



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**“Uso del cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) como ingrediente en alimentos  
para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*”**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Acuicultura)

Presenta

**Alfonso Galicia González**

La Paz, B. C. S., México

Junio de 2009

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9 horas del día 26 del Mes de Junio del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Uso del cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) como ingrediente en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)"

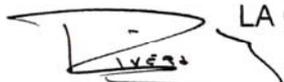
Presentada por el alumno:

Alfonso Galicia González

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Roberto Civera Cerecedo  
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez  
CO-TUTOR



Dr. Héctor Nolasco Soria  
CO-TUTOR



Dr. Francisco Javier Moyano López  
CO-TUTOR



Dr. Darío Tovar Ramírez  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## Conformación de Comités

### Comité tutorial

Dr. Roberto Civera Cerecedo	Director de tesis
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez	Co-tutor
Dr. Héctor Nolasco Soria	Co-tutor
Dr. Francisco Javier Moyano López	Co-tutor
Dr. Dariel Tovar Ramírez	Co-tutor

### Comité revisor de tesis

Dr. Roberto Civera Cerecedo	CIBNOR
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez	UANL
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Francisco Javier Moyano López	UAL
Dr. Dariel Tovar Ramírez	CIBNOR

### Jurado de examen de grado

Dr. Roberto Civera Cerecedo	CIBNOR
Dra. Lucía Elizabeth Cruz Suárez	UANL
Dr. Héctor Nolasco Soria	CIBNOR
Dr. Francisco Javier Moyano López	UAL
Dr. Dariel Tovar Ramírez	CIBNOR
Suplente: Dra. Lucía Ocampo Victoria	CIBNOR

## RESUMEN

Debido a los altos costos e incertidumbre en el abasto de la harina de pescado y pasta de soya, en los últimos años se han buscado alternativas que puedan sustituirlos sin tener un efecto negativo en el crecimiento de los camarones en el cultivo. En el presente trabajo se realizó un estudio para evaluar el valor nutricional del cártamo (*Carthamus tinctorius*) como fuente proteica en alimentos para juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. El primer capítulo comprende el estudio de la caracterización de tres productos de cártamo (HIC; Harina Integral de Cártamo, PCB; Pasta de cártamo baja en proteína y PCA; Pasta de cártamo alta en proteína) en base a su composición de nutrientes y algunos factores antinutricionales (hemaglutininas, saponinas, actividad uréasica, aflatoxinas e inhibidor de tripsina). Los productos de cártamo tuvieron un contenido de proteína entre 20.6 y 36.8%. La harina integral fue la que presentó el mayor nivel de extracto etéreo 31%, mientras que las pastas tuvieron un nivel bajo (1.8-1.0%). El contenido de fibra en el cártamo fue alto (17-23%). Los aminoácidos más abundantes en los productos de cártamo fueron el ácido aspártico y glutámico, en contraste los menos abundantes fueron lisina y metionina. Los ácidos grasos más abundantes fueron el ácido oleico, el linoleico, el palmítico y el estearico. El contenido de calcio de los productos de cártamo varió de 0.25 a 0.42%, mientras que el contenido de fósforo varió del 0.23 a 0.25%. No se encontraron los factores antinutricionales buscados, a excepción del inhibidor de tripsina que tuvo valores bajos (7.56 UTI/mg de muestra). No se encontraron diferencias significativas en los coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA) de materia seca y carbohidratos de los productos de cártamo; sin embargo, sí se encontraron diferencias en los CUDA de proteína, lípidos (CUDA<sub>I</sub>) y de energía digestible (CUDA<sub>e</sub>). La actividad de

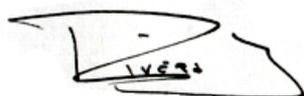
las enzimas digestivas de camarones que fueron alimentados con productos de cártamo mostró un incremento en proteinasas generales y quimotripsina. La atractabilidad y el consumo de los alimentos con un 30% de inclusión de los productos de cártamo se vieron afectadas negativamente en los camarones. El segundo capítulo comprende el estudio de la factibilidad de sustituir la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína (PCA), así como la sustitución de una mezcla de pasta de soya-harina de trigo por pasta de cártamo baja en proteína (PCB) en el alimento, para determinar sus efectos sobre el crecimiento, la utilización del alimento, la digestibilidad *in vivo*, la actividad enzimática y el contenido proteico en el músculo de organismos juveniles de camarón *L. vannamei*. Se realizó un bioensayo de crecimiento durante 45 días, en el cual la supervivencia fue superior al 87.5% con todos los tratamientos. El alimento con PCA a un nivel de sustitución del 75% (PCA-75) y el alimento control (CT) fueron los que permitieron obtener los mayores pesos promedio finales (3.48 y 3.32g), así como también las mayores tasas de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en el Factor de Conversión Alimenticia (FCA) y la Eficiencia Proteica (EP) entre ninguno de los tratamientos alimenticios. Con respecto a la digestibilidad de los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la pasta de soya por proteína de la PCA, se encontró que los CUDAm variaron entre 71.2 y 82.7%. Los CUDAp y CUDAl disminuyeron a medida que se incrementó la sustitución de la proteína de la pasta de soya. Los tratamientos CT y PCB con un nivel de sustitución del 25% (PCB-25) fueron los que permitieron obtener los mayores pesos promedio finales (3.32 y 3.30g), así como también las mayores tasas de crecimiento, mientras que no se encontraron diferencias significativas en el FCA y la EP. Con respecto a los CUDAm de los alimentos en donde se sustituyó mezcla trigo-soya por

PCB, se encontró que el CUDAm varió entre 56.7 y 82.7% y que a medida que se incrementó la sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya con la PCB disminuyeron los CUDAm y CUDAl. Los mayores CUDAp se obtuvieron con los alimentos CT y PCB-25 (91.4 y 89.2%). El contenido de proteína en el músculo de los camarones que fueron alimentados con PCB-100 se incrementó significativamente en comparación con los demás tratamientos. Los alimentos en donde se sustituyó la pasta de soya por productos de cártamo no tuvieron un efecto significativo en la actividad de las enzimas digestivas de los camarones. El tercer capítulo comprende el estudio de la factibilidad de sustituir la proteína de la harina de pescado por proteína de la PCA en el alimento, así como la suplementación de D-L-metionina protegida. Después de 45 días del bioensayo, la supervivencia fue superior al 83.3%. Los tratamientos con 66% de sustitución de harina de pescado (D-66) y con D-L metionina protegida adicionada (D-66CM) fueron los que permitieron obtener los mayores pesos promedio, así como también las mayores tasas de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en el FCA y la EP. La sustitución de la proteína de harina de pescado en los alimentos disminuyó la actividad de las enzimas digestivas de los camarones. Los CUDAm de los alimentos variaron entre 68.2 y 78.9%. Los mayores CUDAp se obtuvieron con los alimentos CT y D-66 (91.17 y 89.14). No se encontraron diferencias significativas en los CUDAl entre los tratamientos. Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que las pastas de cártamo evaluadas aquí pueden ser utilizadas como ingredientes en la formulación de alimentos para juveniles del camarón *L. vannamei*, especialmente la pasta alta en proteína, debido a que es una fuente de proteína digestible, contiene bajos o nulos niveles de los factores antinutricionales

determinados, y puede sustituir totalmente a la pasta de soya o parcialmente a la harina de pescado, sin afectar el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento.

Palabras claves: atractabilidad; camarón; cártamo; *Carthamus tinctorius*; digestibilidad; enzimas digestivas; factores antinutricionales; *Litopenaeus vannamei*.

Vo. Bo.



---

Dr. Roberto Civera Cerecedo

## ABSTRACT

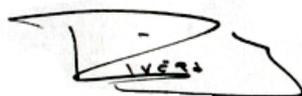
In recent years, alternatives to fish and soybean meals in aquacultural feeds that do not have negative effects on growth of cultivated shrimp have been intensively studied in an effort to reduce the high costs and uncertainty in supplies. In this study, the nutritional value of safflower (*Carthamus tinctorius*) meal as a protein source in diets for juveniles Pacific whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was investigated. Initially, characterization of three safflower meals (i.e. WSM; whole safflower meal, LPSM; low-protein safflower meal and HPSM; high-protein safflower meal), focusing on chemical composition and anti-nutritional factors (hemagglutinine, saponine, ureasic activity, aflatoxin, and trypsin inhibitor) was conducted. Protein content ranged from 20.6 to 36.8%. Whole safflower meal contained the highest level of lipids (31%); lipids in the other safflower meals were as low as 1.0–1.8%. Fiber content was high (17–23%). The most abundant amino acids were aspartic and glutamic acids and lysine and methionine were less abundant. Oleic, linoleic, palmitic, and stearic fatty acids were present in greatest amounts. Calcium content ranged from 0.25–0.42% and phosphorus content ranged from 0.23–0.25%. Anti-nutritional factors were not found in the analyses, except for trypsin inhibitor, with values as low as 7.56 UTI  $\text{mg}^{-1}$  per sample. No significant differences between the apparent digestibility coefficients (ADC) for dry matter and carbohydrates in safflower meals were detected; however, protein ADC, lipid ADC, and energy ADC were different. Total proteinase and chymotrypsin increased significantly in diets where safflower meals were included. Atractability and consumption of feed with 30% safflower meals appeared to have negative effects on the juveniles.

Additionally, the feasibility of replacing protein of soybean meal with protein of high-protein safflower meal (HPSM) and replacing a mixture of wheat and soybean meal with low-protein safflower meal was studied. Effects of the dietary treatments were measured by survival and growth rates, feed intake and utilization, *in vivo* digestibility, digestive enzyme activity, and protein content in the muscle in trials lasting 45 days. Survival was higher than 87.5% in all treatments. The HPSM diet with 75% level of replacement (HPSM-75) and the control diet produced the highest weight gain, but also the fastest rate of growth. No significant differences in the feed conversion ratio and protein efficiency of any diet were detected. However, when soybean meal protein was replaced by HPSM, the ADC of dry matter varied from 71.2 to 82.7%. As the amount of replacement of soybean meal protein increased, the protein ADC and lipid ADC decreased. The control diet and the low protein safflower meal diet at the 25% replacement level resulted in the highest final weights, as well as the highest rates of growth; however, the food conversion ratio and protein efficiency were not significantly different. Diets with wheat meal-soybean meal replacement by low protein safflower meal were found to have dry matter ADC variations from 56.7 to 82.7%. Dry matter ADC and lipid ADC decreased when the replacement of wheat meal-soybean meal by low protein safflower meal increased. The highest protein ADC was obtained from the control diet and 25% low protein safflower replacement diets. The protein content of the muscle for shrimp fed with 100% substitution with low protein safflower meal was significantly higher than the other substitution diets. In general, diets with replacement of soybean meal with safflower meal did not have a significant effect on the shrimp's digestive enzyme activity.

Another set of 45-day trials studied the feasibility of replacing fish meal protein with high protein safflower meal and supplementation of coated D-L methionine. Survival was higher than 83.3% in all treatments. The diet with 66% high protein safflower meal replacement and the same replacement diet with added D-L methionine had the highest weight gain and the highest growth rate, but there were no significant differences in the feed conversion ratio and protein efficiency detected among diets. Enzymatic activity was reduced only with replacement fish meal protein. The protein ADC varied between 68.2 and 78.9%. The highest protein ADC was obtained with the control and 66% replacement diets (91.17 and 89.14%). There were no significant differences in lipid ADC between diets. Overall, the high protein and low protein safflower meal diets can be used as ingredient in diets for juvenile shrimp, specialty high protein safflower meal; because this meal is good source of protein and carbohydrates and have low levels of anti-nutritional factors. Moreover, it can replace soybean meal or part of fish meal without affecting growth and feed utilization.

Keywords: *Carthamus tinctorius*; digestibility, juvenile shrimp; *Litopenaeus vannamei*; safflower meal.

Vo. Bo.



---

Dr. Roberto Civera Cerecedo

## **DEDICATORIA**

A mis padres: Alfonso Galicia López y Ángela González Nájera.

Mi hermana: Cynthia Galicia González.

Mi amigo y hermano Roberto Carlos Vázquez Juárez

A toda mi familia por ser simplemente la mejor.

A un gran amigo, Roberto Civera Cerecedo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por el apoyo brindado durante la realización de la tesis doctoral.

Al proyecto SAGARPA-CONACYT (2004-C01-122). “Uso del cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) como fuente de proteína en alimentos para organismos acuáticos” por el apoyo económico para la realización del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (No. de beca: 166400) brindado para la realización de la presente investigación.

Al personal administrativo y técnico del CIBNOR, Thelma Castellanos, Horacio Sandoval, Manuel Melero, Leticia González, Osvelia Ibarra, Beatriz Gálvez, Claudia Olachea, Sandra de la Paz, Patricia Hinojosa, Francisco Sandoval, Jorge Cobos, .

A los técnicos del laboratorio de Análisis de Químico Proximal, Sonia Rocha y Dolores Rondero por su gran ayuda en los diferentes análisis realizados a los alimentos.

Al grupo de Nutrición Acuícola del CIBNOR. Al Dr. Roberto Civera Cerecedo por la excelente dirección de la tesis, al técnico del laboratorio Ernesto Goytortúa por su gran ayuda en las diferentes técnicas y comentarios en los artículos.

Al Dr. Francisco Javier Moyano López por su gran contribución en la parte de digestibilidad *in vitro* y la placentera y enriquecedora estancia en España.

Al personal del laboratorio de la universidad de Almería. Antonia Barros de las Heras, Manolo Díaz, Beatriz, Francisco Javier Alarcón, David Malagon, Miguel, por todos los comentarios enriquecedores en mi estancia en España.

A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez y el Dr. Denis Ricque Marie por la gran asesoría en la revisión de los artículos científicos y su gran amistad.

Al personal del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, Dra. Josefina Morales, Silvia, por su asesoramiento en la determinación de factores antinutricionales de los productos de cártamo.

Al Dr. Héctor Nolasco Soria por su gran amistad y asesoramiento en la parte de atractabilidad de los alimentos.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez por el apoyo académico y revisión de la tesis.

A la Dra. Elena Palacios y Olivia Arjona por el asesoramiento en la determinación de ácidos grasos de los diferentes productos de cártamo.

A Elsa Arellano por su gran colaboración en la revisión de los artículos, así como el envío de numerosos artículos científicos.

Un especial agradecimiento a Susana Garduño editora de la revista ANIAME, por toda la revisión de la tesis, así como la información proporcionada para la elaboración de la tesis.

A la empresa Aceites del Mayo, Navojoa, Son. por la donación de los productos de cártamo.

A Francisco Malagamba y Gustavo Pineda por la donación de los camarones utilizados en los experimentos.

A mi trapito por todo el amor y cariño que me ha brindado a largo de esta tesis.

A todos y cada uno de mis compañeros de doctorado por los consejos buenos y malos que me dieron. Ximena (Gisela), Miguel Correa, Miguel Oliva, Evelyn Ríos, Marlene Manzano, Blanca Romero.

A mi segunda madre Gabriela Roldan que siempre me brindó su apoyo en las buenas y en las malas.

## PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

**Del trabajo de investigación se generaron los siguientes artículos:**

- 1. Alfonso Galicia-González** (2005). Uso de cártamo en alimentación de organismos acuáticos. ANIAME (Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles A.C.) 10(49) 10–12.
- 2. Alfonso Galicia-González**, Francisco J. Moyano-López, Lucía E. Cruz-Suárez, Denis Ricque-Marie, Ernesto Goytortúa-Bores, Roberto Civera-Cerecedo (2009). Chemical Composition and Digestibility of Three Mexican Safflower Meals Used as Ingredients in Diets for Whiteleg Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Journal of World Aquaculture Society. En prensa.
- 3. Alfonso Galicia-González**, Francisco J. Moyano-López, Lucía E. Cruz-Suárez, Roberto Civera-Cerecedo (2009). Effects of safflower meals on feed digestibility and digestive enzyme activities of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture (sometido).

## ÍNDICE

Resumen.....	iv
Abstract.....	viii
Dedicatoria.....	xi
Agradecimientos.....	xii
Productos de investigación.....	xv
Índice.....	xvi
Lista de Tablas.....	xxi
Lista de Figuras.....	xxiii
Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
El sistema digestivo de los camarones.....	4
Digestibilidad de los nutrientes.....	5
Fuentes alternativas de proteína.....	11
Cártamo.....	13
Planta entera.....	14
Flores.....	15
Semillas.....	15
Aceite.....	15
Pasta.....	16
Justificación.....	18
Objetivos.....	21
Hipótesis.....	23
Metodología.....	25
<b>Capítulo 1.....</b>	<b>26</b>
<b>VALOR NUTRICIO DE PRODUCTOS DE CÁRTAMO CON BASE EN SU COMPOSICIÓN PROXIMAL, CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS GRASOS, FÓSFORO, CALCIO, FACTORES ANTINUTRICIONALES, CUA Y DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>1.1. Material y métodos.....</b>	<b>26</b>
1.1.1. Materias primas e ingredientes.....	26
1.1.2. Análisis químico proximal.....	27
1.1.3. Energía bruta.....	28

1.1.4. Cuantificación de aminoácidos.....	28
1.1.5. Cuantificación de ácidos grasos.....	29
1.1.6. Cuantificación de calcio y fósforo.....	30
1.1.7. Factores antinutricionales en productos de cártamo.....	31
1.1.7.1. Inhibidor de tripsina.....	31
1.1.7.2. Inhibición de tripsina en productos de cártamo.....	32
1.1.7.3. Hemaglutininas.....	33
1.1.7.4. Saponinas.....	34
1.1.7.5. Actividad ureásica.....	35
1.1.7.6. Aflatoxinas.....	35
1.1.8. Experimento de CUDA de productos de cártamo.....	36
1.1.8.1. Formulación de los alimentos.....	37
1.1.8.2. Sistema experimental.....	37
1.1.8.3. Organismos experimentales.....	38
1.1.8.4. Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	38
1.1.8.5. Criterios de evaluación.....	42
1.1.9. Análisis de actividad enzimática.....	44
1.1.9.1. Extractos enzimáticos de la glándula digestiva.....	44
1.1.9.2. Cuantificación de proteína soluble.....	44
1.1.9.3. Actividad de proteinasas alcalinas.....	45
1.1.9.4. Actividad de tripsina.....	46
1.1.9.5. Actividad de quimotripsina.....	47
1.1.9.6. Actividad de $\alpha$ -amilasa.....	47
1.1.9.7. SDS-PAGE y zimogramas de la actividad de proteinasas.....	48
1.1.10. Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	51
1.1.11. Atractabilidad de los alimentos con productos de cártamo.....	54
1.1.12. Cuantificación de alimento consumido.....	55
1.1.13. Análisis estadísticos.....	56
<b>1.2. Resultados.....</b>	<b>57</b>
1.2.1 Análisis químicos.....	57
1.2.1.1. Análisis proximal y energía.....	57
1.2.1.2. Composición de aminoácidos de los productos de cártamo.....	57
1.2.1.3. Composición de ácidos grasos de los productos de cártamo.....	57

1.2.1.4. Cuantificación de calcio y fósforo de los productos de cártamo .....	58
1.2.2. Factores antinutricionales en los productos de cártamo .....	61
1.2.3. Inhibición de tripsina en productos de cártamo .....	62
1.2.4. Experimento de CUDA de productos de cártamo .....	63
1.2.5. Efecto de la inclusión de los diferentes productos de cártamo en el alimento sobre la actividad enzimática de la glándula digestiva del camarón. ....	67
1.2.6. Actividad de proteinasas de extractos de camarón. ....	70
1.2.7. Digestibilidad <i>in vitro</i> . ....	71
1.2.8. Atractabilidad y consumo de los alimentos con productos de cártamo. ....	72
<b>1.3 Discusión</b> .....	<b>74</b>
<b>1.4 Conclusiones</b> .....	<b>89</b>
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>91</b>
<b>EFFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE LA PASTA DE SOYA CON PASTAS DE CÁRTAMO EN EL ALIMENTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y CUDA DE JUVENILES DE CAMARÓN <i>L. vannamei</i></b> .....	<b>91</b>
<b>2.1. Material y métodos</b> .....	<b>91</b>
2.1.1. Experimento de crecimiento .....	91
2.1.1.1. Organismos experimentales.....	91
2.1.1.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo .....	92
2.1.1.3. Criterios de evaluación .....	93
2.1.2. Experimento de CUDA.....	95
2.1.2.1. Organismos experimentales.....	95
2.1.2.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo .....	96
2.1.2.3. Criterios de evaluación .....	97
2.1.2.4 Análisis estadísticos.....	97
<b>2.2. Resultados</b> .....	<b>97</b>
2.2.1. Experimento de crecimiento .....	97
2.2.1.1. Parámetros fisicoquímicos.....	97
2.2.1.2. Análisis proximal de los alimentos.....	97
2.2.1.3. Sustitución de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína.....	98
2.2.1.4. Sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína.....	101
2.2.1.5. Actividad enzimática digestiva.....	101
2.2.1.6. Contenido de proteína en el músculo del camarón.....	102

2.2.2. Experimento de CUDA.....	105
2.2.2.1. Sustitución de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína.....	105
2.2.2.2. Sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína.....	106
<b>2.3. Discusión</b> .....	107
<b>2.4. Conclusiones</b> .....	112
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>114</b>
<b>EFEECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA de HARINA DE PESCADO CON LA PROTEÍNA DE LA PASTA DE CÁRTAMO EN ALIMENTOS SUPLEMENTADOS O NO CON D-L METIONINA SOBRE EL CRECIMIENTO PONDERAL Y los CUDA DE JUVENILES DE CAMARÓN <i>L. VANNAMEI</i></b> .....	<b>114</b>
<b>3.1. Material y métodos</b> .....	<b>114</b>
3.1.1. Experimento de crecimiento.....	114
3.1.1.1. Organismos experimentales.....	114
3.1.1.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	114
3.1.1.3. Criterios de evaluación.....	117
3.1.2. Experimento de CUDA.....	117
3.1.2.1. Organismos experimentales.....	117
3.1.2.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo.....	117
3.1.2.3. Criterios de evaluación.....	118
3.1.3. Análisis estadísticos.....	118
<b>3.2. Resultados</b> .....	<b>118</b>
3.2.1. Experimento de crecimiento.....	118
3.2.1.1. Parámetros fisicoquímicos.....	118
3.2.1.2. Análisis proximal de los alimentos.....	119
3.2.1.3 Parámetros zootécnicos.....	121
3.2.1.4. Actividad enzimática digestiva.....	123
3.2.2. Experimento de CUDA.....	125
3.2.2.1. Sustitución de la proteína de harina de pescado por pasta de cártamo alta en proteína sin D-L metionina adicionada.....	125
3.2.2.2. Sustitución de la proteína de la harina de pescadopor pasta de cártamo alta en proteína con D-L metionina adicionada.....	126
<b>3.3. Discusión</b> .....	<b>127</b>
<b>3.4. Conclusiones</b> .....	<b>132</b>

<b>Discusión General</b> .....	134
<b>Conclusiones Generales</b> .....	141
<b>Recomendaciones</b> .....	143
<b>Literatura citada</b> .....	144
Anexo 1. Composición teórica de aminoácidos <sup>1</sup> en los alimentos usados para determinar la sustitución de la mezcla de pasta de soya-harina de trigo por pasta de cártamo baja en proteína y la sustitución de la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo.....	168
Anexo 2. Composición de la premezcla de vitaminas (VITCRU0604). .....	169
Anexo 3. Composición de la premezcla de minerales (MINCRU0409). .....	170
Anexo 4. Composición teórica de aminoácidos <sup>1</sup> de los alimentos utilizados para determinar la sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína.....	171

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Respuesta en los CUDA de materia seca (CUDAmS), proteína (CUDAp), lípidos (CUDAl), carbohidratos (CUDAc) y de los componentes energéticos totales (CUDAce) de camarones peneidos después de ser alimentados con productos animales.....	8
Tabla II. Respuesta en los CUDA de materia seca (CUDAmS), proteína (CUDAp), lípidos (CUDAl), carbohidratos (CUDAc) y de los componentes energéticos totales (CUDAce) de camarones peneidos después de ser alimentados con productos vegetales.....	10
Tabla III. Composición de ingredientes de la dieta de referencia (% en base húmeda).....	40
Tabla IV. Formulación de los alimentos usados para determinar la digestibilidad <i>in vivo</i> de alimentos con cártamo.....	41
(g / 100 g base húmeda).....	41
Tabla V. Protocolo de preparación de los geles de electroforesis.....	49
Tabla VI. Marcadores de peso molecular (LMW).....	50
Tabla VII. Composición proximal de los productos de cártamo.....	58
Tabla VIII. Contenido de aminoácidos (g /100 g proteína bruta) y cómputo químico de los productos de cártamo.....	59
Tabla IX. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos $\pm$ DE) de los diferentes productos de cártamo.....	60
Tabla X. Contenido de calcio y fósforo (% $\pm$ DE) de los diferentes productos de cártamo.....	61
Tabla XI. Factores antinutricionales en los productos de cártamo.....	62
Tabla XII. Composición química proximal de los alimentos usados para determinar los CUDA de los productos de cártamo.....	64
(g/100g base seca).....	64
Tabla XIII. CUDA (% $\pm$ DE) de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de los productos de cártamo.....	66
Tabla XIV. CUDA (% $\pm$ DE) de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de los alimentos con productos de cártamo.....	67
Tabla XV. Proteína soluble (mg/mL) y actividad específica (U/mg proteína) de diferentes enzimas en el hepatopáncreas del camarón blancoa.....	68
Tabla XVI. Digestibilidad <i>in vitro</i> de los productos de cártamo medido por el grado de hidrólisis y digestibilidad relativa de proteína.....	71
Tabla XVII. Digestibilidad <i>in vitro</i> de los alimentos con productos de cártamo medido por el grado de hidrólisis.....	72

Tabla XVIII. Atractabilidad y consumo de alimento por camarones <i>L. vannamei</i> alimentados con alimentos que contienen productos de cártamo.....	73
Tabla IX. Composición de los alimentos (g/100g alimento, en base húmeda) usados para determinar la sustitución de mezcla de pasta de soya-harina de trigo por pasta de cártamo baja en proteína y la sustitución de la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo.....	94
Tabla XX. Composición química proximal de los alimentos utilizados para determinar la sustitución de la pasta de soya por pastas de cártamo .....	99
Tabla XXI. Resultados zootécnicos finales (45 días) de juveniles de camarón <i>L. vannamei</i> para evaluar la sustitución pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína .....	100
Tabla XXII. Resultados zootécnicos de juveniles de camarón <i>L. vannamei</i> para evaluar la sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína inclusión.....	103
Tabla XXIII. Proteína soluble (mg/mL) y actividad específica (U/mg Proteína) de diferentes enzimas en el hepatopáncreas del camarón blanco.....	104
Tabla XXIV. CUDA (% ± DE) de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos para juveniles de camarones <i>L. vannamei</i> .....	106
Tabla XXV. CUDA (% ± DE) de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos para juveniles de camarones <i>L. vannamei</i> .....	107
Tabla XXVI. Composición de los alimentos (g/100g alimento, en base húmeda) usados para determinar la sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína. ....	116
Tabla XXVII. Composición química proximal de los alimentos utilizados para determinar el efecto de la sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína en el alimento, con y sin D-L-metionina adicionada. ....	120
Tabla XXVIII. Resultados zootécnicos finales (45 días) de juveniles de camarón <i>L. vannamei</i> para evaluar el efecto de la sustitución parcial de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína en el alimento, con y sin D-L-metionina adicionada. ....	122
Tabla XXIX. Proteína soluble (mg/mL) y actividad específica (U/mg Proteína) de diferentes enzimas en el hepatopáncreas del camarón blanco.....	124
Tabla XXX. CUDA (% ± DE) de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos para juveniles de camarones <i>L. vannamei</i> .....	126
Tabla XXXI. CUDA (% ± DE) de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos para juveniles de camarones <i>L. vannamei</i> .....	127

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción pesquera y acuícola mundial de 1950 a 2007.....	1
Figura 2. Producción de cártamo ciclo otoño-invierno 2008 en México.....	14
Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en este estudio. ....	25
Figura 4. Sistema de pH- stat utilizado para las mediciones de digestibilidad <i>in vitro</i> .....	52
Figura 5. Porcentaje de inhibición de la actividad de tripsina del hepatopáncreas de camarón con extractos de cártamo. PCA = Pasta de cártamo alta en proteína; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína.....	63
Figura 6. Resultados de análisis multivariado de cluster elaborado usando los valores de CUDAs (A) o las actividades enzimáticas digestivas (B). ....	69
Figura 7. Zimogramas de la actividad de proteinasas de extractos de camarón. ....	70
Figura 8. Correlación entre atractabilidad y consumo de alimento. ....	73
Figura 9. Composición de proteína en el músculo de los camarones al inicio, y al final del bioensayo de crecimiento después de haber sido alimentados con el alimento control (CT), y los alimentos donde se sustituyó al 100% pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína (PCA-100) o la mezcla trigo-soya por pasta de cártamo baja en proteína (PCB-100). ....	104

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los datos proporcionados por la FAO, hasta el año 2007 la producción pesquera y acuícola mundial fue de 221.56 millones de toneladas, de las cuales el 29.4% correspondieron a la acuicultura (Figura 1) (FAOSTAT, 2009). En México, la pesquería del camarón es una de actividad prioritaria y su volumen de producción en el 2007 fue de 184 695 t, siendo el 39.47% por captura y el restante 60.53% por acuicultura (SAGARPA, 2008). La región Noroeste del país es donde se encuentran el 97% de las granjas de camarón, considerándose como una de las zonas productoras de camarón más importantes de Latinoamérica (Páez-Osuna *et al.*, 2003).

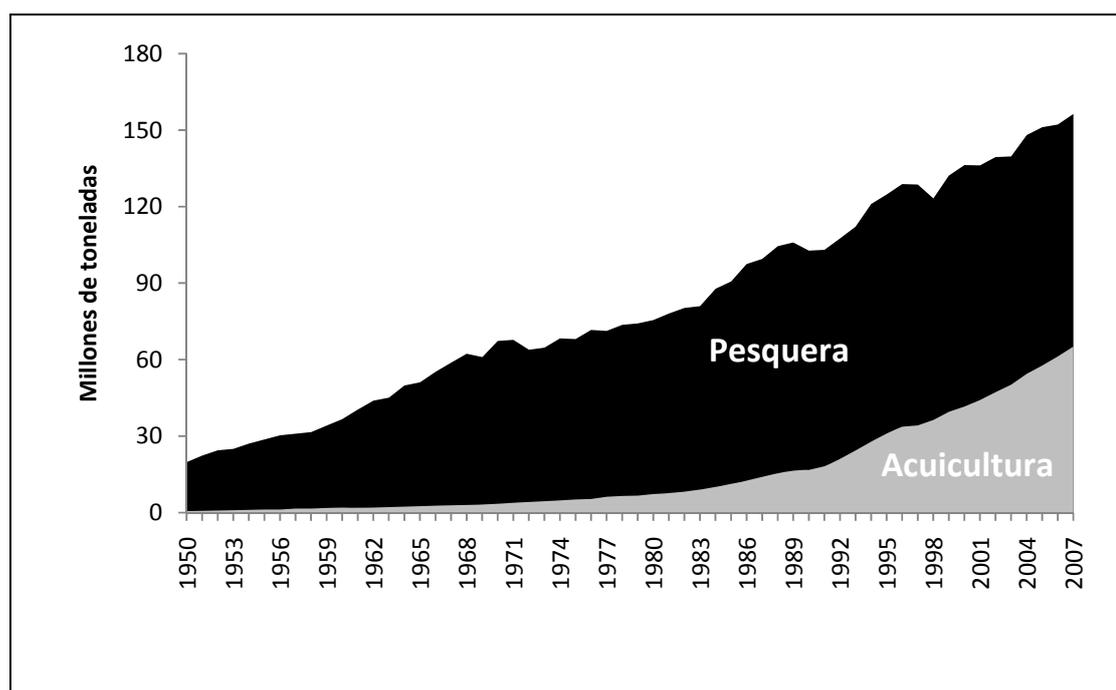


Figura 1. Producción pesquera y acuícola mundial de 1950 a 2007 (FAOSTAT, 2009).

Para que el cultivo de camarones sea rentable y sostenible es necesario el desarrollo de “alimentos amigables” de alto valor nutricional con ingredientes de bajo precio, considerando que en los sistemas intensivos de producción de camarones peneidos, el alimento artificial es la fuente exclusiva de nutrientes y representa el mayor costo de operación (superior al 60%) en las granjas (Tan y Dominy, 1997; Kureshy y Davis, 2002). En el año 2000 se produjeron 1.5 millones de toneladas de alimento para camarón, representando el 12% de la producción de alimentos para acuicultura. Para el 2010 se espera que la producción de alimento para camarón se incremente a 2.5 millones (Hardy, 2006).

Es así que una línea actual de investigación en acuicultura se ha venido centrando en el estudio de factores que permitan la formulación y elaboración de alimentos que optimicen la eficiencia productiva, minimicen la pérdida de nutrientes en las heces y que puedan significar un ahorro en los costos de producción (Civera *et al.*, 1998; Divakaran y Velasco, 1999).

En el presente trabajo se investigó el uso del cártamo (*Carthamus tinctorius*) como ingrediente en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*. Esta fuente proteica vegetal está siendo estudiada por su composición química y por su posible uso en alimentos para organismos acuáticos. Por otra parte no tenemos conocimiento de trabajos en los que se hayan evaluado alimentos con cártamo como una fuente proteica en alimentos para camarones peneidos.

Para tener un mejor entendimiento del documento de tesis, se dividió en tres partes principales, mismas que consisten en lo siguiente: Capítulo 1. Comprende el estudio de la caracterización de tres productos de cártamo (HIC; Harina Integral de Cártamo, PCB; Pasta de cártamo baja en proteína y PCA; Pasta de cártamo alta en proteína) en base a su composición de nutrientes y algunos factores antinutricionales. Capítulo 2. Comprende el estudio de la factibilidad de sustituir la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína (PCA), y la sustitución de la mezcla de pasta de soya-harina de trigo por pasta de cártamo baja en proteína (PCB) en el alimento, para determinar sus efectos sobre el crecimiento, la utilización del alimento, la digestibilidad *in vivo*, la actividad enzimática y el contenido proteico en el músculo de organismos juveniles de camarón *L. vannamei*. Capítulo 3. Comprende el estudio de la factibilidad de sustituir la proteína de la harina de pescado por proteína de la PCA en el alimento, así como la suplementación de la D-L metionina, sobre el crecimiento, utilización del alimento, digestibilidad *in vivo* y actividad enzimática de organismos juveniles de camarón *L. vannamei*. Al final, se presenta una discusión general donde se integra la información obtenida, y se presentan las conclusiones del estudio.

## ANTECEDENTES

### *El sistema digestivo de los camarones*

Los estudios sobre el sistema digestivo de los crustáceos se han multiplicado durante las últimas décadas en las especies de interés comercial, principalmente en los camarones peneidos. Sin embargo, la aplicación de este conocimiento para mejorar la producción no ha mantenido el mismo ritmo.

Las funciones del tracto digestivo de los crustáceos son ingestión, transporte de ingesta, digestión (hidrólisis enzimática y química), absorción, almacenamiento de nutrientes y transporte de nutrimentos a los vasos circulatorios y finalmente eliminación de las excretas al medio. El tracto se subdivide clásicamente en cinco partes: boca, esófago, estómago, glándula digestiva (hepatopáncreas) e intestino (anterior, medio y posterior) (Ceccaldi, 1997).

En los crustáceos al igual que muchos artrópodos, la boca está rodeada de varios pares de apéndices especializados en la quimiorrecepción (antenas y anténulas), sujeción (periópodos) y en la separación de fragmentos del alimento: maxilas, maxílulas, mandíbulas y maxilípedos. Estas estructuras permiten a los camarones localizar, sujetar, “manipular” y fragmentar los alimentos al tamaño adecuado al orificio bucal. En los camarones, el esófago es usualmente corto, delgado y conecta la boca con el estómago. Las paredes internas están recubiertas de una fina capa de quitina, la cual tiene que ser renovada en el momento de la muda o ecdisis. El estómago comprende dos partes separadas por una constricción evidente que posee una especie de válvula. Estas partes se han denominado:

cámara cardíaca y cámara pilórica. La parte antero-ventral de la cámara cardíaca contiene un revestimiento con una serie de salientes y protuberancias duras y afiladas que se denominan osículos. El estómago tiene otras particularidades como la musculatura externa, una nerviación cuasi-anatómica y un revestimiento particular. El pH del contenido estomacal permanece neutro o ligeramente alcalino. La glándula digestiva o hepatopáncreas es un órgano masivo, constituido por lóbulos simétricos con células diferenciadas, y es el sitio de síntesis y secreción de las enzimas digestivas, de absorción de los productos digeridos, de mantenimiento de reservas minerales y sustancias orgánicas, del metabolismo de lípidos y carbohidratos, y de distribución de las reservas almacenadas durante la intermuda. El intestino medio va del píloro hasta el recto y la mayor particularidad del epitelio de esta región posterior es su aptitud para secretar un mucus que envuelve los desechos sólidos derivados del estómago. La parte distal del tubo digestivo es rectilínea y corta, y las células de este epitelio están provistas de numerosas mitocondrias, lo que permite que se lleve a cabo el transporte iónico y la absorción de agua (Brunet *et al.*, 1994; Ceccaldi, 1997; Guillaume *et al.*, 2004).

#### *Digestibilidad de los nutrientes*

El valor nutricional de un alimento no depende solo de su contenido de nutrientes, sino también de la capacidad del animal para digerirlos y absorberlos. En la acuicultura, los estudios de digestibilidad tienen un triple objetivo: mejor conocimiento de la utilización potencial de los nutrientes, optimización de la calidad de los alimentos para los organismos, y finalmente, disminución de los desechos de origen alimentario; de modo que se pueda preservar la sanidad del ambiente en general y del agua en particular.

La digestibilidad de los nutrientes depende por una parte, de la calidad de la materia prima, el proceso, la forma y el tiempo de almacenamiento, y por otra parte, de la capacidad enzimática del organismo y de la eficiencia de su funcionamiento. Eficiencia que a su vez, depende de la edad, del estado de salud del camarón y de las condiciones ambientales (Cruz-Suárez *et al.*, 1999). La medición de la digestibilidad se puede realizar con dos métodos: directo o indirecto. El método directo implica la medición de la totalidad del alimento ingerido y de las heces emitidas correspondientes a una o varias comidas, lo cual es sumamente complicado en el medio acuático. De ahí que se opte por utilizar el método indirecto que no implica la medición de la totalidad de la ingestión alimenticia ni de la emisión fecal. Su originalidad reside en la utilización de un marcador inerte, no digerible y no absorbible, incluido en los alimentos. El aumento de la concentración del marcador, en comparación con la de los nutrientes, permite cuantificar la desaparición de estos nutrientes y esta desaparición se equipara con la digestión y absorción.

Hoy por hoy, el marcador del método indirecto más utilizado en los estudios de digestibilidad en camarones es el óxido crómico, con una tasa de incorporación que varía de 0.05 al 1% (Guillaume *et al.*, 2004).

El estudio de la digestibilidad de alimentos para camarones no es nuevo. El primer experimento de digestibilidad que evaluó diferentes ingredientes fue realizado por Lee (1970) utilizando cuatro especies de camarones peneidos. A partir de este trabajo, se han realizado diversos estudios en donde se determinan los coeficientes de utilización digestiva aparentes de ingredientes de origen animal (Tabla 1). Lee y Lawrence (1985) evaluaron

alimentos con diferentes niveles de proteína en camarones *Penaeus setiferus* de diferentes tamaños y encontraron que los CUDA de materia seca y proteína disminuían a medida que los camarones incrementan su tamaño.

Sudaryono *et al.* (1996) evaluaron diferentes combinaciones de fuentes de proteína animal preparadas de subproductos de la pesca (harina de cabeza de camarón, harina de desperdicios de langosta y harina de desperdicios de mejillones) en alimentos para camarón *P. monodon* y encontraron que los camarones alimentados con las harinas preparadas con subproductos tuvieron una mejor digestibilidad en comparación con los que fueron alimentados con harinas de pescado. Brunson *et al.* (1997) evaluaron diferentes productos animales (de cangrejo, carne, hueso, pescado, camarón y calamar), encontrando que los camarones *P. setiferus* alimentados con productos de pescado y calamar tuvieron los mejores CUDA de proteína. Cruz-Suárez *et al.* (2007) evaluaron la sustitución de la harina de pescado con subproductos de pollo en alimentos para *L. vannamei* encontrando que los CUDA fueron similares y, aún superiores al 80% en todos los alimentos. Finalmente, Hernández *et al.* (2008) evaluaron la sustitución de la harina de pescado por harina de carne de cerdo en alimentos para camarones *L. vannamei* encontrando que la harina de cerdo puede reemplazar el 35% de la harina de pescado sin que se tengan efectos negativos en los camarones.

**Tabla I. Respuesta en los CUDA de materia seca (CUDAmS), proteína (CUDAp), lípidos (CUDAl), carbohidratos (CUDAc) y de los componentes energéticos totales (CUDAce) de camarones peneidos después de ser alimentados con productos animales.**

Especie	Productos evaluados	CUDAmS	CUDAp	CUDAl	CUDAc	CUDAce	Referencia
<i>P. indicus</i>	Harina de camarón = 21, 33, 43 y 53 <sup>2</sup>	+	+				Colvin (1976)
<i>P. setiferus</i>	Harina de camarón = 22, 30, 38 y 50% <sup>2</sup>	+	+				Lee y Lawrence (1985)
	Productos de cangrejo, carne, hueso, pescado, camarón y calamar= 30% <sup>3</sup>	+	+			+	Brunson <i>et al.</i> (1997)
<i>P. japonicus</i>	Harina de cangrejo = 21, 31, 42, 50 y 61% <sup>2</sup>	-	-				Koshio <i>et al.</i> (1993)
<i>P. monodon</i>	Subproductos de pescado = 40% <sup>2</sup>	+	+				Sudaryono <i>et al.</i> (1996)
	Harinas de pescado, calamar, hígado de calamar e hígado de pescado = 15% <sup>3</sup>	+		+			Merican y Shim (1995)
	Harinas de pescado y animales terrestres	+	+			+	Smith <i>et al.</i> (2000)
<i>L. vannamei</i>	Harina de pescado = 47% <sup>1</sup>	+	-	+	+	-	Cabanillas-Beltrán <i>et al.</i> (2001)
	Harinas de carne y hueso = 25, 50 y 75% <sup>1</sup>	+	+				Forster <i>et al.</i> (2003)
	Harina de langostilla = 5, 10 y 15% <sup>1</sup>	+	+	+	-	+	Goytortúa-Bores <i>et al.</i> (2006)
	Harina de subproductos de pollo = 35, 50, 65 y 80% <sup>1</sup>	+	+			+	Cruz-Suárez <i>et al.</i> (2007)
	Harina de carne de cerdo = 25, 35, 45, 55 y 65% <sup>1</sup>	+	+	+		+	Hernández <i>et al.</i> (2008)

La abreviaciones o símbolos utilizados son los siguientes: ningún incremento significativo del ingrediente evaluado (-); incremento significativo del ingrediente evaluado (+).<sup>1</sup> Porcentajes de sustitución de la harina de pescado. <sup>2</sup>Nivel de proteína en el alimento. <sup>3</sup>Nivel de inclusión del ingrediente en el alimento.

Así como se han evaluado diferentes productos animales, también se han evaluado diversos ingredientes vegetales como posibles ingredientes en los alimentos para camarones (Tabla II). Eusebio (1991) evaluó el valor nutricional de *Vigna unguiculata* y *Phaseolus calcaratus* como fuentes de proteína en alimentos para camarones *P. monodon* encontrando que el proceso de descascarillado incrementó significativamente la digestibilidad de proteína en los camarones que fueron alimentados con arroz. Sudaryono *et al.* (1999a, 1999b) evaluaron el potencial de la harina de lupino como sustituto de la harina de pescado y pasta de soya en alimentos para camarones *P. monodon* encontrando que se puede sustituir más del 75% de la proteína de la harina de pescado y más del 50% de la pasta de soya por harina de lupino sin tener efectos negativos en el desarrollo de los organismos. Bautista-Teruel *et al.* (2003) evaluaron el potencial de la harina de chícharo como fuente alterna a la pasta de soya en alimentos para camarones *P. monodon* encontrando que los CUDAs de materia seca y proteína de los alimentos que contenían harina de chícharo se incrementan a medida que se incrementa el reemplazo de la soya. Molina-Poveda y Morales (2004) usaron una mezcla de harina de cebada y gluten de trigo como alternativa en alimentos para camarones *L. vannamei*, encontrando que los organismos alimentados con esta mezcla incrementaron su digestibilidad de proteína y materia seca, concluyendo que la mezcla puede sustituir en su totalidad a la proteína de origen animal.

**Tabla II. Respuesta en los CUDA de materia seca (CUDAmS), proteína (CUDAp), lípidos (CUDAl), carbohidratos (CUDAc) y de los componentes energéticos totales (CUDAce) de camarones peneidos después de ser alimentados con productos vegetales.**

Especies	Productos evaluados	CUDAmS	CUDAp	CUDAl	CUDAc	CUDAce	Referencia
<i>P. monodon</i>	Harinas de leguminosas = 40% <sup>2</sup>		+				Eusebio (1991)
	Harina de trigo =40% <sup>2</sup>	+	-	-			Catacutan (1991)
	Pasta de soya <sup>1</sup>	+		+			Merican y Shim (1995)
	Harina de lupino = 25, 50, 75 y 100% <sup>1</sup>	-	-				Sudaryono <i>et al.</i> (1999a)
	Harina de lupino = 25, 50, 75 y 100% <sup>1</sup>	+	+				Sudaryono <i>et al.</i> (1999b)
	Harina de chícharo 20, 40, 60, 80 y 100% <sup>1</sup>	+	+				Bautista-Teruel <i>et al.</i> (2003)
	Harinas de chícharo y frijol = 50% <sup>3</sup>	+	+	+	+		Kumaraguru <i>et al.</i> (2006)
	Harina de lupino = 30% <sup>3</sup>	+	+			+	Smith <i>et al.</i> (2007)
<i>L. stylirostris</i>	Harinas de chícharo y canola = 30% <sup>3</sup>	+	-		-		Cruz-Suárez <i>et al.</i> (2001)
<i>L. vannamei</i>	Harinas de trigo, sorgo y maíz =30% <sup>3</sup>	+				+	Davis y Arnold (1993)
	Harinas de trigo, maíz, arroz y milo = 30% <sup>3</sup>	+				+	Davis y Arnold (1995)
	Almidón de maíz, papa y trigo = 35% <sup>3</sup>		+	+	+		Cousin <i>et al.</i> (1996)
	Pasta de soya = 15 y 30% <sup>3</sup>	+	+			+	Divakaran <i>et al.</i> (2000)
	Harinas de chícharo = 30% <sup>3</sup>	-				-	Davis <i>et al.</i> (2002)
	Harinas de cebada y trigo = 33, 66 y 100% <sup>1</sup>	+	+		+		Molina-Poveda y Morales (2004)
	Almidón de maíz = 10, 15, 20, 25, 30 y 35% <sup>3</sup>	+	-	+			Guo <i>et al.</i> (2006)
	Harinas de frijol = 30% <sup>3</sup>	+	+		+		Rivas-Vega <i>et al.</i> (2006)
	Hierbas y plantas medicinales = 0, 1, 2, 4 y 8% <sup>3</sup>		+	+			Lin <i>et al.</i> (2006)

La abreviaciones o símbolos utilizados son los siguientes: ningún incremento significativo del ingrediente evaluado (-); incremento significativo del ingrediente evaluado (+).<sup>1</sup>Porcentajes de sustitución de la harina de pescado o soya. <sup>2</sup>Nivel de proteína en el alimento. <sup>3</sup>Nivel de inclusión del ingrediente en el alimento.

Rivas-Vega *et al.* (2006) midieron el valor nutricional de diversas harinas a base de frijol yorimón en alimentos para camarones *L. vannamei*, y concluyen que las harinas de frijol entero y el extruido son buenas fuente de carbohidratos y proteína que pueden ser usadas como un ingredientes en los alimentos para juveniles de esta especie. Smith *et al.* (2007) determinaron los CUDA de materia seca, proteína y componentes energéticos totales (energía) en alimentos que contenían harinas de lupino para camarones *P. monodon* encontrando valores superiores al 56.5, 92.7 y 69.6% para materia seca, proteína y energía.

#### *Fuentes alternativas de proteína*

Los alimentos comerciales para camarón contienen entre 30 a 50% de proteína bruta, principalmente de productos de origen marino como son harinas de pescado, camarón y calamar (Lim y Dominy, 1990; Hardy y Masumoto, 1991). Estos ingredientes alimenticios tienen un alto valor nutritivo y buena palatabilidad; sin embargo, son muy caros y su disponibilidad es variable (Lim y Petersen, 1989). Tomando en cuenta el posible incremento en el costo de los productos de origen marino y la incertidumbre de la disponibilidad a mediano plazo, se ha planteado la necesidad de buscar nuevas fuentes alternativas de proteína, convencionales o no convencionales, tanto de origen animal (Civera-Cerecedo *et al.*, 1998; Forster *et al.*, 2003; Galicia-González, 2003) como vegetal (Lim y Dominy, 1990; Floreto *et al.*, 2000 y Cruz-Suárez *et al.*, 2001) que pueden ser empleadas como sustitutos parciales o totales de la harina de pescado. Sin embargo, la sustitución de la harina de pescado a niveles elevados con fuentes proteicas de origen vegetal no siempre ha dado buenos resultados, debido a tres principales razones: a) la presencia de factores antinutricionales como inhibidores de tripsina, saponinas,

hemaglutininas, glucósidos, ácido fítico, etc., que afectan el valor nutricional de los alimentos y reducen su palatabilidad (Reigh y Ellis, 1992; Floreto *et al.*, 2000), b) una composición inadecuada de aminoácidos y bajo contenido de metionina y lisina (Dabrowski *et al.*, 1989); debido a esto, se han realizado varios estudios donde se suplementan los alimentos con los aminoácidos limitantes, en forma cristalina o protegidos contra la lixiviación, y se ha encontrado una mejora en el crecimiento de los organismos (El-Saidy y Gaber, 2002; Alam *et al.*, 2004; Forster y Dominy, 2006), y c) un bajo contenido energético en comparación con la harina de pescado (Milton y Slinger, 1986). A pesar de esto, los subproductos de semillas oleaginosas, como la pasta de soya, son las proteínas vegetales más ampliamente utilizadas en la alimentación animal, por su alto contenido de proteína, su amplia disponibilidad y su costo, que generalmente es menor al de la harina de pescado (Taylor y Berk, 1981 citado en: Martínez-Palacios, 1999).

Una ventaja de las oleaginosas es que la utilización primaria de estos productos vegetales es la obtención de aceite, la pasta derivada del proceso presenta un mayor contenido proteico en peso seco que la semilla original, y en consecuencia, su uso resulta adecuado como ingrediente en alimentos para salmón (*Salmo salar*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*), carpa y bagre (Martínez-Palacios *et al.*, 1999).

Entre los productos de oleaginosas, se incluyen las semillas de soya, algodón, girasol, ajonjolí, cacahuate y cártamo. El proceso a que se someten las semillas para la extracción del aceite da lugar a variaciones en el contenido de lípidos y proteínas residuales (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000; Cruz-Suárez *et al.*, 2009).

### *Cártamo*

El cártamo *Carthamus tinctorius L.*, es miembro de la familia Compositae o Asteracea. Es una planta anual ramificada, con numerosas espinas y brácteas sobre las hojas. La planta tiene una altura entre 30-150 cm con una cabeza floral globular (capitula) de color amarillo, anaranjado o rojo (Li Dajue y Mündel, 1997; Gecgel *et al.*, 2007).

El cultivo del cártamo es uno de los más antiguos del mundo. México es uno de los principales productores de semilla de cártamo (*C. tinctorius L.*) a nivel mundial, reportándose una producción de 110 751 t en el 2008, y es el país que más aceite de cártamo exporta (Ortega y Ochoa, 2003; FAOSTAT, 2009). Dado que el cártamo es resistente a la sequía y se puede cultivar en zonas áridas y semiáridas, es una de las oleaginosas que se cultivan en mayor proporción en el Noroeste de México (Figura 2) (SIAP/ANIAME, 2009). El aceite de cártamo es ampliamente utilizado para consumo humano, con un alto contenido de ácidos oleico y linoleico que puede cambiar de acuerdo con las variedades y condiciones climáticas de cultivo (Paredes y Ordorica, 1986).

### *Usos del cártamo*

En Egipto, los pétalos del cártamo se usaban para teñir la vestimenta que se utilizaba en las ceremonias religiosas. Las semillas de cártamo y guirnaldas de flores han sido encontradas con restos humanos que tienen más de 4000 años. De acuerdo con Weiss, (1971) en Europa y África se ha utilizado como medicamento (laxante).

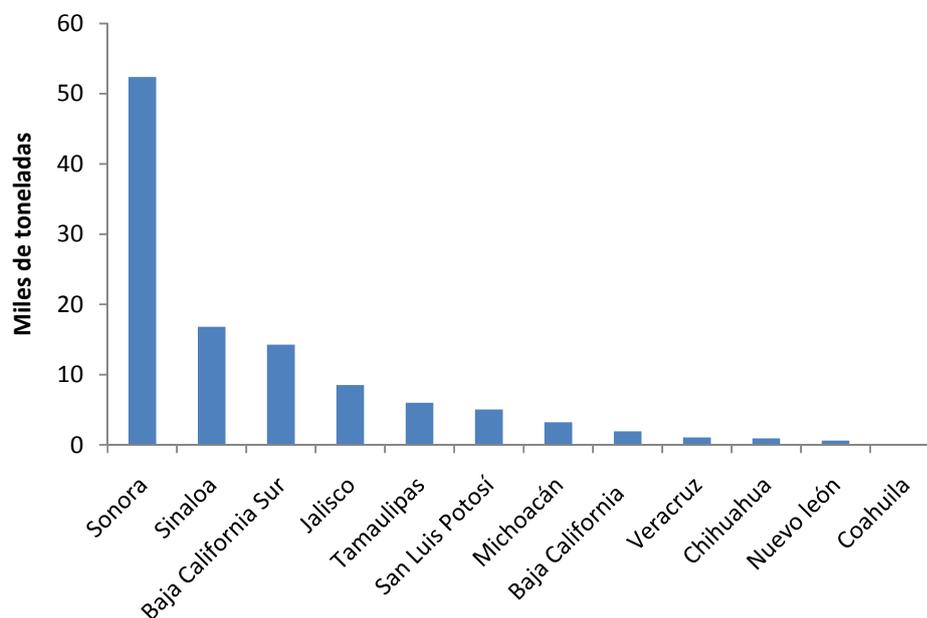


Figura 2. Producción de cártamo ciclo otoño-invierno 2008 en México (SIAP/ANIAME, 2009).

#### *Planta entera*

En Afganistán y la India, el té elaborado con el follaje del cártamo se considera un buen remedio para prevenir la infertilidad de las mujeres (Weiss, 1983). Todas las partes de la planta se venden en tiendas naturistas en India y Pakistán como “pansari” y como afrodisíaco (Knowles, 1965). El forraje es palatable para becerros y el valor alimenticio así como los rendimientos son similares o mejores a los que se obtienen de la avena y la alfalfa (Smith, 1996).

### *Flores*

En China se prepara té con flores de cártamo. También se utilizan para dar color a los alimentos; por ejemplo, el arroz, el pan y algunas salsas. China, principalmente en la provincia de Yunnan produce “carthamin” para su uso en la cocina y de las flores también se extraen tintes que se utilizan para teñir el cabello y las telas (Li Li Dajue y Mündel, 1997).

### *Semillas*

Las semillas enteras de cártamo se utilizan generalmente como alimento para aves; en especial, loros y palomas. Se ha encontrado que la harina de cártamo usada como fuente proteica en alimentos para pollos mejora el crecimiento y la utilización del alimento (Kuzmicky y Kohler, 1968). En Irán preparan una pasta de cártamo para elaborar queso, y en Etiopía las semillas sirven para preparar una bebida llamada “fitfit”. En Sudán, las semillas tostadas mezcladas con cebada o trigo sirven para preparar una botana. Por otro lado, en muchos países de Asia, las semillas de cártamo continúan siendo un medicamento para la prevención de la arteriosclerosis (Belayneh y Wolde-Mariam, 1991).

### *Aceite*

Alrededor del mundo, el aceite de cártamo se usa para cocinar, para condimentar ensaladas y para la fabricación de margarinas. El aceite de cártamo, nutricionalmente es similar al de oliva, con altos niveles de ácido oleico y linoleico, pero mucho más barato. Los ácidos grasos poli-insaturados se asocian con la reducción de los niveles de colesterol sanguíneo. De igual forma, se ha demostrado que los ácidos monoinsaturados como el

oleico ayudan a disminuir los niveles de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad o “malo”) sin afectar el colesterol HDL (lipoproteína de alta densidad o “bueno”), (Smith, 1996). El aceite de cártamo tiene una estabilidad oxidativa alta (más de 25 horas), no cambia a baja temperatura, por lo que es muy adecuado para la preparación de alimentos congelados. El aceite de cártamo, rico en ácido oleico, es muy estable a temperaturas altas, y no genera humo u olor cuando se fríen alimentos (Li Dajue y Mündel, 1997).

### *Pasta*

La pasta de cártamo, que se obtiene después de la extracción de aceite, contiene un elevado porcentaje de proteína bruta (25-42%) cuando se utiliza la semilla decorticada (Tacon, 1990; Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). Sin embargo, la pasta no se usa para el consumo humano debido a su sabor amargo, ocasionado por la presencia de glucósidos (Palter *et al.*, 1972 citado en: Madrigal y Ortega, 2002). Estos glucósidos son solubles en agua, por lo que pueden eliminarse por extracción de la proteína en su punto isoeléctrico (Paredes, 1991), y así los concentrados y otros productos de cártamo podrían utilizarse en alimentos para animales.

Generalmente, la pasta de cártamo se ha utilizado para alimentar organismos terrestres. Girau y Zweigart (1953) sustituyeron la pasta de soya del alimento con una pasta de cártamo decorticado (41% de proteína), para alimentar gallinas ponedoras, y después de 11 semanas de experimentación encontraron que no había diferencias entre los tratamientos en cuanto a la producción de alimento consumido, y la producción y calidad del huevo. Petersen *et al.* (1957) encontraron que la pasta de cártamo decorticado (35% de proteína)

puede reemplazar la pasta de soya en pequeñas raciones si los alimentos contienen un 5% de harina de pescado y 5-10% de harina de carne. Madrigal y Ortega reportaron en el 2002 que es posible utilizar un concentrado proteico de cártamo como sustituto parcial de las proteínas lácteas en reemplazantes de leche para becerros. El uso de cártamo en la alimentación para organismos acuáticos ha sido poco evaluado. Durante la década de 1950 y 1960 la empresa Pacific Oil Corporation (PVO) produjo en el Estado de California, alimentos peletizados con pasta de cártamo para alimentar truchas. Los peces del experimento aceptaron rápidamente los alimentos; sin embargo, los alimentos con cártamo tenían una menor estabilidad en el agua, comparados con los fabricados con pastas de menor contenido de fibra. Algunas granjas japonesas han utilizado el 5% de inclusión de pasta de cártamo en base seca en alimento para la alimentación de truchas sin afectar el crecimiento (Smith, 1996).

## JUSTIFICACIÓN

La acuicultura mundial se ha expandido en forma espectacular en los últimos 50 años. Desde una producción menor a un millón de toneladas al comienzo de la década de los 50's, hasta llegar a una producción de 51.7 millones de toneladas en 2006 con un valor de US\$78 800 millones de dólares (FAOSTAT, 2009). Esto significa que la acuicultura sigue creciendo a un ritmo mayor que otros sectores productores de alimentos de origen animal. No obstante, para que este crecimiento se mantenga, es necesario que los alimentos equilibrados cubran los requerimientos nutricionales de los organismos. Por esta razón, una línea actual de investigación en acuicultura se ha venido centrando en el estudio de factores que permitan la formulación y elaboración de alimentos cada vez más eficientes, que mejoren el crecimiento y la digestibilidad de nutrientes, y aumenten la rentabilidad de los cultivos con un ahorro significativo en los costos de producción.

La búsqueda de fuentes de proteína alternas a las harinas de pescado y a las pastas de oleaginosas, como la de soya es una actividad necesaria para resolver algunos de los retos económicos y nutricionales inherentes a la producción acuícola. En lo que se refiere a la pasta de soya, que sustituye a las harinas de pescado, tiene la desventaja de ser un ingrediente mayoritariamente de importación de Estados Unidos, alto costo de transporte y su uso compite con el consumo humano, pero afortunadamente contamos con opciones potenciales: México es uno de los principales productores mundiales de semilla de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), reportándose en 2007 una producción nacional de 106 343 toneladas y en 2008 de 98 700 toneladas (SIAP/ANIAME, 2009) destinadas a la fabricación de aceite comestible y pastas proteínicas.

Las pastas oleaginosas podrían tener un gran potencial para su uso en la acuicultura, porque son sub-productos disponibles en México y porque contienen niveles elevados de proteína. Otras ventajas de las oleaginosas radican en que su cultivo no necesita fertilizantes nitrogenados; además, existe en México una flexibilidad al surtir el producto, hay programas establecidos de embarque, disponibilidad de medios de transporte, entrega inmediata del producto y pago posterior, se tiene un buen abasto según los requerimientos del cliente, y otras ventajas, que en conjunto, evitan una serie de costos financieros inherentes a la importación. Además, el cliente tiene la posibilidad de establecer un diálogo con el proveedor que le permite dar a conocer sus necesidades específicas y así, crear esquemas adecuados y, si la harina es mexicana, siempre existirá la posibilidad de resolver rápidamente cualquier reclamación sobre el peso y calidad del producto. No obstante, las harinas de cártamo presentan también algunas desventajas, como es el alto contenido de fibra, la presencia de inhibidores de tripsina y un sabor amargo; causa por la cual se ha limitado su uso en la alimentación de algunos animales terrestres (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). Sin embargo, estas limitantes dependen de las condiciones de procesamiento de la pasta de cártamo, de tal manera que algunos de los efectos negativos pueden ser eliminados.

Como se mencionó con anterioridad, las pastas de oleaginosas se destinan principalmente a la alimentación de organismos terrestres. Sin embargo, el mercado actual de los productores de aceites y pastas podría ampliarse al de alimentos para organismos acuáticos, siempre y cuando el valor nutricional y el precio de estas pastas sean los más adecuados. Estos aspectos que se desconocen hasta el momento por falta de estudios dirigidos en este sentido, y que es

necesario explorar. Por tal motivo, en el presente trabajo de tesis se planteó determinar el valor nutricional de diversos productos de cártamo como fuentes de proteína alternativa en alimentos para juveniles del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*).

## OBJETIVOS

### *Objetivo general*

Evaluar el valor nutritivo del cártamo (*Carthamus tinctorius*) en alimentos para juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*.

### *Objetivos específicos*

- 1.- Caracterizar los productos de cártamo: harina integral y dos pastas (alta y baja en proteína), con base en su composición proximal y contenido de aminoácidos, ácidos grasos fósforo, calcio y factores antinutricionales.
2. Determinar la digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de la harina integral y dos pastas de cártamo (alta y baja en proteína) en juveniles de camarón *L. vannamei*.
3. Medir la atractabilidad y el consumo de alimentos para camarón que contienen los productos de cártamo, y compararlos contra un alimento a base de harina de pescado.
- 4.- Determinar el efecto de la sustitución de la pasta de soya con pastas de cártamo (alta y baja en proteína) en el alimento sobre el crecimiento, composición química y la digestibilidad *in vivo* de juveniles de camarón *L. vannamei*.

5.- Determinar el efecto de la sustitución parcial de la proteína de la harina de sardina con la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína en alimentos suplementados o no con D-L-metionina protegida sobre el crecimiento ponderal y la digestibilidad *in vivo* de juveniles de camarón *L. vannamei*.

## HIPÓTESIS

Con base en los diferentes procesos de fabricación utilizados para la obtención de la harina integral y las pastas de cártamo, se espera que en la primera, la composición química sea similar a la de la semilla, en cambio en las últimas, se tendrá una mayor concentración de proteína y fibra, y una menor concentración de lípidos.

Los niveles de los factores antinutricionales (saponinas, hemaglutininas e inhibidor de tripsina) en las pastas de cártamo serán menores que en la harina integral, debido al tratamiento térmico al que son sometidas durante el proceso de fabricación, por lo tanto, se espera que las pastas tendrán una mayor digestibilidad que la harina integral de cártamo.

La atractabilidad y el consumo de alimentos que contienen los productos de cártamo serán menores que los de un alimento a base de harina de pescado.

El uso del cártamo como sustituto de la pasta de soya en alimentos para camarón *L. vannamei*, no afectará la supervivencia, el crecimiento ponderal, la utilización del alimento de los organismos o la digestibilidad *in vivo* de nutrientes por los organismos porque la composición de aminoácidos es similar entre la soya y el cártamo.

La sustitución de la harina de sardina por pasta de cártamo alta en proteína en alimentos para camarón *L. vannamei* disminuirá el crecimiento ponderal y el consumo del alimento porque la composición de aminoácidos esenciales en el cártamo es menor que en el pescado. En particular, la disminución de lisina y arginina por la inclusión del cártamo

disminuirá la digestibilidad de proteína, en virtud de que la tripsina, que es la principal enzima digestiva en camarón, que hidroliza enlaces peptídicos donde se encuentran estos aminoácidos.

La disminución del contenido de metionina en los alimentos, debida a la sustitución parcial de la harina de sardina por pasta de cártamo alta en proteína, podrá ser compensada por la suplementación de D-L-metionina protegida en el alimento, y por ende, no se afectarán el crecimiento ponderal y el factor de conversión alimenticia.

## METODOLOGÍA

El presente trabajo se dividió en tres capítulos como se muestra en la Figura 3.

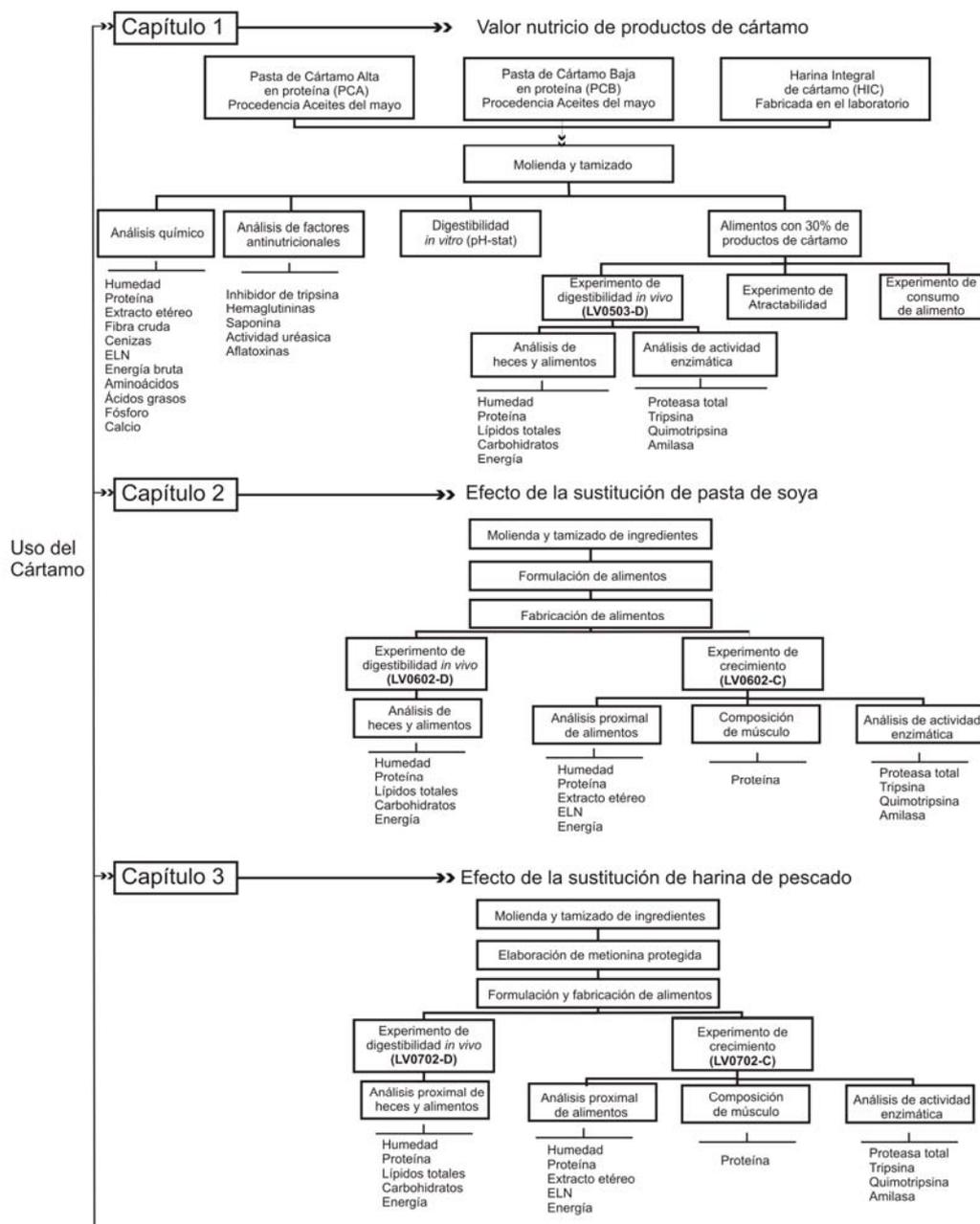


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en este estudio.

## **CAPÍTULO 1.**

### **VALOR NUTRICIONAL DE PRODUCTOS DE CÁRTAMO CON BASE EN SU COMPOSICIÓN PROXIMAL, CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS Y ÁCIDOS GRASOS, FÓSFORO, CALCIO, FACTORES ANTINUTRICIONALES, CUDAS Y DIGESTIBILIDAD *IN VITRO***

#### ***1.1. Material y métodos***

##### ***1.1.1. Materias primas e ingredientes***

La mayor parte de los ingredientes para elaborar los alimentos fueron adquiridos en casas comerciales (Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México y PIASA, La Paz, México). Tres productos de cártamo fueron evaluados. Una harina integral de cártamo (HIC), la cual fue elaborada en el laboratorio de Nutrición Acuícola del CIBNOR, con semillas de cártamo (S-518) producidas en el Valle del Yaqui en el estado de Sonora, México. Debido a que las semillas contenían un elevado contenido de aceite (~36%) no se pudieron moler y tamizar con los aparatos con los que se disponía en el CIBNOR, por lo cual se realizó el siguiente procedimiento para obtener una harina con tamaño de partícula homogénea. El aceite de la semilla fue extraído cuantitativamente con éter de petróleo en un sistema de extracción (Soxtec Avanti 2050, Foss Analytical, Höganäs, Suecia). La harina desengrasada fue pulverizada en un molino (Cyclotec 1093, Foss Analytical, Höganäs, Suecia) y finalmente el aceite que se había extraído se reincorporó a esta harina en la misma proporción en que se encontraba originalmente, y se homogenizó en una mezcladora (Kitchen Aid). El segundo producto que se evaluó fue la pasta de cártamo baja en proteína (PCB). El tercer producto fue la pasta de cártamo alta en proteína (PCA). Estos dos últimos productos fueron comercialmente producidos por medio de extracción

mecánica (prensas Hivex Hexpander) y solventes (hexano) por la empresa Aceites del Mayo S.A de C.V. en Sonora, México. Todos los ingredientes fueron molidos en un pulverizador (PULVEX 200, Molinos Pulvex, D.F., México) y tamizados a menos de 250- $\mu\text{m}$  (malla No. 35). Se almacenaron a 4°C hasta su uso.

### *1.1.2. Análisis químico proximal*

Los ingredientes y alimentos fueron analizados en su composición química proximal siguiendo la metodología descrita por la Asociación Oficial de Análisis Químico (AOAC, por sus siglas en inglés). La humedad se determinó por diferencia de peso; el contenido de cenizas se determinó por calcinación en mufla a 550°C por 6 h. (AOAC, 2005, No. 942.05); para la cuantificación de proteína bruta se utilizó un digestor y un destilador automático Tecator, siguiendo el método de microkjeldhal (AOAC, 2005, No. 2001.11); el extracto etéreo se cuantificó utilizando un sistema Soxtec Avanti, utilizando éter de petróleo como solución extractora (AOAC, 2005, No. 2003.05); para la cuantificación de lípidos totales en las heces de camarón y alimentos se siguió el método de Folch (Folch *et al.*, 1957). El contenido en fibra se determinó por hidrólisis sucesiva, ácida y básica (ácido sulfúrico e hidróxido de sodio), con un equipo Fibertec (AOAC, 2005, No. 978.10). El extracto libre de nitrógeno (ELN) se calculó restando de 100 los porcentajes de proteína bruta, extracto etéreo, fibra, y cenizas.

$$\text{ELN} = 100 - (\% \text{ Proteína} + \% \text{ Extracto etéreo} + \% \text{ Fibra} + \% \text{ Cenizas})$$

Para la cuantificación de carbohidratos en las heces de camarón y alimentos se siguió el método de Dreywood, 1946 basado en la solución de antrona (9,10-dihidro-9-

oxoantraceno). El contenido de óxido crómico se determinó por el método descrito por Furukaka y Tsukahara (1966).

### *1.1.3. Energía bruta*

Se usó un calorímetro adiabático (Parr Instrument Co. Modelo 1261, Moline, IL). Se elaboraron pastillas usando aproximadamente 1g de muestra, se secaron a 70°C durante 12h, se colocaron en crisoles de acero inoxidable, se colocaron 10cm de alambre Níquel-Cobre, de tal manera que tocara la muestra y se procedió a la combustión con oxígeno. Los líquidos obtenidos de la combustión de la muestra se titularon con carbonato de sodio 0.725N, usando naranja de metilo como indicador, y se midió la cantidad de alambre Níquel-Cobre quemado durante la combustión.

### *1.1.4. Cuantificación de aminoácidos*

Para determinar la composición de aminoácidos de los productos de cártamo se llevó a cabo una hidrólisis ácida con 3 mL de HCL 6N por 6h a 150°C, de 1–3 mg de muestra seca, previamente desengrasada. Se agregó tioglicolato de sodio para prevenir la oxidación de las muestras. Las muestras hidrolizadas fueron resuspendidas en 1 mL de amortiguador de citrato de sodio 0.2M pH 2.2 y derivatizadas con 250µL de *o*-oftalaldehído. La muestra hidrolizada (10 mL) fue inyectada a un cromatógrafo de alta resolución (HPLC) (Varian 9012, Varian Associates, Lake Forest, CA, EUA) equipado con un detector fluorescente con un filtro de excitación de 350-nm y un filtro de emisión de 455-nm. Para la separación de los aminoácidos se utilizó una columna Microsorb Short C18 de 3 µm (10cm × 4.6mm)

empacada con partículas de octadecil dimetilsilano conectada a una precolumna Microsorb (30cm × 4.6mm) empacada con el mismo material. El flujo fue de 1.5 mL min<sup>-1</sup> a 25–29°C. Los aminoácidos fueron completamente eluidos después de 20min y la columna equilibrada por 10min. Se utilizaron estándares de aminoácidos así como ácido L- $\alpha$ -amino n-butírico (Sigma, C3875; St. Louis, MO, EUA) como estándar interno. Se utilizó el software Star Chromatography Workstation Version 6.0 (Varian Associates, Lake Forest, CA, EUA) para la integración de los datos (Vázquez-Ortiz *et al.*, 1995). Se calculó el cómputo químico de los productos de cártamo para comparar la composición de aminoácidos de estos con las necesidades estimadas de aminoácidos del camarón *L. vannamei* según Tacon *et al.*, 2002.

#### 1.1.5. Cuantificación de ácidos grasos

Para determinar la composición de ácidos grasos de los productos de cártamo se pesaron aproximadamente 15 mg de cada muestra, los cuales fueron colocados en un tubo de vidrio de 15 mL con tapa de teflón. Se les agregó 12 mL de solución cloroformo:metanol (2:1) para la extracción de lípidos (Bligh y Dyer, 1959), 20 $\mu$ L de agua destilada, 10 $\mu$ L de antioxidante (BHT) a 0.5g/mL y 10 $\mu$ L del ácido tricosanoico 23:0 a 2mg/mL (Sigma, T-6543; St. Louis, MO, EUA) como estándar interno. Las muestras fueron guardadas a –20°C por 24 horas para asegurar la extracción total de los lípidos. Las muestras de cártamo fueron maceradas con una varilla de vidrio y el extracto se sometió a una disrupción ultrasonica a 40KHz/min (Sonicador Branson 2510, Danbury, CT, EUA) durante 15 minutos. El extracto fue separado en dos partes iguales y una parte fue evaporada hasta la obtención de 1 mL pasando por una corriente de nitrógeno. El extracto fue separado con microcolumnas compuestas de una pipeta Pasteur empaquetada con sílice

humedecida al 6%. Los lípidos totales fueron eluidos utilizando 5 mL de cloroformo:metanol (98:2) y 7.5 mL de metanol. El eluido se separó en dos partes y una de ellas se evaporó a sequedad por medio de un evaporador centrífugo al vacío (Jouan RCT90, Saint-Herblain, Francia). Esta parte fue derivatizada con  $\text{BF}_3$  (14% metanol, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) a  $95^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Una vez enfriados los tubos, se añadió 1 mL de hexano y se realizaron de 2 a 3 lavados, que consistieron en adicionar 1 mL de agua destilada (previamente extraída con hexano) para eliminar impurezas del hexano con los metil ésteres de ácidos grasos (FAME). Las muestras fueron centrifugadas a  $720 \times g$  a  $5^\circ\text{C}$  por 5 minutos (Allegra<sup>TM</sup> 21R, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) en cada lavado. Los restos de agua fueron eliminados por congelación a  $-20^\circ\text{C}$  y el hexano se transfirió a viales ámbar de 2 mL para ser inyectados (1  $\mu\text{L}$ ) en un cromatógrafo de gases (6890-N, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) equipado con una columna de sílice DB-23 (30m  $\times$  0.25mm de diámetro interno  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de capa (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA), se utilizó un detector de ionización de flama con helio como gas portador (0.7 mL  $\text{min}^{-1}$ ), y una rampa de temperatura de 110–220  $^\circ\text{C}$ . La identificación de los ácidos grasos esterificados fue realizada comparando sus tiempos de retención con los de estándares (Sigma, Bellefonte, PA, EUA). La determinación cuantitativa de los ácidos grasos se realizó integrando las áreas de cada uno de los picos, siguiendo el protocolo de Mercier (2007).

#### *1.1.6. Cuantificación de calcio y fósforo*

Para determinar el contenido de calcio y fósforo se pesaron entre 0.25 a 0.3 g de producto de cártamo a los cuales se les agregó 10 mL de ácido nítrico concentrado

(Spectrum. No. 1079), se calentó a 80°C por 30min, posteriormente se aforó a 50 mL con agua desionizada para finalmente filtrarse con papel filtro. Se realizó una curva estándar de 2 a 30µg/mL ó 2 a 30ppm de estándar de calcio (carbonato de calcio en ácido nítrico al 2%, Spectrum Lote. UC1636. No.AA145). Se analizó el contenido de calcio usando un espectrofotómetro de absorción atómica GBC modelo Avanta PM a una longitud de onda de 422.7nm, usando óxido nitroso-acetileno. Para calcular la concentración de calcio se hizo una curva estándar de 2 a 30 µg/mL de estándar de calcio (carbonato de calcio en 2% de ácido nítrico, Spectrum, AA145) (Sapp y Davidson, 1991). El fósforo se cuantificó colorimétricamente, usando el método del color amarillo del complejo vanadomolibdofosfórico en un sistema acidificado con ácido nítrico al 70%, la lectura se realizó en un espectrofotómetro de microplaca Marca Labsystems, Modelo Multiscan Ascent. Para calcular la concentración de fósforo se realizó una curva estándar de fósforo de 0 a 2.5 mg/mL (Jackson, 1958).

### *1.1.7. Factores antinutricionales en productos de cártamo*

#### *1.1.7.1. Inhibidor de tripsina*

Se determinó la actividad del inhibidor de tripsina siguiendo la metodología descrita por Kakade y colaboradores (1974) utilizando Benzoil-Arg-*p*-Nitroanilida (BAPNA) (Sigma, B4875; St. Louis, MO, EUA) como sustrato. Los productos de cártamo se sometieron a una extracción por 3 horas en NaOH 0.01N, a pH alrededor de 9.0. Se mezclaron 2 mL del extracto con 2 mL de solución de tripsina tipo I de páncreas bovino (Sigma, T-8003; St. Louis, MO, EUA) al 0.002% (p/v, en HCl 0.001M pH 8.0, la reacción se inició al adicionar 5 mL del sustrato BAPNA (0.92mM en amortiguador de Tris 0.05M /

0.02M CaCl<sub>2</sub>, pH 8.2) a 37°C. Después de 10 minutos, la reacción se detuvo con 1 mL de ácido acético al 30%. Se corrió a la vez un blanco utilizando la misma mezcla de reacción pero se adicionó el ácido acético antes que el sustrato. La mezcla de reacción se filtró en papel filtro (Whatman No. 3) y se leyó la absorbancia a 410 nm. La unidad de enzima se definió como el incremento de 0.01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 mL de mezcla de reacción, y se expresó como las unidades de tripsina inhibidas por mg de muestra seca (UTI/ mg de muestra) o UTI/ mg de proteína.

#### *1.1.7.2. Inhibición de tripsina en productos de cártamo*

El efecto inhibitorio de los productos de cártamo sobre las proteinasas de los extractos enzimáticos de la glándula digestiva de camarones fue medido por la reducción de la actividad tripsina. El método se basó en poner en el pozo de una microplaca, 10µL de extracto de cártamo y 10µL de extracto de hepatopáncreas en diferentes tiempos de incubación (30, 60 y 120 minutos). Transcurrido el tiempo se agregaron 200µL de BAPNA (Sigma, B-4875; St. Louis, MO, EUA) 1.25mM en amortiguador Tris HCl pH 7. A continuación, se midió la absorbancia a 405nm. La unidad de tripsina se definió de acuerdo con Dimes y Haard (1994). Una unidad de tripsina es 1µmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar 8,800cm<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>. La actividad específica se definió en Unidades por mg proteína soluble. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de tripsina.

### *1.1.7.3. Hemaglutininas*

El método se basó en efectuar una hemaglutinación no inmunológica que se produce por la unión de las lectinas con los glóbulos rojos. Primero se realizó la extracción de las lectinas de los productos de cártamo con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.2 (1.4g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 9.68g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 4 °C durante 12h. La mezcla se filtró con una gasa para eliminar partículas grandes para posteriormente centrifugar en una centrifuga Beckman J2-MC con un rotor JA.20 a 6000 rpm a 4°C durante dos horas, el sobrenadante se filtró en una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (Albet, 135, Barcelona, España). Para preparar el paquete de eritrocitos se colocaron 10 mL de sangre humana (RH-O+) en un tubo (sterile Becton Dickinson vacutainer Systems No. L42414) con anticoagulante (EDTA), se centrifugó en una centrífuga Solbat C-300 a 2500rpm durante 15min, se extrajo el suero con una pipeta Pasteur. Al paquete de eritrocitos se le agregó solución salina de la misma cantidad del suero extraído. Se hicieron tres lavados con solución salina, mezclando suavemente y centrifugando en una centrífuga Solbat C-300 a 2500rpm durante 15min. Se preparó una solución al 4% con los eritrocitos obtenidos utilizando una solución salina de NaCl al 0.85% (p/v). Para la cuantificación de unidades de aglutinación se utilizaron microplacas de 96 pozos. En todos los pozos se pusieron 25  $\mu\text{L}$  de solución salina (NaCl 0.85%, p/v), en la primera fila se pusieron 25  $\mu\text{L}$  del extracto de cártamo y en las siguientes filas se realizaron diluciones sucesivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 etc.). A todos los pozos se les agregó 25  $\mu\text{L}$  de la solución de eritrocitos al 4%. La placa se agitó suavemente con movimientos en “8” y se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente (25 °C). Finalmente se observó la aglutinación en los pozos y se anotó la dilución más alta en donde

se presentó aglutinación. Se utilizó como estándar interno la lectina del frijol *Phaseolus vulgaris* (Sigma, L-8629; St. Louis, MO, EUA) (Gómez, 1992).

#### 1.1.7.4. Saponinas

Las saponinas de las muestras de cártamo se determinaron siguiendo la metodología descrita por Walter *et al.* (1989). En resumen: se pesó 0.1g de la muestra de cártamo desengrasada y tamizada a menos de 250  $\mu\text{m}$ . La muestra se colocó en un embudo de separación y se le agregaron 30 mL de metanol:agua (9:1 v/v), se agitó y se dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente (27 °C). En un tubo de ensaye se agregaron 1 mL del filtrado y 9 mL de agua destilada, de esta mezcla se tomó 1 mL en un tubo de ensaye y se agitó durante un minuto en un Vortex a la máxima velocidad posible. A los 15min de reposo se observó la altura de la espuma y se midió con una regla. Para control positivo se pesó 1g de reactivo de saponinas y se procedió igual que las muestras.

La escala utilizada para evaluar los resultados fue la siguiente:

Altura de menos de 5mm = prueba negativa.

Altura de 5-9mm = contenido bajo.

Altura de 10-14mm = contenido moderado

Altura mayor de 15mm = contenido alto.

#### *1.1.7.5. Actividad ureásica*

Las muestras de cártamo se molieron a menos de 25  $\mu\text{m}$ . Se pesó 0.2g de muestra en un tubo de ensaye al cual se le agregaron 10 mL de solución de urea (15g de urea en 500mL de solución de potasio monobásico 0.05M) y se colocó en un baño María a 30 °C durante 30 min. Finalmente se midió el pH con un potenciómetro calibrado a 25°C. Se registró la diferencia en términos de pH entre el problema y el blanco como incremento de pH o como actividad ureasa (AOAC, 2002; Norma Oficial Mexicana NMX-Y-117-SCFI-2004).

#### *1.1.7.6. Aflatoxinas*

En un vaso de licuadora se pusieron 25g de muestra de cártamo y se le agregaron 125 mL de metanol al 80%, se mezcló a alta velocidad en una licuadora durante un minuto y el extracto se filtró en un papel filtro (Whatman 1). Del extracto filtrado se tomaron 20 mL y se diluyeron con 20 mL de agua destilada, este extracto se filtró nuevamente en un papel de fibra de vidrio (Whatman 934). Quince mililitros del filtrado se pasaron a través de una columna de inmunoafinidad (AflaTest<sup>®</sup>-P), conteniendo anticuerpos monoclonales específicos para aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> a una tasa de 2 gotas/s con la ayuda de una bomba de mano. Posteriormente la columna se lavó dos veces con 10 mL agua destilada cada vez y se llevó a sequedad. Las aflatoxinas fueron eluidas de la columna con la ayuda de 2 mL de metanol grado HPLC. Posteriormente las aflatoxinas totales fueron cuantificadas por fluorescencia derivatizándolas con 2 mL de solución diluida de bromo. Después de exactamente 60s se leyó en un fluorómetro (Sequoia Turner (Vicam) a 450nm de emisión y 360nm de excitación. Se utilizaron estándares de micotoxinas (Vicam, 33020)

para calibrar el fluorómetro (Norma Oficial Mexicana NOM- 188-SSAI-2002; AOAC, 2002 No. 991.31).

#### *1.1.8. Experimento de CUDA de productos de cártamo*

Se evaluaron tres productos de cártamo: 1) pasta de cártamo alta en proteína (PCA), 2) pasta de cártamo baja en proteína (PCB), ambas donadas por una aceitera comercial (Aceites del Mayo S.A. de C.V., Sonora, México), y 3) harina integral de cártamo (HIC) fabricada en el laboratorio de Bromatología del CIBNOR, siguiendo el siguiente procedimiento: 200g de semilla de cártamo fueron molidos por 10 minutos en una licuadora a alta velocidad, posteriormente, lotes de 3g de muestra fueron sometidos a una doble extracción de grasa en un equipo Soxtec Avanti 2050 (Foss Analytical, Höganäs, Sweden), utilizando éter de petróleo como solución extractora. De las extracciones se obtuvieron dos fracciones, una fracción líquida (aceite de cártamo) y una fracción sólida (pasta de cártamo). Para eliminar los residuos de éter de petróleo en la fracción líquida se utilizó nitrógeno gaseoso, posteriormente se le agregó antioxidante Butilhidroxitolueno (BHT; MP Biomedicals No.101162, Solon, OH EUA) a una concentración final de 0.04% (p/v). El aceite de cártamo se mantuvo a 4°C y en obscuridad hasta su utilización. La fracción sólida fue molida en un molino (Cyclotec 1093, Foss Analytical, Höganäs, Sweden) y tamizada a través de un tamiz de 250 µm. Finalmente las dos fracciones, de todos los lotes procesados, fueron reintegradas, conservando la proporción original de extracto étereo en la semilla, y posteriormente fueron mezcladas en una mezcladora (Kitchen Aid) durante 30min. La harina integral de cártamo resultante fue embolsada, etiquetada y almacenada bajo refrigeración (4°C) hasta su uso.

#### *1.1.8.1. Formulación de los alimentos*

La formulación de los alimentos se hizo acorde a los resultados de la composición proximal y de aminoácidos de los ingredientes con la ayuda del paquete MIXIT-Win<sup>MR</sup> (Agricultural Software Consultants, Inc., San Diego, CA, EUA) tomando en cuenta los requerimientos nutricionales reportados para camarón blanco *L. vannamei* (Akiyama *et al.*, 1991) y las relaciones de proteína y energía recomendadas para camarón (Cruz-Suárez *et al.*, 2000).

#### *1.1.8.2. Sistema experimental.*

Los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR. El sistema de cultivo consistió en acuarios de fibra de vidrio con una capacidad de 60 L (34 x 55 x 38cm) que contaron con agua de mar filtrada a través de filtro de arena, de cartucho (10 y 1  $\mu$ m) y luz ultravioleta. Cada acuario estuvo equipado con un sistema de drenaje para poder hacer los recambios diarios, así como un exhaustor externo que permite airear el agua con la ayuda de mangueras de aireación alimentadas por un soplador de 5HP. Se cubrieron con una malla mosquitero para evitar la fuga de organismos. La temperatura del agua en los acuarios fue controlada por calentadores sumergibles de 250W (EBO-JAGER) con precisión de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . La iluminación del sistema experimental se hizo con lámparas de 200W controladas por un temporizador (“timer”) a manera de mantener una fotofase de 12h de luz, a partir de las 6:00 am constante a lo largo del experimento.

#### 1.1.8.3. Organismos experimentales

Los camarones utilizados fueron juveniles de la especie *L. vannamei* (Boone, 1931), donados por la empresa Acuicultores de la Península (APSA). Estos organismos fueron aclimatados en el laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, dentro de tanques de plástico con 2,500L de capacidad a una temperatura de 27°C y salinidad de 40ups. Los camarones se alimentaron dos veces al día (10:00 y 16:00h) con un alimento comercial PIASA<sup>MR</sup> con 35% de proteína, hasta que alcanzaron el tamaño requerido para el experimento.

#### 1.1.8.4. Diseño experimental y condiciones de cultivo

Para medir la digestibilidad *in vivo* se diseñaron 4 alimentos: Un alimento control con 35% de proteína (dieta de referencia de Monterrey ARD-F-65-050301, Tabla III), y 3 alimentos experimentales donde se incluía la harina integral de cártamo (HIC-D), pasta de cártamo baja en proteína (PCB-D) y pasta de cártamo alta en proteína (PCA-D) a un nivel de inclusión del 30%, y 1% de óxido crómico como marcador inerte. (Tabla IV).

Después de una semana de aclimatación, los juveniles de *L. vannamei* se pesaron individualmente y se seleccionaron 200 camarones con peso entre 5 y 6g. Se distribuyeron aleatoriamente en 20 acuarios a razón de 10 organismos por acuario, a manera de contar con cinco réplicas por cada tratamiento alimenticio.

Cada uno de los 4 alimentos fue asignado aleatoriamente a 5 acuarios. Los camarones fueron aclimatados a los alimentos con óxido crómico durante 7 días antes de iniciar la

colecta de las heces. El experimento tuvo una duración de 45 días tiempo necesario para coleccionar aproximadamente 15 gramos de heces de cada acuario. Diariamente se monitorearon la temperatura ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ) con un termómetro de mercurio, la salinidad ( $39 \pm 1$  ups) por medio de un refractómetro portátil (Vista A366 ATC) y el oxígeno disuelto ( $5.0 \pm 0.3$  mg/mL) con un oxímetro portátil (YSI, 550A).

Los restos de alimento no consumido, mudas y heces fueron extraídos de los acuarios todos los días por la mañana (9:00h) y posteriormente se realizó un recambio de agua equivalente al 80% del volumen total. Una vez limpios los acuarios, se suministró el alimento (10:00h) correspondiente al 10% de la biomasa de los camarones, al paso de dos horas se llevó a cabo la primera colecta de las heces en cada acuario. Después de esta primera colecta, se volvió a proporcionar alimento (14:00), para luego de una hora proceder a una segunda ronda de colecta, por lo que las heces obtenidas corresponden a aquellas excretadas durante aproximadamente 3 a 4 horas después de la primera alimentación.

**Tabla III. Composición de ingredientes de la dieta de referencia (% en base húmeda).**

Ingrediente	%
Harina de pescado <sup>1</sup>	34.0
Harina de trigo <sup>2</sup>	45.0
Pasta de soya <sup>3</sup>	14.0
Lecitina de soya <sup>4</sup>	3.5
Aceite de pescado <sup>5</sup>	2.8
Premezcla de vitaminas <sup>6</sup>	0.3
Premezcla de minerales <sup>7</sup>	0.15
Vitamina C <sup>8</sup>	0.06
Vitamina E <sup>9</sup>	0.03
Antioxidante (etoxiquina) <sup>10</sup>	0.02

<sup>1</sup>Sardina 57% proteína bruta, Alimentos marinos, Ciudad Obregón, Sonora, México; <sup>2</sup>Harina de trigo 12-13% proteína bruta, Ciudad Obregón, Sonora, México; <sup>3</sup>Pasta de soya, extracción con solvente, 47% proteína bruta, ADM, EUA; <sup>4</sup>Lecitina de soya. ADM, EUA; <sup>5</sup>Aceite de pescado, Alimentos Marinos, Ciudad Obregón, Sonora, México; <sup>6</sup>Composición de premezcla de vitaminas (IU o mg/kg): A, 4,000,000 IU; D<sub>3</sub>, 3,200,000 IU; E, 60,000; B<sub>1</sub>, 24,000; B<sub>2</sub>, 16,000; DL-Ca pantoténico, 30,000; B<sub>6</sub>, 30,000; B<sub>12</sub>, 80; C, 60,000; K<sub>3</sub>, 16,000; H, 400; niacina, 20,000; ácido fólico, 4000; <sup>7</sup>Composición de premezcla de minerales (mg/kg): Co, 2000; Mn, 16,000; Zn, 40,000; Cu, 20,000; Fe, 1; Se, 100; I, 2000; <sup>8</sup>Vitamina C (L-ascórbico 1-2-polifosfato, 35%). Basf, D.F., México; <sup>9</sup>Vitamina E. Basf, D.F., México; <sup>10</sup>Antioxidant. Dresquin 66, Dressen, D.F., México.

**Tabla IV. Formulación de los alimentos usados para determinar la digestibilidad *in vivo* de alimentos con cártamo.**

INGREDIENTE (g / 100 g base húmeda)	ALIMENTOS <sup>1</sup>			
	DC	HIC-D	PCB-D	PCA-D
Dieta de referencia Monterrey <sup>2</sup>	98.0	68.0	68.0	68.0
Harina integral de cártamo <sup>3</sup>		30.0		
Pasta de cártamo baja en proteína <sup>4</sup>			30.0	
Pasta de cártamo alta en proteína <sup>5</sup>				30.0
Alginato de sodio <sup>6</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0
Óxido crómico	1.0	1.0	1.0	1.0

<sup>1</sup>DC = Alimento control; HIC-D = Alimento con harina integral de cártamo; PCB-D = Alimento con pasta de cártamo baja en proteína; PCA-D = Alimento con pasta de cártamo alta en proteína. <sup>2</sup>ARD-F-65-050301; <sup>3</sup>HIC0505; <sup>4</sup>PCbp0409; <sup>5</sup>PCap0409; Sigma-Aldrich 180947-050301; <sup>6</sup>IMPEX Continental 12233-050301 Monterrey, N.L.

La colecta de las heces se llevó a cabo mediante sifoneo con la ayuda de una manguera de plástico (0.5cm de diámetro) unida a un tubo de vidrio en la punta. El material fecal de cada acuario fue colectado en un recipiente de plástico, enjuagado suavemente en agua destilada para eliminar sales, congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , liofilizado y homogenizado con la ayuda de una espátula, a fin de contar con una sola muestra por acuario (réplica biológica). Posteriormente, las heces fueron analizadas por triplicado para determinar sus contenidos de proteína, lípidos, carbohidratos y óxido crómico (ver sección 1.1.2).

### 1.1.8.5. Criterios de evaluación

Por medio de un equilibrio de materia, tomando como base al óxido crómico, se estimaron los CUDA de materia seca, proteínas, lípidos y carbohidratos (CUDAm, CUDAp, CUDAI y CUDAc, respectivamente) de los alimentos con las siguientes ecuaciones (Maynard *et al.*, 1981).

$$\% \text{CUDAm} = 100 - \left[ \left( \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} \right) \times 100 \right]$$

$$\% \text{CUDAnutrientes} = 100 - 100 \left[ \left( \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces}} \times \frac{\% \text{nutriente en heces}}{\% \text{nutriente en dieta}} \right) \right]$$

Los coeficientes de utilización digestiva aparente de ingredientes (CUDAI) fueron determinados acorde con el método descrito por Cho y Slinger (1979) con algunas modificaciones de la expresión matemática propuesta por Bureau y Hua (2006).

$$\begin{aligned} \text{CUDAI (materia seca)} = \% \text{CUDA}_{\text{alimento experimental}} + [(\text{c}) / (0.3 \times \% \text{Materia seca}_{\text{ingrediente}} \\ \text{experimental})] + [(\% \text{CUDA}_{\text{alimento experimental}} - \% \text{CUDA}_{\text{Alginato+Óxido crómico}}) \times (0.0061 \times \% \\ \text{Materia seca}_{\text{Alginato+Óxido crómico}}) / (0.3 \times \% \text{Materia seca}_{\text{ingrediente experimental}})] \end{aligned}$$

$$\text{CUDAI (nutriente)} = \% \text{ CUDA}_{\text{alimento experimental}} + [(\% \text{ CUDA}_{\text{nutriente alimento experimental}} - \% \text{ CUDA}_{\text{nutriente alimento de referencia}}) \times (0.6939 \times \% \text{ Nutriente}_{\text{alimento de referencia}}) / (0.3 \times \% \text{ Nutriente}_{\text{ingrediente experimental}})] + [(\% \text{ CUDA}_{\text{nutriente alimento experimental}} - \% \text{ CUDA}_{\text{Alginato+ Óxido crómico}}) \times (0.0061 \times \% \text{ Nutriente}_{\text{Alginato+Óxido crómico}}) / (0.3 \times \% \text{ Nutriente}_{\text{ingrediente experimental}})]$$

Donde: 0.6939, 0.3 y 0.0061 son respectivamente las tasas de inclusión de la mezcla de referencia (0.6939 = 68% / 98%), ingrediente experimental (30%) y una pequeña cantidad de ácido algínico y óxido crómico que subieron sus contribuciones al 1% (en lugar de 0.7% que se obtiene típicamente del 70% de la mezcla de referencia + 30% ingrediente experimental). El tercer término de la expresión matemática de los CUDAI fue nulo para proteínas y lípidos, (la mezcla de óxido crómico y ácido algínico no presenta estos nutrientes,  $\% \text{ nutriente}_{\text{Alginato+Óxido crómico}} = 0$ ), el valor de 0.5% para materia seca se obtuvo de la siguiente manera:  $(70 - 45) \times (0.0061 \times 100) / (0.3 \times 100) = 0.5\%$ , mientras que el valor de 1.7% para carbohidratos se obtuvo de la siguiente manera:  $(90 - 45) \times (0.0061 \times 50) / (0.3 \times 25) = 1.7\%$

Los CUDA de los componentes energéticos totales (energía digestible) (CUDAce) se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$\text{CUDAce (\%)} = (\text{energía digestible, kJ/g} / \text{energía bruta, kJ/g}) \times 100.$$

Donde la energía digestible (ED) se calculó con la fórmula:

$$\text{ED (kJ/g)} = [(\text{g nutriente } 100 \text{ g}^{-1} \text{ alimento}) \times (\text{CUDA nutriente} / 100) \times \text{valor energía, kJ g}^{-1}].$$

La energía digestible fue calculada basándose en los valores energéticos de 23, 35 y 15kJ/g para la proteína, lípidos y carbohidratos, respectivamente según Cousin (1995).

Al inicio y final del bioensayo, para obtener los hepatopáncreas, se disectaron 5 camarones en estadio de intermuda “C” (determinado por medio de la observación del desarrollo setal o setogénesis de los urópodos de los camarones con la ayuda de un estéreomicroscopio con una lente de 40X) de cada tratamiento. Los hepatopáncreas se utilizaron para medir la actividad de enzimas digestivas, así como la digestibilidad *in vitro* de las pastas de cártamo y de los alimentos que se utilizaron en el experimento de digestibilidad *in vivo*.

#### *1.1.9. Análisis de actividad enzimática*

##### *1.1.9.1. Extractos enzimáticos de la glándula digestiva.*

Los extractos enzimáticos se prepararon homogenizando los hepatopáncreas en agua destilada a una proporción de 1:3p/v. Posteriormente fueron centrifugados a 16 000 x g, durante 30min a 4°C, los sobrenadantes se guardaron en alícuotas de 500 µL y se almacenaron a -20°C. El sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de proteína soluble, de actividad de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina y  $\alpha$ -amilasa.

##### *1.1.9.2. Cuantificación de proteína soluble*

La concentración de proteína soluble en los extractos se determinó por el método de Bradford (1976), técnica fundamentada en el cambio de color del Azul Brillante de Coomassie G-250. Su color rojo se convierte en azul después de formar un complejo con la proteína. El complejo presenta una absorbancia máxima a 595nm. El protocolo utilizado

fue el siguiente: a 10  $\mu\text{L}$  de extracto problema se le añadió 190  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford [(100 mg de azul coomassie (G, Sigma, B-0770; St. Louis, MO, EUA) + 50 mL de Etanol al 95% (Panreac Química SA, 141086.1214 + 100 mL de ácido ortofosfórico (Panreac Química SA, 141032.1211) al 85% (w/v) + 50mL de NaOH 1M (Panreac Química SA, 141687.1214)]. La densidad óptica (DO) se midió a 595nm en un espectrofotómetro uv/visible GBC911 entre los 5 y 10 minutos del comienzo de la reacción colorimétrica. La recta patrón o de calibrado se llevó a cabo con una solución estándar de albúmina bovina (Sigma, A-6003; St. Louis, MO, EUA) (1 mg/mL). Dado que la sensibilidad de este método está comprendida entre 0 y 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , aquellos extractos que daban una absorbancia a 595nm superior a 0.6 se diluyeron convenientemente para ajustar el valor de absorbancia a la recta de calibrado.

#### *1.1.9.3. Actividad de proteinasas alcalinas*

La actividad de proteinasas alcalinas de los extractos de hepatopáncreas se midió por el método de Kunitz modificado por Walter (1984). El protocolo utilizado fue el siguiente: 20 $\mu\text{L}$  del extracto enzimático fueron mezclados con 500 $\mu\text{L}$  de 100mM Tris-HCl + CaCl<sub>2</sub> 10mM a pH 8.0. La reacción fue iniciada por la adición de 500 $\mu\text{L}$  de caseína (ICN, 101289) al 1% (p/v) y fue detenida después de 30min agregando 500 $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v). La mezcla de reacción se dejó reposar durante 20min a 4°C para que las proteínas precipitaran. Se centrifugó a 16 500 x g por 5min a 4°C. La absorbancia del sobrenadante fue registrada a 280nm en un espectrofotómetro uv/visible GBC911. Se utilizó un control en donde se hizo la misma mezcla de reacción pero se

antepuso el TCA sobre el sustrato. La actividad de un extracto problema se determinó utilizando las *Ecuaciones 1 y 2*.

**Ecuación 1.** Cálculo de la actividad en unidades por mL.

$$\text{Unidades/mL} = \frac{\text{DABS}_{280\text{nm}} \times \text{volumen final}_{\text{reacción}} \text{ (mL)}}{\text{CEM}_{\text{tirošina}} \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen extracto (mL)}}$$

**Ecuación 2.** Cálculo de la actividad en unidades por mg de proteína soluble en el extracto.

$$\text{Unidades / mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades/mL}}{\text{mg proteína soluble/mL}}$$

siendo;

$\Delta\text{ABS}_{280\text{nm}}$  = el incremento de absorbancia a 280nm;

Volumen final reacción, =1.52 mL;

$\text{CEM}_{\text{tirošina}} = 0.008 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (calculado de la recta de regresión)

#### 1.1.9.4. Actividad de tripsina

La actividad de tripsina se determinó usando BAPNA ( $\alpha$ -N-Benzoyl- DL-Arg- $\rho$ -nitroanilida) (Sigma, B-4875; St. Louis, MO, EUA) como sustrato según el método de Erlanger *et al.* (1961). Se preparó una solución 1mM de BAPNA en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevó a 100 mL usando amortiguador 1.25 mM en amortiguador de Tris-HCl, 1.25mM, pH 7. Para iniciar la reacción se mezclaron 200 $\mu$ L de

sustrato con 10µL del extracto enzimático. A continuación, se midió la absorbancia a 405nm en un espectrofotómetro uv/visible GBC911 utilizando un blanco (mezcla de reacción con agua destilada) (agua destilada) como control. Una unidad de tripsina se definió de acuerdo con Dimes y Haard (1994). Una unidad de tripsina es 1µmol de p-nitroanilida liberada por minuto usando como coeficiente de extinción molar  $8800\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . La actividad específica se definió en Unidades por mg proteína soluble.

#### *1.1.9.5. Actividad de quimotripsina*

La actividad de quimotripsina en los extractos enzimáticos fue medida usando 200µL de N-Succinil-(Ala)<sub>2</sub>-Pro-Phe p-Nitroanilida (SAPNA) (Sigma, S-7388; St. Louis, MO, EUA) 0.1mM en amortiguador Tris-HCl, pH 8.0 más 10µL de extracto de hepatopáncreas. Se leyó la absorbancia a 410nm en un espectrofotómetro uv/visible GBC911. Una unidad de actividad enzimática fue definida como 1 µmol de p- nitroanilida liberada por minuto, usando un coeficiente de extinción de  $8800\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

#### *1.1.9.6. Actividad de α-amilasa*

La actividad de α-amilasa (α1-4 glucán 4-glucanohidrolasa) de los extractos fue determinada de acuerdo al método de Somogy–Nelson descrito por Robyt y Whelan (1968), usando almidón (Panreac Química, 121096) (2% p/v) como sustrato. El protocolo utilizado fue el siguiente: 10µL de extracto de hepatopáncreas fueron mezclados con 125µL de amortiguador fosfato-citrato 0.1M + NaCl 0.05M, pH 7.5 a 37°C. La reacción fue iniciada por la adición de 125µL de sustrato y se detuvo en un recipiente con agua fría 15

minutos después. Se leyó la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro uv/visible GBC911. La actividad fue medida por la cuantificación de azúcares reductores liberados después de este tiempo de incubación. Se utilizó un blanco (mezcla de reacción sin sustrato) sin sustrato y un control que no contenía el extracto enzimático, que se corrieron simultáneamente con la mezcla de reacción. Una unidad de actividad fue definida como 1  $\mu$ g de maltosa liberada por minuto.

#### *1.1.9.7. SDS-PAGE y zimogramas de la actividad de proteinasas*

Se realizaron electroforesis en presencia de lauril (dodecil) sulfato sódico (SDS-PAGE), en condiciones desnaturizantes, empleando un sistema discontinuo (gel almacenador preparativo y gel separador resolutivo) de las proteínas en los extractos enzimáticos acorde a Laemmli (1970) y adaptada para visualizar actividad proteasa alcalina por García-Carreño *et al.* (1993).

Las electroforesis se realizaron en una cubeta Mini PROTEAN<sup>®</sup> II (Bio-Rad) con placas de geles verticales de 8 x 10 x 0.075cm con capacidad para 20 muestras por electroforesis. Cada placa estaba compuesta por dos tipos de gel; un gel concentrador con un 4% de poliacrilamida (PAA) y, un gel separador con un porcentaje de poliacrilamida de 12.5%. En la Tabla V se detalla el procedimiento empleado para la elaboración de los geles. Una vez montados los cristales, se llenó primero el gel separador, dejando 1 hora para que polimerizase. A continuación, se preparó el gel almacenador y se colocó un peine con diez dientes para fabricar los pocillos. Los extractos, una vez preparados los geles, se mezclaron a partes iguales con el amortiguador de muestra (0.125 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS (p/v),

20% glicerol (v/v), 0.04% (p/v) azul de bromofenol (2X), procurando que la concentración final de proteína soluble en la muestra fuera de 1,5 a 3 mg/mL, para aplicar unos 35-40 µg de proteína por pocillo. El azul de bromofenol es un colorante trazador que permite visualizar el frente de corrimiento durante la electroforesis. En todas las electroforesis se utilizó un patrón comercial, LWM de Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) compuesto por seis proteínas de peso molecular conocido (Tabla VI).

**Tabla V. Protocolo de preparación de los geles de electroforesis.**

Reactivo	Gel concentrado(4%)*	Gel separador (12%)
Solución madre de poliacrilamida <sup>1</sup>	065 mL	4 mL
Amortiguador del gel almacenador <sup>2</sup>	1.25 mL	—
Amortiguador del gel separado <sup>3</sup>	—	25 mL
Agua destilada	3.05 mL	3.42 mL
TEMED <sup>4</sup>	6 µL	6 µL
Persulfato de amonio (10%)	50 µL	75 µL
Volumen final aprox	5 mL	1 0mL

<sup>1</sup>Solución monómera de poliacrilamida 30.8% (p/v) en agua destilada. Relación acrilamida:bis-acrilamida = 30:0.8. Una vez preparada se filtró con papel Whatman No. 1. Se almacenó en un frasco de cristal topacio. La solución es estable durante un mes; <sup>2</sup>Amortiguador Tris-HCl 0.5M pH 6.8 (4X); <sup>3</sup>Amortiguador Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (4X); <sup>4</sup>TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilendiamina); <sup>5</sup>Solución preparada en fresco y se uso rápidamente;

**Tabla VI. Marcadores de peso molecular (LMW).**

<b>Proteína</b>	<b>kDa</b>	<b>Fuente</b>
Fosforilasa b	94	Músculo de conejo
Albúmina	67	Suero bovino
Ovoalbúmina	43	Clara de huevo
Anhidrasa carbónica	30	Eritrocito bovino
Inhibidor de tripsina de soya	20.1	Soya
$\alpha$ -Lactoalbúmina	14.4	Leche bovina

El patrón de marcadores de peso molecular se preparó disolviendo un vial (aprox. 600  $\mu$ g de proteína) con 100 $\mu$ L de amortiguador que contenía 0.0625M Tris-HCl, pH 6.8; 2.5% SDS; 0.04% azul de bromofenol y éste se hirvió durante 5 minutos a 100°C. Una vez montados los geles en la cubeta, se vertió el amortiguador de electroforesis 0.025M Tris, 0.192M glicina, pH 8.3; 0.1% SDS (p/v), y a continuación se aplicaron las muestras (10 $\mu$ L por pocillo, excepto para el marcador de pesos moleculares que se aplicó siempre 5 $\mu$ L en cada gel) por medio de una jeringa HAMILTON Microliter<sup>®</sup>.

Una vez colocadas las muestras en los pocillos, se puso la cubeta en una cámara a 4°C y se conectó a una fuente de poder (EPS<sup>®</sup> 3500 Pharmacia), desarrollándose la electroforesis a voltaje constante de 100V por gel) e intensidad de 60mA por gel durante unos 60 minutos.

Para detectar actividad proteasa, seguido a la electroforesis, se sumergieron los geles en una solución de caseína Hammerstein al 3% tamponada en 50mM TRIS-HCl, pH 9, durante 30

minutos a 5°C y, a continuación se pasaron a otra solución similar a 25°C durante 90 minutos, en ambos casos sin agitación. A continuación fueron lavados con agua destilada y se fijaron en una solución de ácido tricloro acético (TCA) al 12%. La fijación después de la incubación es esencial ya que elimina (no precipita) los productos de la degradación proteolítica (péptidos y aminoácidos) y precipita la caseína no degradada en la matriz del gel.

Para la tinción de los geles se utilizó la metodología de Weber y Osborn (1969) con algunas modificaciones. Los geles permanecieron durante toda la noche y a temperatura ambiente (25°C) en la solución de tinción, compuesta de 0.1% azul brillante de Coomassie (Sigma, B-0770; St. Louis, MO, EUA) en metanol: ácido acético y agua destilada (50:20:50, v/v). Para desteñir los geles y revelar las bandas de hidrólisis se utilizó una solución de metanol: ácido acético: agua (35:10:55). Durante este proceso podían verse las bandas claras sobre un fondo azul intenso (caseína embebida en el gel) que correspondían a proteínas con actividad proteolítica. Una vez desteñidos después de varios lavados, los geles se sumergieron en agua destilada para su hidratación.

#### *1.1.10. Digestibilidad in vitro*

La hidrólisis de proteínas de los productos de cártamo y alimentos con productos de cártamo fueron medidas de acuerdo a Dimes y Haard (1994) usando el método pH-Stat (Figura 4). Para ello 10 mL de cada una de las soluciones proteicas fueron ajustadas a un pH de 8.0 con 0.1M de NaOH y equilibrando a 37°C durante 10min en un vaso de reacción de 10 mL. Los extractos enzimáticos fueron añadidos en una relación E:S de 0.8Umg<sup>-1</sup> de

proteína. La mezcla de reacción fue mantenida en agitación constantemente con la ayuda de un agitador magnético. El curso de la reacción fue registrada automáticamente durante 60min usando un pH-stat titrator (718 Stat Titrino, Methrom Ltd, Heriau, Switzerland).

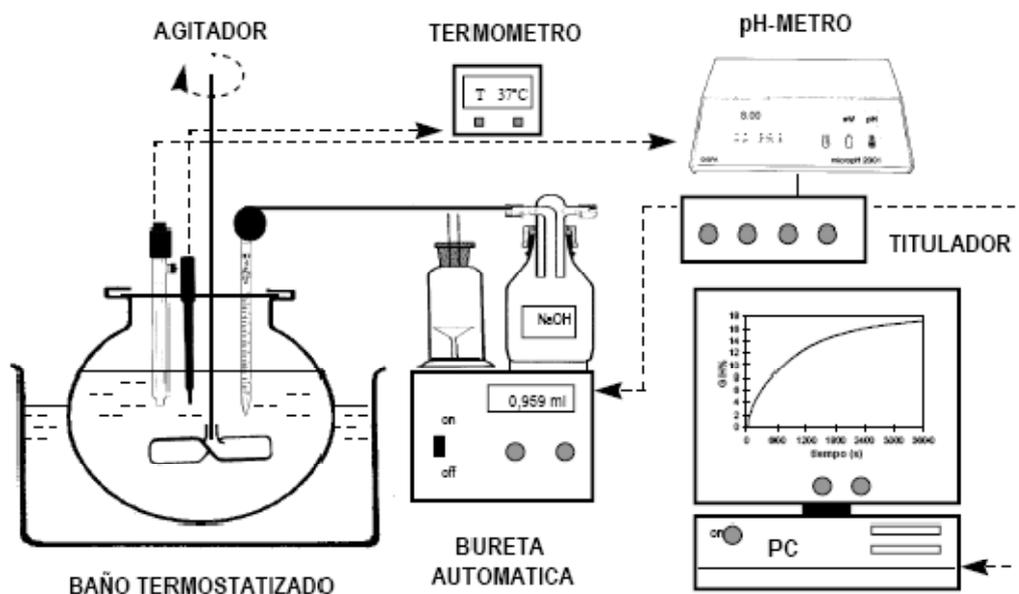


Figura 4. Sistema de pH- stat utilizado para las mediciones de digestibilidad *in vitro*.

El grado de hidrólisis (GD) fue calculado usando el equivalente de hidrólisis ( $h$ ) del volumen del estándar de base (0.1 M NaOH) requerido para mantener el pH de la mezcla de reacción a 8.0:

$$h = [B \times (1/\alpha) \times N_b] / [M \times (S/100)]$$

Donde:  $B$  (mL) es el volumen de NaOH consumido durante 60min de digestión enzimática,

$$\alpha = 10^{\text{pH}-\text{pK}} / (1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}})$$

$N_b$  es la normalidad de la base,  $M$  (g) es la masa de la mezcla de reacción y  $S$  (%) es la concentración de la proteína en la mezcla de reacción. El grado de hidrólisis proteica fue calculado de  $h$  como:

$$\text{GD (\%)} = (h/h_{\text{tot}}) \times 100$$

Donde  $h_{\text{tot}}$  es el número total de enlaces peptídicos en la proteína expresados como  $\text{meq g}^{-1}$  de proteína. Para definir el número de enlaces peptídicos de la proteína se asumió un valor promedio de  $8.0 \text{ meq g}^{-1}$ . Cada determinación fue hecha por triplicado.

La digestibilidad relativa de proteína (DRP) de cada uno de los productos de cártamo fue calculado comparando el grado de hidrólisis (%GD) de los productos de cártamo contra un estándar de caseína (Sigma, C-7078; St. Louis, MO, EUA) tratado de la misma forma.

$$\text{DRP} = (\% \text{GD del ingrediente} / \% \text{GD de la caseína}) \times 100$$

La caseína fue elegida como estándar debido a que tiene una alta digestibilidad *in vivo* (alrededor de 99%) por camarones *L. vannamei* (Akiyama *et al.*, 1989).

### 1.1.11. Atractabilidad de los alimentos con productos de cártamo

Se utilizaron adultos de camarón blanco *L. vannamei* en estadio C de intermuda en ayuno de 24h. Los organismos fueron mantenidos en el laboratorio húmedo a una temperatura de  $27 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y una salinidad de 40ups, en acuarios de vidrio con una capacidad de 40L (10 organismos por acuario) con aireación constante, fotoperiodo de 12/12 y con dos alimentaciones diarias (11:00 y 1530:h) a base de alimento PIASA (35% de proteína). Las pruebas de atractabilidad se realizaron en un dispositivo de acrílico transparente en forma de “Y” de 1.36m de largo, 0.81m de ancho y 0.20m de alto. La temperatura del agua dentro del dispositivo tipo “Y” se mantuvo a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , con circulación de agua con la ayuda de una bomba sumergible. Se usó agua de mar filtrada (filtro de cartucho  $10\mu$ ). Los organismos fueron aclimatados por 30 minutos, antes de iniciar la prueba. Al tiempo cero, el alimento de prueba (Tabla IV) se colocó al azar en alguno de los extremos superiores de la “Y” (denominándose como punto A=Atractante) y el otro extremo se denominará punto B (blanco). Cada prueba incluyó una prueba testigo donde no se colocó alimento en ningún extremo de la “Y” (B1 y B2). Los experimentos de atractabilidad se realizaron entre las 10:00 y las 14:00h, usando luz blanca dentro del laboratorio húmedo donde se ubicó el dispositivo tipo “Y”. Tres minutos antes del tiempo cero se inició la videograbación (Videocámara Panasonic, VHS, con contador de tiempo), por otros 20 minutos, para registrar el comportamiento de los animales en el sistema. Se utilizó el cronómetro del video para registrar el tiempo y comportamiento de los organismos en presencia y/o ausencia del alimento. La atractabilidad se cuantificó en función del tiempo de residencia relativo del animal cerca del alimento (Com. per. Nolasco, 2005).

*1.1.12. Cuantificación de alimento consumido*

Los organismos ( $5 \pm 0.5\text{g}$ ) fueron alimentados durante una semana con los alimentos experimentales (Tabla IV) para que se acostumbraran al alimento. Posteriormente se procedió a evaluar el consumo de alimento utilizando para ello un sistema cerrado, en el cual el volumen de agua se mantuvo constante durante la cuantificación. El sistema consistió en recipientes circulares de 1L inmersos en un baño María (72cm x 40cm x 33cm) para regular la temperatura ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ) por medio de calentadores sumergibles de 250W. Se colocó un organismo ( $5 \pm 0.5\text{g}$ ) en estadio de intermuda “C” por recipiente durante 24 horas antes de la evaluación de su consumo de alimento. Cada recipiente fue mantenido con aireación constante,  $27^\circ\text{C}$  de temperatura, 40ups de salinidad, y colocado en un cuarto con un mínimo de ruido para no perturbar a los organismos. Una vez transcurridas las 24 horas de aclimatación, se procedió a recambiar el 100% del agua de los recipientes, utilizando agua de mar filtrada (filtro de cartucho  $10\mu$ ). Los recipientes se llenaron por medio de sifón a través de una manguera introducida hasta el fondo, evitando burbujeo y turbulencia. Los alimentos se suministraron con base al 10% del peso de los camarones y se les dejó comer durante dos horas. Se realizó la misma operación pero con recipientes sin organismos, los cuales fueron utilizados como blancos (3 blancos por cada tipo de alimento) para estimar la pérdida de alimento por lixiviación. Transcurridas las dos horas de alimentación se retiraron los camarones y las heces fecales. Toda el agua de cada recipiente fue filtrada a través de un papel filtro Whatman No. 1, previamente secado y pesado, con la ayuda de una bomba de vacío. El papel filtro con el alimento residual se sometió a un secado en una estufa con flujo de aire a  $70^\circ\text{C}$  por 24 horas. La fórmula utilizada para determinar el consumo de alimento fue la siguiente:

*Consumo de Alimento*  $g^{-1} \cdot h^{-1}$  = g de Alimento consumido/g de camarón en peso húmedo / horas de alimentación

Se realizaron cinco réplicas por cada tratamiento, todas las mediciones fueron realizadas durante el día entre las 09:00 y las 16:00 h. Después de la evaluación del consumo de alimento se midió el pesos húmedos de cada organismo.

#### *1.1.13. Análisis estadísticos*

Se utilizó un diseño completamente al azar, con al menos 3 réplicas para todos los casos. Para el análisis de datos se llevó a cabo un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas utilizando las pruebas de Lillieford y Bartlett (Ott, 1992; Sokal, 1995). Se utilizó el análisis de varianza de una vía, a fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos, y una posterior comparación de medias de Tukey, cuando existieron diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%. Se realizó un análisis de correlación entre la digestibilidad *in vivo* y la digestibilidad *in vitro*. Para comparar los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos alimenticios contra la digestibilidad de los nutrientes o la actividad enzimática digestiva se utilizó un análisis multivariado de cluster (agrupando y estandarizando los datos). Se usó el paquete estadístico STATISTICA<sup>MR</sup> 7.0. (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok, EUA) (Zar, 1984).

## **1.2. Resultados**

### *1.2.1 Análisis químicos*

#### *1.2.1.1. Análisis proximal y energía*

En la Tabla VII se presenta la composición química proximal de las dos pastas de cártamo proporcionadas por la empresa Aceites del Mayo y una harina integral de cártamo fabricada en el laboratorio de Bromatología del CIBNOR. El contenido de proteína varió de 20.6 a 36.8% en base seca. La harina integral de cártamo presentó el mayor nivel de extracto etéreo 31% en base seca, mientras que las pastas de cártamo tuvieron un nivel muy bajo (1.8%, PCB y 1.0%, PCA). El contenido de fibra de harina integral de cártamo fue de 23.2% en base seca, disminuyendo en las pastas de cártamo, (21.7%, PCB y 17%, PCA). El nivel de ceniza en las pastas de cártamo fue alrededor de 7% en base seca. El contenido de energía bruta varió de 24.3 a 19.0kJ/g en los productos de cártamo.

#### *1.2.1.2. Composición de aminoácidos de los productos de cártamo*

Los aminoácidos más abundantes en los productos de cártamo (g/100 g proteína bruta) fueron el ácido glutámico (~23), ácido aspártico (11) y arginina (9.4). El cómputo químico muestra que el primer aminoácido limitante en los productos de cártamo fue la lisina y el segundo fue la metionina (Tabla VIII).

#### *1.2.1.3. Composición de ácidos grasos de los productos de cártamo*

El ácido oleico fue el ácido graso más abundante en las muestras de cártamo (71–74% del total de los ácidos grasos), seguido por los ácidos grasos linoleico (12–15%),

palmítico (7–11%) y esteárico (2–3%); los otros ácidos grasos fueron menores al 2% (Tabla IX). Los ácidos grasos EPA y DHA no se presentaron en las muestras de cártamo.

**Tabla VII. Composición proximal de los productos de cártamo.**

	Ingredientes <sup>1</sup>		
	HIC	PCB	PCA
Humedad (%)	5.06 ± 0.2	2.52 ± 0.02	4.00 ± 0.08
Proteína bruta	20.64 ± 0.09	27.48 ± 0.16	36.77 ± 0.05
Extracto Etéreo	34.61 ± 0.12	1.78 ± 0.02	1.03 ± 0.04
Fibra	23.17 ± 0.06	21.66 ± 0.35	17.01 ± 0.23
Cenizas	3.66 ± 0.05	6.76 ± 0.09	6.58 ± 0.03
ELN <sup>3</sup>	17.91	42.32	38.56
Energía bruta (kJ/g)	24.3 ± 0.07	19.1 ± 0.03	19.0 ± 0.04

<sup>1</sup>Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 de materia seca, excepto humedad; <sup>2</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína; PCA = Pasta de cártamo alta en proteína; <sup>3</sup>Extracto libre de nitrógeno.

#### 1.2.1.4. Cuantificación de calcio y fósforo de los productos de cártamo

El contenido de calcio varió de 0.25 a 0.42% en los productos de cártamo. Por otro lado el contenido más alto de fósforo (0.25%) se presentó en la harina integral de cártamo; en las pastas PCB y PCA el contenido de fósforo fue de 0.24 y 0.23 g/100g muestra, respectivamente (Tabla X).

**Tabla VIII. Contenido de aminoácidos (g /100 g proteína bruta) y cómputo químico de los productos de cártamo.**

Aminoácidos	Requerimiento estimado <sup>1</sup>	Ingredientes <sup>2</sup>			Cómputo químico		
		HIC	PCB	PCA	HIC	PCB	PCA
Ácido aspártico	9.85	10.90	10.58	10.96	110.7	107.4	111.3
Ácido glutámico	14.67	23.08	22.66	23.88	157.3	154.5	162.8
Alanina	5.60	5.01	4.66	4.79	89.5	83.2	85.5
Arginina	9.70	9.44	10.32	9.99	97.3	106.4	103.0
Fenilalanina	4.97	4.49	5.17	4.79	90.3	104.0	96.4
Glicina	8.04	7.40	7.59	7.82	92.0	94.4	97.3
Histidina	2.16	3.01	2.88	2.99	139.4	133.3	138.4
Isoleucina	4.13	4.30	4.57	4.47	104.1	110.7	108.2
Leucina	7.13	6.75	7.38	7.07	94.7	103.5	99.2
Lisina	5.35	1.38	2.98	1.63	25.8	55.7	30.5
Metionina	2.13	1.01	1.52	1.50	47.4	71.4	70.4
Serina	4.13	5.06	4.05	3.83	122.5	98.1	92.7
Tirosina	4.13	2.98	3.14	3.25	72.2	76.0	78.7
Treonina	4.00	3.98	3.46	3.57	99.5	86.5	89.3
Valina	4.57	6.02	6.13	6.19	131.7	134.1	135.4

<sup>1</sup>Requerimiento estimado de aminoácidos del camarón (*L. vannamei*) Tacon *et al.* (2002). <sup>2</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína; PCA = Pasta de cártamo alta en proteína.

**Tabla IX. Composición de ácidos grasos (% del total de ácidos grasos  $\pm$  DE) de los diferentes productos de cártamo.**

Ácido graso	Ingredientes <sup>1</sup>		
	HIC	PCB	PCA
14:0	0.14 $\pm$ 0.005	0.16 $\pm$ 0.016	0.18 $\pm$ 0.019
16:0	6.55 $\pm$ 0.069	8.71 $\pm$ 0.197	10.54 $\pm$ 0.255
16:1n-7	0.10 $\pm$ 0.002	0.16 $\pm$ 0.002	0.26 $\pm$ 0.017
17:0	0.06 $\pm$ 0.002	0.11 $\pm$ 0.011	0.15 $\pm$ 0.011
17:1n-8	0.05 $\pm$ 0.002	0.04 $\pm$ 0.039	ND
18:0	2.04 $\pm$ 0.008	2.77 $\pm$ 0.279	2.81 $\pm$ 0.022
18:1n-9*	74.08 $\pm$ 0.069	72.17 $\pm$ 0.564	71.00 $\pm$ 0.166
18:1n-7	0.69 $\pm$ 0.002	0.81 $\pm$ 0.055	0.83 $\pm$ 0.007
18:2n-6**	15.15 $\pm$ 0.011	13.21 $\pm$ 0.082	12.34 $\pm$ 0.037
18:3n-3	0.12 $\pm$ 0.002	0.38 $\pm$ 0.004	0.36 $\pm$ 0.012
20:0	0.38 $\pm$ 0.006	0.60 $\pm$ 0.009	0.61 $\pm$ 0.021
20:1n-11	0.30 $\pm$ 0.004	0.38 $\pm$ 0.049	0.35 $\pm$ 0.022
22:0	0.32 $\pm$ 0.004	0.49 $\pm$ 0.006	0.26 $\pm$ 0.038

<sup>1</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína; PCA = Pasta de cártamo alta en proteína. ND = no detectado. \* Ácido oleico, \*\* Ácido linoleico.

**Tabla X. Contenido de calcio y fósforo (%  $\pm$  DE) de los diferentes productos de cártamo**

	Ingredientes <sup>1</sup>		
	HIC	PCB	PCA
Calcio	0.25 $\pm$ 0.001	0.36 $\pm$ 0.003	0.42 $\pm$ 0.002
Fósforo	0.25 $\pm$ 0.015	0.24 $\pm$ 0.013	0.23 $\pm$ 0.006

<sup>1</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB=Pasta de cártamo baja en proteína; PCA = Pasta de cártamo alta en proteína.

### 1.2.2. Factores antinutricionales en los productos de cártamo

Los factores antinutricionales determinados en los productos de cártamo se muestran en la Tabla XI. La actividad del inhibidor de tripsina de la harina integral de cártamo (7.56 UTI/mg muestra) fue significativamente mayor en las pastas de cártamo. No se encontró actividad de hemaglutininas en ninguno de los productos de cártamo. La determinación de saponinas resultó negativa para todos los productos de cártamo. La actividad ureásica medida por el incremento del pH en los productos de cártamo fue menor a 0.01. El mayor contenido de aflatoxinas 2 ppb se encontró en la PCA, mientras que en los productos HIC y PCB el contenido de aflatoxinas fue de 0.5 y 1 ppb, respectivamente.

**Tabla XI. Factores antinutricionales en los productos de cártamo**

	Ingredientes <sup>1</sup>		
	HIC	PCB	PCA
Inhibidor de tripsina (UTI/mg muestra) <sup>2</sup>	7.56 ± 0.2a	5.65 ± 0.1b	5.01 ± 0.1b
Hemaglutininas <sup>3</sup>	ND	ND	ND
Saponinas (mm) <sup>4</sup>	PN	PN	PN
Actividad uréasica <sup>5</sup>	0.01 ± 0.01	ND	ND
Aflatoxinas (ppb)	0.5 ±	1 ± 0.0	2 ± 0.0

<sup>1</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína; PCA = Pasta de cártamo alta en proteína; <sup>2</sup>UTI = Unidades de tripsina inhibida; <sup>3</sup>Dilución máxima que produce aglutinación visible en una hora; <sup>4</sup>Altura menor de 5mm de espuma del sobrenadante indica prueba negativa (PN); <sup>5</sup>Incremento de pH o actividad ureásica. ND= No determinado

### 1.2.3. Inhibición de tripsina en productos de cártamo

La Figura 5 muestra que las pastas de cártamo PCB y PCA tuvieron una inhibición de un 30% a los 60 min: sin embargo esta inhibición disminuyó a cero a los 120 min de reacción.

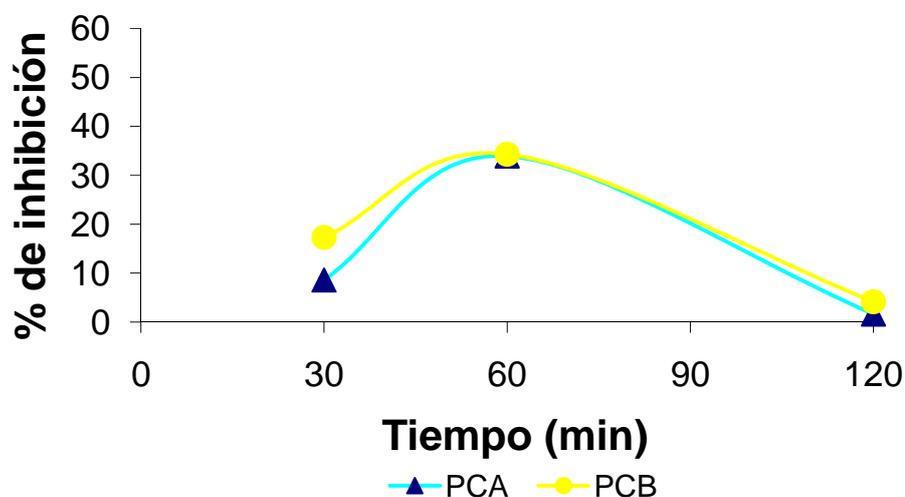


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la actividad de tripsina del hepatopáncreas de camarón con extractos de cártamo. PCA = Pasta de cártamo alta en proteína; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína.

#### 1.2.4. Experimento de CUDA de productos de cártamo

La composición proximal de los alimentos se presenta en la Tabla XII. Se observan diferencias en el contenido proteínico de los alimentos, el cual varió de 35.18 a 28.58%. El mayor contenido de extracto etéreo (17.71%) lo presentó el alimento que contenía harina integral de cártamo. El contenido de fibra se incrementó en los alimentos que contenían productos de cártamo. El contenido de cenizas fue menor en los alimentos que contenían cártamo en comparación con el control. El alimento con harina integral de cártamo fue el que presentó el mayor contenido de energía bruta (4682.8 cal/g) en comparación con los demás alimentos.

**Tabla XII. Composición química proximal de los alimentos usados para determinar los CUDA de los productos de cártamo.**

NUTRIENTE (g/100g base seca)	ALIMENTOS <sup>2</sup>			
	DC	HIC-D	PCB-D	PCA-D
Humedad (%) <sup>1</sup>	5.95	5.91	6.78	6.59
	±0.15	±0.05	±0.20	±0.05
Proteína cruda <sup>1</sup>	34.65	28.58	33.65	35.18
	±0.18	±0.10	±0.35	±0.22
Extracto etéreo <sup>1</sup>	8.59	17.71	6.41	6.25
	± 0.28	±0.30	±0.08	±0.18
Fibra cruda <sup>1</sup>	1.56	6.35	5.81	6.31
	±0.06	±0.12	0.18	±0.16
Cenizas <sup>1</sup>	11.36	8.92	10.24	10.25
	±0.03	±0.03	±0.01	±0.02
E.L.N. <sup>3</sup>	43.83	38.44	43.90	42.00
Energía (cal/g)	4078.29	4682.83	4169.89	4129.47
	±6.89	±8.33	±8.33	±5.43

<sup>1</sup>Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 de materia seca, excepto humedad. <sup>2</sup>DC = Alimento control; HIC-D = Alimento con harina integral de cártamo; PCB-D = Alimento con pasta de cártamo baja en proteína; PCA-D = Alimento con pasta de cártamo alta en proteína. <sup>3</sup>ELN= Extracto libre de nitrógeno.

Las condiciones de cultivo durante el bioensayo para determinar los coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA) *in vivo* fueron  $27.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  de temperatura,  $40.0 \pm 0.3$  ups de salinidad y  $5.5 \pm 0.5$  mg/mL de oxígeno disuelto, las cuales se mantuvieron constantes en todos los tratamientos.

En la Tabla XIII se muestran los CUDA de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de los productos de cártamo. Los CUDAMs de los productos de cártamo variaron entre 47.8 a 56%. El CUDAp de HIC (72.4%) fue significativamente más bajo en comparación con el de PCA (89.3%) y el de PCB (87.6%). En contraste el CUDAI de la HIC fue significativamente más alto en comparación con los otros productos de cártamo. El CUDAI más bajo (60.7%) lo presentó PCA. Los CUDAc fueron superiores al 96.8% y no se encontraron diferencias significativas entre los productos de cártamo. PCB presentó el menor CUDAc (67.7%) y fue significativamente más bajo que los de PCA (76.0%) y HIC (73.4%).

En la Tabla XIV se muestran los coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA) de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de los alimentos con productos de cártamo. Los CUDAMs en los alimentos con productos de cártamo variaron entre 68.6 a 78.2%. El CUDAMs más alto se encontró con el alimento control, mientras que los alimentos que contenían los productos de cártamo no presentaron diferencias significativas entre si (Tabla XIV). El CUDAp más bajo se encontró con el alimento con harina integral de cártamo, los alimentos con las pastas de cártamo alta y baja de proteína no fueron significativamente diferentes con respecto al alimento control. El mejor CUDAI (91.3%) lo presentó el alimento con harina integral de cártamo y el más bajo (82.1%) lo presentó el alimento con la pasta de cártamo alta en proteína. Los CUDAs de carbohidratos y energía no fueron significativamente diferentes entre los alimentos.

**Tabla XIII. CUDA (%  $\pm$  DE) de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de los productos de cártamo.**

	Ingrediente <sup>1</sup>		
	HIC	PCB	PCA
Materia seca	56.0 $\pm$ 4.4a	47.8 $\pm$ 5.2a	51.8 $\pm$ 10.0a
Proteína	72.4 $\pm$ 6.3b	87.6 $\pm$ 1.5a	89.3 $\pm$ 3.0a
Lípidos	93.6 $\pm$ 2.0a	76.1 $\pm$ 10.1b	60.7 $\pm$ 6.2c
Carbohidratos	97.4 $\pm$ 3.2a	96.8 $\pm$ 1.6a	98.8 $\pm$ 2.5a
Energía (Componentes energéticos totales) <sup>2</sup>	73.4 $\pm$ 1.2a	67.7 $\pm$ 1.0b	76.0 $\pm$ 2.5a

<sup>1</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína; PCA= Pasta de cártamo alta en proteína; <sup>2</sup>La energía digestible fue calculada en base a los valores calóricos 23, 35 y 15 KJ/g de proteína, lípidos y carbohidratos, respectivamente (Cousin 1995); Valores con diferentes superíndices dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

**Tabla XIV. CUDA (%  $\pm$  DE) de materia seca, proteína, lípidos, carbohidratos y energía de los alimentos con productos de cártamo.**

	Alimentos <sup>1</sup>			
	DC	HIC-D	PCB-D	PCA-D
Materia seca	78.2 $\pm$ 0.20a	71.3 $\pm$ 1.09b	68.6 $\pm$ 1.23b	69.9 $\pm$ 0.72b
Proteína	85.3 $\pm$ 0.14a	82.5 $\pm$ 0.78b	85.9 $\pm$ 0.53a	86.6 $\pm$ 0.25a
Lípidos	87.0 $\pm$ 0.94b	91.3 $\pm$ 0.64a	85.1 $\pm$ 0.29b	82.1 $\pm$ 1.23c
Carbohidratos	93.0 $\pm$ 0.41a	93.6 $\pm$ 0.27a	93.8 $\pm$ 0.22a	94.4 $\pm$ 0.13a
Energía	87.7 $\pm$ 0.60a	88.1 $\pm$ 0.44a	87.5 $\pm$ 1.23a	87.5 $\pm$ 1.21a

<sup>1</sup>DC = Alimento control; HIC-D = Alimento con harina integral de cártamo; PCB-D = Alimento con pasta de cártamo baja en proteína; PCA-D = Alimento con pasta de cártamo alta en proteína. Valores con diferentes superíndices dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### *1.2.5. Efecto de la inclusión de los diferentes productos de cártamo en el alimento sobre la actividad enzimática de la glándula digestiva del camarón.*

La Tabla XV muestra la actividad enzimática específica de proteinasa, quimotripsina, tripsina y amilasas de camarones *L. vannamei* alimentados con alimentos que contenían productos de cártamo.

**Tabla XV. Proteína soluble (mg/mL) y actividad específica (U/mg proteína) de diferentes enzimas en el hepatopáncreas del camarón blanco.**

	Alimentos <sup>b</sup>			
	CT	HIC-D	PCB-D	PCA-D
Proteína soluble	3.81±1.05ab	4.67±0.30b	5.31±0.32ab	5.75±0.75a
Proteinasas totales	3.17±0.09b	3.15±0.09b	3.81±0.15a	3.76±0.14a
Tripsina	0.26±0.01a	0.24±0.03 <sup>a</sup>	0.27±0.02a	0.27±0.01a
Quimotripsina	1.18±0.10ab	1.14±0.08ab	1.07±0.08b	1.28±0.06a
Amilasa	2,789.7±258.2a	1,721.9±23.3b	2,387.4±35.5ab	2,660.1±357.6a

<sup>a</sup> Letras diferentes dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup>CT = Alimento control; HIC-D = Alimento con harina integral de cártamo; PCB-D = Alimento con pasta de cártamo baja en proteína; PCA-D = Alimento con pasta de cártamo alta en proteína.

La actividad enzimática fue significativamente influenciada por la inclusión de los productos de cártamo en el alimento ( $P < 0.05$ ). Los más altos valores de proteinasas fueron obtenidos con los alimentos PCB-D y PCA-D (3.81 y 3.76 U/mg proteína, respectivamente). La actividad de tripsina no fue significativamente diferente con ninguno de los tratamientos. La actividad de quimotripsina más baja fue observada en los camarones que fueron alimentados con los alimentos PCB-D, mientras que las más altas actividades para esta enzima se obtuvieron con el alimento PCA-D, pero no se observaron diferencias significativas entre los alimentos que contenían productos de cártamo y el alimento control. La actividad específica de amilasa más alta fue encontrada en los camarones que se

alimentaron con el alimento control, siendo significativamente diferente con respecto a los que se alimentaron con el alimento HIC-D.

Los resultados del análisis multivariado de cluster utilizando los valores de los CUDAs o las actividades enzimáticas digestivas se muestran en la Figura 6. En primer lugar, se observa una clara similitud entre los tratamientos PCB-D y PCA-D, siendo estos dos alimentos más similares con respecto al alimento control en términos de digestibilidad. Los análisis de actividades enzimática digestiva confirman las diferencias obtenidas cuando se usa el alimento HIC-D, mientras que se encontró una gran similitud para los perfiles enzimáticos de los camarones alimentados con el alimento control y el PCA-D.

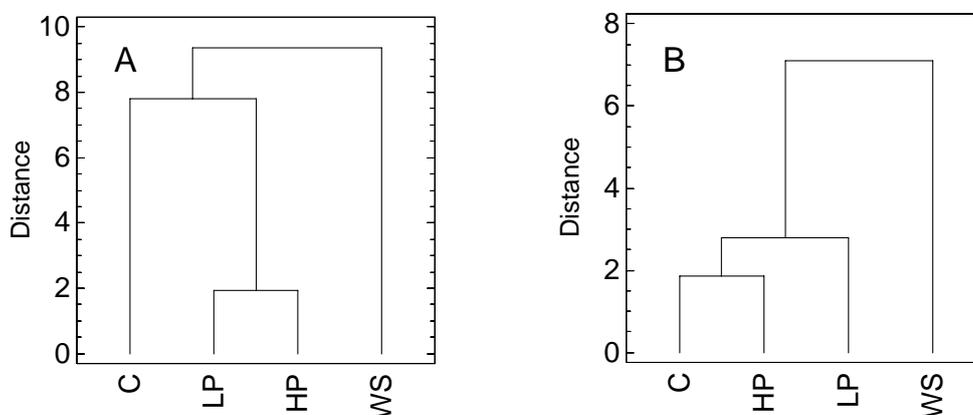


Figura 6. Resultados de análisis multivariado de cluster elaborado usando los valores de CUDAs (A) o las actividades enzimáticas digestivas (B).

### 1.2.6. Actividad de proteinasas de extractos de camarón.

Para comprobar la influencia del extracto de cártamo sobre las proteinasas del hepatopáncreas de juveniles de camarón, se realizó un zimograma (Figura 7). En esta figura se muestra que los extractos de cártamo no afectan la actividad de las proteinasas de los camarones, debido a que se presenta actividad en el carril de inhibición de camarón. Se encontraron 4 bandas de actividad que tienen un peso molecular entre los 21 y 55kDa. Las proteasas alcalinas se mostraron estables a la solución de SDS al 0.1%, concentración habitual en la electroforesis.

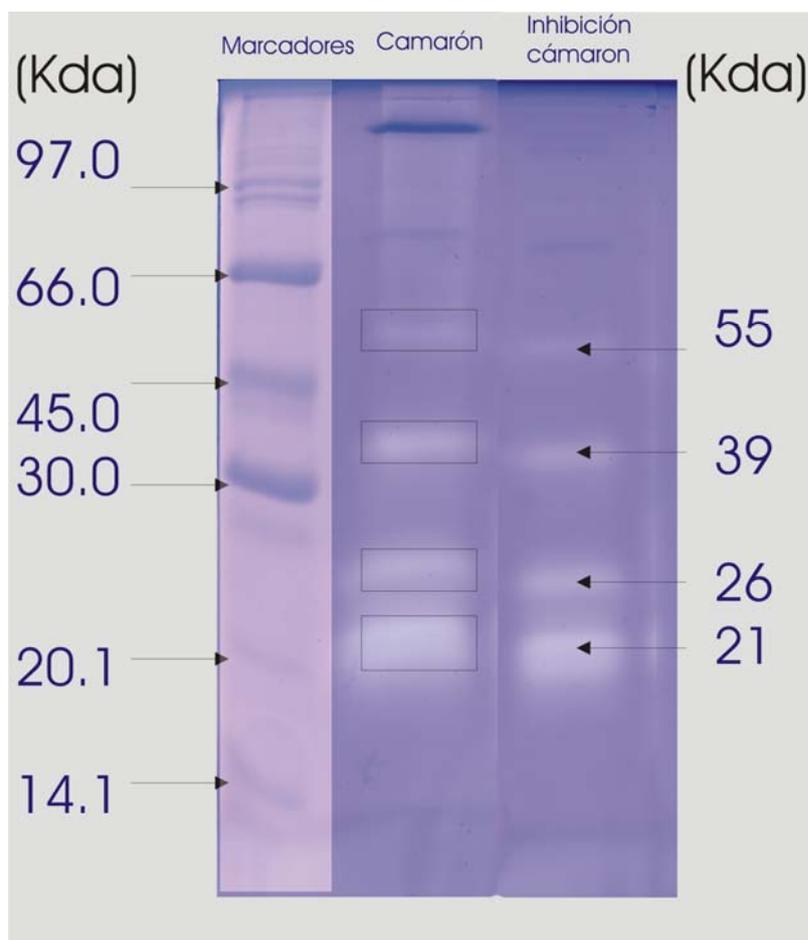


Figura 7. Zimogramas de la actividad de proteinasas de extractos de camarón.

### 1.2.7. Digestibilidad *in vitro*.

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* de los productos de cártamo, medido por el grado de hidrólisis usando enzimas de camarones que fueron alimentados con productos de cártamo se muestra en la Tabla XVI. No se encontraron diferencias significativas en el grado de hidrólisis y digestibilidad relativa de proteína entre los productos de cártamo, sin embargo se observa una ligera tendencia a incrementarse en la pasta de cártamo alta en proteína. Se encontró una correlación positiva ( $r^2 = 0.87$ ) entre el valor de digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad *in vivo* de proteína.

**Tabla XVI. Digestibilidad *in vitro* de los productos de cártamo medido por el grado de hidrólisis y digestibilidad relativa de proteína.**

	Ingredientes <sup>a</sup>			
	HIC	PCB	PCA	Caseína <sup>b</sup>
Grado de hidrólisis (%)	4.46	4.86	5.18	9.6
	± 0.54a	± 0.48a	± 0.10a	± 0.20
Digestibilidad relativa de proteína (%)	44.8	48.7	51.9	100%
	± 5.4a	± 4.9a	± 1.0a	

Valores promedio ± DE. <sup>a</sup>HIC = Harina integral de cártamo; PCB = Pasta de cártamo baja en proteína; PCA = Pasta de cártamo alta en proteína. <sup>b</sup>Proteína de referencia. Letras diferentes dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los resultados de la digestibilidad *in vitro* (expresados como grado de hidrólisis) de los alimentos con productos de cártamo se muestran en la Tabla XVII. La mayor digestibilidad

*in vitro* (3.97%) se obtuvo con el alimento que contenía pasta de cártamo alta en proteína y la menor (3.27%) fue con el alimento control.

**Tabla XVII. Digestibilidad *in vitro* de los alimentos con productos de cártamo medido por el grado de hidrólisis**

	Alimentos <sup>a</sup>			
	DC	HIC-D	PCB-D	PCA-D
Grado de hidrólisis (%)	3.27±0.11c	3.54±0.00bc	3.78±0.29ab	3.97±0.08a

Valores promedio ± D.E. <sup>a</sup>DC = Alimento control; HIC-D = Alimento con harina integral de cártamo; PCB-D = Alimento con pasta de cártamo baja en proteína; PCA-D = Alimento con pasta de cártamo alta en proteína. La caseína se utilizó como proteína de referencia y tuvo un valor de grado de hidrólisis de 9.6%. Letras diferentes dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 1.2.8. Atractabilidad y consumo de los alimentos con productos de cártamo.

La atractabilidad y consumo de los alimentos con un 30% inclusión de los productos de cártamo mostraron valores significativamente menores a los encontrados con el alimento control (Tabla XVIII). Entre las pastas de cártamo alta y baja en proteína, no se observaron diferencias significativas en la atractabilidad o el consumo de los alimentos. Se encontró una correlación positiva ( $R^2 = 0.94$ ) entre la atractabilidad y el consumo de alimento con un 30% de inclusión de los productos de cártamo (Figura 8).

**Tabla XVIII. Atractabilidad y consumo de alimento por camarones *L. vannamei* alimentados con alimentos que contienen productos de cártamo.**

Alimentos	Atractabilidad <sup>1</sup>	Consumo de alimento <sup>2</sup>
DC	38.45 ±1.05a	0.136 ±0.004a
PCA-D	25.33 ±1.30b	0.125 ±0.005b
PCB-D	24.49 ±1.10b	0.124 ±0.004bc
HIC-D	19.34 ±0.85c	0.114 ±0.003c

Valores promedio ± D.E. <sup>1</sup>Tiempo de residencia (min). <sup>2</sup>Alimento consumido, g/g de camarón/hora. Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas (P<0.05).

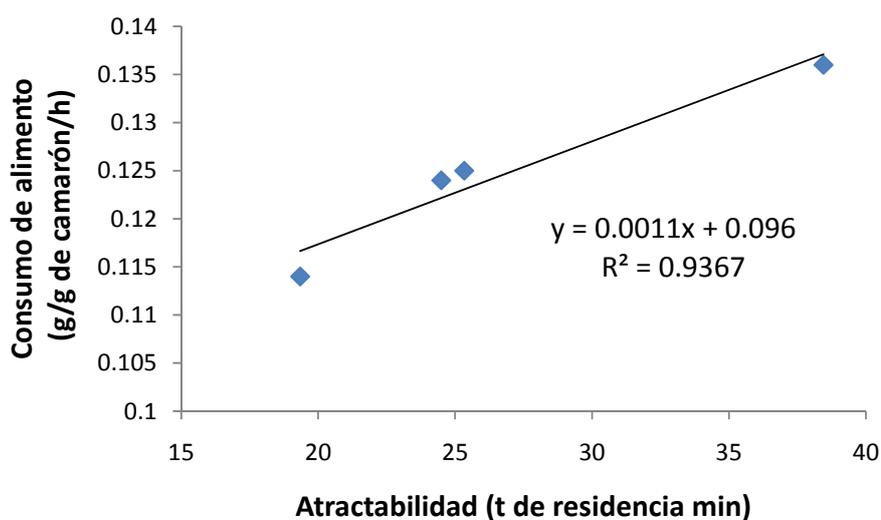


Figura 8. Correlación entre atractabilidad y consumo de alimento.

### ***1.3 Discusión***

En este trabajo se evaluaron tres productos de cártamo. El primer producto fue la pasta de cártamo alta en proteína (PCA) que se obtuvo mediante un proceso industrial usando dos prensas Hivex expander (Anderson International Corp, OH, EUA) y hexano para extraer el aceite, el producto final de esta extracción fue tamizado en una malla para remover la cáscara y por consiguiente se concentró la proteína y se redujo la cantidad de fibra en el producto final. El segundo producto fue la pasta de cártamo baja en proteína (PCB) que no fue tamizado después de la extracción del aceite. Finalmente, el tercer producto fue la harina integral de cártamo (HIC) que no se produce a escala comercial; sin embargo, en el presente trabajo se utilizó como referencia. A pesar de que se ha reportado que el contenido de proteína se ve afectado por las condiciones de cultivo, la variedad y las condiciones del ambiente, en el presente trabajo la composición proximal de las pastas de cártamo coincide con lo reportado por otros autores (Tacon, 1989 y Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). La HIC tuvo un bajo contenido de proteína y un alto contenido de lípidos, debido a que el aceite presente en la semilla de cártamo fue extraído para facilitar la molienda y homogenizado del material resultante de la extracción, finalmente el aceite fue reincorporado en la misma proporción en la que estaba en la semilla de cártamo. Hertrampf y Piedad-Pascual (2000) reportan un significativo incremento en el contenido de la proteína de harinas parcial y totalmente descascarilladas y un efecto sobre el contenido de fibra. Si comparamos la composición proximal de la PCA con la composición proximal de la pasta de soya reportada por Hertrampf y Piedad-Pascual (2000) se observa que el cártamo tiene un menor contenido de proteína (36.8 vs 50%) y un mayor contenido de fibra (17 vs 3.2%).

El contenido de aminoácidos y ácidos grasos de los productos de cártamo evaluados en el presente trabajo vario en algunos de estos monómeros con respecto a lo reportado por Tacon (1990) y Hertrampf y Piedad-Pascual (2000), estas diferencias se deben al tipo de proceso al que fueron sometidas las semillas para la extracción del aceite, así como la variedad y condiciones climáticas en las que se cultivó la semilla. Comparando el requerimiento de los aminoácidos de camarones *L. vannamei* estimado por Tacon *et al.* (2002) (Tabla VIII) con el contenido de aminoácidos de los productos de cártamo, se observa que la lisina es el primer aminoácido limitante, seguido de la metionina. Estos aminoácidos son de forma común deficientes en las proteínas de origen vegetal (Siccardi *et al.*, 2006). Un ligero incremento de lisina y metionina fue encontrado en PCA y PCB con respecto HIC.

La harina integral de cártamo tuvo un contenido de lípidos de 34%, de los cuales el 74.1% fue ácido oleico (18:1n9) y 15.2% fue ácido linoleico (18:2n-6), estos valores son similares a los encontrados por Carvalho *et al.* (2006) quien reporta valores de lípidos en un rango entre 24.3–48.8% en semillas de diferentes variedades de cártamo. En la actualidad hay dos tipos principales de cultivo de cártamo, en el primero la semilla tiene un alto contenido ácido oleico o ácidos grasos monoinsaturados y en el segundo tiene con un alto contenido de ácidos grasos poli-insaturados generalmente ácido linoleico (Marechal y Rigal 1990). La variedad de cártamo (S-518) utilizada en el presente estudio pertenece al primer tipo de cultivo. Como muchas oleaginosas, los lípidos presentes en la semilla son una fuente rica en ácidos grasos de cadena relativamente corta (14-18 C), pero deficientes en ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados como los son EPA, DHA y ArA. Estos deben ser

considerados al momento de formular los alimentos. Diversos estudios han demostrado que los camarones, como otros crustáceos no pueden sintetizar *de novo* estos ácidos grasos, por lo que requieren que estén presentes en los alimentos (Glencross y Smith, 2001).

El calcio y fósforo son dos de los mayores constituyentes de la porción inorgánica de los alimentos y son componentes fundamentales del exoesqueleto de los crustáceos. Adicionalmente a la función estructural, el calcio es esencial para funciones musculares, transmisión de impulsos nerviosos, osmoregulación y cofactor de procesos enzimáticos. El fósforo es componente esencial de los fosfolípidos, ácidos nucleicos, coenzimas y los fosfatos inorgánicos sirven como amortiguadores importantes en la regulación del equilibrio normal ácido-base de los fluidos corporales (Tacon 1990; Sales *et al.*, 2003). El calcio y el fósforo generalmente se encuentran en bajas concentraciones (>1%) en el agua de mar (Boyd, 1981). Por lo tanto el alimento es una fuente esencial de estos nutrientes para los organismos acuáticos (Davis *et al.*, 1993). La información existente sobre el requerimiento de minerales en los alimentos para camarones es escasa debido a la variación en la respuesta a la regulación de las sales (presión osmótica) de los organismos. (Davis y Arnold 1998). Se han realizado diferentes estudios en donde se ha evaluado la suplementación de estos minerales en el alimento. Los niveles de suplementación de calcio y fósforo recomendados en los alimentos para *L. vannamei* se han estimado entre 1 y 2% del alimento (Deshimaru y Yone 1978). Sin embargo, estudios más recientes concluyen que en ausencia de una suplementación de calcio, el requerimiento de fósforo es menor a 0.34% (Davis *et al.*, 1993). El contenido de calcio y fósforo varió en los productos de cártamo

entre 0.25 a 0.42% y 0.23 a 0.25%, respectivamente, debido a esto, se puede considerar al cártamo como una fuente de estos minerales.

El uso de las fuentes de proteína de origen vegetal como ingredientes en alimentos para organismos acuáticos se ha limitado por la presencia de una variedad de compuestos químicos que genéricamente se les ha denominado como antinutrientes o factores antinutricionales (Walter *et al.*, 1989; Francis *et al.*, 2001). En el presente trabajo se encontró que la actividad del inhibidor de tripsina en la semilla de cártamo (7.56 UTI/mg de muestra) es mucho menor que lo encontrado en la harinas de soya que no fueron calentadas (73 UTI/mg de muestra) y harinas que fueron moderadamente calentadas (107 UTI/mg de muestra) (Kakade *et al.*, 1984). En un trabajo realizado por Rivas-Vega *et al.* (2006) reportaron una disminución considerable del inhibidor de tripsina por efecto de la cocción a ebullición durante 20 min y una eliminación del inhibidor cuando la harina de frijol yorimón fue extraída. En el presente estudio también se encontró una disminución significativa del inhibidor de tripsina en las pastas de cártamo en comparación con la semilla; esto se puede deber al proceso térmico al que fueron sometidas las semillas durante la extracción del aceite. Es bien conocido que el inhibidor de tripsina así como otros inhibidores de proteasas, son termolábiles por su naturaleza química por lo que el tratamiento térmico como el que se usa para la obtención del aceite pudo reducir significativamente el porcentaje de inhibidor de la tripsina en los productos de cártamo.

En lo que respecta a los otros factores antinutricionales determinados en este trabajo no se encontraron o están con niveles muy bajos y no son detectables por los métodos aplicados.

El método utilizado en el presente estudio para la determinación de saponinas no detectó la presencia de éstas. Sin embargo diversos autores han reportado que el cártamo contiene glucósidos, que le confieren un sabor amargo a los productos de cártamo, lo que ha limitado su uso en la alimentación de organismos terrestres (Palter *et al.*, 1972; Smith, 1996; Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000). Desafortunadamente, estos compuestos no se pudieron determinar en este estudio por falta de disponibilidad de una metodología adecuada. Adicionalmente, se determinó la actividad ureásica que es habitualmente empleada como un indicador de la eficacia del tratamiento térmico practicado a las pastas. En nuestro estudio los incrementos de pH fueron menores a 0.01. De acuerdo con estos valores las pastas de cártamo donadas por la aceitera comercial no fueron fabricadas con temperaturas elevadas que pudieran afectar a los nutrientes.

El estudio del valor biológico del cártamo como ingrediente para alimentos para acuicultura ha recibido muy poca atención. Durante los años 50's y 60's una compañía en el estado de California, EUA produjo alimentos para trucha que contenían cártamo. Los peces aceptaron rápidamente los pellets; sin embargo, los pellets tuvieron baja hidroestabilidad en comparación con alimentos con menor contenido de fibra (Smith, 1996). Recientemente Álvarez-González *et al.* (2007) elaboraron alimentos que contenían con pasta de cártamo alta en proteína para tilapias (*Oreochromis niloticus*), y encontraron que el peso final y el tamaño de los peces alimentados con estos alimentos fue menor en comparación con el alimento control. Además, de dicho trabajo no tenemos conocimiento de algún otro estudio en donde se haya reportado el valor nutricional del cártamo para organismos acuáticos, y en especial para camarón.

Los CUDAmS de las pastas de cártamo (PCB 47.8% y PCA 51.8%) fueron similares a los reportados para otros ingredientes usados en los alimentos para organismos acuáticos, como es maíz (55.8%), arroz (42.8%), harina de algodón (53.6%) y trigo (46.8%), sin embargo son menores a los reportados para pasta de soya (60.3%) (Brunson *et al.*, 1997). Adicionalmente, los mismos autores reportan que los CUDAmS de los ingredientes consumidos por camarones *L. setiferus* disminuyen cuando se incrementa el contenido de fibra y cenizas de los ingredientes. En el presente estudio no se encontró una relación significativa ( $r^2 = 0.021$ ;  $P > 0.05$ ) entre la fibra y los CUDAmS, indicando que aunque los productos de cártamo tienen un alto contenido de fibra (PCB 21.7% y PCA 17.1%) no se afectaron los CUDAmS. Por otro lado las diferencias de los CUDAmS de los productos de cártamo y la pasta de soya se pueden deber a que la pasta de soya tiene un menor contenido de fibra (1.59%) en comparación con los productos de cártamo.

Los CUDAp fueron relativamente altos (72–89%) en los productos de cártamo evaluados. Esta respuesta es similar a los resultados encontrados por Cruz-Suárez *et al.* (2001) usando harinas de chícharo (*Pisum sativum*) en juveniles de camarón *L. stylirostris*. La calidad de las proteínas de las fuentes proteicas alimenticias está basada en su composición de aminoácidos y su biodisponibilidad (Lin *et al.*, 2006). Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo (alimentos con 30% del ingrediente experimental), PCA y PCB tienen una mejor calidad proteica para los camarones en comparación con la HIC en términos de digestibilidad. El proceso térmico utilizado a nivel comercial para la extracción de los lípidos de las pastas PCA y PCB posiblemente mejoró la digestión de las proteínas en dos aspectos: un calor moderado causa la parcial desnaturalización de las proteínas, haciéndolas

más digestibles en comparación con las proteínas nativas (Fennema 1996). El otro aspecto es que el proceso térmico disminuyó el inhibidor de tripsina en los productos de cártamo (Tabla XI). En camarones blancos la harina de frijol (*Vigna unguiculata*) cocida y extruída fue más digestible en comparación con la harina entera y el inhibidor de tripsina fue eliminado en las harinas que fueron tratadas térmicamente (Rivas-Vega *et al.*, 2006).

Los camarones alimentados con la PCA fueron los que tuvieron los más bajos CUDAI y fueron significativamente diferentes con respecto a los camarones alimentados con PCB y HIC. Esto se puede deber a la oxidación de los lípidos durante el proceso de molienda y tamizado para elaborar la PCA. Glencross *et al.* (2002) encontró que el nivel de lípidos en los alimentos influye en la biodisponibilidad así como también que los ácidos monoinsaturados como el 18:1n-9 tienen una alta digestibilidad. En el presente estudio la extracción previa de lípidos para poder moler el cártamo, el alto contenido de lípidos en HIC y también la composición de ácidos grasos rica en 18:1n-9 resultó en una alta digestibilidad de este ingrediente.

Los CUDAc fueron altos y no presentaron diferencias significativas entre los productos de cártamo. Los carbohidratos son la forma energética más barata la formulación de alimentos para animales, incluyendo a los camarones; aunque se ha encontrado, en especies más carnívoras como *L. stylirostris* que la utilización y el metabolismo de los carbohidratos del trigo es limitada (Rosas *et al.*, 2000). El mayor contenido de carbohidratos almidonosos altamente digestibles en PCA y PCB puede explicar por qué los CUDAm no fueron tan bajos en comparación con HIC. En un trabajo realizado por Guo *et al.* (2006) se encontró

que los CUDAm se incrementaron al subir los niveles del almidón de maíz en alimentos para camarón blanco. Otra explicación de los altos valores de los CUDAc se puede deber a la gelatinización de los almidones durante los tratamientos térmicos utilizados para la extracción de los lípidos o también el secado de los alimentos. Estos procesos causan la apertura de los gránulos de almidón y los hacen más susceptibles a la hidrólisis enzimática (Thiessen *et al.*, 2003). Debido a los altos valores de digestibilidad de carbohidratos en los productos de cártamo encontrados se puede sugerir que estos productos son una excelente fuente de carbohidratos para camarones blancos.

Los resultados de los CUDA de los componentes energéticos totales (energía) del presente trabajo fueron semejantes a los reportados por Brunson *et al.* (1997) quienes encontraron en camarones *L. setiferus* resultados similares para la pasta de soya (76.1%), la harina de trigo (66.0%) y la harina de algodón (61.2%). Sin embargo, Cruz-Suárez *et al.* (2009) encontraron valores entre 85.1 y 98.2% de los CUDA de los componentes energéticos totales en camarones *L. vannamei* cuando fueron alimentados con diferentes productos de soya. En animales acuáticos la digestibilidad de los componentes energéticos totales (energía) de los productos vegetales tiende a ser inversamente relacionada al contenido de fibra y en algunas especies (con baja actividad enzimática para hidrolizar enlaces glucosídicos alfa 1,4 y alfa 1,6), al contenido de almidón. La fibra contiene energía que no es disponible para organismos monogástricos y los almidones son digeridos con diferentes grados de eficiencia dependiendo del tipo y forma de gránulo, de la composición química del almidón (relación de amilosa y amilopectina), del proceso tecnológico al que fueron expuestos y de la capacidad de las enzimas digestivas ( $\alpha$ -amilasas) de la especie. Cousin *et*

*al.* (1996) compararon la digestibilidad *in vivo* e *in vitro* de el almidón de maíz (alto en amilosa) y almidón de trigo (alto en amilopectina) en *L. vannamei* encontrando baja digestibilidad del almidón cuando contiene altas cantidades de amilosa.

Diversos autores han desarrollado y evaluado métodos usando tratamientos enzimáticos *in vitro* para estimar o predecir la digestibilidad *in vivo* de proteínas de los ingredientes que se utilizan en los alimentos para camarones (Dimes y Haard 1994; Ezquerro *et al.*, 1997b; Lazo *et al.*, 1998; Alarcón *et al.*, 2002). Estos métodos pueden ser utilizados como herramientas para determinar la digestibilidad de los ingredientes. El grado de hidrólisis (GH) de los productos de cártamo que fueron evaluados varió entre 4.46 a 5.18% y no se presentaron diferencias significativas entre los ingredientes. Similares valores de GH fueron encontrados por Lemos *et al.* (2004) para harina de trigo y pasta de soya usando extractos enzimáticos de camarones (*Farfantepenaeus paulensis*) y enzimas comerciales. Sin embargo Ezquerro *et al.* (1997b) encontraron diferentes rangos de valores, por ejemplo el valor de GH para la pasta de soya fue de 31.1 utilizando el sistema pH-stat con una preparación enzimática de hepatopáncreas de camarones blancos. Las diferencias en los rangos de los valores se puede deber a la diferencia en los ingredientes, la concentración de las enzimas y diferencias metodológicas en la determinación del GH. En el presente estudio se encontró una relación positiva ( $r^2 = 0.87$ ;  $P < 0.05$ ) entre la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de proteína indicando que el método de digestibilidad *in vitro* estima adecuadamente la digestibilidad de proteína; sin embargo no es suficientemente sensible para identificar diferencias entre los ingredientes obtenidos por diferentes procesos. Los resultados de este estudio concuerdan con los encontrados por Ezquerro *et al.* (1997b) quienes encontraron un

coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ) de 0.77 utilizando el método de pH-stat. El método *in vitro* es un procedimiento simple y barato para determinar la digestibilidad de proteína de los ingredientes y los alimentos. Sin embargo, los experimentos de digestibilidad *in vivo* siguen siendo aún los métodos más adecuados para medir la digestibilidad (Chong *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2007; Borghesi *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2008). La digestibilidad proteica relativa (DPR) a caseína tipo Hemmerstein de los productos de cártamo varió de 45 a 52%, y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Lazo *et al.* (1998) encontraron para la pasta de soya y el gluten de trigo valores de 60.7 y 81.7%, respectivamente.

El uso de ingredientes altamente digestibles es muy importante para la alimentación de los camarones peneidos, en cultivo; un alimento que no es digerido puede generar diversos problemas entre los que destacan, la contaminación del agua, incrementos en los costos por tratamiento del agua, aumento en el riesgo de aparición de enfermedades y por consiguiente la mortalidad de los organismos (Siccardi *et al.*, 2006). En el experimento donde se evaluaron alimentos con tres diferentes productos de cártamo en términos de digestibilidad de los alimentos se observó que el CUDAm de los alimentos con productos de cártamo (68.6–71.3%) presentaron diferencias significativas con respecto al alimento control (78.2%). Esta disminución se puede deber al incremento en el contenido de fibra (celulosa) de los alimentos. La celulosa es un carbohidrato presente en los productos vegetales que no es bien utilizado por los camarones. Se ha encontrado en peces (*Oreochromis aureus*) que bajas concentraciones de fibra (3–5%) en el alimento pueden tener un efecto benéfico en el crecimiento de los organismos; sin embargo altas concentraciones de fibra (>8%) bajan la

digestibilidad de materia seca y de energía de los alimentos y pueden reducir la disponibilidad de otros nutrientes (De Silva *et al.*, 1990). Smith *et al.* (2007) reportan que los CUDAm de los alimentos con diferentes variedades de lupino (*Lupinus luteus*) para camarones tigre (*Penaeus monodon*) disminuyen cuando se incrementan las cantidades de extracto libre de nitrógeno en el alimento. Adicionalmente, el alto contenido de cenizas de los ingredientes en los alimentos puede también disminuir los valores de los CUDAm (Bureau *et al.*, 1999). Hernández *et al.* (2008) encontraron que la digestibilidad tiende a bajar en los alimentos con alto contenido de ceniza (por ejemplo la harina de carne). En contraste, los CUDAm, los CUDAp de los juveniles de camarón blanco fueron significativamente más bajos en los alimentos que contenían harina integral de cártamo (HIC-D) en comparación con los que contenían pasta de cártamo alta en proteína (PCA-D) y pasta de cártamo baja en proteína (PCB-D). Sin embargo, los CUDAp no parecen estar relacionados con el contenido de fibra en los alimentos. Resultados similares han sido reportados por McGoogan y Reigh (1996). Los alimentos PCB-D y PCA-D tuvieron los más altos CUDAp, esto se puede deber a su contenido de proteína (33.7 y 35.2%) y su bajo contenido de fibra proveniente del cártamo, comparado con el alimento HIC-D y al tratamiento térmico que permitió la destrucción de los factores antinutricionales termolábiles. Se ha reportado en camarón blanco que existe una fuerte correlación entre la digestibilidad de proteína y el nivel de proteína en el alimento (Smith *et al.*, 1985). Hu *et al.* (2008) midieron el efecto de diferentes relaciones de proteína y energía sobre el crecimiento de juveniles de camarón blanco, demostrando que el crecimiento es más afectado por el nivel de proteína en comparación con la calidad de la proteína.

La digestibilidad de lípidos es influenciada por la longitud de la cadena, el nivel de inclusión de los lípidos en el alimento, la composición de ácidos grasos y el procesamiento del ingrediente. En el presente estudio se encontró que los CUDAI fueron relativamente altos (82.1–91.3%) en los alimentos que contenían cártamo. Los camarones que fueron alimentados con el alimento D-PCA el CUDAI fue significativamente más bajo en comparación con los demás alimentos, similar a esto se ha reportado en camarones blancos donde se reemplazó la harina de pescado por harina de carne (Hernández *et al.* 2008). Adicionalmente el CUDAI del alimento D-HIC (91.3%) fue significativamente más alto en comparación con los otros alimentos que contenían cártamo y ligeramente más alto que lo reportado por Glencross *et al.* (2002). Estos autores encontraron alta digestibilidad de los ácidos grasos insaturados y monoinsaturados 18:1n9, siendo estos últimos los más abundantes en la semilla de cártamo. La alta digestibilidad de los lípidos monoinsaturados presentes en el alimento D-HIC se puede deber a que cuando se elaboró la harina integral de cártamo se extrajeron los lípidos y se liberaron de la pared celular para después ser reincorporados una vez que se molió a menos de 250  $\mu\text{m}$  el material resultante de la extracción.

Los CUDAc no presentaron diferencias significativas entre los alimentos. La habilidad para utilizar los carbohidratos como fuente de energía es diferente entre peces, camarones y animales terrestres. Los camarones en particular aparentemente tienen limitada capacidad para digerir carbohidratos comparado con otros animales y usan a las proteínas como su principal fuente de energía (Rosas *et al.*, 2000). Cousin *et al.* (1996) encontró que los CUDAc de los alimentos para camarones blancos fueron altos cuando se utilizaron

almidones gelatinizados en comparación con almidones nativos. En nuestro estudio todos los valores de los CUDAc fueron superiores al 93%, estos resultados concuerdan con lo reportado por estos autores. Rivas-Vega *et al.* (2006) reportaron valores ligeramente inferiores (>82.5%) de los CUDAc para camarones blancos cuando fueron alimentados con alimentos que contenían frijol *Vigna unguiculata*. Davis y Arnold (1993) demostraron que la extrusión y el cocimiento mejoran considerablemente los CUDAc en camarones. Los altos CUDAc en los alimentos que contenían cártamo indican que el cártamo es una buena fuente de carbohidratos y pudiera tener un ahorro con las proteínas, en contraste con lo reportado por Rosas *et al.*, 2000.

No se encontraron diferencias significativas en la utilización digestiva de energía entre los tratamientos. En organismos acuáticos, la biodisponibilidad de la energía de los productos vegetales tiende a ser inversamente relacionado con el contenido de fibra en el producto (Brunson *et al.*, 1997). Sin embargo, en este experimento no se encontró que el contenido de fibra afectara la energía disponible. Brunson *et al.* (1997) determinaron los CUDAc en alimentos para juveniles de camarón (*Penaeus setiferus*) usando diferentes ingredientes (maíz, harina de algodón, sorgo, arroz, cáscara de arroz, pasta de soya, gluten de trigo y trigo) los resultados mostraron que todos los alimentos tuvieron valores de energía disponible por debajo del 81.2%, este valor es más bajo que los valores encontrados con los alimentos que contenían cártamo (87.5–88.1%).

La hidrólisis *in vivo* de las proteínas de los alimentos es resultado de la acción proteolítica de diferentes endo- y exo-proteasas. Por esta razón, los ensayos *in vitro* están basados en el

uso de extractos semipurificados que contienen tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas, que pueden simular de mejor manera el proceso de hidrólisis *in vivo* en comparación de los ensayos en donde se utilizan sólo dos o tres enzimas. En este estudio se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad *in vitro* de proteína entre los alimentos, como es indicado por el grado de hidrólisis (GH). La digestibilidad se incrementó en los alimentos que contenían los productos de cártamo, pero no se encontró una correlación significativa entre la digestibilidad *in vivo* e *in vitro*, al igual que los encontrados por Divakaran *et al.* (2004) quien no encontró una correlación entre la digestibilidad aparente de proteína y la digestibilidad *in vitro*. Esto se debe a que la determinación *in vitro* involucra sólo la hidrólisis del sustrato mientras que el proceso de digestión *in vivo* involucra también la absorción de los productos finales que determina el resultado neto de la digestión.

La elección de un ingrediente es un parámetro importante que influye en la actividad de las enzimas digestivas. Los resultados muestran que los alimentos D-PCA incrementaron la cantidad de proteína soluble, las proteasas totales y la actividad de quimotripsina en el hepatopáncreas de los camarones, confirmando que la producción de enzimas digestivas está relacionada con la cantidad y calidad de la proteína ingerida. Lee *et al.* (1984) encontraron que la actividad específica de las enzimas digestivas se incrementa como resultado de la inclusión de proteína animal en los alimentos para camarones blancos y también reportan que los camarones que pesan más de 15g pueden ingerir alimentos que contengan altas cantidades de proteína vegetal, reduciendo los costos del alimento en las últimas etapas del cultivo intensivo.

Para comprobar la influencia del cártamo sobre las proteinasas del hepatopáncreas de los juveniles de camarón, se realizó un zimograma (Figura 6). Se encontró que los extractos de cártamo no afectaron la actividad de las proteinasas de los camarones, debido a que se presenta actividad en el carril de inhibición del camarón. Asimismo también se encontraron 4 bandas de actividad que tienen un peso molecular entre los 21 y 55kDa. Las proteasas alcalinas se mostraron sumamente estables a la solución SDS al 0.1%, concentración habitual en la electroforesis. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Dimes y Haard (1994).

El análisis multivariado de cluster ha sido propuesto como una herramienta que puede determinar diferencias y similitudes globales entre los tratamientos cuando muchas variables están involucradas. Ha sido satisfactoriamente aplicado en la evaluación de la composición de aminoácidos de larvas de peces marinos que fueron mantenidos bajo diferentes regímenes alimenticios (Cara *et al.*, 2007). En el presente trabajo la gran similitud existente entre alimentos PCA-D, PCB-D y CT fue confirmada por la evaluación global de sus digestibilidades y por los valores de actividad enzimática, sugiriendo que el alimento PCA-D resultó ser el mejor en términos de los CUDAs y actividad enzimática.

La respuesta de los camarones a los diferentes productos de cártamo, permitió determinar que la inclusión del cártamo a un 30% en el alimento, disminuye la atractabilidad y el consumo del alimento en comparación con el alimento control, esta respuesta también ha sido reportada por otros autores cuando se sustituyen ingredientes de origen animal por ingredientes de origen vegetal (Sudaryono *et al.*, 2005). Adicionalmente, se encontró una

alta correlación ( $R^2=0.96$ ) entre la atractabilidad y el consumo de alimento. Es bien conocido que los ingredientes vegetales no son buenos atractantes en comparación con las harinas de pescado y calamar (Alvarez *et al.*, 2005). Debido a esto, si se utiliza este nivel de inclusión del cártamo en el alimento, es recomendable incluir ingredientes que estimulen la atractabilidad y el consumo del alimento para que de esta manera, la cantidad y calidad de los nutrientes disponibles para la digestión y asimilación aumenten (Lee y Lawrence, 1997).

#### ***1.4 Conclusiones***

- La harina integral de cártamo resultó no ser adecuada para los alimentos del camarón debido a que tienen un bajo contenido de proteína y un alto contenido de fibra.
- Las pastas de cártamo alta y baja en proteína son subproductos que tienen una composición química adecuada por lo que pueden ser usados como ingredientes para alimentos del camarón, especialmente la PCA.
- Las proteínas y carbohidratos de PCA y PCB fueron bien digeridos por los juveniles del camarón blanco, por lo que estos ingredientes pueden ser usados en los alimentos para camarón como una alternativa económica para la fabricación de los alimentos.

- El uso de los diferentes productos de cártamo al nivel de inclusión de 30% en los alimentos para camarón blanco, en el peor de los casos, redujo los CUDA de materia seca, proteína o lípidos en 10%, 3% ó 5%, respectivamente. Esto sugiere que las pastas de cártamo, alta y baja en proteína, pueden ser usadas como ingredientes en los alimentos para camarón, sin tener un efecto significativo en los parámetros determinados.
- La inclusión de 30% de los productos de cártamo en los alimentos redujo la atractabilidad y el consumo del alimento en los camarones. Sin embargo, los alimentos con cártamo no fueron totalmente rechazados, ya que fueron consumidos por los organismos de forma aceptable.

## CAPÍTULO 2

### EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE LA PASTA DE SOYA CON PASTAS DE CÁRTAMO EN EL ALIMENTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y CUD DE JUVENILES DE CAMARÓN *L. vannamei*

#### *2.1. Material y métodos*

##### *2.1.1. Experimento de crecimiento*

Se evaluaron las dos pastas de cártamo PCA y PCB descritas en la sección 1.1.1. como sustitutos de la pasta de soya. La formulación de los alimentos se hizo como se menciona en la sección 1.1.8.1. El sistema experimental fue el mismo que se menciona en la sección 1.1.8.2.

##### *2.1.1.1. Organismos experimentales*

Se obtuvieron postlarvas de camarones de la especie *L. vannamei* (Boone, 1931), donadas por la empresa Acuacultura Mahr (La Paz, B.C.S., México). Los organismos fueron aclimatados en el laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, dentro de tanques de plástico con 2 500L de capacidad a una temperatura de 27°C y salinidad de 40ups. Los camarones se alimentaron dos veces al día (10:00 y 16:00h) con un alimento comercial PIASA<sup>MR</sup> para camarón con 35% de proteína y calamar fresco, hasta que alcanzaron el tamaño requerido para el experimento.

### 2.1.1.2. *Diseño experimental y condiciones de cultivo*

Se formularon 9 alimentos: un alimento control (CT), cuatro con diferentes niveles de sustitución de una mezcla de pasta de soya y harina integral de trigo (1:2) por pasta de cártamo baja en proteína (alimentos PCB-25, PCB-50, PCB-75, PCB-100%) y cuatro con diferentes niveles de sustitución de la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína (alimentos PCA-25, PCA-50, PCA-75, PCA-100%) (Tabla IX). Los alimentos se formularon para contener 32.5% de proteína y 8.5% de lípidos, así como satisfacer el contenido de aminoácidos esenciales para camarón según lo sugerido por Akiyama *et al.* (1991) y la relación proteína/energía (80 mg proteína/Kcal) reportado por Cruz-Suárez *et al.* (2000).

Los organismos se pesaron individualmente y se seleccionaron 360 camarones con peso promedio de  $350 \pm 0.05$  mg. Se distribuyeron aleatoriamente en 36 acuarios a razón de 10 organismos por acuario, a manera de contar con cuatro réplicas por cada tratamiento alimenticio.

Cada uno de los 9 alimentos fue asignado aleatoriamente a 4 acuarios. El experimento de crecimiento tuvo una duración de 45 días. Diariamente se monitorearon la temperatura con un termómetro de mercurio, la salinidad por medio de un refractómetro portátil (VISTA A366 ATC) y el oxígeno disuelto con un oxímetro portátil (YSI, 550A). Los restos de alimento no consumido, mudas y heces fueron extraídos de los acuarios todos los días por la mañana (09:00h) y posteriormente se realizó un recambio de agua equivalente al 80% del volumen total. El alimento fue distribuido en dos raciones al día (50% a las 10:00h y 50% a

las 17:30h). Al inicio del bioensayo, el alimento se suministró a razón del 10% de la biomasa total de los organismos en cada acuario y posteriormente se ajustó en función del consumo diario a manera de que siempre hubiera un excedente (de aprox. 20% del alimento suministrado).

### 2.1.1.3. Criterios de evaluación

Los criterios para evaluar los diferentes tratamientos fueron los siguientes: supervivencia, peso final, tasa relativa de crecimiento, alimento consumido total, factor de conversión alimenticia, y eficiencia proteica. Se calcularon usando las siguientes ecuaciones (Tacon, 1989):

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{No. de organismos final}}{\text{No. de organismos inicio}} * 100$$

$$\text{Tasa relativa de crecimiento (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

$$\text{Factor de conversión alimenticia} = \frac{\text{Alimento total consumido (g)}}{\text{Incremento en peso corregido (g)}}$$

Incremento en peso corregido (IPC) =

$$\text{Biomasa final} + \left( \frac{\text{Peso promedio final} + \text{Peso promedio inicial}}{2} * \text{No. de muertos} \right) - \text{Biomasa inicial}$$

$$\text{Eficiencia proteica (EP)} = \frac{\text{Incremento en peso (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

**Tabla IX. Composición de los alimentos (g/100g alimento, en base húmeda) usados para determinar la sustitución de mezcla de pasta de soya-harina de trigo por pasta de cártamo baja en proteína y la sustitución de la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo.**

Ingrediente (Base Húmeda)	CT	PCB				PCA			
		25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
Mezcla Pasta Soya-Harina Int. Trigo <sup>1</sup>	43.11	32.33	21.56	10.78	0.00				
Pasta de Soya <sup>2</sup>						11.25	7.50	3.75	0.00
Harina Integral de Trigo <sup>3</sup>	17.55	17.56	17.55	17.57	17.58	44.30	42.94	41.58	40.22
Pasta de Cártamo Baja <sup>4</sup>	0.00	10.78	21.56	32.33	43.11				
Pasta de Cártamo Alta <sup>5</sup>						5.10	10.19	15.29	20.39
Harina de Pescado <sup>6</sup>	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00	28.00
Aceite de Pescado <sup>7</sup>	3.05	3.04	3.03	3.03	3.02	3.06	3.07	3.08	3.09
Ácido Algínico <sup>8</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla Vitaminas Crustáceos <sup>9</sup>	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Lecitina de Soya <sup>10</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Fosfato Dibásico de Sodio <sup>11</sup>	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Óxido Crómico <sup>12</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premezcla de Minerales Crustáceos <sup>13</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de Colina 62% <sup>14</sup>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C <sup>15</sup>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
BHT <sup>16</sup>	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004

<sup>1</sup>Proteínas Marinas, Guadalajara, México. PC = 26.76% y EE = 1.67% (PsoyHIT0609-1); <sup>2</sup>Proteínas Marinas, Guadalajara, México. PC = 47.98% y EE = 0.88% (Psoy0607-1); <sup>3</sup>Proteínas Marinas, Guadalajara, México. PC = 15.44% y EE = 2.08% (HIT0607-1); <sup>4</sup>Aceites del Mayo, Sonora, México. 26.79% y EE = 1.74% (PCB); <sup>5</sup>Aceites del Mayo, Sonora, México. 35.30% y EE = 0.99% (PCA); <sup>6</sup>Proteínas Marinas, Guadalajara, México. PC = 64.87% y EE = 10.95 (HP0607-1); <sup>7</sup>Proteínas Marinas, Guadalajara, México (AcPes0607); <sup>8</sup>Sigma, A-7128; <sup>9</sup>(VITCRU0604) (Anexo 2); <sup>10</sup>(LSoy0607); <sup>11</sup>Sigma, S-0876; <sup>12</sup>Impex, 12233; <sup>13</sup>(MINCRU0409) (Anexo 3); <sup>14</sup>(CloCol98); <sup>15</sup>(Stay-C 35% aa); <sup>16</sup>ICN, 101162.

Al inicio y final del bioensayo se disectaron 5 camarones en estadio de intermuda “C” (por medio de la observación del desarrollo setal o setogénesis de los urópodos de los camarones con la ayuda de un estéreomicroscopio (40X) de cada tratamiento, a fin de medir la actividad de enzimas digestivas en el hepatopáncreas. A éstos mismos organismos se les disectó el músculo para determinar el contenido de proteína.

Los extractos enzimáticos se prepararon homogenizando los hepatopáncreas como se describe en la sección 1.1.9. El sobrenadante se utilizó para determinar el contenido de proteína soluble, actividad enzimática de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina y  $\alpha$ -amilasa como se describe de la sección 1.1.9.2 a la 1.1.9.6.

### *2.1.2. Experimento de CUDA*

Se midieron los CUDA de los 9 alimentos empleados en el experimento de crecimiento anterior, descritos en la Tabla IX. El sistema experimental fue el mismo que se mencionó en la sección 1.1.8.2.

#### *2.1.2.1. Organismos experimentales*

Los camarones utilizados fueron juveniles de la especie *L. vannamei* (Boone, 1931), donados por la granja Camarón Sureño, ubicada en el poblado de Melitón Albañes, B.C.S. Estos organismos fueron aclimatados en el laboratorio de Nutrición Experimental del CIBNOR, dentro de tanques de plástico con 2 500L de capacidad a una temperatura de 27°C y salinidad de 40ups. Los camarones se alimentaron dos veces al día (10:00 y 16:00h)

con un alimento comercial NASSA con 35% de proteína, hasta que alcanzaron el tamaño requerido para el experimento.

#### *2.1.2.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo*

Los organismos se pesaron individualmente y se seleccionaron 190 camarones con un peso de entre 16.5 y 19.5g. Se distribuyeron aleatoriamente en 36 acuarios a razón de 5 organismos por acuario, a manera de contar con 4 réplicas por cada tratamiento alimenticio.

Cada uno de los 9 alimentos fue asignado aleatoriamente a 4 acuarios. El experimento de CUDA tuvo una duración de 40 días; tiempo necesario para colectar aproximadamente 15 gramos de heces de cada acuario. Diariamente se monitorearon la temperatura con un termómetro de mercurio, la salinidad por medio de un refractómetro portátil (VISTA A366 ATC) y el oxígeno disuelto con un oxímetro portátil (YSI, 550A). Los restos de alimento no consumido, mudas y heces fueron extraídos de los acuarios todos los días por la mañana y posteriormente se realizó un recambio de agua equivalente al 80% del volumen total. Antes de iniciar las colectas de heces, los camarones se alimentaron durante 7 días con los alimentos que contenían óxido crómico. La colecta de las heces en cada acuario se realizó como se mencionó en la sección 1.1.8.4. Posteriormente, las heces fueron analizadas por triplicado para determinar sus contenidos de proteína, lípidos, carbohidratos y óxido crómico como se describió en la sección 1.1.2.

### *2.1.2.3. Criterios de evaluación*

Se estimaron los CUDA de materia seca, proteínas, lípidos y carbohidratos (CUDAms, CUDAp, CUDAl y CUDAc, respectivamente) de los alimentos como se mencionó en la sección 1.1.8.5.

### *2.1.2.4 Análisis estadísticos*

Los análisis estadísticos que se utilizaron para determinar diferencias significativas entre los tratamientos son los que se mencionó en la sección 1.1.13.

## **2.2. Resultados**

### *2.2.1. Experimento de crecimiento*

#### *2.2.1.1. Parámetros fisicoquímicos*

Los parámetros fisicoquímicos del agua registrados durante el experimento no fueron diferentes entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ): temperatura (27-28°C), salinidad (39-40ups) y oxígeno (5.6-5.9 mg/L). Estos valores se mantuvieron durante todo el experimento y están dentro de los intervalos para el cultivo de camarones peneidos (Lawrence, 1985).

#### *2.2.1.2. Análisis proximal de los alimentos*

Los alimentos que se utilizaron en este experimento presentaron un contenido proteico que varió de 34.47% en el alimento del 100% de sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína (PCB-100) a 31.34% en el alimento del 75% de sustitución de la soya por pasta de cártamo alta en proteína (PCA-75). Los alimentos con el 75% y 100% de la sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta

de cártamo baja en proteína (PCB75 y PCB-100, respectivamente) son los que presentaron los valores más altos de lípidos (9.52 y 9.15%), mientras que el menor valor se presentó con el alimento PCA-25 (7.60%). Los valores más altos de fibra (3.33 y 6.80%) se presentaron en los alimentos con el 75% y 100% de la sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína (PCB75 y PCB-100, respectivamente), mientras que el menor valor se presentó con el alimento control (0.87%). El contenido de cenizas en todos los alimentos varió entre 9.89 y 11.48% (Tabla XX).

#### *2.2.1.3. Sustitución de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína*

Después de 45 días de experimentación la supervivencia fue superior al 92.5% con todos los tratamientos (Tabla XXI). Los tratamientos PCA-75 y CT fueron los que presentaron el mayor peso promedio final (3.48 y 3.32g, respectivamente), así como también la mayor tasa de crecimiento (902.1 y 853.3%, respectivamente), mientras que los tratamientos PCA-100 y PCA-25 fueron los que presentaron el menor peso promedio (3.12 y 3.13g, respectivamente) y la menor tasa de crecimiento. La sustitución de la pasta de soya por la pasta de cártamo de alta proteína no produjo cambios significativos en ninguna de los parámetros zootécnicos evaluados. El nivel de reemplazo del 75% produjo el mayor crecimiento entre todos los tratamientos.

**Tabla XX. Composición química proximal de los alimentos utilizados para determinar la sustitución de la pasta de soya por pastas de cártamo**

Nutriente (g/100g base seca)	CT	PCA				PCB			
		25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
Humedad (%) <sup>1</sup>	9.51	8.31	9.01	8.55	8.32	8.15	8.16	7.76	7.51
	±0.4	±0.04	±0.18	±0.14	±0.21	±0.04	±0.18	±0.06	±0.10
Proteína bruta <sup>1</sup>	31.97	32.93	31.59	31.34	31.40	32.27	32.63	33.59	34.47
	±0.26	±0.44	±0.39	±0.09	±0.18	±0.24	±0.11	±0.19	±0.37
Extracto etéreo <sup>1</sup>	7.66	7.60	7.63	7.70	8.16	7.91	7.79	8.52	9.15
	±0.04	±0.10	±0.17	±0.32	±0.14	±0.17	±0.20	±0.26	±0.29
Fibra <sup>1</sup>	0.87	0.92	1.23	1.71	1.71	1.26	3.17	3.33	6.80
	±0.03	±0.14	±0.25	±0.15	±0.23	±0.26	±0.25	±0.28	±0.29
Cenizas <sup>1</sup>	9.89	10.46	10.19	10.30	10.43	10.28	10.63	11.10	11.48
	±0.04	±0.05	±0.04	±0.07	±0.13	±0.03	±0.11	±0.02	±0.04
E.L.N. <sup>2</sup>	49.61	48.09	49.36	48.95	48.30	48.28	45.78	43.47	38.09
Energía (cal/g)	4194.46	4157.24	4171.24	4138.29	4129.82	4116.17	4147.39	4160.63	4287.79
	±10.05	±8.75	±6.84	±8.21	±6.66	±8.14	±5.42	±5.44	±7.24

<sup>1</sup>Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 de materia seca, excepto humedad. <sup>2</sup>ELN= Extracto libre de nitrógeno.

**Tabla XXI. Resultados zootécnicos finales (45 días) de juveniles de camarón *L. vannamei* para evaluar la sustitución pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína**

<b>Alimento</b>	<b>Peso Inicial (g)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>Alimento consumido (g/org/día)</b>	<b>Alimento consumido Total (g)</b>	<b>Tasa de crecimiento (%)</b>	<b>Factor de conversión alimenticia</b>	<b>Eficiencia proteica</b>
<b>Control</b>	0.35 <sup>a</sup> ±0.01	90.0 <sup>a</sup> ±8.16	3.32 <sup>ab</sup> ±0.30	0.21 <sup>a</sup> ±0.01	45.50 <sup>a</sup> ±1.72	853.26 <sup>ab</sup> ±63.95	1.62 <sup>a</sup> ±0.14	1.91 <sup>a</sup> ±0.16
<b>PCA-25</b>	0.35 <sup>a</sup> ±0.01	87.5 <sup>a</sup> ±12.56	3.13 <sup>ab</sup> ±0.27	0.20 <sup>a</sup> ±0.02	41.52 <sup>a</sup> ±2.18	796.61 <sup>ab</sup> ±75.90	1.60 <sup>a</sup> ±0.11	1.94 <sup>a</sup> ±0.13
<b>PCA-50</b>	0.35 <sup>a</sup> ±0.01	92.5 <sup>a</sup> ±12.56	2.89 <sup>b</sup> ±0.20	0.20 <sup>a</sup> ±0.03	39.29 <sup>a</sup> ±3.29	716.54 <sup>b</sup> ±79.76	1.71 <sup>a</sup> ±0.11	1.83 <sup>a</sup> ±0.12
<b>PCA-75</b>	0.35 <sup>a</sup> ±0.01	92.5 <sup>a</sup> ±9.57	3.48 <sup>a</sup> ±0.26	0.21 <sup>a</sup> ±0.03	45.00 <sup>a</sup> ±6.59	902.10 <sup>a</sup> ±87.74	1.49 <sup>a</sup> ±0.09	2.11 <sup>a</sup> ±0.14
<b>PCA-100</b>	0.35 <sup>a</sup> ±0.01	92.5 <sup>a</sup> ±5.00	3.12 <sup>ab</sup> ±0.24	0.19 <sup>a</sup> ±0.01	42.00 <sup>a</sup> ±1.45	831.98 <sup>ab</sup> ±62.86	1.53 <sup>a</sup> ±0.13	2.08 <sup>a</sup> ±0.17

Valores promedio de 4 réplicas ± desviación estándar. Alimentos PCA-25, PCA-50, PCA-75 y PCA-100 (correspondientes a 25, 50, 75 y 100% de sustitución de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína). Valores con diferente superíndice dentro de la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

El mayor consumo de alimento lo presentaron los camarones que fueron alimentados con el alimento control, sin embargo no se encontraron diferencias significativas no se ( $P>0.05$ ) (Tabla XXI).

#### *2.2.1.4. Sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína*

Después de 45 días de experimentación la supervivencia fue superior al 87.5% con todos los tratamientos (Tabla XXII). La sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína tendió a disminuir el crecimiento y la eficiencia proteica y aumentar la TCA, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos (Tabla XXII).

#### *2.2.1.5. Actividad enzimática digestiva*

La Tabla XXIII muestra la actividad enzimática específica de proteinasas, tripsina y amilasa de camarones *L. vannamei* alimentados con alimentos en donde se sustituyó totalmente la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína (PCA-100) y donde se sustituyó la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína (PCB-100). La cantidad de proteína soluble se incrementó significativamente en los camarones que fueron alimentados con PCB-100. La actividad enzimática no fue significativamente influenciada por la inclusión de los productos de cártamo en el alimento ( $P > 0.05$ ). El valor más alto de proteinasas fue obtenido en el alimento con PCA-100 (7.9 U/mg proteína). La actividad de tripsina no fue significativamente diferente en ninguno de los tratamientos. La actividad específica más alta de amilasa fue encontrada en los camarones que se

alimentaron con el alimento control, siendo significativamente diferente con respecto a los que se alimentaron con el alimento PCB-100 (Tabla XXIII).

#### *2.2.1.6. Contenido de proteína en el músculo del camarón*

En la Figura 9 se muestra el contenido de proteína en el músculo de los camarones al inicio del experimento, así como de camarones al final del experimento que fueron alimentados con los alimentos Control, PCA-100 y PCB-100. Se muestra que hubo un incremento en la cantidad de proteína en el músculo de los camarones al final con respecto al inicio del experimento. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos alimenticios. Donde la mayor cantidad de proteína en el músculo de los camarones (83.71%) se presentó cuando fueron alimentados con el alimento PCB-100.

**Tabla XXII. Resultados zootécnicos de juveniles de camarón *L. vannamei* para evaluar la sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína inclusión**

Alimento	Peso Inicial (g)	Supervivencia (%)	Peso final (g)	Alimento consumido (g/org/día)	Alimento consumido Total (g)	Tasa de crecimiento (%)	Factor de conversión alimenticia	Eficiencia proteica
<b>Control</b>	0.35 <sup>a</sup>	90.0 <sup>a</sup>	3.32 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	45.50 <sup>a</sup>	853.26 <sup>a</sup>	1.62 <sup>a</sup>	1.91 <sup>a</sup>
	±0.01	±8.16	±0.30	±0.01	±1.72	±63.95	±0.14	±0.16
<b>PCB-25</b>	0.34 <sup>a</sup>	90.0 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	41.65 <sup>a</sup>	778.09 <sup>ab</sup>	1.66 <sup>a</sup>	1.86 <sup>a</sup>
	±0.02	±8.16	±0.33	±0.03	±3.33	±82.87	±0.07	±0.07
<b>PCB-50</b>	0.35 <sup>a</sup>	87.5 <sup>a</sup>	2.97 <sup>a</sup>	0.20 <sup>a</sup>	40.33 <sup>a</sup>	739.99 <sup>ab</sup>	1.65 <sup>a</sup>	1.87 <sup>a</sup>
	±0.01	±12.58	±0.33	±0.05	±4.13	±79.23	±0.12	±0.13
<b>PCB-75</b>	0.34 <sup>a</sup>	87.5 <sup>a</sup>	2.73 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	43.98 <sup>a</sup>	694.26 <sup>b</sup>	1.98 <sup>b</sup>	1.56 <sup>b</sup>
	±0.01	±9.57	±0.19	±0.03	±2.44	±50.56	±0.12	±0.10
<b>PCB-100</b>	0.35 <sup>a</sup>	90.0 <sup>a</sup>	2.82 <sup>a</sup>	0.21 <sup>a</sup>	45.24 <sup>a</sup>	710.29 <sup>ab</sup>	1.93 <sup>b</sup>	1.60 <sup>b</sup>
	±0.01	±8.16	±0.23	±0.03	±4.37	±52.85	±0.09	±0.07

Valores promedio de 4 réplicas ± desviación estándar. Alimentos PCB-25, PCB-50, PCB-75 y PCB-100 (correspondientes a 25, 50,75 y 100% de sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína). Valores con diferente superíndice dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

**Tabla XXIII. Proteína soluble (mg/mL) y actividad específica (U/mg Proteína) de diferentes enzimas en el hepatopáncreas del camarón blanco.**

	Alimentos <sup>b</sup>		
	CT	PCA-100	PCB-100
Proteína soluble	8.8±0.9a	8.9±0.5 <sup>a</sup>	9.6±1.0a
Proteinasas totales	7.0±0.5a	7.9±2.2 <sup>a</sup>	7.3±0.8a
Tripsina	52.5±5.1a	51.8±3.4 <sup>a</sup>	48.8±4.8a
Quimotripsina	835.0±140.6a	827.4±76.8a	677.5±89.76a
Amilasa	351.0±33.4a	348.6±19.6a	327.1±29.7a

<sup>a</sup> Letras diferentes dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup>CT = Alimento control; PCA-100 = 100% de sustitución de la proteína de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína; PCB-100 = 100% de sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína.

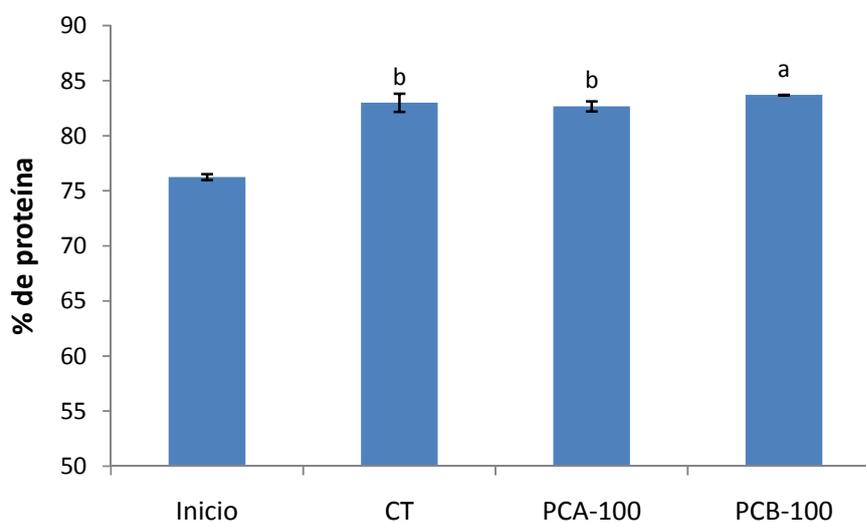


Figura 9. Composición de proteína en el músculo de los camarones al inicio, y al final del bioensayo de crecimiento después de haber sido alimentados con el alimento control (CT), y los alimentos donde se sustituyó al 100% pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína (PCA-100) o la mezcla trigo-soya por pasta de cártamo baja en proteína (PCB-100).

### 2.2.2. Experimento de CUDA

#### 2.2.2.1. Sustitución de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína

Los resultados de los análisis proximales de los alimentos se presentan en la Tabla XX, ver sección 2.2.1.2.

Las condiciones de cultivo durante el bioensayo para determinar los CUDA *in vivo* fueron  $27.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ,  $40.0 \pm 0.5$  ups y  $5.5 \pm 0.5$  mg/mL de oxígeno disuelto, las cuales se mantuvieron constantes para todos los tratamientos.

En la Tabla XXIV se muestran los CUDA de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos en donde se sustituyó la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína. Los CUDAm de los alimentos variaron entre 71.2% a 82.7%. Se observa que a medida que se incrementó la sustitución de la pasta de soya con el cártamo el CUDAm disminuyó. Los mayores CUDAp se obtuvieron con los alimentos CT y PCA-25 (91.4% y 89.5%, respectivamente), mientras que los menores CUDAp se observan con los mayores niveles de sustitución PCA-50, PCA-75 y PCA-100. El mayor CUDAI se obtuvo con el alimento CT (93.7%) y el menor fue con el alimento PCA-100 (89.9%).

**Tabla XXIV. CUDA (% ± DE) de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos para juveniles de camarones *L. vannamei***

	Alimentos <sup>1</sup>				
	CT	PCA-25	PCA-50	PCA-75	PCA-100
Materia seca	82.74±0.59a	78.77±0.58b	78.36±0.85b	75.44±0.19c	71.21±0.46d
Proteína	91.41±0.75a	89.45±0.25ab	88.22±1.67b	88.72±0.12b	85.69±0.50c
Lípidos	93.68±0.43a	91.46±0.04b	91.04±1.11bc	91.26±0.28bc	89.89±0.59c

<sup>1</sup>DC = Alimento control; Alimentos; PCA-25, PCA-50, PCA-75 y PCA-100 (correspondientes a 25, 50, 75 y 100% de sustitución de la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína, respectivamente, en base seca). Valores con diferentes letras dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 2.2.2.2. Sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína

En la Tabla XXV se muestran los CUDA de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos en donde se sustituyó la mezcla trigo-pasta de soya pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína. Los CUDAmS de los alimentos variaron entre 56.7% a 82.7%. Se observa que a medida que se incrementó la sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya con la pasta de cártamo baja en proteína el CUDAmS y CUDAl disminuyeron. El alimento PCB-100 fue significativamente diferente con respecto a los demás tratamientos. Los mayores CUDAp se obtuvieron con los alimentos CT y PCB-25 (91.4% y 85.2%, respectivamente), aunque fueron significativamente diferentes entre sí, mientras que los menores CUDAp se obtuvieron con los mayores niveles de sustitución PCB-50, PCB-75 y PCB-100. Entre los alimentos donde se utilizó pasta de cártamo baja en

proteína no se encontraron diferencias significativas en los CUDAp y CUDAl, y fueron significativamente menores que el alimento (CT).

**Tabla XXV. CUDA (%  $\pm$  DE) de materia seca, proteína, lípidos y carbohidratos de los alimentos para juveniles de camarones *L. vannamei***

	Alimentos <sup>1</sup>				
	CT	PCB-25	PCB-50	PCB-75	PCB-100
Materia seca	82.74 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	68.87 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	65.07 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>	62.95 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	56.68 $\pm$ 1.62 <sup>c</sup>
Proteína	91.41 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	85.21 $\pm$ 1.44 <sup>b</sup>	83.33 $\pm$ 3.32 <sup>b</sup>	85.31 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	82.90 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
Lípidos	93.68 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	87.80 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	85.26 $\pm$ 2.18 <sup>b</sup>	86.45 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>	86.27 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>CT = Alimento control; Alimentos; PCB-25, PCB-50, PCB-75 y PCB-100 (correspondientes a 25, 50, 75 y 100% de sustitución de la mezcla trigo-pasta de soya por la pasta de cártamo baja en proteína, respectivamente, en base seca). Valores con diferentes letras dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 2.3. Discusión

Entre los ingredientes vegetales usados en la nutrición animal, la pasta de soya es la fuente de proteína más ampliamente utilizada debido a la calidad nutricional, costo y amplia disponibilidad en el mercado (Akiyama *et al.*, 1991). El uso de la pasta de soya en la alimentación de camarones se ha incrementado; sin embargo, la utilización de este insumo en la alimentación de humanos y alimentos para organismos terrestres se también se ha incrementado, y la superficie sembrada disminuye por la producción de maíz para producción de bioetanol, por lo que la incorporación de este ingrediente en alimentos para acuicultura se hace menos favorable. Como alternativa para reducir los posibles efectos negativos de la alta demanda de pasta de soya, en este Capítulo se evaluó la sustitución de

la misma con pasta de cártamo, que es un ingrediente más económico, no utilizado en la alimentación de humanos y que se encuentra disponible en el mercado.

El crecimiento observado en este estudio con el alimento control (0% de sustitución) fue de 66 mg/d. Este crecimiento es menor a lo observado en otros estudios utilizando juveniles de *P. monodon* y *L. vannamei* en condiciones de cultivo en laboratorio. Por ejemplo Sudaryono *et al.* (1999b) reportaron un crecimiento de 91 mg/d en camarones *P. monodon* de 4.35 g alimentados con alimentos experimentales (40% proteína) durante 42 días. Cruz-Suárez *et al.* (1992) utilizando camarones *P. monodon* de 2.2 g alimentados con alimentos experimentales (49% proteína) a base de harina de calamar durante 40 días reportaron un crecimiento de 95.8 mg/d. Davis *et al.* (2002) reportaron un crecimiento de 99 mg/d en camarones *L. vannamei* de 0.66 mg alimentados con peletizados experimentales (36% proteína) a base de pescado-soya-trigo durante 49 días. Smith *et al.* (2007) utilizando camarones *L. vannamei* de 3.34 g alimentado con alimentos peletizados (42% proteína) a base de pescado-krill-trigo durante 50 días reportaron un crecimiento de 111 mg/d.

No se encontró un patrón claro en la mayoría de los parámetros de evaluación (supervivencia, crecimiento en peso, FCA y EP); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a medida que se incrementó la sustitución de la pasta de soya por la pasta de cártamo alta en proteína, sugiriendo que esta pasta puede sustituir totalmente la pasta de soya a un nivel de inclusión de 11.25% en el alimento control, sin tener efectos significativos en el crecimiento de los organismos a pesar de la baja digestibilidad en materia seca de la pasta de cártamo con respecto a la pasta de soya. Estos resultados

contrastan con lo reportado por Sudaryono *et al.* (1999b) donde evaluaron la sustitución de la pasta de soya por harina de lupino de un alimento de referencia que contenía 24% de inclusión de harina de pescado, encontrando que el crecimiento y utilización del alimento es afectado cuando se hace la sustitución total de la pasta de soya. Por otro lado nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros estudios en donde se pudo sustituir totalmente la pasta de soya sin tener efectos negativos en el crecimiento de otras especies de peces y camarones (Hughes 1988, 1991; Bautista-Teruel *et al.*, 2003). En éste estudio el alimento control no tenía un nivel de muy elevado de pasta de soya, por lo que para hacer una recomendación mas acertada sobre el nivel óptimo de sustitución de la soya habrá que estudiar si la pasta de cártamo podría sustituir a la soya cuando el nivel de inclusión de ésta en el alimento sea mayor. Así como evaluar sus posibles efectos sobre la atractabilidad, palatabilidad y por ende consumo y CUDAmS.

Estudios sobre la palatabilidad del cártamo para camarones peneidos no se encuentran en la literatura. Aparentemente en este experimento la inclusión del cártamo no afectó de manera significativamente el consumo de los alimentos. El consumo de los alimentos es generalmente relacionado con el contenido de atractantes en el alimento (Alvarez *et al.*, 2005). Se ha reportado que ciertos aminoácidos como la alanina y la glicina son buenos atractantes para camarones *L. vannamei* y *L. setiferus* (Clark *et al.*, 1993). La pasta de cártamo alta en proteína tiene 4.79 y 7.83% de estos aminoácidos que posiblemente pudieron ayudar en la atractabilidad de los alimentos a estos niveles de inclusión. El alto contenido de harina de pescado en los alimentos también pudo mantener una buena atractabilidad.

Se decidió probar la mezcla trigo-soya, dado que la pasta de cártamo baja en proteína por sí sola no podía sustituir totalmente la proteína de la pasta de soya debido a la diferencia de proteína que existe entre estos ingredientes (47.9% vs 26.8%). En este experimento no se detectaron diferencias significativas en la supervivencia y el alimento consumido entre los tratamientos; sin embargo, el factor de conversión alimenticia y la eficiencia proteica muestran un progresivo deterioro (aumento del FCA y decremento de la EP) cuando se incrementó el nivel de inclusión de la pasta de cártamo baja en proteína que llegó a ser significativo con respecto al alimento control en los alimentos PCB-75 y PCB-100. Estos resultados concuerdan con los reportados por Sudaryono *et al.* (1999b) en donde encontraron que niveles altos (75 y 100%) de sustitución de la pasta de soya por lupino en alimentos para juveniles de camarón *P. monodon* disminuyen el crecimiento. Por lo anterior, la pasta de cártamo baja en proteína puede remplazar solo parcialmente la mezcla de trigo-soya sin afectar la utilización del alimento. La disminución de la eficiencia del alimento se puede deber al incremento de la fibra en los alimentos PCB-50, PCB-75 y PCB-100%. Aunque la soya y el cártamo son deficientes en metionina y lisina (Tacon, 1990; Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000), el contenido de estos aminoácidos en el cártamo es menor en comparación con la soya, una posible deficiencia de metionina y lisina pudo ser también responsable de la disminución de las tasas de crecimiento de los camarones alimentados con los alimentos PCB-75 y PCB-100% con respecto al alimento control.

La actividad de las enzimas digestivas de los camarones alimentados con altos niveles de la pasta de cártamo alta y baja en proteína no fue disminuida, debido a esto se comprueba que los inhibidores de proteasas presentes en el cártamo no afectan significativamente la

actividad de estas enzimas. Similares resultados han sido reportados cuando se utilizan ingredientes vegetales con bajos niveles del inhibidor de tripsina (Mohamed y Rayasdurate, 1995; Robaina *et al.*, 1995). Estos resultados son favorables, dado que se comprueba que no se afecta la capacidad digestiva por efecto los alimentos con pasta de cártamo.

El porcentaje de proteína en el músculo de los camarones alimentados con las pastas de cártamo obtenido en este estudio, es superior al reportado en camarones alimentados con alimentos con diferentes niveles de harina de algodón en juveniles *L. vannamei* (Lim, 1996). Por otro lado el contenido de proteína en el músculo de los camarones no se correlaciono con el crecimiento final de los camarones como ha sido reportado (Lim, 1996).

Los CUDA de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos en donde se reemplazó la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína disminuyeron a medida que se incrementó el nivel de sustitución, lo que muestra que la digestibilidad de la pasta de soya es mayor que la pasta de cártamo, sin embargo estos resultados son similares a lo reportado en la literatura para alimentos en donde se sustituyó la pasta de soya por harina de lupino (Sudaryono *et al.*, 1999b). Los datos indican que los juveniles de camarón *L. vannamei* pueden digerir eficientemente los alimentos que contienen altos niveles de inclusión (15 y 20%) de pasta de cártamo alta en proteína. La buena digestibilidad de proteína de los alimentos con pasta de cártamo alta en proteína se puede deber a que las proteínas de este ingrediente fueron más hidrolizadas por las enzimas digestivas debido a que la pasta de cártamo alta en proteína contiene bajos niveles de factores antinutricionales como son el

inhibidor de tripsina. Desafortunadamente no existen en la literatura datos en donde se reporte la digestibilidad de proteína del cártamo en camarones.

Los CUDA de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos en donde se reemplazó la mezcla trigo-soya por pasta de cártamo baja en proteína disminuyeron a medida que se incrementó el nivel de sustitución de la pasta de soya. Esto muestra que la digestibilidad de la mezcla trigo-pasta de soya es mayor que la de la pasta de cártamo baja en proteína. Bautista-Teruel *et al.* (2003) reportan valores de los CUDA de proteína de alimentos con chícharo (*Pisum sativum*) en camarones *P. monodon* entre 82.8% y 87.5%. Los CUDA de proteína obtenidos en este trabajo 82.9% y 91.4% son similares con los resultados obtenidos por dichos autores.

#### **2.4. Conclusiones**

- La pasta de cártamo puede reemplazar la pasta de soya o una mezcla de trigo-soya, peso por peso, sin causar disminución significativa en el rendimiento de los camarones a pesar de su mayor contenido de fibra y su menor digestibilidad de materia seca.
- La sustitución total de la mezcla trigo-pasta de soya por pasta de cártamo baja en proteína no afectó la supervivencia y crecimiento, sin embargo la utilización del alimento si se vio afectada, por lo que se recomienda no sustituir más del 75% de esta mezcla.

- La inclusión de los productos de cártamo en los alimentos no tuvo un efecto significativo sobre la actividad de las enzimas digestivas.
- El contenido de proteína en el músculo de los camarones alimentados con el alimento no se afectó con la inclusión de pasta de cártamo, siendo igual que el alimento control.
- No se mejoraron los CUDA de los alimentos en donde se sustituyó la pasta de soya con pasta de cártamo alta en proteína, así como los alimentos en donde se sustituyó la mezcla trigo-pasta de soya en comparación con el alimento control.

### CAPÍTULO 3

#### **EFFECTO DE LA SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA DE HARINA DE PESCADO CON LA PROTEÍNA DE LA PASTA DE CÁRTAMO EN ALIMENTOS SUPLEMENTADOS O NO CON D-L METIONINA SOBRE EL CRECIMIENTO PONDERAL Y LOS CUDAS DE JUVENILES DE CAMARÓN *L. VANNAMEI***

##### ***3.1. Material y métodos***

###### ***3.1.1. Experimento de crecimiento***

Se evaluó la pasta de cártamo alta en proteína (PCA) donada por Aceites del Mayo S.A. de C.V., Sonora, México. La formulación de los alimentos se hizo como se menciona en la sección 1.1.8.1.

###### ***3.1.1.1. Organismos experimentales***

Se utilizaron postlarvas de camarones utilizados fueron de la especie *L. vannamei* (Boone, 1931), donados por la empresa Acuacultura Mahr (La Paz, B.C.S.). La aclimatación y alimentación se realizó como se menciona en la sección 2.1.1.1.

###### ***3.1.1.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo***

Se formularon 7 alimentos: un alimento control (CT), tres con diferentes niveles de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína (D-22, D-44 y D-66) y tres con diferentes niveles de sustitución de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína suplementada con D-L metionina (D-22CM, D-44CM y D-66CM) (Tabla XXVI). Todos los alimentos se

formularon para contener 32.5% de proteína y 8.5% de lípidos, así como satisfacer el contenido de aminoácidos esenciales para camarón según lo sugerido por Akiyama *et al.* (1991) y la relación proteína/energía (80 mg proteína/Kcal) reportado por Cruz-Suárez *et al.* (2000).

El sistema experimental utilizado fue el mismo que se menciona en la sección 1.1.8.2.

Después de una semana de aclimatación, los juveniles de camarón blanco *L. vannamei* se pesaron individualmente y se seleccionaron 280 camarones con peso promedio de  $222 \pm 0.005$  mg. Se distribuyeron aleatoriamente en 28 acuarios a razón de 10 organismos por acuario, a manera de contar con cuatro réplicas por cada tratamiento alimenticio.

La protección de la D-L-metionina se realizó de la siguiente manera: se calentó agua destilada a 60°C para hacer una gelatina con la caboxil-metil-celulosa (CMC; 99%, Fermex, México), se dejó enfriar, posteriormente ésta gelatina se mezcló en una proporción de 7.5% de CMC con 92.5% de D-L-metionina (p/p), finalmente la mezcla se liofilizó y se molió a menos de 250 $\mu$ m.

Las condiciones de cultivo durante el bioensayo de crecimiento fueron las mismas que las reportadas en la sección 2.1.1.2.

**Tabla XXVI. Composición de los alimentos (g/100g alimento, en base húmeda) usados para determinar la sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína.**

Ingrediente (Base Húmeda)	CT	Nivel de sustitución Sin D-L metionina			Nivel de sustitución Con D-L metionina		
		D-22	D-44	D-66	D-22CM	D-44CM	D-66CM
Harina Integral de Trigo <sup>1</sup>	43.59	35.82	28.11	20.37	35.76	27.96	20.13
Harina de Pescado <sup>2</sup>	25.00	19.50	14.00	8.50	19.50	14.00	8.50
Pasta de Soya <sup>3</sup>	19.72	22.16	24.68	27.17	22.19	24.73	27.24
Pasta de cártamo alta en proteína <sup>4</sup>		10.17	20.21	30.32	10.17	20.21	30.32
Aceite de Pescado <sup>5</sup>	3.40	4.05	4.70	5.35	4.05	4.71	5.36
Ácido Algínico <sup>6</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla Vitaminas Crustáceos <sup>7</sup>	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80
Lecitina de Soya <sup>8</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Fosfato Dibásico de Sodio <sup>9</sup>	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
Óxido Crómico <sup>10</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Premezcla de Minerales Crustáceos <sup>11</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de Colina 62% <sup>12</sup>	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C <sup>13</sup>	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
BHT <sup>14</sup>	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
D-L Metionina protegida <sup>15</sup>					0.043	0.10	0.15

<sup>1</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México. PC = 15.44% y EE = 2.08% (HIT0607-1); <sup>2</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México. PC = 64.87% y EE = 10.95 (HP0607-1); <sup>3</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México. PC = 47.98% y EE = 0.88% (Psoy0607-1); <sup>4</sup>Aceites del Mayo, Sonora, México. 35.30% y EE = 0.99% (PCA); <sup>5</sup>Proteínas Marinas y Agropecuarias, Guadalajara, México (AcPes0607); <sup>6</sup>Sigma, A-7128; <sup>7</sup>(VITCRU0604) (Anexo 2); <sup>8</sup>(LSoy0607); <sup>9</sup>Sigma, S-0876; <sup>10</sup>Impex, 12233; <sup>11</sup>(MINCRU0409) (Anexo 3); <sup>12</sup>(CloCol98); <sup>13</sup>(Stay-C 35% aa ROCHE, DF, México); <sup>14</sup>ICN, 101162; <sup>15</sup>Fabricada en el laboratorio de Nutrición Acuicola, CIBNOR (92.5-CMC7.5-D-L-metionina)

### 3.1.1.3. Criterios de evaluación

Los criterios para evaluar los tratamientos alimenticios fueron los mismos que los que se describen en la sección 2.1.1.3.

Al inicio y final del bioensayo se disectaron 5 camarones en estadio de intermuda como se describe en la sección 2.1.1.3, para determinar el contenido de proteína soluble, actividad enzimática de proteasas alcalinas totales, tripsina, quimotripsina y  $\alpha$ -amilasa se siguieron los métodos descritos en las secciones 1.1.9.2 a 1.1.9.6.

### 3.1.2. Experimento de CUDA

Para este experimento se utilizaron los mismos alimentos que el experimento de crecimiento (Tabla XXVI).

#### 3.1.2.1. Organismos experimentales

Se utilizaron camarones juveniles de la especie *L. vannamei* (Boone, 1931), donados por la granja Camarón Sureño, ubicada en el poblado de Melitón Albañes, B.C.S., mismos que fueron aclimatados y alimentados siguiendo la metodología descrita en la sección 2.1.2.1.

#### 3.1.2.2. Diseño experimental y condiciones de cultivo

Después de una semana de aclimatación, los juveniles de camarón blanco *L. vannamei* se pesaron individualmente y se seleccionaron 140 camarones con peso entre

14.6 y 14.7 g. Se distribuyeron aleatoriamente en 28 acuarios a razón de 5 organismos por acuario, a manera de contar con cuatro réplicas por cada tratamiento alimenticio.

Para medir la digestibilidad *in vivo* se diseñaron 7 alimentos como se menciona en la sección 3.1.1.2. (Tabla XXVI).

La colecta de las heces en cada acuario se realizó como se describe en la sección 1.1.8.4. Posteriormente, las heces fueron analizadas por triplicado para determinar su contenido de proteína, lípidos, carbohidratos y óxido crómico como se menciona en la sección 1.1.2.

#### *3.1.2.3. Criterios de evaluación*

Se estimaron los CUDA de materia seca, proteínas, lípidos y carbohidratos de los alimentos como se describe en la sección 1.1.8.5.

#### *3.1.3. Análisis estadísticos*

Los análisis estadísticos que se utilizaron para determinar diferencias significativas entre los tratamientos son los que se mencionó en la sección 1.1.13.

### **3.2. Resultados**

#### *3.2.1. Experimento de crecimiento*

##### *3.2.1.1. Parámetros fisicoquímicos*

Los parámetros fisicoquímicos del agua registrados durante el experimento no fueron diferentes entre los tratamientos ( $P>0.05$ ): temperatura (27-27.9 °C), salinidad

(39.5-40.2 ups) y oxígeno disuelto (5.4-5.8 mg/L). Estos valores se mantuvieron durante todo el experimento y están dentro de los intervalos recomendados para el cultivo de camarones peneidos (Lawrence, 1985).

### *3.2.1.2. Análisis proximal de los alimentos*

Los alimentos que se utilizaron en este experimento presentaron un contenido proteico que varió de 34.47% en el alimento control a 37.7% en el alimento del 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína (D-66) (Tabla XXVII).

El contenido de extracto etéreo varió de 8.5% a 7.9% entre todos los tratamientos. El contenido de fibra se incrementó a medida que aumentó el nivel de sustitución de la proteína de la harina de pescado. El alimento control fue el que presentó el mayor contenido de cenizas (11.8%), mientras que el menor contenido lo presentó el alimento D-66CM. El contenido de energía bruta varió entre 4242 y 4524 cal/g (Tabla XXVIII).

**Tabla XXVII. Composición química proximal de los alimentos utilizados para determinar el efecto de la sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína en el alimento, con y sin D-L-metionina adicionada.**

Nutriente (g/100g base seca)	Nivel de sustitución de proteína de pescado <sup>3</sup>				Nivel de sustitución de proteína de pescado <sup>3</sup>		
	CT	Sin D-L metionina			Con D-L metionina		
		D-22	D-44	D-66	D-22CM	D-44CM	D-66CM
Humedad (%) <sup>1</sup>	8.0 ±1.5	6.0 ±0.2	7.7 ±0.1	7.5 ±0.1	7.4 ±0.0	7.7 ±0.1	7.1 ±0.1
Proteína bruta <sup>1</sup>	34.4 ±0.2	35.6 ±0.3	36.7 ±0.1	37.2 ±0.2	35.3 ±0.1	35.8 ±0.2	35.5 ±0.1
Extracto etéreo <sup>1</sup>	7.9 ±0.1	8.2 ±0.1	7.9 ±0.0	8.5 ±0.0	8.1 ±0.1	8.4 ±0.0	8.4 ±0.0
Fibra <sup>1</sup>	0.3 ±0.0	0.8 ±0.2	1.2 ±0.1	2.0 ±0.6	1.4 ±0.3	1.8 ±0.2	3.1 ±0.3
Cenizas <sup>1</sup>	10.8 ±0.4	10.4 ±0.0	9.7 ±0.1	9.1 ±0.0	10.6 ±0.0	9.6 ±0.2	9.2 ±0.2
E.L.N. <sup>2</sup>	46.7	45.0	44.5	43.2	44.7	44.5	43.8
Energía (cal/g)	4467 ±11	4460 ±28	4595 ±25	4524 ±25	4242 ±43	4406 ±31	4430 ±20

<sup>1</sup>Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 de materia seca, excepto humedad. <sup>2</sup>ELN= Extracto libre de nitrógeno. <sup>3</sup>CT= Alimento control; D-22, D-44 y D-66 (correspondientes a 22, 44 y 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, respectivamente, en base seca); D-66CM D-66CM (correspondientes al 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína y con suplementación de D-L metionina).

### *3.2.1.3 Parámetros zootécnicos*

Después de 45 días de experimentación la supervivencia en todos los tratamientos fue superior al 83.3% y no se encontraron diferencias significativas entre los mismos (Tabla XXVIII). Los tratamientos D-66 y D-66CM fueron los que permitieron obtener el mayor peso promedio final en los camarones (4.26 y 3.96 g), así como también las mayores tasa de crecimiento (1756.9 y 1644.7%), mientras que los tratamientos D-22 y CT fueron los que resultaron en el menor peso promedio (3.32 y 3.37 g) y la menor tasa de crecimiento. No se encontraron diferencias significativas en el Factor de Conversión Alimenticia (FCA) y la Eficiencia Proteica (EP) entre en ninguno de los tratamientos alimenticios. En el consumo de alimento, no se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos ( $P>0.05$ ) (Tabla XXVIII).

**Tabla XXVIII. Resultados zootécnicos finales (45 días) de juveniles de camarón *L. vannamei* para evaluar el efecto de la sustitución parcial de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína en el alimento, con y sin D-L-metionina adicionada.**

Alimento	Peso Inicial (g)	Supervivencia (%)	Peso final (g)	Alimento consumido (g/org/día)	Alimento consumido Total (g)	Tasa de crecimiento (%)	Factor de conversión alimenticia	Eficiencia proteica
<b>Control</b>	0.223 <sup>a</sup> ±0.006	83.3 <sup>a</sup> ±5.8	3.37 <sup>b</sup> ±0.30	0.12 <sup>ab</sup> ±0.03	45.3 <sup>bc</sup> ±10.6	1417.1 <sup>b</sup> ±176.2	1.56 <sup>a</sup> ±0.23	2.00 <sup>a</sup> ±0.28
<b>D-22</b>	0.225 <sup>a</sup> ±0.002	90.0 <sup>a</sup> ±0.0	3.32 <sup>b</sup> ±0.22	0.10 <sup>b</sup> ±0.02	41.8 <sup>c</sup> ±7.4	1375.4 <sup>b</sup> ±104.6	1.42 <sup>a</sup> ±0.17	2.19 <sup>a</sup> ±0.26
<b>D-44</b>	0.225 <sup>a</sup> ±0.006	96.7 <sup>a</sup> ±5.8	3.57 <sup>b</sup> ±0.30	0.12 <sup>ab</sup> ±0.01	54.1 <sup>abc</sup> ±5.9	1488.0 <sup>ab</sup> ±125.4	1.64 <sup>a</sup> ±0.09	1.87 <sup>a</sup> ±0.11
<b>D-66</b>	0.229 <sup>a</sup> ±0.007	90.0 <sup>a</sup> ±10.0	4.26 <sup>a</sup> ±0.27	0.16 <sup>a</sup> ±0.00	63.9 <sup>a</sup> ±5.6	1756.9 <sup>a</sup> ±63.1	1.67 <sup>a</sup> ±0.17	1.85 <sup>a</sup> ±0.18
<b>D-22CM</b>	0.223 <sup>a</sup> ±0.003	86.7 <sup>a</sup> ±11.5	3.50 <sup>b</sup> ±0.37	0.12 <sup>ab</sup> ±0.03	47.7 <sup>abc</sup> ±10.1	1473.0 <sup>ab</sup> ±168.7	1.56 <sup>a</sup> ±0.27	2.01 <sup>a</sup> ±0.35
<b>D-44CM</b>	0.226 <sup>a</sup> ±0.006	85.0 <sup>a</sup> ±7.1	3.81 <sup>ab</sup> ±0.12	0.14 <sup>ab</sup> ±0.01	55.2 <sup>abc</sup> ±1.8	1591.3 <sup>ab</sup> ±99.8	1.66 <sup>a</sup> ±0.05	1.85 <sup>a</sup> ±0.05
<b>D-66CM</b>	0.227 <sup>a</sup> ±0.005	86.7 <sup>a</sup> ±15.3	3.96 <sup>ab</sup> ±0.57	0.16 <sup>a</sup> ±0.02	61.3 <sup>ab</sup> ±13.5	1644.7 <sup>ab</sup> ±215.2	1.75 <sup>a</sup> ±0.11	1.76 <sup>a</sup> ±0.11

<sup>1</sup>Valores promedio de tres réplicas ± desviación estándar, expresados en g/100 de materia seca, excepto humedad. <sup>2</sup>ELN= Extracto libre de nitrógeno. <sup>3</sup>CT= Alimento control; D-22, D-44 y D-66 (correspondientes a 22, 44 y 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, respectivamente, en base seca); D-66CM D-66CM (correspondientes al 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína y con suplementación de D-L metionina).

#### 3.2.1.4. Actividad enzimática digestiva

La Tabla XXIX muestra la actividad enzimática específica de las proteasas alcalinas totales, tripsina y amilasas de camarones *L. vannamei* alimentados con alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado por pasta de cártamo alta en proteína (D-22, D-44 y D-66) y un alimento en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado por pasta de cártamo alta en proteína y se suplementó con D-L metionina (D-66CM). En general, la concentración de proteína soluble, y de actividad de proteasas generales, tripsina, quimotripsina y amilasa no fue significativamente afectada en los tratamientos D-22 y D-44, con respecto a la dieta control; en contraste, la proteína soluble, en los extractos, se incrementó significativamente en los camarones que fueron alimentados con los alimentos D-66 y D-66CM. La actividad de tripsina, quimotripsina y amilasa fueron significativamente diferentes entre los tratamientos D-66 y D-66CM, respecto al alimento control (excepto para quimotripsina para la dieta D-66). En general, se observa que a medida que se aumentó la sustitución de proteína de pescado, disminuyó la actividad enzimática digestiva (Tabla XXIX), siendo significativa al 66% de sustitución y particularmente en los alimentos que se suplementaron con metionina.

**Tabla XXIX. Proteína soluble (mg/mL) y actividad específica (U/mg Proteína) de diferentes enzimas en el hepatopáncreas del camarón blanco.**

	Alimento <sup>b</sup>				
	CT	D-22	D-44	D-66	D-66CM
Proteína soluble	10.7	11.4	12.2	13.9	13.9
	±0.2b	±1.1b	±1.0ab	±0.7a	±0.7a
Proteinasas totales	4.8	5.1	4.7	5.1	5.0
	±0.4a	±0.5a	±0.3a	±0.3a	±0.8a
Tripsina	45.0	43.0	41.0	37.6	37.5
	±1.5a	±3.4ab	±2.7ab	±0.9b	±1.8b
Quimotripsina	566.2	518.7	499.4	580.0	342.3
	±74.7a	±44.1ab	±59.4ab	±72.8a	±39.7b
Amilasa	281.2	255.4	249.8	213.4	217.7
	±18.6a	±17.7ab	±14.0abc	±17.1c	±12.2bc

<sup>a</sup> Letras diferentes dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup>CT= Alimento control; D-22, D-44 y D-66 (correspondientes a 22, 44 y 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, respectivamente, en base seca); D-66CM D-66CM (correspondientes al 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína y con suplementación de D-L metionina protegida).

### 3.2.2. Experimento de CUDA

#### 3.2.2.1. Sustitución de la proteína de harina de pescado por pasta de cártamo alta en proteína sin D-L metionina adicionada

Para este experimento se utilizaron los mismos alimentos que el experimento de crecimiento (Tabla XXVI). Los resultados de los análisis proximales de los alimentos se presentan en la Tabla XXVII, ver sección 3.2.1.2.

Las condiciones de cultivo durante el bioensayo para determinar los CUDA fueron  $27.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ,  $40 \pm 0.4$  ups de salinidad y  $5.4 \pm 0.5$  mg/mL de oxígeno disuelto, las cuales se mantuvieron constantes en todos los tratamientos.

En la Tabla XXX se muestran los coeficientes de utilización digestiva aparente (CUDA) de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, sin suplementación de D-L metionina protegida. Los CUDAm de los alimentos variaron entre 68.2 a 78.9%. Se observó que a medida que se incrementó la sustitución de proteína de la harina de pescado con el cártamo el CUDAm disminuyó. Los mayores CUDAp se obtuvieron con los alimentos CT y D-66 (91.2 y 89.1%). Mientras que los alimentos en donde se incluyó la pasta de cártamo no presentaron diferencias significativas entre ellos en los CUDAp. Tampoco se detectaron diferencias significativas en los CUDAl entre los tratamientos (Tabla XXX).

**Tabla XXX. CUDA (%  $\pm$  DE) de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos para juveniles de camarones *L. vannamei***

	Alimentos <sup>1</sup>			
	CT	D-22	D-44	D-66
Materia seca	78.93 $\pm$ 4.38a	72.32 $\pm$ 1.08ab	70.55 $\pm$ 3.24b	68.18 $\pm$ 3.06b
Proteína	91.17 $\pm$ 1.16a	89.03 $\pm$ 0.32b	88.92 $\pm$ 0.73b	89.14 $\pm$ 0.52b
Lípidos	91.83 $\pm$ 3.22a	89.42 $\pm$ 1.59a	87.82 $\pm$ 1.39a	87.71 $\pm$ 1.42a

<sup>1</sup>CT = Alimento control; Alimentos; D-22, D-44 y D-66 (correspondientes a 22, 44 y 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, respectivamente, en base seca). Valores con diferentes superíndices dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.2.2. Sustitución de la proteína de la harina de pescadopor pasta de cártamo alta en proteína con D-L metionina adicionada

En la Tabla XXXI se muestran los CUDA de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, con suplementación de D-L metionina. Todos los CUDAs tendieron a disminuir con el nivel de reemplazo. Los CUDAs de los alimentos variaron entre 60.9 a 78.9%. Los alimentos D-44CM y D-66CM fueron significativamente menores con respecto al alimento control. El mayor CUDAp se obtuvo con el alimento control (91.2%). Los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína no presentaron diferencias significativas en el CUDAp. El CUDAl más alto fue encontrado con el alimento control (91.8%); sin embargo, no se presentaron diferencias entre los tratamientos (Tabla XXXI).

**Tabla XXXI. CUDA (%  $\pm$  DE) de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos para juveniles de camarones *L. vannamei***

	Alimentos <sup>1</sup>			
	CT	D-22CM	D-44CM	D-66CM
Materia seca	78.93 $\pm$ 4.38a	69.13 $\pm$ 1.31ab	67.47 $\pm$ 7.95b	60.94 $\pm$ 3.76b
Proteína	91.17 $\pm$ 1.16a	87.57 $\pm$ 0.54b	88.26 $\pm$ 2.38ab	88.72 $\pm$ 1.47b
Lípidos	91.83 $\pm$ 3.22a	88.75 $\pm$ 1.69a	87.09 $\pm$ 4.90a	85.16 $\pm$ 2.59a

<sup>1</sup>CT = Alimento control; Alimentos; D-22CM, D-44CM y D-66CM (correspondientes a 22, 44 y 66% de sustitución de la proteína de la harina de pescado por la proteína de la pasta de cártamo alta en proteína y con suplementación de D-L metionina, respectivamente, en base seca). Valores con diferentes superíndices dentro de las filas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. Discusión

Durante los últimos 20 años la producción de harina de pescado se ha mantenido constante y no se prevé que tenga un incremento (FAOSTAT, 2009). Los alimentos comerciales para camarón incluyen la harina de pescado en niveles entre el 25% y 50% del total del alimento, debido a sus cualidades nutricionales; sin embargo, el costo de este ingrediente es elevado (Amaya *et al.*, 2007). Uno de los factores considerados para reducir los costos de producción de los camarones e incrementar las ganancias a los productores es el uso de alimentos con niveles bajos de harina de pescado y altos niveles de fuentes proteicas de alta calidad y de bajo costo (Amaya *et al.*, 2007; Suárez *et al.*, 2009). En esta sección se evaluó la sustitución parcial de la harina de pescado, trigo y soya por pasta de cártamo alta en proteína. Recientes estudios han mostrado que en alimentos comerciales con un nivel de proteína de 30-35% se pueden incluir niveles bajos (7.5–12.5%) de harina

de pescado sin comprometer el desarrollo de los camarones (Fox *et al.*, 2004). En otro estudio, Samocha *et al.* (2004) no encontraron diferencias significativas en el incremento en peso, supervivencia y eficiencia alimenticia de camarones *L. vannamei* alimentados con alimentos experimentales con 32% de proteína, donde el 100% de la harina de pescado fue sustituida por pasta de soya co-extruida con sub-productos de carne. La inclusión de la pasta de cártamo para la sustitución parcial de la proteína de harina de pescado en el presente estudio resultó satisfactoria hasta un nivel del 66%, de hecho a este nivel incrementó la tasa de crecimiento y el alimento consumido por *L. vannamei*. Estos resultados son similares con lo reportado para *P. schmittii* donde el 77% de la harina de pescado fue remplazada con pasta de soya sin afectar el crecimiento de los organismos (Alvarez *et al.*, 2007). En otro estudio, Suárez *et al.* (2009) pudieron sustituir la proteína de la harina de pescado (15% de inclusión) con una combinación de soya-canola hasta un nivel de 80% sin tener efectos negativos en el crecimiento de los camarones. Una de las ventajas que tiene nuestro estudio con respecto a estos dos trabajos es que no fue necesaria la co-extrusión o mezcla con otros ingredientes; por sí sola, la pasta de cártamo alta en proteína incluida en los alimentos permitió obtener una buena supervivencia durante los 45 días del experimento de crecimiento, lo que indica que los alimentos aparentemente tuvieron un equilibrio adecuado de nutrientes.

La sustitución parcial de la proteína harina de pescado por pasta de cártamo alta en proteína no afectó significativamente los valores del factor de conversión alimenticia y eficiencia proteica con respecto a los obtenidos con los organismos alimentados con el alimento control. Estos resultados contrastan con lo reportado por Sudaryono *et al.* (1999b) donde

encontraron diferencias significativas cuando remplazaron el 100% de la harina de pescado (24% de inclusión) por harina de lupino en alimentos para juveniles de *P. monodon*.

El requerimiento de aminoácidos esenciales de especies acuáticas no ha sido bien establecido y la suplementación de los alimentos para camarón con aminoácidos cristalinos no ha mejorado el desarrollo de los organismos de manera constante. Teshima *et al.* (1992) reportaron que la suplementación de los alimentos con L-metionina cristalina para *P. japonicus* no mejoró el crecimiento y la eficiencia alimenticia. Debido a esto algunos investigadores han tratado de desarrollar nuevas técnicas para minimizar la lixiviación de los aminoácidos en el agua (Alam *et al.*, 2004). En el presente estudio no se encontró una mejora en algunos de los criterios de evaluación (FCA y EP) cuando se suplementó con D-L metionina protegida con carboxil metil celulosa. Alam *et al.* (2004) encontraron mejoras en el crecimiento de juveniles de *P. japonicus* cuando fueron alimentados con alimentos suplementados con aminoácidos cristalinos recubiertos. Estas diferencias se pueden deber a la naturaleza química del material con que fueron cubiertos los aminoácidos. En el caso de la alimentación de camarones, varias técnicas como la encapsulación o ingredientes ligantes han sido utilizadas para mejorar la biodisponibilidad de los aminoácidos. En nuestro estudio utilizamos la carboxil metil celulosa por ser un ligante fácil de conseguir y porque se ha reportado que es eficaz para proteger a los aminoácidos contra la lixiviación (Millamena *et al.*, 1996, 1998).

Las actividades enzimáticas digestivas del tipo tripsina, quimotripsina y amilasa en el hepatopáncreas de los camarones se vieron afectadas por el nivel de sustitución de la harina

de pescado por la pasta de cártamo alta en proteína, esto se pudo deber a la posible deficiencia en aminoácidos limitantes como lisina y metionina en los alimentos en donde se sustituyó la proteína de harina de pescado. Rivas-Vega *et al.* (2006) no encontraron un efecto en la actividad enzimática de proteasas y amilasa cuando alimentaron a camarones *L. vannamei* con alimentos experimentales conteniendo 15% de inclusión de harina de frijol yorimón. Le Moullac *et al.* (1996) sugirieron que la actividad enzimática puede estar regulada por la energía total en del alimento; sin embargo nuestros alimentos fueron isoenergéticos.

Los CUDAmS de los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado por la pasta de cártamo sin suplementación de D-L metionina protegida disminuyen a medida que se incrementó el nivel de sustitución, indicando que los juveniles de *L. vannamei* tienen limitada capacidad para digerir alimentos que contienen elevados niveles de pasta de cártamo alta en proteína, debido a que la actividad de la amilasa y tripsina fueron disminuídas cuando se incluyó el cártamo. Sudaryono *et al.* (1996) observaron también una disminución de los CUDAmS cuando utilizaron alimentos con elevados niveles (70%) de harina de lupino para alimentar juveniles de *P. monodon*. Es posible que la disminución de los CUDAmS haya sido parcialmente causada por el incremento en la cantidad de fibra en los alimentos, provenientes de la pasta de cártamo. Catacutan (1991) usando *P. monodon*, encontró diferencias significativas en los CUDAmS de alimentos que contenían 7.0% y 3.2% de fibra. En el presente estudio el alimento control (conteniendo 0.3% de fibra) tuvo un CUDAmS de 78.9% comparado con 72.3-68.2% con los alimentos que contenían 0.8-2% de fibra. Akiyama *et al.* (1989), usando *L. vannamei*, también reporta

que alimentos experimentales a base de harina de camarón con altos contenidos de fibra tuvieron bajos CUDAm (58.8%) en comparación con alimentos que contenían harina de pescado con 0.9% de fibra (64.3%).

En general, los coeficientes de utilización digestiva de proteína (CUDAp) de los alimentos en los que se incluyó la pasta de cártamo alta en proteína fueron altos con un rango de 88.9 a 89.0%. Estos valores son comparables con otros valores reportados para camarones peneidos alimentados con alimentos experimentales. Por ejemplo Sudaryono *et al.* (1999a) evaluaron la sustitución de la harina de pescado por harina de lupino en alimentos para juveniles de *P. monodon*, reportando valores de los CUDAp entre 89.6 y 93.1%. Cruz-Suárez *et al.* (2007) evaluaron el remplazo de la harina de pescado por harina de subproductos de pollo en alimentos para juveniles de *L. vannamei* encontrando valores de los CUDAp entre 86.9 y 90.5%. Posteriormente Hernández *et al.* (2008) evaluaron la sustitución de la harina de pescado por harina de carne en alimentos para juveniles de *L. vannamei*, encontrando valores de los CUDAp entre 73.5 y 85.3%. Se observó una significativa disminución de los valores de los CUDAp cuando se incluye el cártamo, que puede deberse a una disminución de la digestibilidad aminoácidos esenciales, así como la posible disminución del consumo de los alimentos como se ha reportado con otros ingredientes vegetales como por ejemplo la harina chícharo (Cruz-Suárez *et al.*, 2001).

Los CUDAI no se vieron afectados por la inclusión del cártamo en los alimentos. Los valores encontrados en este trabajo (87.7-91.8%) concuerdan con lo reportado en otros estudios. Por ejemplo Hernández *et al.* (2008) reportaron valores de CUDAI entre 83.7 y

93.6% cuando alimentaron juveniles de camarón *L. vannamei* con alimentos en donde se sustituyó la harina de pescado por harina de subproductos de carne.

Los CUDA de materia seca, proteína y lípidos de los alimentos en donde se suplementó con D-L metionina protegida no se incrementaron significativamente en comparación con los alimentos en los que no se utilizó metionina protegida. Por otro lado los valores de los CUDAs presentan el mismo patrón que los alimentos en los que no se suplementó con D-L metionina, por lo que creemos que la D-L metionina protegida no indujo un incremento en la digestibilidad de los camarones, quizá por una mayor velocidad de tránsito en el tracto digestivo en comparación con los aminoácidos que se encuentran unidos en forma de proteínas.

#### **3.4. Conclusiones**

- La pasta de cártamo alta en proteína puede remplazar al menos el 66% de la proteína de harina de pescado, correspondiendo a un 78% de sustitución de ésta en el alimento, sin afectar el crecimiento y la utilización del alimento a pesar de producir una disminución en la digestibilidad de los alimentos. Por el contrario, a ese nivel de sustitución se obtuvo el mejor crecimiento, a pesar de que la digestibilidad de materia seca, proteína y lípidos fue menor con el cártamo.
- A pesar de que la inclusión de la pasta de cártamo alta en proteína redujo los CUDA de materia seca y proteína cuando se utilizaron altos niveles (66%) de sustitución de la

proteína de la harina de pescado, los valores son comparables con otros alimentos a base de productos vegetales o animales. Por otro parte la digestibilidad de lípidos no fue afectada por el remplazo de la proteína de la harina de pescado.

- La sustitución de la proteína de harina de pescado con proteína de la pasta de cártamo alta en proteína provocó una disminución de la actividad de las enzimas digestivas.
- La suplementación de D-L-metionina protegida en los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado no tuvo efectos benéficos en el crecimiento, la utilización del alimento ni la digestibilidad aparente de proteína.

## DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo, la composición proximal y química (aminoácidos, ácidos grasos, fósforo y calcio) de los productos de cártamo modificó la digestibilidad de los alimentos en los juveniles de camarón blanco *L. vannamei*. Lo anterior se observó en algunas de las variables evaluadas, tales como los CUDAs de proteína, lípidos y energía de los productos de cártamo (Capítulo 1). Estos resultados tienen implicaciones directas para el cultivo de camarón, ya que la determinación adecuada de la digestibilidad permitirá formular alimentos equilibrados que cubran los requerimientos nutricionales del camarón. Así mismo, los resultados obtenidos sugieren que los CUDAs pueden ser usados para reducir la producción de desperdicios. Sin embargo, como se discutió en el capítulo 1, el tipo de proceso al que fueron sometidos los productos de cártamo modifica su digestibilidad por los camarones, por lo que se debe de tomar en cuenta al momento de formular los alimentos y utilizarlos como ingredientes alternativos.

No se detectaron o están a niveles muy bajos los factores antinutricionales (hemaglutininas, saponinas, aflatoxinas e inhibidor de tripsina) en los productos de cártamo. Sin embargo, Hertrampf y Piedad-Pascual (2000) han reportado que el cártamo contiene glucósidos que le confieren un sabor amargo, lo que ha limitado su uso en la alimentación de organismos terrestres (pollos y puercos). Desafortunadamente, estos compuestos no se pudieron determinar en este estudio por falta de una metodología adecuada, pero no se descarta que la presencia de glucósidos pudiera ser una causa de la reducción de la atractabilidad y el consumo de los alimentos que fueron observados en los ensayos realizados para ese

propósito. Por lo anterior, se concluye que el uso de los diferentes productos de cártamo, a un nivel de inclusión de 30% en los alimentos para juveniles de camarón blanco, disminuye la atractabilidad y el consumo del alimento en comparación con el alimento control, por lo que sería necesario incluir atractantes y fagoestimulantes en este tipo de alimentos para *L. vannamei* cuando el alimento tiene un alto contenido de los productos de cártamo. No obstante, cuando los productos de cártamo fueron utilizados en los alimentos a niveles de inclusión diferentes (tanto más bajos, como más elevados; Capítulos 2 y 3) en los bioensayos de crecimiento no se observaron efectos negativos sobre el consumo del alimento, lo cual es muy alentador, y deja pensar que los productos de cártamo podrían utilizarse como ingredientes alternos a la pasta de soya o parcialmente para la harina de pescado en los alimentos para organismos juveniles de *L. vannamei*.

Por otra parte, existió una correlación positiva ( $r^2 = 0.87$ ;  $P < 0.05$ ) entre los CUDA de proteína y la digestibilidad *in vitro* de proteína obtenida utilizando un sistema pH-stat. Al respecto, existe bastante controversia sobre la correlación de las digestibilidades de proteína en camarones *L. vannamei*. (Siccardi *et al.* 2006). Sin duda, se requieren realizar más investigaciones antes de que éstos resultados puedan utilizarse para predecir los CUDA. Los resultados de digestibilidad *in vitro* podrían reemplazar a los trabajos de digestibilidad *in vivo* solamente si son capaces de predecir la compleja naturaleza de la digestión de los camarones, la que se ha demostrado que está modulada por los componentes del alimento (Moyano-López, 2006). A pesar de haber tenido una aceptable correlación entre la digestibilidad *in vitro* de proteína y los CUDA de proteína de los ingredientes, no se

encontró una correlación entre la digestibilidad *in vitro* de proteína y los CUDAs de proteína de los alimentos con 30% de los productos de cártamo. Lo anterior muestra que el método *in vitro* utilizado no parece suficientemente adecuado para predecir los resultados obtenidos en los bioensayos de digestibilidad *in vivo*.

En el presente estudio (Capítulo 2) se demostró que es posible sustituir en el alimento una mezcla de pasta de soya-trigo con la pasta de cártamo baja en proteína, sin afectar el consumo del alimento y el crecimiento en peso de los juveniles de camarón *L. vannamei*. Ahora bien, desde un punto de vista económico, la pasta de cártamo baja en proteína tiene un precio de \$ 220 dólares/t, mientras que la pasta de soya cuesta \$ 538 dólares/t (precios proporcionados por parte de la empresa Aceites del Mayo, Navojoa, Son. México; Junio de 2009) y la tonelada de trigo cuesta aproximadamente 340 dólares. Considerando lo anterior, los tratamientos alimenticios PCB-75 y PCB-100 (75 y 100% de sustitución de la mezcla pasta de soya-trigo con pasta de cártamo baja en proteína) permiten disminuir el costo del alimento en 11.5 y 15.4% con respecto al alimento control. Esta reducción del costo se tiene que analizar con cuidado ya que cuando se toma en cuenta el factor de conversión alimenticia para calcular el costo de producción de kilogramo de camarón no hay una disminución en el costo. Esto se puede deber a que los CUDAs de materia seca, proteína y lípidos disminuyeron a medida que se incrementó la sustitución de la pasta de soya. Cruz-Suárez *et al.* (2009) reportan una mayor digestibilidad de materia seca (84.2%) y proteína (96.9%) en productos de soya en comparación con los obtenidos en este trabajo para la pasta de cártamo baja en proteína para materia seca (47.8%) y para proteína (87.6%). Esto

se puede deber a la diferencia en la digestibilidad de aminoácidos y la diferencia en el porcentaje de fibra entre la pasta de soya (0.59%) y el cártamo (17.07%).

En el caso de los alimentos en donde se sustituyó la pasta de soya con pasta de cártamo alta en proteína, los tratamientos PCA-75 y PCA-100 (75 y 100% de sustitución) permiten disminuir los costos del alimento en 5.4 y 7.1% con respecto al alimento control. Si tomamos en cuenta el factor de conversión alimenticia obtenido en el experimento de crecimiento, se pueden disminuir los costos de producción de kilogramo de camarón en un 13.0 y 12.3%. Adicionalmente, aprovechar un subproducto de la industria aceitera que ha sido subutilizado en la industria de la acuicultura permitiría diversificar las opciones de ingredientes para hacer las formulaciones de los alimentos. Los resultados demuestran la factibilidad económica de sustituir totalmente la pasta de soya por pasta de cártamo alta en proteína en alimentos para juveniles de camarón *L. vannamei*, bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio, a pesar de que el cártamo tiene un mayor contenido de fibra y una menor digestibilidad de materia seca. Desafortunadamente, no se determinó la digestibilidad de aminoácidos de los alimentos. Investigaciones sobre este aspecto en el camarón son necesarias. A raíz de este estudio se vislumbra la necesidad de determinar la digestibilidad y la lixiviación de aminoácidos de los productos de cártamo, así como de los alimentos que los contienen, a fin de tratar de explicar el por qué no se correlacionó el crecimiento con la digestibilidad *in vivo*.

La sustitución de harina de pescado con ingredientes vegetales no siempre ha tenido buenos resultados en términos de crecimiento, debido a la baja atractabilidad, inadecuada composición de aminoácidos, bajos niveles de ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) y ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), así como la presencia de factores antinutricionales (Davis y Arnold, 2000; Samocha *et al.*, 2004; Amaya *et al.*, 2007). A lo largo de este trabajo de tesis hemos visto cómo algunos de estos parámetros son modificados positivamente o negativamente; aún así, en la parte final del trabajo (Capítulo 3), se evaluó la sustitución parcial de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína, a pesar de que la harina de pescado tiene un mayor poder attractante y una mejor composición de aminoácidos. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, ya que se pudo sustituir al menos un 66% de la proteína de la harina de pescado, correspondiendo a un 78% de sustitución de la harina de pescado en el alimento (25% de inclusión de harina de pescado), sin afectar el crecimiento, el FCA y la EP. En el caso de los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado con pasta de cártamo alta en proteína, tratamientos D-10 y D-66 (22 y 66% de la sustitución), éstos permiten disminuir los costos del alimento en un 6.7 y 20% con respecto al alimento control. Adicionalmente, si tomamos en cuenta el factor de conversión alimenticia obtenido en el experimento de crecimiento, se pueden disminuir los costos de producción de kilogramo de camarón en un 15.1 y 14.4%. Desafortunadamente, no contamos con los resultados de la digestibilidad de carbohidratos y de aminoácidos de los alimentos, que son elementos que nos podrían ayudar a explicar por qué se mejoró el crecimiento en los alimentos con 66% de sustitución. Sería conveniente realizar un bioensayo similar, pero de

mayor duración, donde se evaluarán las mismas formulaciones, pero inclusive utilizando niveles de sustitución aún mayores, en la medida de lo posible, a fin de verificar si se confirman los resultados obtenidos aquí, y conocer la respuesta de los organismos ante la sustitución total de la harina de pescado.

Por otra parte, dado que la harina de pescado contiene más metionina que la pasta de cártamo (1.98 vs 0.55%), al hacer la sustitución de uno por otro, el contenido de metionina en el alimento disminuye. De ahí que se hiciera la suplementación de los alimentos con D-L metionina protegida para tratar de equilibrar el alimento, sin embargo, esto no mejoró el desempeño biológico de los organismos. Lo anterior se pudo deber a que éste aminoácido protegido no tuvo una buena estabilidad en el agua o que posiblemente la velocidad de absorción fue más rápida que la de los aminoácidos que componen la proteína de los ingredientes del alimento, y por tanto, los camarones no pudieron utilizar más eficientemente los aminoácidos. No obstante, no se detectaron diferencias significativas en la Eficiencia Proteica con los diversos tratamientos, por lo que una explicación plausible sería que el aporte de proteína, y por ende de aminoácidos digestibles, en todos los alimentos hayan cubierto los requerimientos nutricionales del camarón, por lo que una ligera disminución en el contenido de metionina por la inclusión del cártamo, no llegó a tener consecuencias a nivel del crecimiento o la utilización de los alimentos. Esto implicaría o sería una indicación de que las cantidades de proteína y aminoácidos esenciales recomendadas por Akiyama y Dominy (1991) para los alimentos de camarón

blanco, y en las cuales se basaron las formulaciones realizadas en el presente trabajo, pudieran estar sobrestimadas.

El presente trabajo demuestra que las pastas de cártamo, pueden ser utilizadas como ingredientes en la formulación de alimentos para juveniles del para camarón, especialmente la pasta alta en proteína, debido a que es una fuente de proteína digestible, contiene bajos o nulos niveles de los factores antinutricionales determinados, y puede sustituir totalmente a la pasta de soya o parcialmente a la harina de pescado, sin afectar el crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento.

### CONCLUSIONES GENERALES

- La harina integral de cártamo no resultó tener una composición química adecuada para ser utilizada en los alimentos para camarón, debido a que tiene un bajo contenido de proteína y altos contenidos de lípidos, pobres en HUFAS, y fibra. En cambio, las pastas de cártamo alta y baja en proteína son subproductos que tienen composiciones químicas más adecuadas, con proteínas y carbohidratos que fueron bien digeridos por los juveniles del camarón blanco, y su contenido de los factores antinutricionales aquí evaluados no fue detectable o muy bajo, por lo que pueden ser usadas como ingredientes en alimentos para camarón, particularmente la que tiene nivel más elevado de proteína.
- La pasta de cártamo baja en proteína permitió sustituir una mezcla de trigo-soya en el alimento, mientras que la pasta de cártamo alta en proteína permitió sustituir a la pasta de soya. En ambos casos, a pesar de su mayor contenido de fibra y su menor digestibilidad de materia seca, no se detectaron efectos adversos sobre la supervivencia, el consumo de alimento, ni el crecimiento de los organismos. Sin embargo, la utilización del alimento sí se vio afectada, por lo que se recomienda no sustituir más del 75% de la mezcla trigo-soya.
- Bajo las condiciones experimentales empleadas en este estudio realizado a nivel de laboratorio, el uso de la pasta alta en proteína, permitió disminuir el costo del alimento, así como el costo de producción de los camarones. Mientras que la sustitución de la

mezcla soya-trigo con la pasta baja en proteína, redujo el costo de los alimentos, pero no el costo de producción del camarón, que inclusive fue más elevado que con el alimento control. Sin embargo, estos aspectos deberán ser corroborados en condiciones industriales de fabricación de alimentos y de producción de camarón en diversos sistemas de cultivo en granja comercial.

- La pasta de cártamo alta en proteína puede reemplazar al menos el 66% de la proteína de la harina de pescado, correspondiendo a un 78% de sustitución de ésta en el alimento, sin afectar negativamente el crecimiento y la utilización del alimento. Por el contrario, a ese nivel de sustitución se obtuvo el mejor crecimiento, a pesar de que la digestibilidad de materia seca, proteína y lípidos fue menor con el cártamo. Habrán de realizarse estudios de mayor duración y con niveles de sustitución aún mayores para corroborar estos resultados.
- La suplementación de D-L- metionina protegida en los alimentos en donde se sustituyó la proteína de la harina de pescado no mejoró el crecimiento, la utilización del alimento, ni la digestibilidad aparente de proteína. Es posible que el aporte de proteína, y por ende, de aminoácidos digestibles en todos los alimentos, haya cubierto los requerimientos de aminoácidos esenciales del camarón, por lo que una ligera disminución en el contenido de metionina por la inclusión del cártamo, no llegó a tener consecuencias a nivel del crecimiento o la utilización de los alimentos.

### RECOMENDACIONES

- Determinar la atractabilidad de los productos de cártamo a diferentes niveles de inclusión y su correlación con el crecimiento.
- Determinar los CUDA de los aminoácidos esenciales de los productos de cártamo.
- Evaluar el beneficio de utilizar la pasta de cártamo alta en proteína como sustituto total de la pasta de soya o sustituto parcial de la harina de pescado en alimentos comerciales, así como probarlas en camarones de diferentes estadios de desarrollo y bajo condiciones de cultivo intensivo o semi-intensivo en granjas camaroneras.
- Evaluar el efecto de la suplementación de diferentes tipos de metionina y formas de protegerlas con diferentes ligantes, sobre el crecimiento y utilización de alimento de juveniles de camarón *L. vannamei*.
- Realizar un estudio económico detallado sobre el costo-beneficio del uso de las pastas de cártamo en los alimentos comerciales para camarón, debido a que desde el punto biológico, resultaron ser susceptibles de ser usadas.

**LITERATURA CITADA**

- **Akiyama D.M., Coehlo S.R., Lawrence A.L. y Robinson E.H.** (1989). Apparent digestibility of feedstuffs by marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 55, 91–98.
- **Akiyama D.M., Dominy W.G. y Lawrence A.L.** (1991). Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. pp. 80–97. En: Akiyama D.M., Tan R.K.H. (Eds.). *Proceeding of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop*. American Soybean Association. 19 al 25 Septiembre 1991. Tailandia e Indonesia.
- **Alam M.S., Teshima S., Koshio S. y Ishikawa M.** (2004). Effects of supplementation of coated crystalline amino acids on growth performance and body composition of juvenile kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture Nutrition*. 10, 309–316.
- **Alarcón F.J., Moyano F.J. y Díaz M.** (2002). Evaluation of different protein sources for aquafeeds by an optimised pH-stat system. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 697–704.
- **Alvarez J.S., Hernandez-Llamas A., Galindo J., Fraga I., García T. y Villarreal H.** (2007). Substitution of fishmeal with soybean meal in practical diets for juvenile white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Pérez-Farfante & Kensley 1997). *Aquaculture Research*. 38, 689–695.
- **Alvarez J.S., Villarreal H., García T., Galindo J., Pelegrin E.** (2005). Estimuladores del consumo de alimentos con alto contenido de harina de soya para el engorde del camarón *Litopenaeus schmitti*. *Rev. Invest. Mar.* 26, 243-248.

- **Amaya E., Davis A.D. y Rouse D.B.** (2007). Replacement of fish meal in practical diets for the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared under pond conditions. *Aquaculture*. 262, 393–401.
- **AOAC (Association of Official Analytical Chemists)** (2002). Official methods of analysis 16th edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA.
- **AOAC (Association of Official Analytical Chemists)** (2005). Official methods of analysis 18th edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Gaithersburg, Maryland, EUA.
- **Bautista-Teruel M.N., Eusebio P.S. y Welsh T.P.** (2003). Utilization of feed pea, *Pisum sativum*, meal as a protein source in practical diets for juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 225, 121–131.
- **Belayneh H. y Wolde-Mariam Y.** (1991). Safflower production, utilization and research in Ethiopia. pp. 43–55. En: Ranga R.V. y Ramachandran M. (Eds.) *Proceedings Second International Safflower Conference*. Indian Society of Oilseeds Research, Directorate of Oilseeds Research Hyderabad, India, 9 al 13 Enero 1989. Hyderabad, India.
- **Bligh E.G. y Dyer W.J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- **Borghesi R., Portz L., Oetterer M. y Cyrino J.E.P.** (2008). Apparent digestibility coefficient of protein and amino acids of acid, biological and enzymatic silage for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*. 14, 242–248.

- **Boyd C.E.** (1981). Water quality in warmwater fish ponds. Craftmaster Printers Inc., Opelika, Alabama, EUA.
- **Bradford M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- **Brunet M., Arnaud J., y Mazza J.** (1994). Gut structure and digestive cellular processes in marine crustacean. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review.* 32, 335–367.
- **Brunson J.F., Romaine R.P. y Reigh R.C.** (1997). Apparent digestibility of selected ingredients in diets for white shrimp *Penaeus setiferus L.* *Aquaculture Nutrition.* 3, 9–16.
- **Bureau D.P, Harris A.M., y Cho C.Y.** (1999). Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 180, 345–358.
- **Bureau D.P. y Hua, K.** (2006). Letter to the editor of Aquaculture. *Aquaculture* 252, 103–105.
- **Cabanillas-Beltran H., Ponce-Palafox J., Martínez-Palacios C.A., Chávez-Sánchez M.C. y Ross L.G.** (2001). Comparison of the digestibility of diets based on fish meal and soybean meal in *Litopenaeus vannamei* Boone 1931, using different temperatures and salinities for culture. *Ciencias Marinas.* 27, 577–593.

- **Cara J.B., Moyano F.J., Zambonino J.L., Alarcón F.J.** (2007). The whole amino acid profile as indicator of the nutritional condition in cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 13, 94–103.
- **Carvalho I. S., Miranda I. y Pereira H.** (2006). Evaluation of oil composition of some crops suitable for human nutrition. *Industrial Crops and Products*. 24, 75–78.
- **Catacutan M.R.** (1991). Apparent digestibility of diets with various carbohydrates levels and the growth response of *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 95, 89–96.
- **Ceccaldi H.J.** (1997). Digestive anatomy and physiology. pp. 261-291. En: D'Abramo L.R., Conklin D.E. y Akiyama D.M (Eds.). *Crustacean Nutrition*. Adv. World Aquac. Vol 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EUA.
- **Cho C.Y. y Slinger S.J.** (1979). Apparent digestibility measurement in feedstuff for rainbow trout. pp. 239–247. En: Halver J.E. y Tiews K. (Eds.) *Proceedings of the World Symposium on Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*. 20 al 23 Junio 1978. Vol. II. Hamburgo, Berlin, Alemania.
- **Chong A.S.C., Hashim R. y Ali A.B.** (2002). Assessment of dry matter and protein digestibilities of selected raw ingredients by discus fish (*Symphysodon aequifasciata*) using *in vivo* and *in vitro* methods. *Aquaculture Nutrition* 8:229–238.
- **Civera-Cerecedo R., Goytortúa-Bores E., Rocha-Meza S., Vega-Villasante F., y Nolasco-Soria H.** (1998). Utilización de la langostilla roja como insumo proteico en alimentos para camaronicultura. Proyecto Piloto. Promotora Industrial Acuasisistemas, S.A. Federación de Sociedades Cooperativas Pesqueras de Baja California-CIBNOR Informe Ejecutivo No.2 Febrero de 1998 86p.

- **Clarck D.J., Lawrence A.L. y Swakon D.H.D.** (1993). Apparent chitin digestibility in Penaeid shrimp. *Aquaculture* 109, 51–57.
- **Colvin P.M.** (1976). Nutritional studies on penaeid prawns: protein requirements in compounded diets for juvenile *Penaeus indicus* (Milne Edwards). *Aquaculture*. 7, 315–326.
- **Cousin M.** (1995). Etude de l'utilisation des glucides et du rapport proteines-energie chez deux especes de crevettes penaeides: *Penaeus vannamei* et *Penaeus stylirostris*. PhD. Dissertation Université de Bretagne Occidentale, Brest, France. 209p.
- **Cousin M., Cuzon G., Guillaume J. y Aquacop** (1996). Digestibility of starch in *Penaeus vannamei*: in vivo and in vitro study on eight samples of various origins. *Aquaculture*. 140, 361–372.
- **Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D. y Aquacop** (1992). Effect of squid meal on growth of *Penaeus monodon* juvenile reared in pond pens and tanks. *Aquaculture*. 106, 293–299.
- **Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Martínez-Vega J.A. y Wesche-Ebelling P.** (1993) Evaluation of two shrimp by-product meals as protein sources in diets for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 115, 53–63.
- **Cruz-Suárez L.E.** (1999). Digestión en camarón y su relación con formulación y fabricación de alimentos balanceados. pp. 207-232. En: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D. y Mendoza-Alfaro R. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuicola III*. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 11 al 13 de Noviembre 1996. Monterrey, Nuevo León, México.

- **Cruz-Suárez L.E., Antimo-Pérez J.S., Luna-Mendoza N., Tapia-Salazar M. y Ricque-Marie D.** (2000). Relaciones proteína/energía y proteína vegetal/animal óptimas en alimentos de engorda para *Litopenaeus vannamei* y *L. stylirostris*. In: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola V* – Memorias del Quinto Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 19 al 20 de Noviembre 2000. Mérida, Yucatán, México.
- **Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., McCallum I. y Hickling D.** (2001). Assessment of differently processed feed pea (*Pisum sativum*) meals and canola meal (*Brassica* sp.) in diets for blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). *Aquaculture*. 196, 87–104.
- **Cruz-Suárez L.E., Nieto-López M., Guajardo-Barbosa C., Tapia-Salazar M., Scholz U. y Ricque-Marie D.** (2007). Replacement of fish meal with poultry by-product meal in practical diets for *Litopenaeus vannamei*, and digestibility of the tested ingredients and diets. *Aquaculture*. 272, 466–476.
- **Cruz-Suárez L.E., Tapia-Salazar M., Villareal-Cavazos D., Beltran-Rocha J., Nieto-López M., Lemme A. y Ricque-Marie D.** (2009). Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in White shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 292, 87–94.
- **Dabrowski K., Poczycynski P., Koek G. y Berger B.** (1989). Effect of partial or totally replacing fish meal protein by soybean meal protein on grow, food utilization and

proteolytic enzyme activities in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. New in vivo test for exocrine pancreatic secretion. *Aquaculture*. 77, 29–49.

- **Davis A.D. y Arnold C.R.** (1993). Evaluation of five carbohydrate sources for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 114, 285–292.
- **Davis A.D., Lawrence A.L. y Gatlin III D.M.** (1993). Response of *Penaeus vannamei* to dietary calcium, phosphorus and calcium: Phosphorus ratio. *Journal of The World Aquaculture Society*. 24, 504–515.
- **Davis A.D. y Arnold C.R.** (1995). Effect of two extrusion processing conditions on the digestibility of four cereal grains for *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*. 133, 287–294.
- **Davis A.D. y Arnold, C. R.** (2000). Replacement of fish meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 185, 291–298.
- **Davis A.D., Arnold C.R. y McCallum I.** (2002) Nutritional value of feed peas (*Pisum sativum*) in practical diet formulations for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*. 8, 87–94.
- **Deshimaru O. y Yone Y.** (1978). Requirement of prawn for dietary minerals. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 44, 907–910.
- **De Silva S.S., Shim K.F. y Khim Ong A.** (1990). An evaluation of the method used in digestibility estimations of a dietary ingredient and comparisons on external and internal markers, and time of faeces collection in digestibility studies in fish *Oreochromis aureus* (Steindacher). *Reprod. Nutr. Develop.* 30, 215–226.

- **Dimes L.E. y Haard N.F.** (1994). Estimation of protein digestibility: I. Development of an in vitro method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 108, 349–362.
- **Divakaran S. y Velasco M.** (1999). Effect of proteolytic enzyme addition to a practical feed on growth of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Nutrition*, 30, 335-339.
- **Divakaran S., Velasco M., Beyer E., Forster I.P. y Tacon A.G.J.** (2000). Soybean meal apparent digestibility for *Litopenaeus vannamei*, including a critique of methodology. pp. 267-277. En: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A. y Civera-Cerecedo, R. (Eds.) *Avances en Nutrición Acuícola V*, Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19 al 22 Noviembre, Mérida, Yucatán, México.
- **Divakaran S., Forster I.P. y Velasco M.** (2004). Limitations on the use of shrimp *Litopenaeus vannamei* midgut gland extract for the measurement of *in vitro* protein digestibility. *Aquaculture* 239, 323–329.
- **Dreywood R.** (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Engng. Chem. Analyt. Edm.* 18, 499–505.
- **El-Saidy D.M.S y Gaber M.M.A.** (2002). Complete replacement of fish meal by soybean meal with dietary L-lysine supplementation for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) Fingerlings. *Journal of The World Aquaculture Society*. 33, 297–305.
- **Erlanger B., Kokowsky N. y Cohen W.** (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrate of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278.

- **Eusebio P.** (1991) Effect of dehulling on the nutritive value of some leguminous seeds as protein source for tiger prawn, *Penaeus monodon*, juveniles. *Aquaculture*. 99, 297–308.
- **Ezquerro-Brauer J.M., García-Carreño F.L. y Haard N.F.** (1997a). Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of Food Biochemistry*. 21, 401–419.
- **Ezquerro J.M., García-Carreño F.L., Civera R. y Haard N.F.** (1997b). pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157, 251–262.
- **FAOSTAT Database.** URL <http://fao.org>. [Ingresado en Marzo 2009].
- **Fennema O. R.** (1996). *Food chemistry*. Tercera edición. Marcel Dekker, Nueva York, EUA.
- **Floreto E.A.T., Bayer R.C., y Brown P.B.** (2000). The effects of soybean-based diets, with and without amino acid supplementation, on growth and biochemical composition of juvenile American lobster, *Homarus americanus*. *Aquaculture*. 189, 211–235.
- **Folch J., Lees M. y Sloane-Stanley G.H.** (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- **Forster I.P., Dominy W., Obaldo L. y Tacon A.G.J.** (2003). Rendered meat and bone meals as ingredients of diets for shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 219, 655–670.

- Forster I.P. y Dominy W.G.** (2006). Efficacy of three methionine sources in diets for Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 37, 474–480.
- **Fox J.M., Lawrence A.L. y Smith F.** (2004). Development of a low-fish meal feed formulation for commercial production of *Litopenaeus vannamei*. pp. 238-258. En: Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D., Nieto-López M., Villareal M.G., Scholz D. y González M. (Eds.) *Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Hermosillo, Sonora, México.
  - **Francis G., Makkar H.P.S. y Becker K.** (2001). Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. 199, 197–227.
  - **Furukawa A. y Tsukahara, H.**, (1966). On the acid digestion method for the determination of chromic oxide as an index substance in the study of digestibility of fish feed. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 32, 502–506.
  - **Galicia-González A.** (2003). Utilización de hidrolizado de langostilla (*Pleuroncodes planipes*) como aditivo en alimentos para juveniles del camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S., México.
  - **García-Carreño F.L., Dimes L.E. y Haard N.F.** (1993). Substrategel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65–69.

- **Gecgel U., Demirci M., Esendal E. y Tasan M.** (2007). Fatty acid composition of the oil from developing seeds of different varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 84, 47-54.
- **Glencross B. D. y Smith D.M.** (2001). Optimizing the essential fatty acids, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the diet of the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture Nutrition* 7, 101–112.
- **Glencross B.D., Smith D.M. Thomas M.R. y Williams K.C.** (2002). The effects of dietary lipid amount and fatty-acid composition on the digestibility of lipids by the prawn, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 205, 157–169.
- **Gómez F.E.** (1992). Efecto de las lectinas de dos variedades de frijol sobre la respuesta inmune intestinal en ratas. Tesis de Licenciatura.
- **Goytortúa-Bores E., Civera-Cerecedo R., Rocha-Meza S. y Green-Yee A.** (2006). Partial replacement of red crab (*Pleuroncodes planipes*) meal for fish meal in practical diets for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Effects on growth and in vivo digestibility. *Aquaculture*. 256, 414–422.
- **Grau C.R. y Zweigart P.** (1953). Phosphatic clay as a phosphorus source for chicks *Calif. Agr.* 7 (12).
- **Guillaume J., Kaushik S., Bergot P. y Métailler R.** (2004). Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. pp. 287–302. Ed. Mundi-Prensa. España.
- **Guo R., Liu Y.J., Tian L.X. y Huang J.W.** (2006). Effect of dietary cornstarch levels on growth performance, digestibility and microscopic structure in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in brackish water. *Aquaculture Nutrition*. 12, 83–88.

- **Hardy R.W and Masumoto T.** (1991). Specifications for marine by-products for aquaculture. pp. 99-108. En: Akiyama D.M y Tan R.K. (Eds.) *Proceedings of the aquaculture feed processing and nutrition workshop*. American Soybean Association. 19 al 25 Septiembre 1991. Tailandia e Indonesia.
- **Hardy R.W.** (2006). Worldwide fish meal production outlook and the use of alternative protein meals for aquaculture. En Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Nieto-López M., Villareal-Cevallos D.A, Puello-Cruz A., García-Ortega A. (Eds). *Avances en nutrición acuícola VIII*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15 al 17 Noviembre 2006. Mazatlán, Sinaloa, México.
- **Hernández C., Olvera-Novoa M.A., Aguilar-Vejar K., González-Rodríguez B. y Abdo de la Parra I.** (2008). Partial replacement of fish meal by porcine meat meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 277, 244–250.
- **Hertrampf J.W. y Piedad-Pascual F.** (2000). *Handbook on ingredients for aquaculture feeds*. pp. 414–513. Ed. Kluwer Academic. Dordrecht. Boston.
- **Hilton J.W. y Slinger S.J.** (1986). Digestibility and utilization of canola meal in practical-type diets for rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canadian Journal of Fisheries Sciences* 43, 1149–1155.
- **Hu Y., Tan B., Mai K., Ai Q., Zheng S., y Cheng K.** (2008). Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. *Aquaculture Nutrition* 14, 499–506.

- **Hughes S.G.** (1988). Assessment of lupin flour as a diet ingredient for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 71, 379–385.
- **Hughes S.G.** (1991). Use of lupin flour as a replacement for full-fat soy in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 93, 57–62.
- **Jackson M.L.** (1958). *Soil chemical analysis*. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, W. J.
- **Kakade M.L., Rackis J.J., McGhee J.E. y Pusk,i F.** (1974). Determination of trypsin inhibitors activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51, 376–382.
- **Knowles P.F.** (1965). Report of sabbatic leaves, Agosto 1, 1964- Agosto 1, 1965. Report for University of California, Davis, CA, EUA.
- **Koshio S., Teshima S., Kanazawa A. y Watase T.** (1993). The effect of dietary protein content on growth, digestion efficiency and nitrogen excretion of juvenile Kuruma prawns, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 113, 101–114.
- **Kumaraguru-Vasagam K. P., Balasubramanian T. y Venkatesan R.** (2006). Apparent digestibility of differently processed grain legumes, cow pea and mung bean in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius and associated histological anomalies in hepatopancreas and midgut. *Animal Feed Science and Technology*. 132, 250-266.
- **Kureshy N. y Davis A.D.** (2002). Protein requirement for maintenance and maximum weight gain for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 204, 125–143.

- **Kuzmicky D.F. y Kohler G.O.** (1968). Safflower meal utilization as a protein source for broiler ration. *Poultry Sci.* 47, 1266–1270.
- **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.
- **Lawrence A.L.** (1985). Marine shrimp culture in the western hemisphere. Second Australian National Prawn seminar. Queensland Australia. pp. 327–336.
- **Lazo J.P., Romaine R.P. y Reigh R.C** (1998). Evaluation of three *in vitro* enzyme assays for estimating protein digestibility in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society* 29, 441–450.
- **Lee D.L.** (1970). Study on digestibility and absorption of protein in artificial feeds by four species of shrimp. *Collect. Repr. Tungkang Mar. Lab.* 1, 77–84.
- **Lee P.G., Smith L.L., Lawrence A.L.** (1984). Digestive proteases of *Penaeus vannamei* Boone: Relationship between enzyme activity, size and diet. *Aquaculture* 42, 225–239.
- **Lee P.H. y Lawrence A.L.** (1985). Effect of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricul. Soc.* 16, 275–287.
- **Lee P.H. y Lawrence A.L.** (1997). Digestibility pp. 194–260. En: D’Abramo L.R., Conklin D.E., Akiyama D.M. (Eds.) *Crustacean Nutrition*. Adv. World Aquac. Vol 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EUA.
- **Le Moullac G., Klein B., Sellos D. y Van Wormhoudt A.** (1996). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus*

*vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 208, 107–125.

- **Lemos D., Navarrete del Toro A. Córdova-Murueta J.H. y García-Carreño F.** (2004). Testing feeds and feed ingredients for juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*: *in vitro* determination of protein digestibility and proteinase inhibition. *Aquaculture* 239, 307–321.
- **Li Dajure y Mündel H. H.** (1997). Safflower *Carthamus tinctorius* L. En: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. (Prom Underused Crops)* 7, 1–83.
- **Lim C. y Petersen D.** (1989). Practical feeding-penaeid shrimps. pp. 205–222. En: Lovell T. (Ed.) *Nutrition and feeding of fish*. Nueva York, Nostrand Reinhold.
- **Lim C. y Dominy W.G.** (1990). Evaluation of soybean meal as a replacement for marine animal protein in diets for shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture*. 87, 53–63.
- **Lim C.** (1996) Substitution of cottonseed meal for animal protein in diets for *Penaeus vannamei*. *J. World Maricult. Soc.* 17, 402–409.
- **Lin H.Z., Li Z.J., Chen Y.Q., Zheng W.H. y Yang K.** (2006). Effect of dietary traditional Chinese medicines on apparent digestibility coefficients of nutrients for white shrimp *Litopenaeus vannamei*, Boone. *Aquaculture*. 253, 495–501.
- **Madriral L.V. y Ortega M.E.** (2002). Obtención de un concentrado proteico de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) para su uso en replazantes de leche para becerras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 36, 211–216.

- **Marechal V. y Rigal L.** (1999). Characterization of by-products of sunflower culture-commercial applications for stalks and heads. *Industrial Crops and Products* 10, 185–200.
- **Martínez-Palacios C.A., Chávez-Sánchez M.C., Olvera-Novoa M.A. y Abdo de la Parra M.I.** (1999). Fuentes alternativas de proteínas vegetales como sustitutos de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura. Pp 279–324. En: Cruz-Suárez L. E., Ricque-Marie D., y Mendoza-Alfaro R. *Avances en Nutrición Acuícola III*. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola 11 al 13 de Noviembre 1996. Monterrey, Nuevo León, México.
- **Maynard L.A., Loosli J.K., Hintz H.F. y Warner R.G.** (1981). *Nutrición animal*. 4ª Ed. Mc Graw Hill. U.S.A.
- **McGoogan B.B. y Reigh R.C.** (1996). Apparent digestibility of selected ingredients in red drum (*Sciaenops ocellatus*) diets. *Aquaculture* 141, 233–244.
- **Mercier L.** (2007). Efecto de los ácidos grasos altamente insaturados sobre el sistema de defensa y la susceptibilidad al estrés en camarón blanco. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Baja California Sur, México.
- **Merican Z.O. y Shim K.F.** (1995). Apparent digestibility of lipid and fatty acids in residual lipids of meals by adult *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 133, 275–286.
- **Millamena O., Bautista-Teruel M.N. y Kanazawa A.** (1996). Methionine requirement of juvenile tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*. 143, 403–410.

- **Millamena O., Bautista-Teruel M.N., Reyes O.S. y Kanazawa A.** (1998). Requirements of juvenile marine shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius) for lysine and arginine. *Aquaculture*. 164, 95–104.
- **Mohamed A.A. y Rayasduarte P.** (1995). Composition of *Lupinus albus*. *Cereal Chemistry* 72, 643–647.
- **Molina-Poveda C. y Morales M.E.** (2004). Use of a mixture of barley-based fermented grains and wheat gluten as an alternative protein source in practical diets for *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research*. 35, 1158–1165.
- **Moyano-López F.J.** (2006). Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en nutrición. En: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Nieto-López M., Villarreal-Cavazos D.A., Puello-Cruz A.C., García-Ortega A. *Avances en Nutrición VIII*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre, 2006. Mazatlán, Sinaloa, México.
- **Norma Oficial Mexicana NOM- 188-SSAI-2002.** Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Octubre de 2002. URL <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>
- **Norma Oficial Mexicana NMX-Y-117-SCFI-2004.** Alimentos para animales. Determinación de actividad ureásica en soya y sus derivados. Método de prueba. URL <http://www.amepa.org/nuevo/amepasite/normas/MNX/nmx-y-117-scfi-2004.pdf>
- **Ortega R.C. y Ochoa B.R.** (2003). El cártamo, una oleaginosa para el mercado de exportación. *Claridades Agropecuarias*. 114, 1–16.

- **Ott L. R.** (1992). Analyzing data: analysis of variance methods. En: Ott R.L. y Longnecker M.T. (Eds.). *An introduction to statistical methods and data analysis*. 4th Edición. Doxbury Press, Belmont, California, EUA.
- **Páez-Osuna F., Gracia A., Flores-Verdugo F., Lyle-Fritch L.P., Alonso-Rodríguez R., Roque A., Ruiz-Fernández A.C.** (2003). Shrimp Aquaculture development and the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Poll. Bull.* 46, 806–815.
- **Palter R., Lundin, R.E. y Fuller G.** (1972). New steroid from safflower. *Phytochemistry* 11, 819–822.
- **Paredes-López O. y Ordorica-Falomir C.** (1986). Production of safflower protein isolates: Composition, yield and protein quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 37, 1097–1103.
- **Paredes L.O.** (1991). Safflower proteins for food use. En: *Developments in Food Proteins*. pp. 7–33. Elsevier Appl. Sci. Publ. Ltd. Barking, UK.
- **Petersen C.F., Wiese A.C., Anderson G.J. y Lampman, C.E.** (1957). *Poultry Sci.* 36, 3–6.
- **Rivas-Vega M.E., Goytortúa-Bores E., Ezquerro-Brauer J.M., Salazar-García M.G., Cruz-Suárez L.E., Nolasco, H. y Civera-Cerecedo, R.** (2006). Nutritional value of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) meals as ingredients in diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Food Chemistry.* 97, 41–49.

- **Reigh R.C. y Ellis S.C.** (1992). Effects of dietary soybean and fish-protein ratios on growth and body composition of red drum, *Sciaenops ocellatus* fed isonitrogenous diets. *Aquaculture*. 104, 279–292.
- **Robaina L., Izquierdo M.S., Moyano F.J., Socorro J., Vergara J.M., Montero D. y Palacios H.F.** (1995). Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219–233.
- **Robyt J.F. y Whelan W.J.** (1968). In *Satarch and its Derivates*. Radley, J.A. (Ed.) Chapman and Hall, London.
- **Rosas C. Cuzon G. Gaxiola G. Arena L. Lemaire P. Soyez A. Y Van Wormhoudt A.** (2000). Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249, 181–198.
- **SAGARPA** (2008). Anuario estadístico de pesca. URL <http://www.siea.sagarpa.gob.mx>
- **Sales J., Brits P.J. y Viljoen J.** (2003). Dietary phosphorus leaching and apparent phosphorus digestibility from different inorganic phosphorus sources for South African abalone (*Haliotis midae* L.). *Aquaculture Nutrition*. 9, 169–174.
- **Samocha T., Davis D.A., Saoud L.P. y DeBault K.** (2004). Substitution of fish meal by co-extruded soybean poultry by-product meal in practical diets for the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 231, 197–203.
- **Sapp R.E. y Davidson S.D.** (1991). Microwave digestion of multi-component foods for sodium analysis by atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Science*. 55, 1412–1420.

- **SIAP** – Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera / **ANIAME** – Asociación Nacional de Industriales de Aceites y Mantecas Comestibles, A. C., (2009). México. *ANIAME, informe anual*. Abril, 2009.
- **Siccardi III A.J., Lawrence A.L., Gatlin III D.M., Fox J.M., Castille F.L., Perez-Velazquez M. y González-Félix M.L.** (2006). Digestibilidad aparente de energía, proteína y materia seca de ingredientes utilizados en alimentos balanceados para el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. En: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Nieto-López M., Villarreal-Cavazos D.A., Puello-Cruz A.C., García-Ortega A. *Avances en Nutrición VIII*. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre, 2006. Mazatlán, Sinaloa, México.
- **Smith L.L., Lee P.H., Lawrence A.L. y Strawn K.** (1985). Growth and digestibility by three sizes of *Penaeus vannamei* Boone: effects of dietary protein level and protein source. *Aquaculture* 46, 85–96.
- **Smith D.M., Allan G., Williams K.C. y Barlow C.G.** (2000). Fishmeal replacement research for shrimp feed in Australia. En: Cruz-Suárez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Olvera-Novoa M.A. y Civera-Cerecedo R. *Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- **Smith J.R.** (1996). Safflower. AOCS Press, Champaign, IL, EUA.
- **Smith D.M., Tabrett S.J., Glencross B.D., Irvin S.J. y Barclay M.C.** (2007) Digestibility of lupin kernel meals in feeds for the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 264, 353-362.

- **Sokal R.R.** (1995). Assumption of analysis of variance. pp 392–450. En: Sokal R. R. y Rohlf F. J. (Eds) *Biometry: Principles and practice of statistic in biological research*, 3rd Edición. W. H. Freeman and Company, Nueva York, EUA.
- **Suárez A.J., Gaxiola G., Mendoza R., Cadavid S., García G., Alanis G. y Suárez A.** (2009). Substitution of fish meal with plant protein source and energy budget for white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture*. 289, 118–123.
- **Sudaryono A., Hoxey M.J., Kailis S.G. y Evans L.H.** (1995). Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 134, 313–323.
- **Sudaryono A., Tsvetnenko E. y Evans L.** (1996). Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 143, 331–340.
- **Sudaryono A., Tsvetnenko E. y Evans L.H.** (1999a). Evaluation of potential of lupin meal as an alternative to fish meal in juvenile *Penaeus monodon* diets. *Aquaculture Nutrition*. 5, 277–285.
- **Sudaryono A., Tsvetnenko E., y Evans L.H.** (1999b). Replacement of soybean meal by lupin meal in practical diets for juvenile *Penaeus monodon*. *Journal of The World Aquaculture Society*. 30, 46–57.
- **Tacon A.G.J.** (1989). *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados*. Italia. 572p.
- **Tacon A.G.J.** (1990). *Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp*. Ed. Argent Laboratory Press. Redmond, Washington, EUA.

- **Tacon A. G. J., Cody J. J., Conquest L. D., Divakaran S., Forster I. P., y Decamp O. E.** (2002). Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition* 8, 121–137.
- **Tan R.K. y Dominy W.G.** (1997). Commercial pelleting of crustacean feed. pp.520–549. En: D'Abramo L.R., Conklin D.E. y Akiyama D.M. (Eds.) *Crustacean Nutrition*. Adv. World Aquac. Vol 6. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, EUA.
- **Teshima S., Kanazawa A. y Koshio S.** (1992). Supplemental effects of methionine-enriched plastein in *Penaeus japonicus* diets. *Aquaculture*. 101, 85–93.
- **Thiessen D.L., Campbell G.L. Y Adelizi P.D.** (2003). Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. *Aquaculture Nutrition* 9, 67–75.
- **Thompson K.R., Rawles S.D., Metts L.S., Smith R., Wimsatt A., Gannam A.L., Twibell R.G., Johnson R.B., Brady Y.J. y Webster C.D.** (2008). Digestibility of dry matter, protein, lipid and organic matter of two fish meals, two poultry by-meals, soybean meal, and distiller's dried grains with solubles in practical diets for sunshine bass, *Morone chrysops* X *M. saxatilis*. *Journal of The World Aquaculture Society* 39, 352–363.
- **Vázquez-Ortiz F.A., Caire G., Higuera-Ciapara I. y Hernández G.** (1995). High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *J. Liq. Chrom.* 18, 2059–2068.

- **Walter H.E.** (1984). Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. pp. 270–270. En: Bergmeyer H.J. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. V. Verlag Chemie. Weinham
- **Walter F. G., Rosales M., Murgueitio E. y Larrahondo J.E.** (1989). Sustancias antinutricionales en hojas de guamo, nacedero y matarratón. *Livestock research for rural development*. 1(1). URL <http://www.lrrd.org/lrrd1/1/mauricio.htm>
- **Weber K. y Osborn M.** (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.
- **Weiss E.A.** (1971). Castor, Sesame and Safflower. pp. 529–550. Barnes and Noble, Inc. Nueva York.
- **Weiss E.A.** (1983). Oilseed crops. Capítulo 6. Safflower. pp. 216–281. Longman Group Limited, Longman House, London, UK.
- **Zar J.H.** (1984). *Biostatistical analysis*. 2da Edición Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J. 679p.

# ANEXOS

*Anexo 1. Composición teórica de aminoácidos<sup>1</sup> en los alimentos usados para determinar la sustitución de la mezcla de pasta de soya-harina de trigo por pasta de cártamo baja en proteína y la sustitución de la proteína de la pasta de soya por proteína de la pasta de cártamo.*

Aminoácido	Recomendado		PCB				PCA			
	Akiyama y Dominy		25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
	1990	CT								
Histidina	0.63	0.85	0.86	0.88	0.89	0.91	0.85	0.85	0.85	0.85
Arginina	1.74	1.75	1.87	1.98	2.09	2.20	1.79	1.81	1.84	1.87
Treonina	1.08	1.19	1.20	1.20	1.21	1.22	1.21	1.19	1.18	1.16
Valina	0.37	1.64	1.69	1.73	1.78	1.82	1.66	1.67	1.68	1.69
Metionina	0.72	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75
Isoleucina	1.05	1.41	1.43	1.44	1.45	1.47	1.40	1.39	1.37	1.36
Leucina	1.62	2.24	2.24	2.24	2.24	2.25	2.20	2.17	2.14	2.11
Fenilalanina	1.20	1.31	1.32	1.33	1.34	1.36	1.29	1.28	1.26	1.24
Lisina	1.59	2.24	2.18	2.11	2.04	1.97	2.14	2.04	1.95	1.85

<sup>1</sup>AminoDat, 2007

*Anexo 2. Composición de la premezcla de vitaminas (VITCRU0604).*

<b>Vitaminas</b>	<b>UI ó mg/kg de alimento</b>	<b>g/100 g de premezcla</b>	<b>Número de Catálogo ICN<sup>1</sup>, SIGMA<sup>2</sup></b>
Vitamina A acetato (Retinol)	15000 UI	0.01	160079 <sup>1</sup>
Vitamina D <sub>3</sub> (Colocalciferol)	7500 UI	3.72	160107 <sup>1</sup>
Vitamina E (Tocoferol)	400	7.93	100555 <sup>1</sup>
Vitamina K <sub>3</sub> Menadiona	20	0.40	102259 <sup>1</sup>
Tiamina (B <sub>1</sub> ) mononitrato	150	2.98	T-4625 <sup>2</sup>
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	100	1.98	R-4500 <sup>1</sup>
Piridoxina (B <sub>6</sub> ) hidrocloreada	50	0.99	102777 <sup>1</sup>
Ácido D-pantoténico	100	1.98	101228 <sup>1</sup>
Niacina (Ac. Nicotínico)	300	5.95	102446 <sup>1</sup>
D-Biotina	1	0.02	B-4501 <sup>2</sup>
Inositol	500	9.92	I-5125 <sup>2</sup>
Ácido fólico	20	0.40	101725 <sup>1</sup>
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0.1	0.002	103271 <sup>1</sup>
Celulosa (vehículo)	1000	19.84	191499 <sup>1</sup>

<sup>1</sup>ICN Biomedicals Inc. Ohio. USA. <sup>2</sup> Sigma Co. St. Louis. EUA.

*Anexo 3. Composición de la premezcla de minerales (MINCRU0409).*

<b>Mineral</b>	<b>g/kg de alimento</b>	<b>g/100 g de premezcla</b>	<b>Número de Catálogo SIGMA<sup>1</sup></b>
KCl	0.5	14.29	P-3911
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5	14.29	M-9397
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.09	2.57	Z-0501
MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0.0234	0.67	M-3634
CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.005	0.15	C-6917
KI	0.05	0.15	P-4286
CoCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.0025	0.07	C-2644
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.37	67.71	S-0876

<sup>1</sup> SIGMA, Co. St. Louis, EUA.

*Anexo 4. Composición teórica de aminoácidos<sup>1</sup> de los alimentos utilizados para determinar la sustitución de la proteína de la harina de pescado por proteína de la pasta de cártamo alta en proteína*

	Recomendado Akiyama y Dominy		Nivel de sustitución Sin D-L-metionina			Nivel de sustitución Con D-L-metionina		
	1990	CT	D-22	D-44	D-66	D-22CM	D-44CM	D-66CM
Histidina	0.63	0.85	0.86	0.88	0.89	0.862	0.88	0.89
Arginina	1.74	1.83	2.05	2.28	2.51	2.054	2.28	2.51
Treonina	1.08	1.23	1.23	1.23	1.23	1.232	1.23	1.23
Valina	0.37	1.64	1.68	1.72	1.75	1.678	1.72	1.75
Metionina	0.72	0.73	0.68	0.62	0.57	0.72	0.72	0.72
Isoleucina	1.05	1.42	1.43	1.45	1.46	1.434	1.45	1.46
Leucina	1.62	2.27	2.30	2.34	2.38	2.303	2.34	2.38
Fenilalanina	1.20	1.34	1.40	1.46	1.52	1.401	1.46	1.52
Lisina	1.59	2.22	2.02	1.83	1.63	2.024	1.83	1.63

<sup>1</sup>AminoDat, 2007