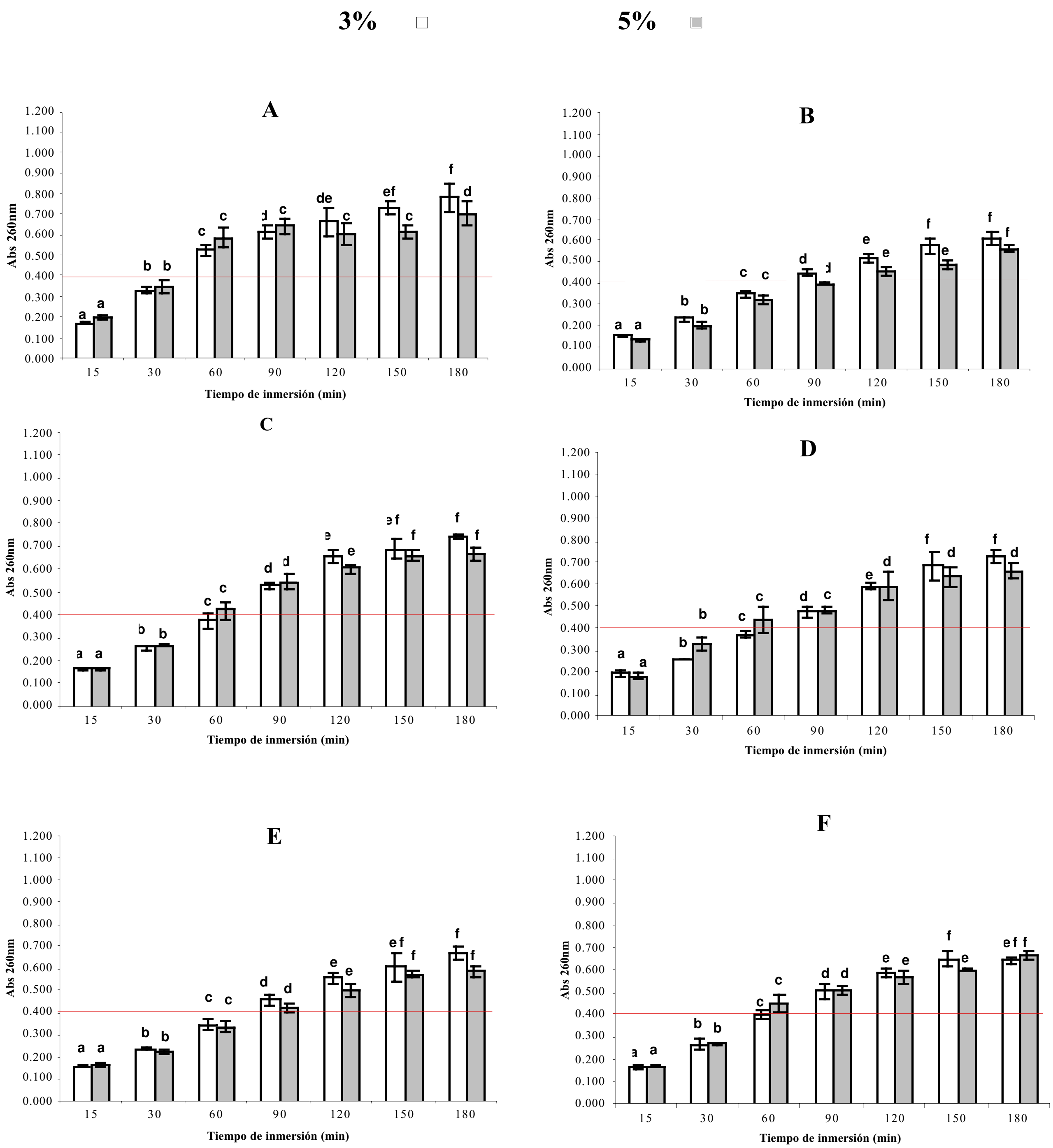

Figura 4. Pérdidas de aminoácidos aromáticos por lixiviación de las dietas con inclusión de aglutinantes al 3 y 5% en función del tiempo de inmersión
* letras iguales en barras del mismo color no son significativamente diferentes (p<0.05)

Tabla 7. Lixiviación de aminoácidos aromáticos en las dietas evaluadas en función del porcentaje de inclusión del aglutinante y del tiempo inmersión

	Tiempo de inmersión en agua (min)						
Dietas	15	30	60	90	120	150	180
A3	0.175±0.005cd	0.334±0.019e	0.530±0.031a	0.624±0.033a	0.670±0.072a	0.735±0.030a	0.788±0.069a
B3	0.156±0.004b	0.236±0.012b	0.351±0.013a	0.451±0.014a	0.523±0.019a	0.575±0.035a	0.609±0.033a
C3	0.168±0.005bc	0.262±0.010cd	0.379±0.031a	0.537±0.015a	0.662±0.031a	0.693±0.042a	0.748±0.010a
D3	0.200±0.017ef	0.267±0.004cd	0.380±0.014a	0.478±0.023a	0.598±0.012a	0.695±0.063a	0.735±0.034a
E3	0.166±0.003bc	0.245±0.005bc	0.354±0.026a	0.466±0.022a	0.565±0.026a	0.612±0.061a	0.673±0.033a
F3	0.166±0.011bc	0.271±0.022d	0.407±0.019a	0.509±0.034a	0.592±0.019a	0.654±0.034a	0.648±0.015a
A5	0.202±0.009f	0.348±0.032e	0.593±0.048a	0.647±0.036a	0.609±0.053a	0.620±0.031a	0.709±0.060a
B5	0.139±0.004a	0.203±0.016a	0.328±0.019a	0.404±0.004a	0.456±0.024a	0.489±0.017a	0.565±0.010a
C5	0.171±0.005c	0.269±0.004cd	0.425±0.040a	0.547±0.034a	0.606±0.022a	0.664±0.029a	0.670±0.027a
D5	0.187±0.014de	0.335±0.028e	0.443±0.057a	0.490±0.017a	0.600±0.063a	0.645±0.046a	0.666±0.035a
E5	0.167±0.006bc	0.231±0.010b	0.341±0.022a	0.429±0.021a	0.508±0.030a	0.583±0.016a	0.596±0.024a
F5	0.173±0.008c	0.277±0.006d	0.455±0.038a	0.514±0.020a	0.573±0.025a	0.607±0.006a	0.671±0.020a

* Valores de Absorbancia (medias±DS) en las columnas con las mismas letras no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

4.2 TASA DE INGESTIÓN Y DIGESTIBILIDAD

La tabla 8 muestra los resultados de los análisis bromatológicos de las dietas utilizadas en este experimento.

Tabla 8. Análisis proximales de las dietas utilizadas en los ensayos biológicos

Composición (% en base seca)	Alginato de sodio	Gluten de trigo	Alginato+gluten	Control
Humedad	9.7±0.1	8.7±0.1	10.1±0.0	10.1±0.0
Proteína	53±1.1	57.2±0.5	54.1±0.2	50.9±0.3
Grasa	8.7±0.0	9.1±0.0	8.7±0.0	8.4±0.0
Cenizas	10.2±0.1	9.1±0.2	9.7±0.0	9.1±0.0
Fósforo	0.96±0.0	0.92±0.0	0.95±0.0	0.91±0.0
Calcio	0.56±0.0	0.51±0.0	0.61±0.1	0.56±0.0

Camarones reproductores con un peso promedio de 38.4±2.9 (machos) y 43±4.1 (hembras) fueron alimentados con las dietas que contenían los mejores aglutinantes.

De acuerdo a los resultados observados en la figura 5, el consumo de alimento varía significativamente según el horario de alimentación siendo mayor a las 03h00 que a las 12h00. Utilizando LSD se pudo determinar que las dietas E5 y control mostraron la mayor tasa de ingestión a las 03h00 (2.06±0.33 y 2.03±0,61% respectivamente). A las 12h00 la dieta control presentó el mayor porcentaje de ingestión (1.31±0,40%) resultando estadísticamente diferente a las demás.

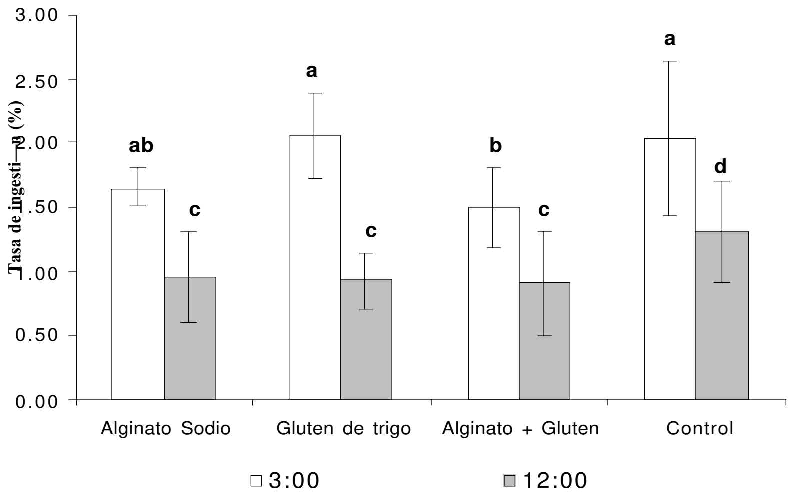

Figura 5. Tasa de ingestión de las dietas registrada para camarones *L. vannamei*, alimentados en dos horarios

* letras iguales en barras del mismo color no son diferentes significativamente (p>0.05)

No se encontraron diferencias significativas (p<0,05) en la tasa de ingestión diaria, sin embargo, las dietas con aglutinantes derivados del trigo E5 y control presentaron el más alto porcentaje 3.00±0.53 y 3.33± 0.90 respectivamente (figura 6).

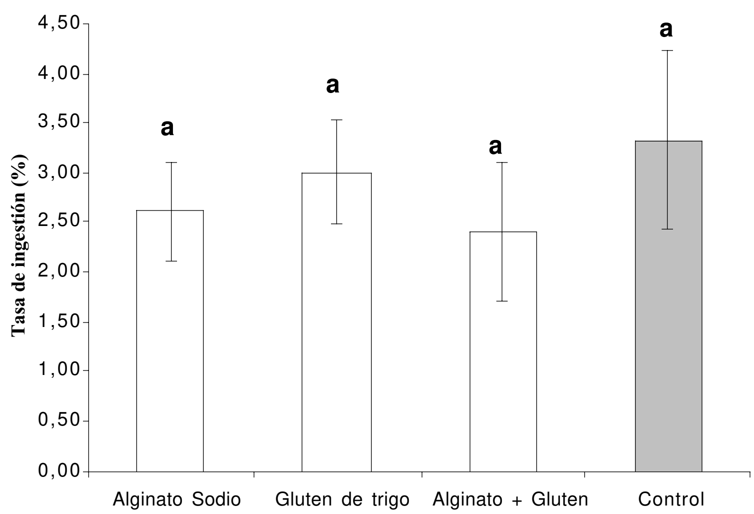

Figura 6. Tasa de ingestión diaria

La digestibilidad aparente de proteína de las dietas E5 y B5+E5 fue significativamente mayor que la digestibilidad de B5 y control, no existiendo diferencias estadísticas entre ellas (figura 7). La menor digestibilidad de materia seca, fue observada en la dieta que contenía alginato de sodio, no encontrándose diferencias entre E5, B5+E5 y control (figura 8).

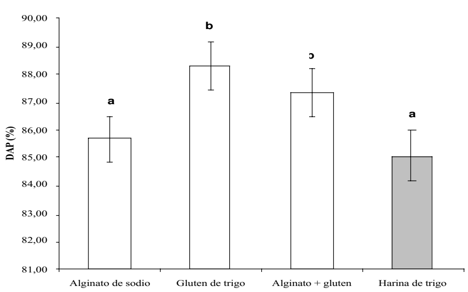

Figura 7. Digestibilidad aparente de proteína (DAP)

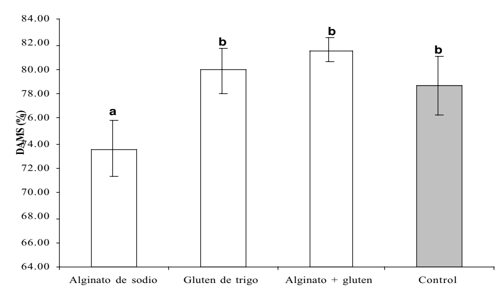

Figura 8. Digestibilidad aparente de materia seca (DAMS)

4.3. DESARROLLO GONADAL

La tabla 9 muestra los resultados del estadío de maduración ovárica alcanzado por hembras ablacionadas monitoreadas externamente por 12 días. El tiempo en el que comenzaron a presentar la variación del color en las gónadas no fue el mismo para todas las hembras, incluso, algunas de las que fueron alimentadas con las dietas E5 y control mudaron durante el periodo de observación.

Tabla 9. Desarrollo gonadal alcanzado por hembras *L. vannamei*

Maduración ovárica	Dietas
Estadío 0	E5 – control
Estadío 1	B5+E5
Estadío 2	B5
Estadío 3	
Estadío 4	

- Los hembras fueron monitoreadas externamente.

Al término de los 20 días de alimentar con las dietas se determinó que E5 y control presentaron índices gonadosomático y hepatosomático bajos (figuras 9 y 10), mientras que la combinación de alginato de sodio y gluten de trigo (B5+E5) presentó IGS y IHS significativamente similares al alginato de sodio.

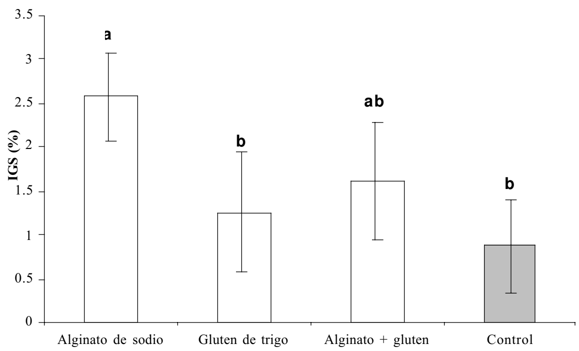

Figura 9. Índice gonadosomático

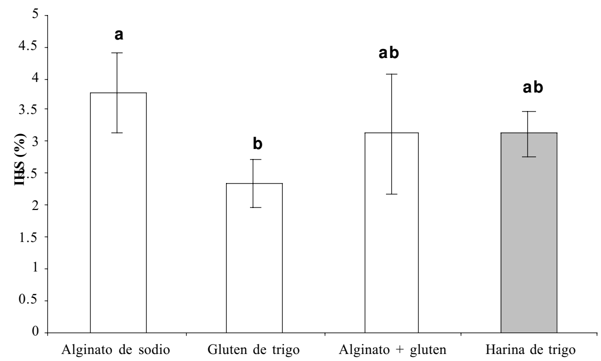

Figura 10. Índice hepatosomático

El contenido de materia seca en gónadas y hepatopáncreas no fue significativamente diferente ($p>0.05$) entre tratamientos (figura 11).

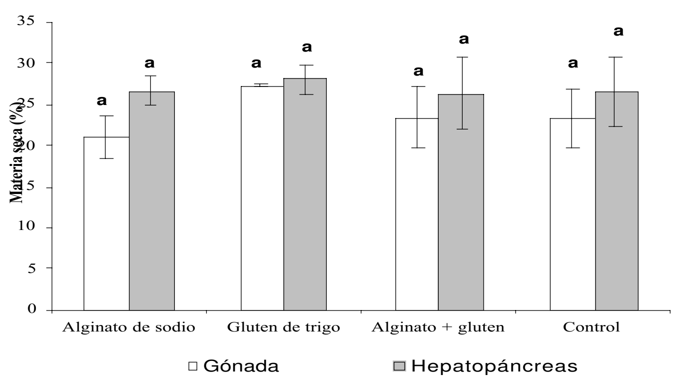

Figura 11. Contenido de materia seca en gónadas y hepatopáncreas

5. DISCUSION

La estabilidad en el agua de los alimentos para camarón, puede alcanzarse con el procesamiento del pellet, mediante la extrusión o peletización del balanceado, accionando la actividad gelatinizante de los almidones, especialmente los de origen vegetal, propios de las materias primas a utilizarse. Sin embargo, si la estabilidad en el agua es insuficiente, debe adicionarse una sustancia aglutinante en la manufactura, para alcanzar no más del 10% de pérdida de materia seca después de 60 minutos de inmersión (Cuzon *et al*., 1994 y Subramanyam, 1994). Considerando lo descrito por éstos autores, los aglutinantes B3, C3, E3, B5, E5 y F5 evaluados en este estudio, presentaron una retención de materia seca de ˜90%, después de permanecer por una hora en el agua. Las dietas B5 y E5 perdieron valores aproximados a 12 y 14% de materia seca respectivamente, después de 3 horas de inmersión. Los resultados de la evaluación de la estabilidad de las dietas en el agua en función del tiempo demostraron, que en la mayoría de los tratamientos la pérdida de materia seca se mantuvo similar a partir de los 90 minutos de inmersión. El rol de un aglutinante en la dieta es crítico, la selección debe hacerse relacionando su poder gelificante para producir pellets estables y la aceptación por parte del animal, una dieta conteniendo poco aglutinante puede no ser adecuadamente estable ocasionando el deterioro de la calidad del agua y pérdida de nutrientes dietáricos valiosos (Meyers *et al*., 1972), por otro lado, altas concentraciones de aglutinantes puede causar reducción en la digestibilidad de la dieta al ser poco aceptado por el camarón (Partridge y Southgate, 1999).

La posible diferencia observada en la prueba de apreciación visual podría deberse a la formación de un esqueleto interno producido por los aglutinantes que alcanzaron la mayor compactación (B3, B5 y E5) formando una matriz rígida (Dominy y Lim, 1991).

Al comparar los resultados de la tabla 3 con las tablas 4a y 4b, las dietas B5 y E5 se presentan como las de mayor estabilidad, conservando su forma intacta y baja disgregación de materia particulada después de 3 horas de inmersión en agua. Para larvas de *Macrobrachium rosembergi*, el alginato ha sido utilizado extensivamente proporcionando una excelente estabilidad en el agua (Aquacop, 1976). Del mismo modo, aglutinantes como harina de trigo, alginato de sodio y gluten de trigo son exitosamente usados para estabilizar dietas de camarones (Akiyama *et al*., 1989; Cuzon *et al*., 1994; Peñaflorida Golez, 1996; Devresse, 1998; Mendoza *et al*., 2001). Sin embargo, una fuerte aglutinación sería un punto contrario para el aprovechamiento de la dieta. De aquí parte la necesidad de evaluar la capacidad de los aglutinantes de absorber agua proporcionando un pellet blando, fácil de roer para brindarle al camarón una dieta más atractiva.

Cruz (2001), indica, que los pellets aumentaron significativamente su capacidad de absorber agua, adquiriendo una textura suave y elástica cuando la harina de kelp fue utilizada como aglutinante (2 - 4% de inclusión). A pesar de esta excelente propiedad, la estabilidad del pellet con harina de kelp fue baja, lo que sugiere un nivel de inclusión mayor al 4% .

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la harina de kelp presentó una diferencia significativa en la hidroabsorción frente a las dietas A5 y B5 que fueron las que presentaron los porcentajes más altos de absorción de agua. Del mismo modo, la gelatina, por su capacidad de absorber agua, ha sido utilizada en dietas para peces convirtiendo al pellet en un alimento de suave textura, la limitante de la gelatina es su bajo poder aglutinante y su acelerado proceso de lixiviación (Partridge y Southgate, 1999).

Adicionalmente, una gran cantidad de nutrientes se disuelven en 120 o 180 minutos después de suministrado el alimento, por lo tanto, el pellet necesita mantener su integridad en el agua por lo menos 2.5 horas (Akiyama y Chwang ,1999 y Cruz, 1999).

La pérdida de proteína de las dietas ensayadas en este estudio indican, que la menor lixiviación se alcanzó con gluten de trigo y alginato de sodio al 5%. Probablemente, ésta diferencia con los otros tratamientos se deba a la estabilidad de las dietas (˜14%). Puesto que, la diferencia entre el peso final e inicial del pellet luego de sumergirlo en agua, es tomado como una medida cuantitativa de la pérdida de nutrientes (Knauer *et al*., 1993). Del mismo modo, la lixiviación de aminoácidos aromáticos relacionada con las lecturas obtenidas del espectrofotómetro fue menor en B5 y E5.

A pesar de que la dieta conteniendo alginato de sodio 5% presentó los mejores resultados de estabilidad, hidroabsorción y lixiviación de nutrientes, frente a E5 inherentes problemas asociados con la digestibilidad y su alto valor comercial restringen su uso. El alginato de sodio reacciona ante la presencia de cationes polivalentes como el calcio formando soluciones viscosas fuertes (Meyers *et al*., 1972; Akiyama *et al*., 1989), el alto efecto aglutinante del alginato puede evitar la liberación de los aminoácidos y otros atractantes reduciendo la ingestión del alimento, tomando en cuenta que el camarón localiza el alimento por quimiorecepción. Sin embargo, presenta mayores porcentajes de ingestión frente a la gelatina en dietas para peces (Patridge y Southgate, 1999).

Así mismo, el gluten de trigo es bien conocido en la industria por sus positivos efectos en la estabilidad del alimento en el agua, su alto valor nutricional, y su completa digestibilidad (Devresse, 1998), su relativamente menor costo efectivo le proporciona otra ventaja frente al alginato, cuya utilización a escala comercial se ha visto limitada (Cruz, 2001). Adicionalmente, la palatabilidad de los productos del trigo es mayor. Así lo demostraron los resultados de tasa de ingestión de este trabajo, donde las dietas E5 y control obtuvieron los mas altos porcentajes de ingestión, especialmente en horas donde el camarón aumenta su ingesta (03h00), aunque no se registraron diferencias con el alginato de sodio.

Probablemente, la no diferencia significativa en la tasa de ingestión diaria de las dietas evaluadas se origine por el similar consumo de alimento registrado a las 12h00. Ligeramente, el mayor porcentaje de ingestión se obtuvo con el aglutinante control, esto pudo deberse no solo a la palatabilidad de la harina de trigo, sino a la baja estabilidad que presentó (81.82±0.35) frente a las demás dietas, disolviéndose la materia seca en mayor proporción a los 120 minutos, puesto que, para calcular la cantidad de alimento sobrante se asume que el alimento no recolectado fue consumido. Precisamente la importancia de evaluar un aglutinante se basa en asegurar que el pellet mantenga su forma y nutrientes hasta ser ingerido por el animal. El contenido proteico de una dieta, aunque sea bueno, pasa a un segundo plano si ésta no es digerida (Briggs *et al*., 1997).

La determinación de la DAP y DAMS demostró que los valores más representativos fueron alcanzados por las dietas E5 y control, siendo diferentes a la dieta B5 y ligeramente semejantes a la dieta B5+E5. Normalmente, el alginato no afecta los componentes lábiles de la dieta, aunque se han reportado resultados no satisfactorios en términos de digestibilidad (Cuzon *et al*., 1994). Se ha encontrado que la inclusión de alginato a niveles del 15% reduce sensiblemente la digestibilidad en los peces (Riaza, 1986 *fide* Mendoza, 1999).

En trabajos con *L. vannamei*, la digestibilidad aparente de proteína y la digestibilidad de energía para almidón de trigo y trigo integral fue muy alta, siendo por lo tanto, el carbohidrato más utilizado como una fuente disponible de energía y aglutinación (Davis *et al*., 1995), la digestibilidad de carbohidratos en camarones varía de acuerdo al tipo de harina, origen botánico del almidón y nivel de inclusión (Cuzon *et al*., 2000).

En *L. vannamei*, el gluten de trigo registró valores de DAP y DAMS de 98.0±0.4 y 85.4±0.4 respectivamente (Akiyama, 1988). Diferencias en la DAP pueden atribuirse a la desigualdad en el contenido de aminoácidos o proteína de las dietas (Sudaryono *et al*., 1996). Esto se explica con el análisis proximal de los mejores aglutinantes de este estudio, donde, el gluten de trigo presentó el mayor porcentaje de proteína (57%). En estudios con trucha arco iris el alginato de sodio reduce la ingestión y la DAP (Storebakken, 1985).

La DAMS en este trabajo fue significativamente menor con alginato de sodio. Según reportes de Storebakken (1985),el contenido de materia seca en las heces se reduce con la inclusión de alginato en dietas para trucha arco iris. Puesto que, el alginato de sodio posee en su composición ácido β-D manurónico, lo que produce una fuerte reducción en la digestibilidad y en el contenido de materia seca en las heces (Storebakken, 1987).

La dieta B5+E5 evidenció promedios aceptables en las pruebas en las que fue evaluada, esto sugiere que la combinación de aglutinantes resultaría una mejor conversión del alimento, así, dietas recubiertas (microbound) con alginato+zeína, alginato+gelatina (Partridge y Southgate, 1999) han sido exitosamente utilizadas en dietas para peces.

Aunque el gluten de trigo presentó la mas alta tasa de ingestión y la más representativa DAP y DAMS, los valores de IGS, IHS, y desarrollo gonadal no fueron muy exitosos, a pesar de no exhibir diferencias con el alginato. Es probable que los más altos índices gonadosomático y hepatosomático, se deba a la mayor estabilidad alcanzada por el alginato de sodio, esto asegura, que a más de la proteína, todos los nutrientes que intervienen en la maduración permanecieron en el pellet hasta ser ingeridos por el camarón. El índice gonadosomático ha sido utilizado para estudiar la biología reproductiva de una especie o población, no obstante, el IGS representa solo una porción del peso del ovario en relación al peso del cuerpo sin el grado de maduración ovárica (Ohtomi y Yamamoto, 1997).

Aún cuando se ha reportado que la eliminación de la IGH (hormona de inhibición gonadal) presente en el pedúnculo ocular, causa un acelerado desarrollo de las gónadas de las hembras (Rosas, *et al*., 1993), inexplicablemente, en este estudio no se alcanzó la maduración completa con ninguno de los tratamientos evaluados, sin embargo, las hembras alimentadas con la dieta B5 presentaron estadío de maduración gonadal medio (Estadío 2).

Adicionalmente, estudios en hembras ablacionadas *Penaeus schimitti*, indican que alcanzaron la maduración completa en 4 días en cada tratamiento, mientras que, en las que no fueron ablacionadas el desarrollo gonadal duró mas tiempo, otro punto de consideración es que los mejores resultados se obtuvieron con 100% de dietas formuladas secas (Nascimento *et al*., 1991).

Las diferencias registradas en el IGS y en el desarrollo gonadal de las hembras monitoreadas en este estudio, pueden deberse a características del animal (por ejemplo; especie y edad). Según los resultados de éste trabajo, el tipo de aglutinantes no parece influenciar en el contenido de materia seca de gónadas y hepatopáncreas.

6. CONCLUSIONES

- El tipo y concentración de aglutinantes produce efectos positivos en la estabilidad de alimentos peletizados para camarón *Litopenaeus vannamei.*

- En las pruebas de calidad de las dietas, de forma general, los mejores resultados se obtienen cuando se incluye el aglutinante a un nivel de 5%, así, las dietas conteniendo alginato de sodio y gluten de trigo al 5% presentaron los valores más representativos.

- El gluten de trigo se presenta como el mejor aglutinante de este estudio, por sus propiedades gelificantes, atractantes y su económico valor comercial frente al alginato de sodio.

- No se registraron diferencias significativas en la tasa de ingestión diaria con los tratamientos evaluados.

- Los valores mas bajos de DAP y DAMS se registraron con la dieta que contenía alginato de sodio al 5%.

- A pesar de no presentarse desarrollo gonadal completo en hembras *Litopenaeus vannamei* utilizadas en este estudio, las hembras alimentadas con las dietas conteniendo alginato de sodio 5% alcanzaron estadío 2 de madure gonadal.

- *Litopenaeus vannamei* consume más alimento en las primeras horas de la mañana (03h00) que a partir del medio día.

7. RECOMENDACIONES

- Evaluar niveles de inclusión más altos de aglutinantes que presentaron una pobre estabilidad en el agua y que son económicamente baratos, como el almidón de yuca.

- Tomando como referencia los resultados obtenidos con la dieta que contenía una mezcla de alginato + gluten se recomienda probar combinaciones de aglutinantes.

- Evaluar la tasa de ingestión de dietas con gluten de trigo 5% como aglutinante, desafiándolo con reemplazos graduales de alimento fresco (100%; 50%-50%; 75%-25%).

- Realizar ensayos con hembras ablacionadas y no ablacionadas, para determinar si hay o no diferencias en el desarrollo gonadal mediante la utilización de aglutinantes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiyama, D. M., Dominy, W. G., & Lawrence, A. L. 1989. Nutrición de camarones peneidos para la industria de alimentos comerciales. Marine Shrimp Culture. Principals and Practices (Editores Fast and Lester). Elsevier Science Publishers.

Akiyama, D., Chwang, N. 1999. Requerimientos nutricionales del camarón y manejo del alimento. Avances en nutrición acuícola I. Memorias del primer simposium internacional de nutrición y tecnología de alimentos para acuicultura.

AQUACOP. 1976. Incorporation de protéines végétales dans un aliment composé pour crevettes *Macrobrachium rosembergii*. Aquaculture 8: 71 - 80.

Bombeo, I., Fukumoto, S., Rodríguez, E. 1995. Use of the goldesi apple snail, cassava, and maize as feeds for the tigre shrimp, *Penaeus monodon*, in ponds. Aquaculture 131: 91 - 100.

Bortone, E., Behnke, K., Dominy, W. 1995. Effects of mixtures of soybean meal, whole wheat flour, and whole wheat flour plus gluten and pelleting processing conditions on growth of juvenile marine shrimp (*Penaeus vannamei*) fed isonitrogenous diets. U.S. Wheat Associates. Republic of Singapore.

Bortone, E. 2001. Diseño de plantas de alimentos balanceados especalizadas para peces y crustáceos. Curso Lance en Acuacultura. México.

Bradford. 1994. Bio-rad protein. Assay for research use only.

Briggs, M., Pinon, E., Wouters, R., Castro, F. 1997. Avances en nutrición acuática en estadíos larvarios. Seminario CENAIM-ESPOL, CNA. Ecuador.

Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J. F., Farndale, B., Carrillo, M., Zany, S., Ramos, J. & Bromage, N. 1999. Development of broodstock diets for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsatured fatty acid to reproductive performance. Aquaculture 177: 85 – 97.

Chamberlain, G., Lawrence, L. 1981. Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* fed natural diets. J. World. Maricul. Soc. 12(1): 209 - 224.

Chamberlain, G. W., 1994. Investigación de frontera en nutrición acuícola. Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.

Cousin, M., Cuzon, G., Guillaume, J., AQUACOP. 1996. Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eigth samples of various origin. Aquaculture 140: 361 - 372.

Cruz, E. 1999. Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. Avances en nutrición acuícola III. Memorias del tercer simposium internacional de nutrición acuícola. México.

Cruz, E., Ricque, D. & Nieto, M. 1999. Importancia de la digestibilidad en alimentos para camarón. Panorama Acuícola 4(2): 10 – 12.

Cruz, E. 2001. Kelps, un excelente aditivo, atractante, aglutinante y texturizante, con propiedades inmunoestimulantes. Panorama Acuícola 6(2): 42 – 45.

Cruz, E., Ricque, D., Tapia, M., Guajardo, C., Obaldo, L., Velasco, M., Carrasco, A. 2002. Water stability, texture of shrimp feeds formulated with natural, synthetic binders. Global Aquaculture Advocate 5(5).

Cuzon, G., Guillaume, J., Cahu, Ch. 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for Crustacea. Aquaculture 124: 253 - 267.

Cuzon, G., Rosas, C., Gaxiola, G., Taboada, G., Van Wormhoudt, A. 2000. Utilization of carbohyfrates by shrimp. Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V simposium internacional de nutrición acuícola. Mérida. Yucatán.

D'Abramo, L. 1997. Triacylglycerol and fatty acids. Crustacean Nutrition. Advanced in World Aquaculture 6: 71 – 84.

Darryl, J. 2001. Manejo integral del alimento de camarón, de estanques de producción camaroneros y principios de bioseguridad. Curso LANCE en Acuacultura. México.

Davis, A., Arnold, R. 1995. Effects of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei* Aquaculture 133: 287 - 294.

Devresse, B. 1998. Production of water stable shrimp feeds. IV International symposium on aquatic nutrition. México.

Devresse, B. 1999. Formulación de alimentos para camarón: las deficiencias nutricionales más frecuentes en alimentos para *Litopeaneus vannamei*. Panorama Acuícola 4(4): 8 –11.

Dominy, W., Lim, C. 1991. Performance of binders in pelleted shrimp diets. Proceding of the Aquaculture feed Processing and nutrition workshop. 149 - 157.

Dominy, W., Cody, J., Terpstra, J., Obaldo, L., Chai, M., Takamori, T., Larsen, B., Forster, I. *in press*. A comparative study of physical and biological properties of commercially available binders for shrimp feeds. Short communication.

Dorado, M. 1996. Formulación de dietas. Fundamentos de nutrición y alimentación en acuacultura. INPA Colombia 237 - 272.

Dore, I., Frimodt, C. 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Osprey and Scandinavian fishing year book.

Forster, J. 1972, Studies on compounded diets for prawns. Proc. World Maricul. Soc. 3: 389 - 402.

Forster, J., Gabbot, P. 1971. The assimilation of nutrients from compounded diets by the prawns *Palaemon serratus* and *Pandalus platyceros*. Journal of Marine Biological association of the United Kingdom 51: 943 – 961.

Hamre, K., Naess, T., ESPE, M., Holm, J., Lie. 2001. A formulated diet for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) larvae. Aquaculture Nutrition. 17: 123 – 132.

Hardy, R. 1999. Perspectivas del aimento balanceado para camarón. Panorama Acuícola 4(5): 12 - 14.

Harrison, K. E., 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans. A review. Journal of Shellfish Research 9(1): 1 – 28.

Harrison, K. E., 1997. Broodstock nutrition and maturation diets. Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture 6: 390 – 408.

Jobling, M. 1994. Fish bioenergetics. First edition. The Norwegian College of fishery science. University of Tromso. Norway.

Knauer, J., Britz, P., Hecht, T. 1993. The effect of seven binding agents on 24-hour water stability of an artificial weaning diet for the South African abalone, *Haliotis midae* (Haliotidae, Gastropoda). Aquaculture, 115: 327 – 334.

Koshio, S., Kanazawa, A., Teshima, S., Castell, J. 1989. Nutritional evaluation of crab protein for larval *Penaeus japonicus* fed microparticulate diets. Aquaculture 81: 145- 154.

Kovalenko, E., D'Abramo, L., Ohs C. & Buddington, R. K. 2002. A successful microbound diet for the larval culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosembergii*. Mississippi Agricultural and Foresty Experiment Station Publication. Aquaculture 210: 385 – 395.

Kumar, R., Bandyopadhyay, S. 1999. A comparative study of shrimp feed pellets processed through cooking extruder and meta mincer. Aquaculture Engineering 19: 71 - 79.

Lim, C., Cuzon, G. 1994. Water stability of shrimp pellet. A review. Asian fisheries science. 7: 115 – 127.

Marsden, G. E., Mc. Garen, J. J., Hansford, S. W. & Burke, M. J. 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. Aquaculture 149: 145 – 156.

Mc.Ginnis, A., Kasting, R. 1964. Colorinetric anakysis of chromic oxide to study food utilization and consumption of food by phytophagous insects. Agricultural and food chemistry 12: 259 – 262.

Mendoza, R., De Dios, A., Vasquez, C., Cruz, E., Ricque, D., Aguilera, C., Montemayor, J. 2001. Fishmeal replacement with feather - enzymatie hydrolyzates co-extruded with soya-bean meal in practical diets for the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Nutrition 7: 143 - 151.

Merck, KGaA. 2000. Reactivos Productos químicos. Merck index.

Meyers, S., Butler, D., Hasting, W. 1972. Alginates as binders for crustacean rations. The progressive fish culturist 34(1): 9 - 12.

Molina, C., Paredes, Y. 1997. Manual de técnicas para nutrición acuícola. Priyecto JICA - CENAIM.

Montejano, J., Rubio, M., Ramirez, J., Morales, O. 1998. Effect of sodium alginate and calcium chloride on the rheological and functional properties of gels form frozen surimi with and without cryoprotectant. IFT Annual meeting & food expo. World Congress. Center, Atlantic Georgia.

Nascimento, I., Bray, W., Leung, J. Lawrence, A. 1991. Rproduction of ablated and unablated *Penaeus schimitii* n captivity using diets consisting of fresh-frozen natural and dried formulated feeds. Aquaculture 99: 387 - 398.

Obaldo, L., Dominy, W., Terpstra, J., Cofy, J. & Behnke, K. 1998. Does size matter ?. International Aquafeed. 36 pp.

Obaldo, L., Tacon, A. 2001. Manufacturing different diet sizes and its effect on pellet water stability and growth of three size classes of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of applied aquaculture 11(4): 57 - 66.

Obaldo, L., Divakaran, S. & Tacon, A. 2002. Method for determining the physical stability of shrimp feeds in water. Aquaculture Research 33: 369 –377.

Ohtomi, J., Yamamoto, Sh. 1997. Change in gonadosomatic index with ovarian maturation in Jack-knife shrimp *Haliporoides sibogae* off south-western Kyushu, Japan. Fisheries Science 63(6).

Partridge, G., Southgate, P. 1999. The effect of binder composition on ingestión and assimilation of microbound diets (MBD) by barramundi *Lates calarifer* Bloch Larvae. Aquaculture research 30: 879 - 886.

Pascual, F., Sumalangcay, A. 1983. Gum arabic, carrageenan of various types and sago palm starch as binders in prawn diets. Fisheries Research Journal 8 (2): 54 - 58.

Pearce, C., Dagget, T., Robinson, S. 2002. Effect of binder type and concentration on prepared feed stability and gonad yield and quality of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensisi*. Aquaculture 205: 301 - 323.

Peñaflorida, V., Golez, N. 1996. Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp Penaeus monodon. Aquaculture 143: 393 - 401.

Perez-Farfante, I., Kensley, B. 1997. Penaeoid and Sergestoid shrimp and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Mémories du muséum national D'histoire naturelle. París.

Pozo, J. 2002. Evaluación del uso de agentes protectores sobre la lixiviación y palatabilidad de dietas medicadas (florfenicol) para camarones. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Machala.

Rivera, G., Yoong, F., Riofrío, G. 2002. Inclusión de Harina de kelp (macrocystis pyrífera) en alimentos balanceados para camarón. Acuacultura del Ecuador 46.

Rivero, L., Viana, T. 1996. Effect of pH, water stability and toughness of artificial diets on the palatability for juvenile abalone *Haliotis fulgens*. Aquaculture 144: 353 - 362.

Rosas, C., Fernández, J., Brito, R., Diaz, E. 1993. The effect of eyestalk ablation on the energy balance of the pink shrimp *Penaeus notialis*. Comp. Biochem. Physiol. 104A(1): 183 - 187.

Sickney, R. 2000. Feed fishing. Encyclopedia de Aquaculture. Chapter F. John Wilay & Sons.Inc. USA.

Smith, D., Allan, G., Williams, K., Barlow, C. 2001. Reemplazo para la harina de pescado. Panorama Acuícola 6(2): 14 - 16.

Soler, M. 1996. Nutrientes esenciales. Fundamentos de Nutrición y alimentación en acuicultura. Colombia 3: 53 - 116.

Sriburi, P., Hills, S., Mitchell, J. 1999. Effects of L - ascorbic acid on the conversión of cassava starch. Food hydrocolloids 13: 177 - 182.

Storebakken, T. 1985. Binders in fish feeds. I Effect of alginate and guar gum on growth, digestibility, feed intake and pasaje through the gastrointestinal tract of Rainbow trout. Aquaculture 47: 11 - 26.

Storebakken, T., Austrong, E. 1987. Binders in fish feeds. II Effect of different alginates on the digestibility of macronutrients in *Rainbow trout*. Aquaculture 60: 121 – 131.

Subramanyam, M. 1994. Ingredient quality in the production and performance of aquaculture feeds. Second international symposium on nutrition of aquatic organisms.

Sudaryono, A., Tsevetnenko, E., Evans, L. 1996. Digestibility studies on fisheries by product based diets for *Penaeus monodon*. Aquaculture 143: 331 - 340.

Tacon, A., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Documento de campo No. 4: 325 – 327.

Wouters, R., Zambrano, B., Espín, M., Calderón, J., Lavens, P. Sorgeloos, P. 2001a. Experimental broodstock diets as partial fresh food substitute for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition Submited, Academiejaar 2000 – 2001. Importance of broodstock nutrition in white shrimp *Litopenaeus vannamei*.

Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P. 2001b. Penaeid shrimp broodstock nutrition; an updated review on research and development. Aquaculture 202: 1 – 21.

Wouters, R., Molina, C., Lavens, P., Calderón, J. 2001c. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei,* in different stages of sexual maturation. Aquaculture 198: 307 - 323.

Wouters, R., Piguave, X., Bastidas, L., Calderon, J., Sorgeloos, P. 2001d. Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenin concentration of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA. Aquaculture Research. 32: 573 - 582.

Wyban, J., Martinez, G., Sweeney, J. 1997. Adding paprika to Penaeus vannamei maturation diet improves nauplii quality. World Aquaculture 28: 59 - 62.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CRUDA

Preparación de soluciones:

- *Solución de hidróxido de sodio 40%* : Disolver 200 g de hidróxido de sodio en agua destilada libre de CO_2 y diluir a 500 ml.
- *Solución indicadora* : 10 partes de verde de bromocresol (100 mg en 100 ml de etanol) y 7 partes de rojo de metilo (100 mg en 100 ml).
- *Solución 0.1N de ácido clorhídrico* : Preparada y estandarizada según Anexo IA.
- *Solución 4% de ácido bórico* : Disolver 40 g de ácido bórico en 100 ml de agua destilada muy caliente y diluir a un litro.
- *Mezcla ácida* : 5 partes de ácido fosfórico concentrado se adicionan con cuidado a 100 partes de ácido sulfúrico concentrado.

Cálculos:

$$\% \text{ Proteína} = \left[\frac{(V - B) \times N \times 1.4 \times Fc}{PM}\right] \times F$$

Donde:

V : ml ClH 0.1 N consumido por la muestra.

B : ml ClH 0.1 N consumido por el blanco.

N : Normalidad del ClH.

Fc : Factor de conversión de Nitrógeno.

PM : Peso de la muestra.

F : Factor de recuperación. Ver anexo IB.

Notas:

- Factores de conversión de Nitrógeno según Kjeldahl en diferentes proteínas :

5.30 : Semillas oleaginosas, frutas con cáscara y derivados.

5.55 : Gelatina.

5.70 : Trigo y derivados, fideos, pan.

5.71 : Soya y derivados.

5.77 : Panes de diversas harinas.

5.83 : Avena, cebada, centeno y derivados. Productos integrales.

5.95 : Arroz y derivados.

6.25 : Carnes, pescados, huevos, maíz y derivados, verduras, frutas (excepto las con cáscara), leguminosas (excepto soya), levadura y derivados.

6.31 : Afrecho.

6.34 : Leche y derivados (suero, mantequilla, queso) aceites y grasas.

Estos factores se aplican, si por lo menos el 75% de los componentes del alimento es uno de los grupos aquí mencionados, en caso contrario, se aplica 6.25.

ANEXO IA

Solución de ácido clorhídrico 0.1 N

Reactivos : Ácido clorhídrico concentrado, carbonato de sodio Q.P. anaranjado de metilo o azul de bromofenol.

Cálculos :

- Determinar a cuantos gramos por mililitros se corresponde el ácido clorhídrico, a partir de la densidad y la concentración del mismo.

$$\frac{\text{Densidad x Concentración}}{100} = \text{g, ml}^{-1}$$

$$\frac{1.19 \text{ x } 37}{100} = 0.4403 \text{ g.ml}^{-1}$$

- Calcular cuántos gramos son necesarios para preparar 1 litro (o la cantidad requerida) de ácido clorhídrico 0.1N

V x	N x	meq ClH	=	g de ClH
100 ml	0.1	0.03646	=	3.646 g

- Establecer la relación entre los gramos requeridos para preparar la solución de ClH y la correspondiente equivalencia con cada ml.

$$3.646 \text{ g ClH x} \frac{1 \text{ ml ClH}}{0.4403 \text{ g ClH}} = 8.28 \text{ ml}$$

Preparación :

Se mide con pipetas graduadas alrededor de 8.1 - 8.2 ml de ácido clorhídrico 37% sobre un matráz de 1 litro que contiene de 400 - 600 ml de agua destilada. Se homogeniza la solución y se enrasa a 1000 ml con agua destilada, se tapa y se agita por inversión.

Estandarización del ClH 0.1 N

Valoración :

La sustancia patrón tipo primario (SPTP) utilizada para ésta valoración es el carbonato de sodio anhidro, el que previamente debe ser desecado en la estufa entre 220 - 240 °C durante 1 hora. El miliequivalente químico (meq) del carbonato de sodio es 0.053.

Cálculos :

Se determina la cantidad a pesar, estimando un consumo aproximado de 20 ml de ClH, aplicando la siguiente fórmula :

$$V \quad x \quad N \quad x \quad meq \quad = \quad \text{g a pesar de } CO_3Na_2$$

$$20\ ml \quad 0.1 \quad 0.053 \quad = \quad 0.106\ g$$

Técnica :

Se pesan aproximadamente 3 réplicas de carbonato de sodio anhidro con un peso aproximado al calculado. Se disuelve cuantitativamente sobre una fiola con 20 ml de agua destilada libre de dióxido de carbono, se agita hasta completa disolución de la bromofenol. Se empieza a adicionar desde la bureta la solución de ácido clorhídrico hasta la aparición de un color canela (anaranjado de metilo) o un color verde limón (azul de bromofenol). Este será el punto final de viraje del indicador utilizado. Se anotan los consumos (Cons.) obtenidos en cada una de las determinaciones realizadas y se establece la normalidad exacta de la solución aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Normalidad} = \frac{\text{g SPTP } CO_3Na_2}{\text{Cons. ClH x meq SPTP } CO_3Na_2}$$

ANEXO IB

Ensayo de recuperación

Determinación de nitrógeno sin digestión usando una sustancia estándar como el sulfato de amonio grado reactivo.

El contenido teórico de nitrógeno de éste reactivo es 21.19%. La tasa de recuperación debe ser mayor al 99.7% (>21.13%), de lo contrario se debe aplicar un factor de recuperación.

El sulfato de amonio previamente secado a 100 °C por una hora, se pesa aproximadamente 150 mg en papel libre de nitrógeno, se coloca en un tubo de digestión, se disuelve con 10 ml de agua destilada y se acopla a la unidad de destilación, procediendo bajo las mismas condiciones dadas para las muestras, posteriormente se titula con ácido clorhídrico 0.1 N.

Cálculos :

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(V - B) \times N \times 1.4}{P}$$

Donde :

V : ml ClH 0.1N consumido por el sulfato de amonio.

B : ml ClH 0.1N consumido por el blanco.

N : Normalidad del ClH.

P : Peso del sulfato de amonio.

Factor de recuperación (F) :

$$F = \frac{\% \text{ N teórico}}{\% \text{ N determinado}} \text{ del } SO_4(NH_4)_2$$

ANEXO II

DETERMINACIÓN DE EXTRACTO ETEREO

Cálculos :

$$\% \text{ Grasa} = \frac{W_2 - W_1}{W} \times 100$$

Donde .

W_1 : Peso del balón menos el extracto.

W_2 : Peso del balón con grasa.

W : Peso de la muestra.

Notas :

- El algodón ayuda a que el éter penetre totalmente y previene cualquier pérdida de la muestra en el capuchón.
- Después de un largo secado para muestras que tengan bajo contenido de ácidos grasos libres volatilizables o ácidos grasos insaturados. Sin embargo a menos que el secado sea completo, las materias disolubles en agua (azúcar, etc.) pueden ser extraídas con el éter o solvente y obtener consecuentemente equivocaciones.
- El control de la temperatura se hará en base a las gotas de éter que caigan del tubo enfriador, aproximadamente 2 a 3 gotas por segundo, a 60 °C normalmente.
- Puesto que cualquier suciedad o polvo de las manos puede adherirse al balón, es necesario limpiarlo con gamuza antes de usarlo.
- El tiempo de enfriamiento en el desecador deberá ser el mismo que en el presecado del balón.

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Cálculos :

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{W_3 - W_1}{W_2 - W_1} \times 100$$

Donde :

W_1 : Peso del crisol vacío.

W_2 : Peso del crisol con la muestra.

W3 : Peso del crisol con las cenizas.

Notas :

- Las cenizas deben ser blancas o ligeramente grises, si esto no es posible se deja enfriar el crisol se humedece el contenido con unas pocas gotas de agua destilada y se evapora en el plato de calentamiento.

ANEXO IV

DETERMINACIÓN DE CALCIO

Preparación de las soluciones :

- *Solución de permanganato de potasio 0.02N :* Preparar y estandarizar según la técnica respectiva (ver anexo IVA).
- *Solución de ácido clorhídrico (1:3 v/v) :* Diluir 1 volumen de ácido clorhídrico concentrado en 3 volúmenes de agua destilada.
- *Solución de hidróxido de amonio (1:50 v/v) :* Diluir 1 volumen de hidróxido de amonio en 50 volúmenes de agua destilada.
- *Solución de oxalato de amonio 4.2% :* Disolver 8.4 g de oxalato de amonio en 200 ml de agua destilada, de ser necesario caliente para disolver.
- *Solución de ácido sulfúrico (5:125 v/v) :* Disolver 5 volúmenes de ácido sulfúrico concentrado en 125 volúmenes de agua destilada.

Cálculos :

$$Ca = \frac{V \times F \times 0.4008 \times D}{W \times A \times 10}$$

Donde :

Ca : Porcentaje de Calcio.

V : ml de permanganato de potasio.

F : Factor resultante de dividir la normalidad determinada para la normalidad teórica.

0.4008 : Peso de calcio correspondiente a permanganato de potasio 0.02N.

D : Volumen total de la solución muestra sujeta al análisis (ml).

W : Peso de la muestra en gramos.

A : Alícuota de la solución sujeta al análisis.

Nota :

Todo el material a ser usado debe ser lavado previamente con una solución caliente de ácido clorhídrico 10%.

ANEXO IVA

Solución de permanganato de potasio 0.02 N

Preparación :

Se pesa entre 0.6 - 0.7 g de permanganato de potasio con un ligero exceso sobre vidrio reloj y se lo disuelve con 500 - 700 ml de agua destilada sobre un vaso de precipitación de 1 litro. Se procede a hervir por lo menos 15 minutos y luego se deja en reposo 48 horas con el objeto de que se oxide toda la sustancia orgánica que contiene el agua destilada y el dióxido de manganeso se sedimente completamente. A continuación se filtra a través de un crisol filtrante de vidrio, debe evitarse el uso de papel filtro y otras sustancias orgánicas ya que estas se reducen el permanganato. Se trasvasa el filtrado a un matráz volumétrico de 1 litro y se enrasa a volumen con agua destilada previamente hervida. Se acostumbra envasar estas soluciones en recipientes de vidrio color ámbar con tapa de vidrio esmerilada.

Debido al tono de color, estas soluciones en la bureta se leen en la parte superior del menisco en vez de la inferior.

Las porciones no utilizadas una vez realizada la valoración no deben regresarse al recipiente donde se encuentra la solución madre.

Cálculos :

$$\text{Volumen x Normalidad x meq } MnO_4K = \text{g}$$

Valoración :

La sustancia patrón tipo primario mayormente utilizada para esta clase de titulación es el oxalato de sodio el que previamente se deseca en la estufa entre 105 - 110 ^{o}C por 2 horas. El miliequivalente químico (meq) del oxalato de sodio es 0.067 g.

Técnica :

Se pesan de 2 a 3 muestras de oxalato de sodio con un peso entre 0.0300 - 0.0350 g cada uno. Se disuelve cada muestra en 250 ml de ácido sulfúrico al 5%, se agita hasta total disolución del oxalato y se procede a calentar a una temperatura entre 70 - 80 °C. En este instante se empieza a adicionar el permanganato de potasio que previamente ha sido puesto en la bureta. Agitando constantemente hasta la aparición de un color rosa pálido persistente por lo menos 30 segundos, siendo éste el punto final de la valoración. El último mililitro de permanganato de potasio se añade lentamente teniendo particular cuidado de que cada gota sea completamente decolorada antes de adicionar la gota siguiente, durante la titulación se debe impedir la formación de una película parda de dióxido de manganeso producida por el permanganato de potasio al deslizarse por las paredes del recipiente de vidrio.

La temperatura durante la titulación no debe ser inferior a 55 °C. Una vez realizada las 2 o 3 determinaciones se realizan los cálculos.

Nota :

- Cuando la solución de permanganato de potasio se la prepara y se la utiliza el mismo día es posible omitir el calentamiento y la filtración simplemente se la prepara, se la valora y se procede a usarla.
- Si se pone exceso de permanganato de potasio después de obtener el tinte rosa pálido se vuelve a oxidar.
- Miliequivalente químico del permanganato de potasio es 0.0316 g.

ANEXO V

DETERMINACIÓN DE FOSFORO TOTAL

Preparación de soluciones :

- *Solución estándar de fósforo:*

  * *Solución Stock :* 2 mg $P.ml^{-1}$. Disolver 8.788 g PO_4H_2K en agua y diluir a 1 L.

  * *Solución de trabajo :* 0.1 mg $P.ml^{-1}$. Diluir 50 ml de solución stock a 1L.

- *Reactivo Molibdovanadato:*

Disolver 40 g de molibdato de amonio tetrahidratado en 400 ml de agua caliente y enfríe. Disolver 2 g de metavanadato de amonio en 250 ml de agua caliente, enfríe y añada 450 ml de ácido perclórico 70%.

Precaución :

Transferir alícuotas de la solución estándar de trabajo que contenga 0.5, 0.8, 1.0 y 1.5 mg de fósforo a matraces volumétricos de 100 ml. Añadir 20 ml de reactivo molibdovanadato, diluir a volumen con agua y mezcle bien. Espere 10 min, luego lea absorbancia en 400 nm contra estándar de 0.5 mg.

Cálculos :

$$\%P = \frac{C}{W \times 10}$$

Donde :

C : mg de P en alícuota.

W : g de muestra en alícuota.

Nota : Usar celdas menores o iguales a 15 mm.

ANEXO VI

DETERMINACIÓN DE PROTEINA

Preparación de las soluciones :

- ***Mezcla para digestión :*** Se disuelve 300 mg de dióxido de selenio en 15 ml de agua destilada, una vez disuelta se adiciona lentamente sobre ésta 85 ml de ácido sulfúrico concentrado. La solución resultante es cuidadosamente diluida a 200 ml con agua destilada.
- ***Solución reactivo fenol :*** Disolver 20 mg de nitroprusiato de sodio en 5 ml de una solución acuosa de fenol al 80% y llevar a 400 ml con agua destilada.
- ***Reactivo de hipoclorito :*** Se prepara adicionando 2 ml de hipoclorito de sodio (aproximadamente 1N en hidróxido de sodio 0.1N) sobre 80 ml de hidróxido de sodio 2.5%, y diluir cuidadosamente a 200 ml con agua destilada.

Preparación de la curva estándar :

- *Solución stock :* Preparar una solución que contenga 30 mg de sulfato de amonio por ml disolviendo 1.5 g de sulfato de amonio y llevar a 50 ml con agua destilada en matraz aforado. A partir de ésta solución preparar soluciones que contengan 60 $\mu g.ml^{-1}$, 12 $\mu g.ml^{-1}$, 24 $\mu g.ml^{-1}$y 36 $\mu g.ml^{-1}$ de sulfato de amonio.

Procedimiento :

1. Trabajar por triplicado, pesar entre 0.7 – 1.1 mg para dietas y 1 a 1.8 mg para heces, en tubos de vidrio resistente al calor.
2. Añadir 1 ml de la mezcla de digestión y llevar a baño térmico a 120 °C por toda la noche.

3. A la mañana siguiente elevar la temperatura del baño térmico a 320 °C por 6 horas, chequeando periódicamente que los fluidos no se hallan evaporado.
4. Remover los tubos del baño térmico y dejar enfriar.
5. Diluir el contenido de cada tubo a 20 ml con agua destilada en matraz volumétrico.
6. Tomar 1 ml de ésta solución y llevar a un matraz volumétrico de 10 ml.
7. A continuación adicionar en éste orden, 2 ml de hidróxido de sodio 2.5%, 4 ml del reactivo de fenol y 2 ml del reactivo de hipoclorito, llevar a volumen con agua destilada.
8. Permitir el desarrollo del color por 20 minutos, y leer inmediatamente en espectrofotómetro a 635 nm.
9. Preparar un blanco con 1 ml de la mezcla de digestión como si fuese 1 ml de muestra y adicionar en el mismo orden los reactivos.

Notas :

La preparación del reactivo de hipoclorito debe ser en primer lugar realizada en el momento del análisis y en segundo lugar en el propio sitio donde se desarrollará la reacción y posterior lectura, ya que es un reactivo que pierde potencia química tan rápido como se lo traslade de un área a otra.