



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DEL VALOR NUTRICIONAL DEL GLUTEN
DE MAÍZ COMO SUSTITUTO DE LA HARINA DE
PESCADO EN DIETAS PARA PARGO FLAMENCO
(*Lutjanus guttatus*)**

Por:

IBQ. DANIELA IVETTE CONTRERAS ROJAS

TESIS APROBADA POR LA:

UNIDAD MAZATLÁN

EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de I.B.Q. Daniela Ivette Contreras Rojas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en ciencias en Acuicultura.



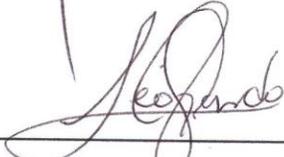
Dra. Crisantema Hernández González

Director de Tesis



Dr. Pablo Almazán Rueda

Asesor



Dr. Leonardo Ibarra Castro

Asesor



M. en C. María Isabel Abdo de la Parra

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico otorgado durante el posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán a través del Posgrado en Ciencias Acuicultura y Manejo Ambiental** por las facilidades brindadas para la realización de éste trabajo.

Al **Fondo Institucional de Fomento Regional para el Desarrollo Científico, Tecnológico y de innovación (FORDECYT)** proyecto 147325 denominado “Desarrollo de la tecnología de engorda de pargo en jaulas flotantes: Una alternativa productiva para las costas del noroeste mexicano” a cargo de la Dra. Crisantema Hernández González, por el apoyo económico para la realización del trabajo.

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE)** proyecto No. 164673, denominado: “Desarrollo de alimentos formulados nutricionalmente eficientes para el cultivo rentable de peces” a cargo de la Dra. Crisantema Hernández González, por el apoyo otorgado en la realización del trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a quienes me brindaron su apoyo en la elaboración mi tesis:

A la **Dra. Crisantema Hernández González**, a quien admiro y le estoy plenamente agradecida por la oportunidad de poder continuar mis estudios bajo su dirección en ésta investigación. Muchas gracias por su apoyo incondicional, amistad, paciencia, confianza y motivación a lo largo de estos años.

A los miembros de mi comité: **Dra. Crisantema Hernández González, Dr. Pablo Almazán Rueda, M. en C. María Isabel Abdo de la Parra y Dr. Leonardo Ibarra Castro**, gracias por brindarme su confianza, valiosos consejos, observaciones y sugerencias aportadas en mi proyecto de tesis.

A la **Biol. Blanca González Rodríguez**, por su gran apoyo, paciencia y por mantener la armonía cada día con su entusiasmo, siempre la recordaremos con mucho cariño y merecidos honores, a la **Biol. Patricia Domínguez Jiménez**, por ayudarme en los análisis de aminoácidos y hematológicos, muchas gracias por sus consejos y motivación. **Biol. Alan González Santos**, por la excelente

ayuda técnica, capacitación durante la etapa de bioensayos, confianza y amistad.

A mis profesores, Doctores: **Miguel Batancourt, Crisantema Hernández, Pablo Almazán, Omar Calvario, Emma Fajer, Alfredo Castillo, Cristina Chávez, Cesar Berlanga, Juan Madrid;** y Maestros en Ciencias: **Isabel Abdo de la Parra, Ana Puello y Héctor Plascencia,** quienes me compartieron un poco de su gran conocimiento, experiencia y enseñanzas durante el posgrado.

A los Investigadores Asociados y técnicos de diferentes laboratorios del CIAD Mazatlán (**M.PA. Noemí García, Biol. Rosa Medina, M. en C. Estela Rodríguez, M. en C. Selene Abad, M. en C. Catherine Soler e Ing. Alberto Duran**) que en algún momento durante mi estancia me compartieron su tiempo, gracias por su colaboración técnica.

Al **IBQ. Juan Luis Sánchez** e **IBQ. Alejandra Marcos,** muchas gracias por el apoyo técnico prestado en la elaboración de alimento, bioensayos y biometrías, parte del desarrollo de éste trabajo es gracias a ustedes.

Al **M. en C. Emyr Saúl Peña Marín** por su valiosa ayuda en la capacitación de técnicas enzimáticas, interpretación de datos y su apoyo en la disección de peces.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron en mi estancia en el Laboratorio de Nutrición: **M. en C. Emmanuel, M. en C. Emyr, IBQ. Lorena, M. en C. Yazmín, M. en C. Denisse, Biol. Laura, Biol. Gabriel, IBQ. Cinthya y M. en C. Carlos** por compartir conmigo momentos alegres y tristes, por sus consejos, su valiosa amistad y disponibilidad para ayudar durante los bioensayos.

A mis compañeros y amigos: **IBQ. Patsy, IBQ. Erick, IBQ. Lorena, IBQ. Jacqueline, IBT. Marcela e IBQ. Alejandro,** por hacer tan ameno el tiempo que compartimos nuestra estancia en el posgrado, su colaboración y por brindarme su amistad.

A todos los que aportaron un granito de arena para poder culminar éste trabajo y realizarme profesionalmente., ¡muchas gracias!

DEDICATORIA

A Dios, por ofrecerme el don de la vida, darme voluntad y ser mi guía.

Con todo mi amor, a mis Padres, que son el pilar en mi vida y ejemplo a seguir. Gracias por su infinito amor, por enseñarme a tener fe y estar conmigo en todo momento dándome fuerzas para seguir adelante. Cada sueño cumplido es gracias a ustedes.

A mi hermana y a mi abuelo, que con su amor, entusiasmo y apoyo, hacen más alegre mi vida y me animan a continuar mis metas. Gracias por creer en mí.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
III. JUSTIFICACIÓN	8
IV. HIPÓTESIS	9
V. OBJETIVO GENERAL	10
5.1. Objetivos específicos	10
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1. Área de estudio.....	11
6.2. Perfil de aminoácidos.....	11
6.2.1. Hidrólisis.....	12
6.2.2. Derivatización.....	12
6.3. Análisis bromatológico	12
6.4. Formulación de dietas experimentales	13
6.5. Elaboración de dietas experimentales	14
6.6. Descripción del sistema experimental.....	17
6.7. Parámetros ambientales	18
6.8. Evaluación biológica	18
6.9. Índices biológicos corporales.....	19
6.10. Análisis económico	20
6.11. Parámetros hematológicos	20
6.11.1. Hematocrito	21

CONTENIDO (continuación)

6.11.2.	Proteína plasmática.....	22
6.11.3.	Hemoglobina	22
6.11.4.	Glucosa	22
6.11.5.	Colesterol y triglicéridos	22
6.12.	Digestibilidad <i>in vivo</i>	23
6.12.1.	Formulación y elaboración de dietas experimentales marcadas con óxido de cromo (Cr ₂ O ₃).....	23
6.12.2.	Colecta, secado y limpieza de heces	23
6.12.3.	Óxido de cromo en dietas y heces	24
6.12.4.	Análisis proximales en heces	24
6.12.5.	Coeficiente de digestibilidad aparente.....	25
6.13.	Análisis estadístico	25
VII.	RESULTADOS	27
7.1	Perfil de aminoácidos.....	27
7.2.	Análisis proximal corporal	28
7.3.	Evaluación biológica	29
7.3.1.	Peso final	31
7.3.2.	Peso ganado	31
7.3.3.	Tasa de crecimiento	32
7.3.4.	Tasa de crecimiento específica	32
7.3.5.	Consumo de alimento individual	32
7.3.6.	Tasa de conversión alimenticia	32
7.3.7.	Supervivencia.....	32
7.3.8.	Índice de eficiencia proteica	33
7.3.9.	Nivel óptimo de inclusión.....	33
7.4.	Índices biológicos corporales.....	34
7.4.1.	Factor de condición	34
7.5.	Evaluación económica	35
7.6.	Parámetros hematológicos	36
7.6.1.	Triglicéridos.....	36
7.6.2.	Colesterol	36

CONTENIDO (continuación)

7.6.3.	Glucosa	38
7.6.4.	Hematocrito	38
7.6.5.	Proteína plasmática.....	38
7.6.6.	Hemoglobina	38
7.7.	Digestibilidad de nutrientes.....	39
7.7.1.	Óxido de cromo en heces	39
7.7.2.	Coeficiente de digestibilidad aparente <i>in vivo</i> de proteína cruda (CDA-PC), lípidos crudos (CDA-LC) materia seca ..(CDA-MS) y energía. (CDA-E)	39
VIII. DISCUSIONES.....		41
8.1.	Determinación de aminoácidos esenciales.....	41
8.2.	Análisis proximal de la carcasa de los organismos.....	42
8.3.	Evaluación biológica nutricional.....	43
8.4.	Parámetros hematológicos	45
8.5.	Digestibilidad de nutrientes y materia seca.....	46
IX. CONCLUSIONES		48
X. RECOMENDACIONES		49
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ubicación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán.....	11
Figura 2. Protocolo de producción de dietas experimentales (Hernández <i>et al.</i> , 2010).....	15
Figura 3. Sistema experimental.....	17
Figura 4. Extracción de sangre en la vena caudal.....	21
Figura 5. Método de stripping (masaje abdominal).....	24
Figura 6. Incremento en peso promedio del pargo flamenco, alimentado con las dietas experimentales durante 10 semanas.....	31
Figura 7. Análisis de regresión polinomial de segundo orden que ajusta el nivel de inclusión del gluten de maíz con la tasa de crecimiento.	33
Figura 8. Resultado de óxido de cromo en heces de los seis tratamientos experimentales. Los datos son una media con una n=3. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre los tratamientos (P<0.05).....	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Análisis proximal de los ingredientes en base seca, los valores son en promedio \pm su desviación estándar de una n=3.....	13
Tabla 2. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para pargo flamenco con inclusiones de gluten de maíz.....	16
Tabla 3. Composición de aminoácidos esenciales de los ingredientes proteicos.....	27
Tabla 4. Determinación del perfil de aminoácidos esenciales (g AA por 100 g de proteína) de las dietas experimentales en base seca.....	28
Tabla 5. Composición proximal corporal del pargo flamenco al final del experimento de alimentación (valores promedios \pm SD expresados en base húmeda).....	29
Tabla 6. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento en pargo flamenco durante 10 semanas de experimentación.....	30
Tabla 7. Índices biológicos del pargo flamenco alimentado con las dietas experimentales por 10 semanas.....	34
Tabla 8. Evaluación económica de las inclusiones de gluten de maíz y dieta sin gluten.....	36
Tabla 9. Parámetros hematológicos del pargo flamenco (<i>Lutjanus guttatus</i>) alimentado con dietas experimentales por 10 semanas.....	37
Tabla 10. Coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda, lípidos crudos, materia seca y energía de las dietas experimentales.....	40

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue evaluar el valor nutricional del gluten de maíz (GM) como sustituto de la proteína de la harina de pescado (HP) en dietas prácticas para la alimentación de juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) mediante la evaluación biológica, el análisis de parámetros sanguíneos y la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA). Se realizaron dos bioensayos: uno de crecimiento y otro de digestibilidad *in vivo* (utilizando un método indirecto con óxido de cromo (Cr_2O_3) al 0.5% como marcador inerte); para ambos bioensayos se formularon seis dietas isoproteicas (50% proteína cruda) y con niveles de lípidos entre 9 y 15%; una a base de harina de pescado (GM-0) y cinco dietas con niveles de 20, 40, 60, 80 y 100% de gluten de maíz (GM-20, GM-40, GM-60, GM-80, GM-100, respectivamente) en sustitución de la proteína aportada por la HP. Para el bioensayo de crecimiento, se evaluaron las dietas por triplicado en 18 tanques cada uno con un volumen de 300 L, aireación y flujo de agua constante. Se colocaron 15 peces por tanque con un peso promedio inicial de 30 ± 3.43 g. Cada tratamiento se evaluó por triplicado durante 10 semanas. Los resultados del presente estudio, sugieren que la proteína de GM podría sustituir hasta el 60% de la proteína de la harina de pescado sin influir en el peso final, peso ganado, tasa de crecimiento, tasa de crecimiento específica del pargo flamenco. Sin embargo, los resultados indican que la disminución en los valores hematológicos a partir de la dieta GM-60 especialmente en organismos alimentados con las dietas donde disminuía la HP (GM 80 y 100). El factor de condición, índice de grasa intraperitoneal e índice hepatosomático, no mostraron diferencias significativas entre dietas. El análisis de la digestibilidad *in vivo* de cada dieta experimental fue determinado usando dos réplicas por tratamiento con 12 peces (peso promedio de 180 ± 0.19 g) por réplica, fueron alimentados 3 veces al día durante un periodo de 5 semanas, las heces fueron recolectadas por el método de *Stripping*. El mayor coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda lo presentó la dieta GM-20 con un $85.28 \pm 0.18\%$ y el mayor coeficiente de digestibilidad aparentes de lípidos crudos se mostró en la dieta GM-0 con un $99.66 \pm 0.0\%$.

Palabras clave: *gluten de maíz, dietas, crecimiento, pargo flamenco, digestibilidad in vivo.*

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the nutritional value of corn gluten meal (GM) as a substitute for protein fishmeal (HP) in practical diets for the feeding of juvenile spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) by biological evaluation, analysis of blood parameters and determination of apparent digestibility coefficients (ADC). Two bioassays were performed, one of growth and another of *in vivo* digestibility (indirect method using chromium oxide (Cr_2O_3) 0.5% as an inert marker); six diets isoproteic (50% crude protein) and lipid levels between 9 and 15%; were formulated for both bioassays; one based on fishmeal (GM-0) and five diets with inclusion levels of 20, 40, 60, 80 and 100% (GM-20, GM-40, GM-60, GM-80, GM-100, respectively) in place of the protein provided by the HP. For the bioassay of growth, diets were evaluated in triplicate in 18 tanks each with a volume of 300 L, aeration and constant water flow. 15 fish per tank were placed with an average initial weight of 30 ± 3.43 g. Each treatment was evaluated in triplicate for 10 weeks. Results of the present study suggested that protein from GM could substitute up to 60% of fishmeal protein without influencing the final weight, weight gain, growing rate, specific growth rate of *Lutjanus guttatus*. However, the results indicate that the decrease in hematological values from the GM-60 diet especially fed diets in which HP decreased (80 and 100 GM) organisms. Condition factor, hepatosomatic index and intraperitoneal fat index, showed no significant differences between diets. The analysis of *in vivo* digestibility of each test diet was determined using two replicates per treatment with 12 fish (average weight of 180 ± 0.19 g) by replication, were fed 3 times a day for a period of 5 weeks, the feces were collected by the *Stripping* technique. The higher coefficient of apparent digestibility of crude protein was presented by the GM-20 diet with $85.28 \pm 0.18\%$ and the highest apparent digestibility coefficient of crude lipid was shown in the GM-0 diet with a $99.66 \pm 0.0\%$.

Keywords: corn gluten, diets, growth, spotted rose snapper, *in vivo* digestibility.

I. INTRODUCCIÓN

La producción acuícola mundial está en constante aumento, pero se enfrenta a algunos retos en la producción de alimentos como la limitada oferta de materia (harina de pescado) para la elaboración de alimentos (Tacon y Metian, 2008). En los últimos años, se han evaluado ingredientes tanto de origen vegetal como animal que cumplan con algunas características (especialmente para peces carnívoros que requieren un alto nivel de proteína) y de esa manera, disminuir la presión existente en la utilización de harina de pescado (Robaina *et al.*, 1997; Salze *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, se tiene que las fuentes de proteína que sustituyan a la harina de pescado deben estar fácilmente disponibles, ser accesibles económicamente y tener una calidad adecuada en el aporte de nutrientes, sin afectar el estado de salud y crecimiento de los peces alimentados con los ingredientes incorporados en su dieta.

En la gran mayoría de los estudios de peces carnívoros, tiende a lograrse un reemplazo parcial del 30% al 40% de proteína de pescado por una fuente de proteínas vegetales en su dieta. Esto se debe a que mayores proporciones puede detener el crecimiento al reducir la palatabilidad, disponibilidad de aminoácidos esenciales, digestibilidad de los ingredientes, etc. (de la Higuera *et al.*, 1988; Pongmaneerat y Watanabe, 1992; Robaina *et al.*, 1995; Nengas *et al.*, 1996; Refstie *et al.*, 2000). Por tal motivo, al considerarse un ingrediente vegetal se debe prestar atención en los aminoácidos dietéticos y/o suplementos minerales para superar posibles desequilibrios nutricionales, así como a la utilización de los procesos tecnológicos adecuados para la desactivación o eliminación de factores endógenos anti-nutricionales (FAN) para aumentar la

disponibilidad de nutrientes (Murai, 1992; Rumsey *et al.*, 1993; Francis *et al.*, 2001). Entre las alternativas de ingredientes vegetales que se han utilizado, se encuentra el gluten de maíz, la cual tiene un alto nivel de proteínas (70.2 g/100 g peso seco) (Gibson *et al.*, 2008), es baja en fibra, rica en vitaminas B y E, y no contienen factores antinutricionales (Regost *et al.*, 1999). Sin embargo, al igual que otras proteínas de origen vegetal, es deficiente en lisina y metionina. La lisina está involucrada en la síntesis de proteínas y junto con la metionina funcionan como precursores de la carnitina, que es una amina implicada en el transporte de ácidos grasos (Fas) a través de las membranas mitocondriales y facilitan su β -oxidación para producir energía (Bremer, 1990).

La sustitución de harina de pescado en dietas por ciertos ingredientes vegetales ricos en proteínas, ha demostrado que influye en la calidad de algunos peces cultivados, formando tejido adiposo y modificando los niveles de colesterol y triglicéridos. La importancia de estos depósitos de grasa, su localización y composición, son aspectos que inciden fuertemente en la calidad de los peces en cuanto a su valor nutritivo, propiedades organolépticas, rendimiento de transformación y la vida útil o la estabilidad de almacenamiento (Dias *et al.*, 2005; Messina *et al.*, 2013). No obstante, la relación entre las fuentes de energía alimentaria y el contenido de grasa muscular son aún poco entendidas.

La familia *Lutjanidae* está dentro de los peces marinos de importancia económica; los cuales se distribuyen desde el Golfo de California, México hasta Perú. La especie *Lutjanus guttatus* forma parte importante de la pesca artesanal en México por los elevados volúmenes de captura y por el costo-beneficio que representa su pesca (Allen, 1985). Se le considera una especie con alto potencial para su cultivo, debido a su demanda comercial, su capacidad de adaptación y que puede controlarse su reproducción en cautiverio (Ibarra-Castro y Duncan, 2007; Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchere, 2009).

Para su cultivo exitoso, el crecimiento de los peces está asociado al consumo de alimento, condiciones de temperatura y concentración de oxígeno disuelto en el agua, y al mismo tiempo, deben desarrollarse alimentos artificiales que cubran los requerimientos nutricionales del organismo en estudio. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio es investigar los efectos de la sustitución parcial y total de la harina de pescado por el gluten de maíz como fuente proteica y sus efectos en el crecimiento, supervivencia, índice de eficiencia alimenticia, digestibilidad de nutrientes y estado de salud de juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).

II. ANTECEDENTES

2.1. Requerimientos nutricionales para la familia Lutjanidae

Existen estudios que reportan los requerimientos para proteína y lípidos en dietas prácticas para juveniles cultivados de la familia Lutjanidae; los cuales varían de acuerdo a la etapa de desarrollo pero también entre especies, como los presentados por los siguientes autores:

Catacutan *et al.* (2001), determinaron en pargo rojo (*Lutjanus argentimaculatus*), que una inclusión de 50% de proteína cruda, 6 % y 12% de lípidos crudos mostraron la mejor tasa de crecimiento específico. Así mismo, Watanabe *et al.* (2001), evaluaron el crecimiento en pargo criollo (*Lutjanus analis*), donde el máximo crecimiento fue observado con las dietas con niveles de 45% de proteína, 6 y 9% de lípidos a 30°C. Por su parte, Miller *et al.* (2005), realizaron experimentos con huachinango del Golfo (*Lutjanus campechanus*), en este caso los autores concluyeron que un buen crecimiento se logra utilizando una dieta con un nivel proteico entre 32 y 36%, y 10% de lípidos.

Villa-López, (2005) determinó los requerimientos de proteína y lípidos para subadultos (140g) silvestres de pargo (*Lutjanus guttatus*). De forma separada evaluaron dietas semi-puras con variaciones en los niveles de proteína (30 a 60%), así como; variaciones en los niveles de lípidos (8-17%). Concluyeron que la dieta con una inclusión de proteína del 40% y con un contenido de lípidos del 11% logró el mejor crecimiento de los peces.

Abdo de la Parra *et al.* (2010) evaluaron el efecto de diferentes niveles de

proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo (*Lutjanus guttatus*) (peso promedio 2.2 ± 0.1 g) producidos en laboratorio. Estos autores formularon nueve dietas semi-puras con tres niveles de proteína (40, 45 y 50%) y tres niveles de lípidos (9, 12 y 15%), con las cuales alimentaron durante ocho semanas. El resultado indica que los juveniles requieren por lo menos 45% de proteína y 9% de lípidos totales en su dieta para promover un mayor crecimiento y supervivencia.

2.2. Evaluación del crecimiento, digestibilidad y estado de salud de peces, utilizando diversas fuentes de proteína

Se ha demostrado que fuentes alternativas de proteína de origen vegetal pueden sustituir a la harina de pescado (HP) en dietas balanceadas para organismos carnívoros; sin embargo una alta inclusión de una proteína vegetal puede llevar a reducir la salud, ya que no están siendo digeridas apropiadamente por el metabolismo de los peces. A continuación, se presentan referencias donde se utilizaron diversos tipos de harina, así como el gluten de maíz (GM) como fuente proteica:

Robaina *et al.* (1997), realizaron dos experimentos para comparar el efecto de la sustitución de HP por dos fuentes diferentes de proteína de GM (20, 30 y 40%), y harina de carne y huesos (HCH) (20, 30 y 40%) en dietas para juveniles de dorada (*Sparus aurata*) (promedio 40 g). Tanto los valores de crecimiento, eficiencia alimenticia y tasa de eficiencia proteica no presentaron diferencias entre los tratamientos. El coeficiente de digestibilidad aparente de las tres dietas con GM fue similar a la dieta control.

Regost y colaboradores (1999), evaluaron por medio de la sustitución de la proteína de HP por la de GM (20, 40 y 57%) en la dietas para rodaballo (*Psetta maxima*) suplementadas con aminoácidos glutamato, arginina y lisina. Concluyeron que la proteína de HP podía ser reemplazada hasta un tercio con GM sin afectar el crecimiento. Sin embargo, la digestibilidad de los nutrientes se

redujo con el aumento de los niveles de GM en la dieta, y la energía fue descendiendo. De igual manera, disminuyó significativamente el colesterol y las concentraciones de triglicéridos en plasma del rodaballo con el aumento de los niveles de GM.

En un estudio realizado por Dias *et al.* (2005) en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). Se formularon cuatro dietas: una a base de HP, dos dietas con distintos concentrados de soya comercial y otra dieta con GM, donde incluyeron un 80% de reemplazo de la proteína de la HP respectivamente. Las tasas de crecimiento de la lubina alimentadas con dietas a base de proteínas vegetales fueron significativamente más bajas que los alimentados con la dieta a base de HP. La digestibilidad de la proteína más baja, se presentó en la dieta que contenía GM.

Men y colaboradores (2014) estudiaron a la lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*) durante 60 días en jaulas flotantes (peso corporal inicial 18.09 g). Las dietas utilizadas tuvieron un reemplazo de 15, 30, 45, 60 y 75% de proteína de HP por GM y se suplementaron con aminoácidos (arginina, isoleucina, lisina, metionina, valina y treonina). Los resultados de este estudio indicaron que el GM puede reemplazar hasta un 60% de proteína de HP, sin efectos negativos significativos en el crecimiento. No obstante, en la dieta con 75% disminuyó significativamente el coeficiente de digestibilidad aparente de la proteína y aumentó el coeficiente de lípidos.

Silva-Carrillo y colaboradores (2012) formularon dietas para pargo (*Lutjanus guttatus*) en las que reemplazo la proteína de HP por harina de soya (0, 20, 40 y 60%) los dos últimos niveles fueron suplementadas con metionina, no encontraron diferencias significativas en crecimiento. Los parámetros hematológicos (hematocrito, hemoglobina, proteína total, triglicéridos, glucosa) fueron similares entre los tratamientos. Los resultados de este estudio muestran que la harina de soya es un ingrediente aceptable para reemplazar el 20% de

proteína en las dietas de pargo pero que a niveles altos en las dietas reduce el rendimiento en peces.

Kader y Koshio (2012) estudiaron juveniles de besugo rojo (*Pagrus major*) de 1.35 g. Durante 56 días fueron alimentados con cuatro dietas formuladas isoproteicas a 50% e isolipídicas a 15%, una dieta control a base de HP y tres más que contenían una mezcla de subproductos marinos y proteína soya hasta 100% de reemplazo. Se incluyó una dieta comercial como referencia. Según sus conclusiones, la HP puede ser reemplazada hasta un 80% al no encontrarse diferencias significativas en crecimiento, manteniendo un buen estado de salud (hematocrito, proteína total, glucosa, triglicéridos, colesterol) de los juveniles.

Messina *et al.* (2013), formularon cinco dietas con niveles variables de gluten de trigo, soya y harina de guisantes en sustitución de la harina de pescado para evaluar el crecimiento de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (peso corporal inicial 23.9 ± 0.1) durante 96 días. No se presentaron diferencias en el peso final y tasa de crecimiento específica de las dietas con proteína vegetal con la dieta de HP. Los niveles de colesterol en plasma sanguíneo disminuyeron significativamente como la dieta incluía soya y harina de gluten de trigo.

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México, el desarrollo de alimentos formulados para el cultivo de peces está basado principalmente en la harina de pescado debido a su elevado valor nutritivo y a su palatabilidad. Sin embargo, su disponibilidad es limitada y el incremento en el precio ha sido constante.

El desarrollo de dietas de alta calidad y de bajo costo constituye un reto importante para la acuicultura, principalmente todas aquellas que involucren la sustitución de la harina de pescado como principal fuente proteica, así mismo, es importante que cubran los requerimientos de aminoácidos esenciales, los cuales pueden ser agregados a las dietas.

Las fuentes de proteínas vegetales como: la harina de soya, harina de colza y harina de gluten de maíz, son alternativas con potencial para ser utilizados como sustitutos parciales o totales en la formulación de dietas, ya que contienen un alto nivel de proteína. Por lo antes expuesto, se consideró evaluar el uso de la proteína de gluten de maíz como fuente proteica vegetal para reemplazar a la harina de pescado en el desarrollo del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) sin que se vea afectado su crecimiento, estado de salud y la digestibilidad de los nutrientes.

IV. HIPÓTESIS

Dada la naturaleza carnívora del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), el reemplazo parcial de hasta un 40% de la proteína de harina de pescado por la proteína de gluten de maíz en su dieta, no afectará su crecimiento, estado de salud, ni la digestibilidad aparente de los nutrientes.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la proteína de gluten de maíz en sustitución de la proteína de harina de pescado, en el crecimiento y el estado de salud del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*); así como la digestibilidad *in vivo* de las dietas experimentales.

5.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del reemplazo de 0, 20, 40, 60, 80 y 100% de la proteína de la harina de pescado por gluten de maíz en dietas experimentales para la alimentación del pargo (*Lutjanus guttatus*), en términos de crecimiento, supervivencia, tasa de conversión alimenticia, índice de eficiencia proteica, así como el rendimiento económico de las dietas experimentales.
- Analizar el estado de salud del pargo (*Lutjanus guttatus*) mediante los siguientes parámetros hematológicos: hematocrito, hemoglobina, proteína total, glucosa, colesterol y triglicéridos cuando es alimentado con las dietas experimentales.
- Determinar el coeficiente de digestibilidad aparente *in vivo* de proteínas, lípidos, materia seca y energía de las dietas experimentales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de nutrición y la Planta de alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, localizado en Av. Sábalo-Cerritos s/n. Estero del Yugo (Figura 1), Mazatlán, Sinaloa. México.

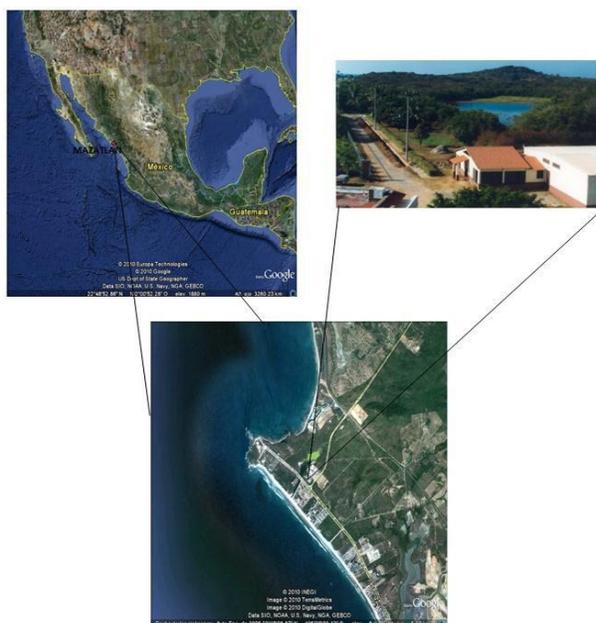


Figura 1. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán.

6.2. Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos en los ingredientes, dietas experimentales y carcasa inicial, se determinó de acuerdo a la técnica para la detección y cuantificación de aminoácidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) utilizando un equipo Varian Pro-Star modelo 510 de acuerdo a la técnica desarrollada por Vázquez-Ortiz *et al.* (1995). Para

la preparación, identificación y cuantificación de las muestras fue necesaria su hidrólisis y derivatización.

6.2.1. Hidrólisis

Aproximadamente 3 g de muestra se sometieron a la eliminación de humedad y grasa por los métodos establecidos por la AOAC, 4.1.06 y 4.5.05 respectivamente. Posteriormente se pesaron 1 mg de muestra por dieta y se colocaron dentro de tubos para hidrólisis (Pierce 29560) a los cuales se les adicionó 3 ml de HCl 6M. Se aplicó vacío durante 3 min y los tubos se colocaron en baño seco a 150°C durante 6 horas.

Para la eliminación del HCl 6M y la obtención de la muestra, fue necesario evaporar en un roto vapor a 65°C (Brinkmann Buchi RE 121) agregando 3 volúmenes de agua destilada por volumen de HCl 6M adicionado. Posteriormente la muestra se colectó usando un buffer de citrato de sodio 0.2N, pH 2.2.

6.2.2. Derivatización

Se tomó una alícuota de 100 µl del hidrolizado y se le añadió 40 µl de estándar interno 2.5 µmol/ml, este se aforó a 1 ml con buffer de Citrato de Sodio pH 2.2. Se tomaron 250 µl del diluido y 250 µl de solución OPA en una jeringa para cromatografía. La mezcla de estas dos soluciones se dejó reposar por un tiempo justo de 2 min e inmediatamente después se pasó por un filtro (0.2 µm), por último se tomaron 10 µl del derivado y se inyectó en el cromatógrafo.

6.3. Análisis bromatológico

Se realizó análisis proximal a la carcasa de los peces (iniciales y finales), los ingredientes utilizados para las dietas experimentales y a las dietas elaboradas. Se incluyó la determinación del contenido de humedad, ceniza, lípidos crudos y proteína cruda, mediante las técnicas de AOAC (2011). La humedad por el método 4.1.06 se utilizó una estufa Craft a $105 \pm 5^\circ\text{C}$ por 12 horas, la ceniza por el método 32.1.05, la cual se obtuvo por calcinación de la

muestra en una mufla Felissa a $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 12 horas. Posteriormente para determinar proteína cruda fue por el método 12.1.07, por combustión y cromatografía de gases mediante la técnica carbono-hidrogeno-nitrógeno equipo Flash modelo 2000, y grasas por el método 4.5.05 con extracción con éter de petróleo utilizando un equipo microSoxhlet.

Para determinar el análisis de la carcasa (cuerpo del organismo) de los peces, al inicio del bioensayo de crecimiento se tomaron 5 peces al azar como muestra del lote total de donde se realizó la siembra. Al final del bioensayo se tomaron 3 peces por tanque, completando 9 organismos por tratamiento, los cuales fueron sacrificados por inmersión térmica y homogenadas en un molino para muestras húmedas FOSS Knifetec 1095 (FOSS Scino Co., China). Las muestras fueron analizadas siguiendo las técnicas oficiales de la AOAC (2011).

6.4. Formulación de dietas experimentales

Para poder formular las dietas, fue necesario analizar la composición química proximal de los ingredientes proteicos: harina de pescado, harina de calamar, harina de krill y gluten de maíz, los cuales se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis proximal de los ingredientes en base seca, los valores son en promedio \pm su desviación estándar de una $n=3$.

Composición (%MS)	Materias primas			
	Harina de pescado ¹	Harina de calamar ²	Harina de krill ³	Gluten de maíz ⁴
Proteína cruda	67.83 \pm 0.74	68.50 \pm 0.12	60.53 \pm 0.1	72.72 \pm 0.07
Lípidos crudos	8.80 \pm 0.04	2.61 \pm 0.05	12.04 \pm 0.1	2.43 \pm 0.2
Ceniza	12.45 \pm 0.1	6.4 \pm 0.1	9.60 \pm 0.1	1.39 \pm 0.04
Humedad	8.13 \pm 0.06	11.60 \pm 0.10	6.92 \pm 0.04	7.73 \pm 0.06

¹Selecta de Guaymas, S.A. de C.V. Guaymas, Sonora, México.

²Proteínas marinas y Agropecuarias, S.A. of C.V., Guadalajara, Jalisco, México.

³PROAQUA, S.A. de C.V. Mazatlán, Sinaloa, México.

⁴Cpingredientes, S.A. de C.V. Guadalajara, Jalisco, México.

Basándose en la composición de los ingredientes, se formularon seis dietas experimentales isoproteicas (50% proteína cruda) y buscando que los niveles

de lípidos crudos se encontraran entre 9 y 15%, utilizando el programa de formulación Mixit-win, como a continuación se detalla:

Se elaboró una dieta control (GM-0), a base de harina de pescado (HP) como principal fuente proteica y cinco dietas experimentales con reemplazo de 20, 40, 60, 80 y 100% de HP por gluten de maíz (GM) (GM-20, GM-40, GM-60, GM-80, GM-100, respectivamente). Las dietas 80 y 100% de GM fueron suplementadas con aminoácidos esenciales de lisina y metionina hasta ajustar a las dietas de acuerdo al perfil que presentó el cuerpo del pez.

6.5. Elaboración de dietas experimentales

Las dietas experimentales se elaboraron siguiendo el protocolo de la planta de alimentos del CIAD, unidad Mazatlán (Hernández *et al.*, 2010) (Figura 2). Durante la elaboración de las dietas se utilizaron: un pulverizador marca Micrón, una balanza Mettler PM4800-Delta Ranger, una báscula marca TORREY EQB 50/100 50 kg, una mezcladora marca Hobart AT-200, un molino para carne marca TORREY y un secador de aire forzado. Después de que los pellets se secaran, se cortaron al tamaño apropiado a la boca de los peces y se colocaron en bolsas de plástico, previamente etiquetadas. Las dietas se almacenaron en un cuarto frío a una temperatura de 4°C para su conservación y hasta su respectivo análisis proximal (Tabla 2).

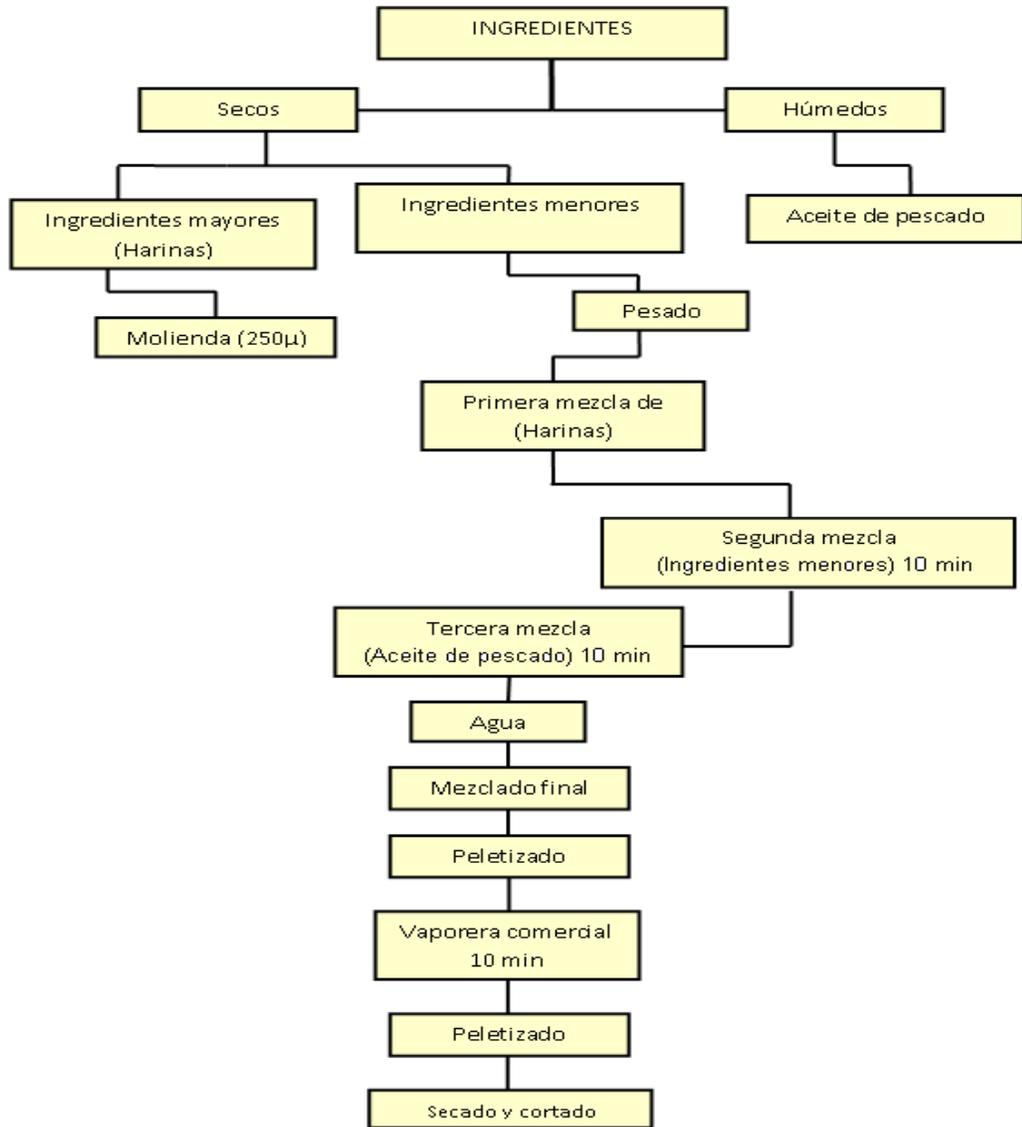


Figura 2.Protocolo de producción de dietas experimentales (Hernández *et al.*, 2010).

Tabla 2. Composición y análisis proximal de las dietas experimentales para pargo flamenco con inclusiones de gluten de maíz.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Dietas					
	GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
Harina de pescado	54.80	43.84	32.88	21.92	10.96	0.00
Gluten de maíz	0.00	11.18	22.37	33.55	44.73	55.91
Harina de calamar	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Aceite de pescado ^a	5.30	6.01	6.73	7.45	8.16	8.60
Harina de krill	7.59	7.59	7.59	7.59	7.59	7.59
Dextrina	19.76	18.82	17.88	16.94	15.57	14.027
Lisina ^b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	1.08
Metionina ^c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.23
Premezcla de vitaminas ^e	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
Premezcla de minerales ^f	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
Carotenoides ^d	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Antioxidantes	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Lecitina de soya	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Vitamina C ^d	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Alginato ^a	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Composición porcentual (%MS)						
Proteína cruda	47.9±0.3	47.3±0.3	47.7±0.4	47.75±0.2	50.4±0.3	47.9±0.2
Lípidos crudos	11.06±0.1	12.2±0.2	12.83±0.1	14.4±0.1	14.1±0.1	15.41±0.1
Ceniza	15.54±0.1	13.8±0.2	11.15±0.1	9.2±0.1	6.61±0.2	4.44±0.05
Materia seca	92.19±0.11	92.38±0.08	93.89±0.35	93.68±0.09	92.58±0.2	92.38±0.11
ELN ¹	17.67±0.35	19.15±0.49	22.20±0.53	22.39±0.29	21.51±0.16	24.66±0.5
Energía (kcal/g)	449.49±0.39	462.60±1.4	483.58±1.94	499.06±0.73	507.48±1.02	518.80±1.1

^aLos valores son en promedio ± su desviación estándar de una n=3. ¹ ELN (Extracto libre de nitrógeno) ELN = 100 - (% humedad + % proteína cruda + % lípidos crudos + % ceniza). Energía (kcal/g) fue calculada en función de los valores fisiológicos de proteína, 5.7 kcal/g; lípidos, 9.4 kcal/g; y extracto libre de nitrógeno, 4.1 kcal/g (Shiau y Chou, 1991). ^aDroguería Cosmopolita, S.A. de C.V. México, D.F., México ^b

^c DL-Methionine M9500-500G Sigma Aldrich Chemical, S.A. de C.V. Toluca, México.

^dDSM Nutritional Products Mexico S.A. de C.V., El Salto, Jalisco, México

^e Pre-mezcla de vitaminas: Vitamina A, 2400 IU o mg/g; Vitamina D3, 2250 IU; Vitamina E, 160 g; Vitamina K3, 8.00 g; Vitamina B1, 20.00 g; Vitamina B2, 40.00 g; Acido Pantoténico, 60.00 g; Acido Nicotínico, 160.00 g; Vitamina B6, 16.00 g; Ácido Fólico, 4.00 g; Vitamina B12, 80 mg; Biotina, 500 mg; Vitamina C, .2 g; gJ.T. Baker®. ^f Pre-mezcla mineral: Manganeseo, 100 g; Zinc, 160 g; Hierro, 200 g; Cobre, 20 g; Yodo, 5 g; Selenio, 0.40 mg; Cobalto 0.60 mg.

6.6. Descripción del sistema experimental

El área donde se llevó a cabo el experimento estaba integrado por 18 tanques circulares de fibra de vidrio color negro y fondo blanco con una capacidad de 300 L (Figura 3), cada uno con un dren central que midió 50 mm, cubierto con malla sombra de 0.5 cm para evitar la salida de los peces y a la vez permitir la limpieza de los tanques. Cada tanque estaba equipado con aireación y flujo de agua continuo equivalente a 5 L min.^{-1} aproximadamente.



Figura 3. Sistema experimental

Se colocaron 15 peces por tanque con un peso promedio inicial de $30 \pm 3.43 \text{ g}$ producidos en la planta piloto de producción de peces marinos del CIAD unidad Mazatlán. Cada tratamiento se evaluó por triplicado durante 10 semanas. La distribución de los tratamientos se realizó al azar, mediante sorteo sin reemplazo, posteriormente los tanques fueron marcados para su identificación.

Los organismos se alimentaron a saciedad durante tres días para aclimatarlos a las dietas experimentales y tanques. Transcurridos los tres días,

se alimentaron al 3% de la biomasa de los organismos dentro de cada tanque, distribuyendo el alimento en tres raciones al día (9:00, 12:00 y 15:00 horas).

6.7. Parámetros ambientales

Diariamente, antes de la primera alimentación tanto en el bioensayo de crecimiento como en la evaluación de digestibilidad, se realizó un monitoreo de parámetros ambientales mediante un oxímetro de mano marca YSI 85. Los resultados registrados en el bioensayo de crecimiento fueron (en promedio): temperatura $29 \pm 0.1^\circ\text{C}$, salinidad 34 ± 0.7 y oxígeno disuelto $5.40 \pm 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En el bioensayo de digestibilidad *in vivo* (el cual se describe más adelante) se registró una temperatura de $24 \pm 0.1^\circ\text{C}$, oxígeno disuelto de $5.56 \pm 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y una salinidad de 33 ± 1.0 .

6.8. Evaluación biológica

La evaluación biológica se llevó a cabo cada 14 días durante un periodo de 10 semanas. Primeramente se capturaban los peces con redes, se separaban en contenedores y posteriormente se anestesiaban de manera individual con esencia de clavo a una concentración de $0.25 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$. Una vez anestesiado el organismo, se pesó en una balanza analítica (con precisión de 0.1 g) y se midió con la ayuda de un ictiómetro convencional para determinar su longitud total y estándar.

Los índices nutricionales determinados fueron: incremento de peso o peso ganado (PG), tasa de crecimiento (TC), tasa de crecimiento específica (TCE), tasa de conversión alimenticia (TCA), supervivencia (S%) e índice de eficiencia proteica (IEP) aplicando los modelos estándar de Utne (1979), New (1987), Hephher (1988) y Hopkins (1992).

$$\text{PG} = \text{Peso promedio final (g)} - \text{Peso promedio inicial (g)}$$

$$\text{TC} = \left[\frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Peso inicial promedio (g)}} \right] \times 100$$

$$\text{TCE} = \left[\frac{[In (\text{Peso final (g)}) - In (\text{Peso inicial (g)})]}{\text{Número de días}} \right] \times 100$$

$$\text{TCA} = \frac{\text{Alimento consumido (g)}}{\text{Peso ganado (g)}}$$

$$\text{S\%} = \left[\frac{\text{No. Final de organismos}}{\text{No. Inicial de organismos}} \right] \times 100$$

$$\text{IEP} = \frac{\text{Peso ganado (g)}}{\text{Proteína consumida (g)}}$$

6.9. Índices biológicos corporales

Al final del experimento de crecimiento, se sacrificó una muestra de 8 organismos por tratamiento, estos fueron pesados, medidos y eviscerados para obtener el peso del paquete visceral, hígado y grasa visceral. Para la determinación de los índices biológicos se emplearon las siguientes ecuaciones (Lagler, 1978):

Factor de condición: Indica el estado fisiológico en términos numéricos.

$$\text{FC} = \frac{\text{Peso corporal (g)}}{[\text{Longitud del cuerpo (cm)}]^3}$$

Índice hepatosomático: La relación del peso del hígado contra el peso del cuerpo.

$$\text{HSI} = 100 \times \left(\frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso del pez (g)}} \right)$$

Índice viscerosomático: Relación de las vísceras y el cuerpo.

$$\text{VSI} = 100 \times \left(\frac{\text{Peso vísceras (g)}}{\text{Peso del pez (g)}} \right)$$

Relación de grasa intraperitoneal: Este factor relaciona la cantidad de grasa que el organismo tiene en la cavidad ventral, con el peso total del organismo, estimando el grado de acumulación grasa.

$$\text{RGI} = 100 \times \left(\frac{\text{Peso grasa intraperitoneal (g)}}{\text{Peso del pez (g)}} \right)$$

6.10. Análisis económico

Se determinó el rendimiento económico de las dietas experimentales mediante el modelo propuesto por Clifford (1992). El cual consiste en calcular el costo unitario de alimentación (CUA) o costo de alimento necesario para producir una unidad de peso. El costo de las dietas se determinó únicamente considerando el costo de la inclusión de gluten de maíz en reemplazo de la harina de pescado de cada formulación, el resto de los ingredientes no se consideraron ya que permanecen económicamente estables.

$$\text{CUA} = \text{TCA} \times \text{costo de alimento}$$

Se calculó el rendimiento económico de las dietas a partir del método de Vincke (1969) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IG} = \text{Índice de ganancia} = \text{Valor del pescado (Kg)} / \text{costo de alimento}$$

6.11. Parámetros hematológicos

Para determinar la salud del pargo flamenco, antes del bioensayo de crecimiento y al final (después de 10 semanas de ser alimentados con su respectiva dieta), se procedió a la extracción de sangre de 10 peces al inicio y 10 peces por nivel de reemplazo. No se realizó después del bioensayo de digestibilidad para evitar cambios inmunológicos por la respuesta de estrés al método de stripping.

Los organismos no se alimentaron durante 24 h previas a la extracción. Durante el procedimiento, los peces fueron capturados de su respectivo tanque

y fueron anestesiados con esencia de clavo $0.25 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$, la muestra se obtuvo antes de tres minutos; del tiempo de captura hasta el momento de la extracción.

La sangre de los peces se extrajo con una jeringa para tuberculina de la marca TERUMO de 1 ml, efectuando una punción en la vena caudal (Figura 4) y se colocó en dos tubos: una parte de la muestra en un tubo con EDTA-K2 para determinar la concentración de hemoglobina y la otra parte en un tubo Eppendorf, del cual, se tomó la muestra para la determinación de hematocrito inmediatamente después de depositar la sangre, el resto se dejó coagular. Posteriormente, la muestra fue centrifugada por 5 minutos a velocidad estándar y una vez separado el suero, éste se depositó en otro tubo Eppendorf y se congeló a -20°C hasta su posterior análisis. Del suero, se determinó las proteínas totales en plasma (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011).



Figura 4. Extracción de sangre en la vena caudal.

6.11.1. Hematocrito

Para la determinación del hematocrito se siguió la técnica de Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011); se utilizó un tubo capilar heparinizado el cual se colocó en una centrifuga para micro-hematocrito P600 (SOL-BAT, México) por 10 min. Posteriormente se determinó el porcentaje del paquete celular con respecto al volumen total de sangre usando un lector para micro-hematocrito (Mytutoyo, México).

6.11.2. Proteína plasmática

La proteína se midió en suero utilizando un kit de Biuret (Biosystems, España). Para ello se colocaron 20 µl de suero con 1 ml de reactivo en una celda de plástico, se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se midió a una longitud de onda de 545 nm.

6.11.3. Hemoglobina

La hemoglobina se determinó mediante un kit colorimétrico (Randox Laboratories LTD, Reino Unido), basado en el método de la cianometahemoglobina. Se tomaron 10 µl de sangre heparinizada de los tubos microtainer almacenados a -20°C y se hicieron reaccionar con 2.5 ml de reactivo, se dejó reposar por un periodo de 3 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

6.11.4. Glucosa

La cuantificación de la glucosa se realizó con un kit comercial, Bayer-Sera-Pak Plus B01 4509-01(Condado de Antrim, Reino Unido) y utilizando un curva patrón.

6.11.5. Colesterol y triglicéridos

El plasma se recuperó después de la centrifugación (6000 g; 10 min) e inmediatamente se almacenó a -20°C para la determinación de triglicéridos y colesterol total. El análisis de los triglicéridos se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit Grupo Mexlab (Guadalajara, México), posteriormente se llevó por espectrofotometría a una longitud de onda de 545 nm. Para la determinación de colesterol total en suero se determinó por la acción de las enzimas colesterol ester hidrolasa y colesterol oxidasa, el cual se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit Grupo Mexlab (Guadalajara, México), utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda (rango 500-550 nm).

6.12. Digestibilidad *in vivo*

6.12.1. Formulación y elaboración de dietas experimentales marcadas con óxido de cromo (Cr_2O_3)

Para las dietas en el bioensayo de digestibilidad (GM-0, GM-20, GM-40, GM-60, GM-80, GM-100) al igual que en el bioensayo de crecimiento, se siguió el protocolo de la planta de alimentos del CIAD, sólo que durante su elaboración se le adicionó a cada una (Tabla 2) óxido de cromo (Cr_2O_3) el cual, sirve como marcador inerte de referencia para determinar la digestibilidad aparente de los nutrientes.

Durante la elaboración de cada dieta, una vez obtenida la mezcla de los ingredientes mayores, se fueron tomando varias porciones de la mezcla a las cuales se les incorporó Cr_2O_3 en pequeñas cantidades, mezclándolo manualmente hasta obtener una mezcla homogénea, la cual contenía un total de 5 g de Cr_2O_3 por 1 kilogramo de alimento (0.5%) (Tabla 3).

El análisis de la digestibilidad *in vivo* de cada dieta experimental fue determinado usando 24 peces por tratamiento (con un peso promedio de 180 ± 0.19 g). Así mismo, se siguió el siguiente protocolo para la colecta y tratamiento de las heces. Posteriormente, se determinó la digestibilidad aparente de las dietas mediante el conocimiento de los nutrientes consumidos por el organismo y excretados en heces y análisis de Cr_2O_3 en dietas-heces.

6.12.2. Colecta, secado y limpieza de heces

Se alimentó a los organismos en los siguientes horarios: 9, 11 y 13 horas. Posteriormente se procedió a la colecta de heces a las 15:00 horas (6 horas después de la primera alimentación), usando el método de stripping o masaje abdominal Austreng (1978) (Figura 5), para ello se anestesió a los organismos utilizando esencia de clavo a una concentración de $0.25 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ para realizar la extracción del material fecal, una vez colectadas las heces fueron trasladadas al

laboratorio de bromatología donde se colocaron en una estufa a 105° durante 12 horas.



Figura 5. Método de stripping (masaje abdominal).

Transcurrido el tiempo establecido, las heces secas se depositaron en frascos herméticamente cerrados y etiquetados con el nombre de la dieta. Una vez reunido el material fecal requerido para la realización del análisis proximal, se pulverizaron en un mortero y se analizaron en un estereoscopio con el fin de remover partículas que pudieran adherirse a éstas, finalmente se depositaron en los frascos hasta el momento de su análisis.

6.12.3. Óxido de cromo en dietas y heces

En la determinación de la digestibilidad aparente se cuantificó el óxido de cromo en heces y alimento aplicando el método espectrofotométrico previa digestión ácida de Furukawa y Tsukahara (1966). La técnica consiste en digerir la muestra con ayuda de un digestor eléctrico tipo Kjeldahl, con ácido nítrico y perclórico. Una vez terminada la digestión se aforó y se procedió a leer la muestra en un espectrofotómetro modelo UV-1800 120 V. a 350 nm.

6.12.4. Análisis proximales en heces

El análisis proximal en heces se realizó con el fin de evaluar el porcentaje de nutrientes que se retuvo o absorbió en el tubo digestivo del animal. Para ello, se evaluó la cantidad de nutrientes del alimento y la cantidad de nutrientes en heces incluyendo los parámetros de humedad, ceniza, proteína cruda y lípidos crudos (AOAC, 2011).

6.12.5. Coeficiente de digestibilidad aparente

Los coeficientes de digestibilidad aparente CDA's de proteína cruda, lípidos crudos, materia seca y energía de las dietas experimentales, se determinaron de acuerdo al principio de sustitución de Cho y Slinger (1979). Fue necesario calcular el CDA de materia seca de las dietas para la determinación de la digestibilidad de los nutrientes de los ingredientes, el cual se llevó a cabo mediante el método indirecto descrito en Hernández *et al.* (2010), incorporando en las dietas el marcador Cr₂O₃ a razón de 0.5%.

$$\text{CDA ms} = 100 - \left[\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ dieta}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ heces}} \right] * 100$$

CDA ms= coeficiente de digestibilidad aparente de materia seca.

$$\text{CDA}_{\text{dieta}} = 100 - \left\{ \left[\frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ alimento}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ heces}} \right] \left[\frac{\% \text{Nutriente heces}}{\% \text{Nutriente alimento}} \right] \right\}$$

CDA dieta = coeficiente de digestibilidad aparente de la dieta

% Cr₂O₃ alimento = porcentaje de óxido de cromo en el alimento

% Cr₂O₃ heces= porcentaje de óxido de cromo en las heces

% Nutriente heces = porcentaje del nutriente a evaluar en las heces

% Nutriente alimento = porcentaje del nutriente a evaluar en el alimento

6.13. Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a una prueba de homogeneidad de varianzas y de normalidad. Los porcentajes de tasa de crecimiento, supervivencia, índices biológicos, hematocrito y óxido de cromo se transformaron a arcoseno ($x^{1/2}$) con el fin de cumplir con el supuesto de normalidad. En el caso de los datos normales, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% ($P < 0.05$), siendo las diferencias entre medias comparadas

por el test de Tukey (Zar 1984). Para los datos que no resultaron normales se empleó la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos de crecimiento y nivel de reemplazo se ajustaron a una función polinomial de segundo orden o cuadrática para un diseño experimental “dosis:respuesta” (Quinn y Keough, 2002).

VII. RESULTADOS

7.1 Perfil de aminoácidos

Se realizó la cuantificación de aminoácidos en los ingredientes proteicos para posteriormente hacer la formulación adecuada para el pargo flamenco (Tabla 3). Se observa que la harina de pescado y la harina de krill son los ingredientes que presenta un perfil de aminoácidos elevados comparados con harina de calamar y el gluten de maíz, en éste último los AA's esenciales de lisina y metionina se presentan en cantidades menores, por lo que fue necesario incorporarlos en las dietas GM-80 y GM-100.

Tabla 3. Composición de aminoácidos esenciales de los ingredientes proteicos.

AA g 100g ⁻¹ de proteína	Materias primas			
	H. Pescado	H. Calamar	H. Krill	Gluten de maíz
Histidina	2.98±2.13	1.36±0.82	3.49±0.65	1.87±0.35
Arginina	5.79±0.64	5.18±0.61	6.88±1.71	3.04±0.47
Treonina	2.77±0.26	2.55±0.46	5.07±1.72	4.54±0.57
Tirosina	3.51±0.22	2.53±0.37	4.47±1.33	3.75±0.52
Metionina	3.32±0.67	2.28±0.58	2.41±0.45	1.57±0.13
Valina	4.99±0.37	3.07±0.68	4.35±1.67	3.48±0.38
Fenilalanina	5.02±0.06	3.57±0.17	5.61±1.43	5.64±0.68
Isoleucina	4.11±0.25	2.87±0.74	3.94±1.44	2.77±0.31
Leucina	9.69±0.27	7.37±0.59	10.14±2.76	15.19±1.87
Lisina	10.65±0.35	6.08±1.28	8.06±2.02	1.09±0.16

Para la verificación de un balance de AA's lisina y metionina, se analizaron las dietas experimentales después de ser elaboradas (Tabla 4). En los resultados, no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en el contenido de lisina y metionina en ninguna de las seis dietas.

Tabla 4. Determinación del perfil de aminoácidos esenciales (g AA por 100 g de proteína) de las dietas experimentales en base seca.

AA g 100g ⁻¹ de proteína	Pargo	Dietas					
		GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
Histidina	1.9	5.85±5.74 ^a	6.69±0.97 ^a	3.95±0.12 ^a	3.90±0.33 ^a	3.84±0.05 ^a	4.04±0.63 ^a
Arginina	5.9	22.26±1.71 ^a	14.78±2.00 ^d	14.99±0.51 ^c	18.50±0.83 ^b	20.04±0.60 ^{ab}	20.89±1.25 ^{ab}
Treonina	2.3	5.82±0.14 ^a	5.05±0.31 ^b	4.70±0.39 ^{ab}	4.18±0.45 ^{ab}	4.21±0.26 ^{ab}	3.65±0.16 ^{ab}
Tirosina	1.5	2.21±0.56 ^b	9.23±4.06 ^a	3.00±0.17 ^{ab}	2.83±0.14 ^b	2.83±0.16 ^b	2.65±0.32 ^b
Metionina	2.4	4.38±1.47 ^a	5.35±1.75 ^a	3.68±0.03 ^a	3.38±0.06 ^a	3.57±0.26 ^a	3.51±0.15 ^a
Valina	4.9	1.79±0.37 ^b	3.52±0.03 ^b	3.15±0.02 ^a	2.12±0.09 ^b	1.71±0.17 ^b	2.03±0.35 ^b
Fenilalanina	5.4	4.77±1.09 ^a	8.23±0.10 ^{ab}	4.26±0.07 ^{ab}	3.83±0.18 ^{ab}	3.62±0.26 ^b	3.60±0.31 ^b
Isoleucina	4.3	0.76±0.30 ^c	2.34±0.75 ^{bc}	2.06±0.12 ^a	1.61±0.07 ^{ab}	1.23±0.10 ^b	1.29±0.19 ^b
Leucina	7.0	5.10±0.64 ^c	5.23±0.10 ^d	8.42±0.13 ^a	7.38±0.40 ^{ab}	6.89±0.55 ^b	7.00±0.45 ^b
Lisina	6.0	6.60±0.81 ^a	7.80±0.06 ^a	7.93±0.3 ^a	7.41±0.24 ^a	7.49±0.53 ^a	7.92±0.33 ^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. Superíndices iguales para cada parámetro denotan que no existen diferencias significativas (P>0.05).

7.2. Análisis proximal corporal

Los resultados de la composición proximal corporal de los peces iniciales fueron: proteína cruda 16.13±0.02, lípidos crudos 7.68±0.08, ceniza 4.97±0.05, humedad 70.1±0.03. En la Tabla 5 se presentan los resultados de carcasa final realizados a cada uno de los tratamientos al finalizar el bioensayo de crecimiento. Se muestra que el contenido de proteína cruda, lípidos crudos, humedad y ceniza en los peces de los seis tratamientos presentaron diferencias significativas (P<0.05). De forma similar se registró para el ELN en donde las dietas GM-80 y GM-100 fueron estadísticamente más bajas al resto (P<0.05).

Tabla 5. Composición proximal corporal del pargo flamenco al final del experimento de alimentación (valores promedios \pm SD expresados en base húmeda).

Composición proximal	Dietas					
	GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
Proteína cruda	16.58 \pm 0.05 ^e	16.33 \pm 0.08 ^f	16.86 \pm 0.02 ^d	17.12 \pm 0.01 ^c	17.53 \pm 0.03 ^b	17.69 \pm 0.06 ^a
Lípidos crudos	12.63 \pm 0.03 ^a	12.35 \pm 0.03 ^b	11.89 \pm 0.16 ^c	9.40 \pm 0.09 ^e	10.23 \pm 0.02 ^d	10.00 \pm 0.06 ^d
Cenizas	4.16 \pm 0.10 ^b	3.79 \pm 0.14 ^c	4.37 \pm 0.05 ^b	5.11 \pm 0.07 ^a	4.92 \pm 0.01 ^a	4.96 \pm 0.05 ^a
Humedad	65.26 \pm 0.05 ^d	66.30 \pm 0.10 ^b	65.47 \pm 0.05 ^c	67.05 \pm 0.06 ^a	66.55 \pm 0.05 ^b	66.41 \pm 0.01 ^b
ELN	1.36 \pm 0.05 ^a	1.23 \pm 0.14 ^a	1.41 \pm 0.15 ^a	1.30 \pm 0.08 ^a	0.76 \pm 0.05 ^b	0.93 \pm 0.05 ^b

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. ELN (Extracto libre de nitrógeno) ELN = 100-(% humedad + % proteína cruda + % lípidos crudos + % ceniza). Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas (P<0.05).

7.3. Evaluación biológica

En la Tabla 6, se presentan los resultados de crecimiento y eficiencia alimentaria de los organismos después de 10 semanas de ser alimentados con su respectiva dieta experimental.

Tabla 6. Parámetros de crecimiento y eficiencia del alimento en pargo flamenco durante 10 semanas de experimentación.

Parámetros	Dietas					
	GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
PI (g)	31.20±0.05 ^a	31.29±0.10 ^a	31.38±0.20 ^a	31.28±0.12 ^a	31.57±0.30 ^a	31.28 ^a ±0.14 ^a
PF (g)	117.93±12.93 ^a	120.29±2.52 ^a	115.48±3.09 ^{ab}	106.70±7.63 ^{abc}	97.23±6.48 ^{bc}	90.60±3.87 ^c
PG (g)	86.73±12.91 ^a	89.00±2.43 ^a	84.10±2.91 ^{ab}	75.41±7.56 ^{abc}	65.66±6.27 ^{bc}	59.32±3.74 ^c
TC (%)	277.96±41.72 ^a	284.46±6.98 ^a	267.93±7.70 ^a	241.04±23.64 ^{ab}	207.89±18.49 ^b	189.63±11.15 ^b
TCE (% día ⁻¹)	1.89±0.16 ^a	1.92±0.03 ^a	1.86±0.03 ^a	1.75±0.10 ^{ab}	1.60±0.09 ^b	1.52±0.05 ^b
CAI (g)	112.89±4.72 ^a	126.20±12.18 ^a	118.86±14.23 ^a	114.74±8.97 ^a	105.21±7.67 ^a	107.66±13.11 ^a
TCA	1.46±0.16 ^b	1.42±0.13 ^b	1.41±0.13 ^b	1.63±0.06 ^{ab}	1.70±0.26 ^{ab}	1.91±0.10 ^a
S (%)	84.44±3.85 ^a	91.11±3.85 ^a	91.11±7.70 ^a	86.67±0.00 ^a	91.11±10.18 ^a	86.67±6.67 ^a
IEP	1.33±0.15 ^a	1.38±0.12 ^a	1.38±0.14 ^a	1.17±0.05 ^{ab}	1.13±0.17 ^{ab}	0.98±0.05 ^b

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. Simbología: PI=Peso Inicial, PF= Peso Final, PG = Peso Ganado; TC= Tasa de Crecimiento; TCE = Tasa de Crecimiento Específico; CAI = Consumo de Alimento Individual total, TCA = Tasa de Conversión Alimenticia, S = Supervivencia; IEP = Índice de Eficiencia Proteica. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas (P<0.05)

7.3.1. Peso final

En la Tabla 6 se observa que el peso promedio final de los peces alimentados con la dieta GM-20 fue más alto, sin embargo no presentó diferencias significativas con la dieta GM-0, GM-40 y GM-60.

7.3.2. Peso ganado

La Figura 6 se observa que a partir de la sexta semana, el efecto de las dietas en los organismos muestra una separación entre las seis dietas experimentales. Al finalizar las diez semanas, los peces alimentados la dieta GM-20 presentaron un mayor peso promedio en comparación con los organismos alimentados con las dietas GM-80 y GM-100, los cuales mostraron el más bajo crecimiento ($P < 0.05$).

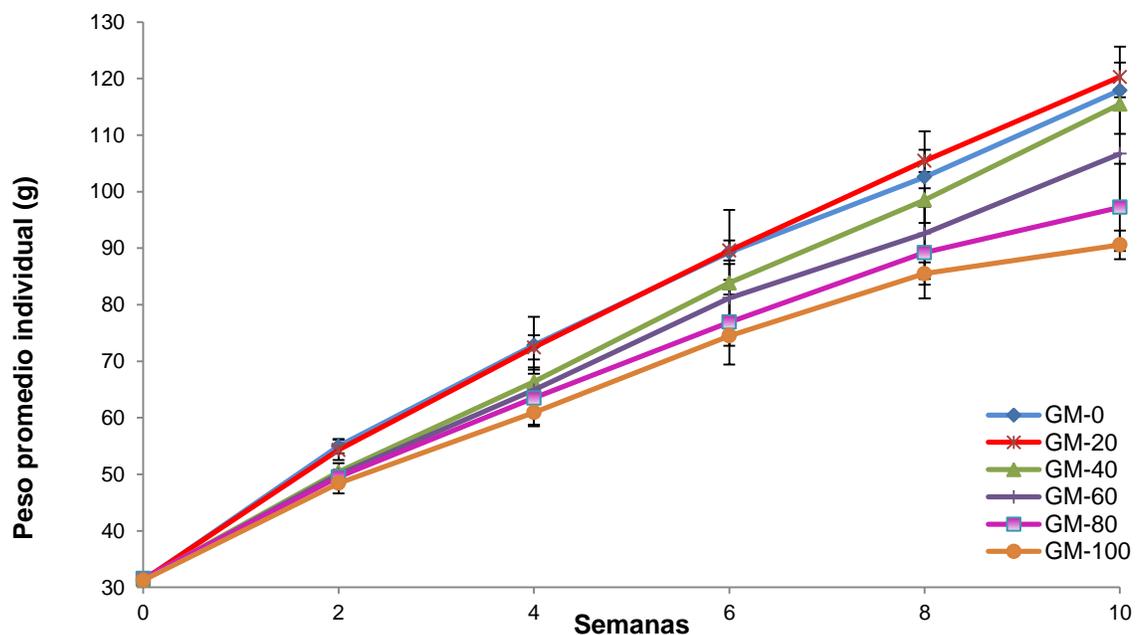


Figura 6. Incremento en peso promedio del pargo flamenco a lo largo del tiempo, alimentado con las dietas experimentales durante 10 semanas.

7.3.3. Tasa de crecimiento

La TC de los organismos se representa en la Tabla 6, donde se observa que la GM-20 tuvo mejor resultado en crecimiento sin embargo, sólo mostró diferencias significativas con la GM-80 y GM- 100.

7.3.4. Tasa de crecimiento específica

La TCE de los peces fue mejor en la dieta GM-20 ($1.92 \pm 0.03\% \text{ d}^{-1}$) la cual, no presentó diferencias significativas con las dietas GM-0, GM-40 y GM-60; no obstante, GM-60 resultó estadísticamente igual ($P > 0.05$) al TCE de las dietas GM-80, GM-100 ($1.52 \pm 0.05\% \text{ d}^{-1}$) (Tabla 6).

7.3.5. Consumo de alimento individual

En la Tabla 6 se observa que no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre consumo de alimento individual de los distintos tratamientos, el consumo más alto fue por los organismos alimentados con la dieta GM-20 ($126.20 \pm 12.18 \text{ g}$) y el menor por los de la dieta GM- 80 ($105.21 \pm 7.67 \text{ g}$).

7.3.6. Tasa de conversión alimenticia

Los organismos de la dieta GM-40 obtuvieron el mejor valor de TCA (1.41 ± 0.13), ya que fue el más bajo; sin embargo, no fue estadísticamente diferente con las dietas: GM-0, GM-20, GM-60 y GM-80. La dieta GM-100 presentó el valor de TCA más alto (1.91 ± 0.10) y no presentó diferencias significativas con los tratamientos GM-60 y GM-80 (Tabla 6).

7.3.7. Supervivencia

En la Tabla 6, se representan los valores promedio de supervivencia de los organismos. No se mostraron diferencias significativas entre los seis tratamientos variando de un porcentaje de 84.44 ± 3.85 (GM-0) a 91.11 ± 3.85 (GM-20) después de los 70 días.

7.3.8. Índice de eficiencia proteica

El IEP fue más alto en la dieta GM-20 con un resultado de 1.38 ± 0.12 , sin embargo, no se mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) hasta la dieta GM-80. El nivel más bajo de la relación entre la masa corporal de los organismos y la proteína dietaria suministrada se presentó en la dieta GM-100 con un valor de 0.98 ± 0.05 , la cual, no presentó diferencias significativas con la dieta GM-80 (Tabla 6).

7.3.9. Nivel óptimo de inclusión

La Figura 7 muestra la función polinomial de segundo orden que relaciona el nivel de reemplazo de HP por GM con la tasa de crecimiento. El 96.96% de variabilidad es explicada por el modelo $y = -0.0085x^2 - 0.148x + 283.37$ y revela que el nivel de reemplazo que logra el mayor crecimiento se encuentra entre los rangos 15 al 40% de inclusión de GM.

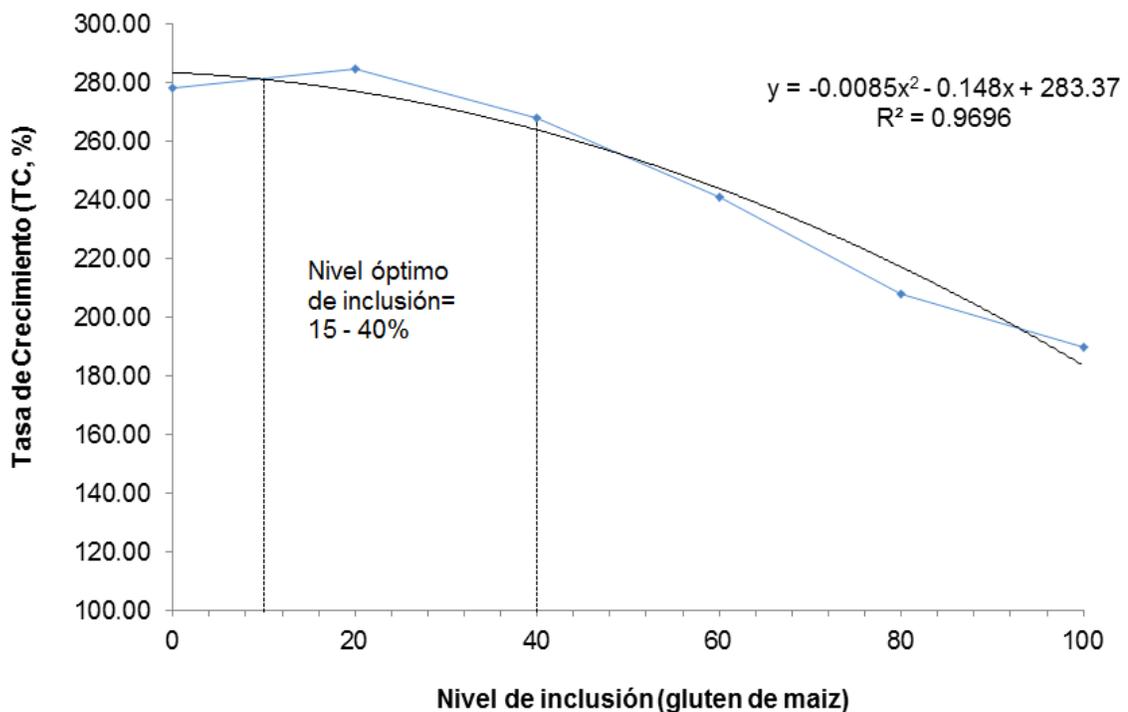


Figura 7. Análisis de regresión polinomial de segundo orden que ajusta el nivel de inclusión del gluten de maíz con la tasa de crecimiento.

7.4. Índices biológicos corporales

Los resultados de los índices biológicos corporales: factor de condición (FC), índice hepatosomático (HSI), índice viscerosomático (VSI) y relación de grasa intraperitoneal (RGI), de los siete tratamientos experimentales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Índices biológicos del pargo flamenco alimentado con las dietas experimentales por 10 semanas.

Índices biológicos (%)	Dietas					
	GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
FC ¹	1.78±0.08 ^a	1.73 ±0.13 ^a	1.72 ±0.11 ^a	1.68±0.15 ^a	1.65±0.09 ^a	1.66±0.12 ^a
HSI ²	1.60±0.31 ^a	1.77±0.24 ^a	1.52±0.24 ^a	1.88±0.41 ^a	1.75±0.23 ^a	1.86±0.47 ^a
VSI ³	4.25±0.41 ^c	4.64±0.30 ^{abc}	4.42±0.42 ^{bc}	5.12±0.82 ^{ab}	4.87±0.59 ^{abc}	5.49±0.69 ^a
RGI ⁴	6.80±1.63 ^a	5.48±1.35 ^a	4.11±2.37 ^a	5.78±3.08 ^a	4.85±1.62 ^a	4.62±2.86 ^a

¹ FC (Factor de condición), ² HSI (Índice hepatosomático), ³ VSI (índice viscerosomático) y ⁴ RGI (relación de grasa intraperitoneal). Los valores son la media y desviación estándar de n=8. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas (P<0.05).

7.4.1. Factor de condición

El FC mostró una tendencia a disminuir entre los tratamiento, el más bajo resultó en la dieta GM-80 (1.65±0.09) y el más alto en la dieta GM-0 (1.78±0.08), aun así, no existieron diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos (Tabla 7).

7.4.2. Índice hepatosomático

En la Tabla 7, se presenta la relación del peso del hígado con respecto al peso del cuerpo en los organismos, no se observaron diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos. La dieta en la que se presentó una menor proporción del índice fue la dieta GM-40 (1.52±0.24).

7.4.3. Índice viscerosomático

El porcentaje del paquete visceral fue estadísticamente diferentes entre los tratamientos ($P < 0.05$), el porcentaje promedio más bajo fue en la dieta a base de harina de pescado GM-0 (4.25 ± 0.41) y el más alto la dieta GM-100 (5.49 ± 0.69) (Tabla 7).

7.4.4. Relación de grasa intraperitoneal

Los peces con más proporción de grasa intraperitoneal promedio correspondieron a los alimentados con la dieta GM-0 (6.80 ± 1.63) y la menor GM-40 (4.11 ± 2.37) (Tabla 7). No obstante, las diferencias no fueron significativas ($P > 0.05$) en RGI entre los seis tratamientos.

7.5. Evaluación económica

Se determinó el costo unitario de alimentación (CUA) de las dietas experimentales GM-0, GM-20, GM-40, GM-60, GM-80 y GM-100, sólo se consideraron las principales fuentes proteicas del estudio: la harina de pescado y el gluten de maíz, sin considerar el costo unitario de los micro-ingredientes. Para calcular el índice de ganancia (IG) se consideró que actualmente el kilogramo de pargo flamenco en el mercado es de aproximadamente \$75.00 (MXN) (Tabla 8).

Se observa que la sustitución de HP por GM disminuye el costo de la dieta, generando mayores índices de ganancia con inclusiones de proteína vegetal (GM).

Tabla 8. Evaluación económica de las inclusiones de gluten de maíz y dieta sin gluten.

Ingredientes	Costo MXN. (Kg)					
	GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
Harina de pescado	9.86	7.89	5.92	3.82	1.97	0
Gluten de maíz	0	1.16	2.33	3.49	4.65	5.81
Total	9.86	9.05	8.25	7.31	6.62	5.81
TCA	1.46	1.42	1.41	1.63	1.7	1.91
CUA (MXN)	14.40	12.85	11.63	11.92	11.25	11.10
IG (MXN)	5.21	5.84	6.45	6.29	6.67	6.76

7.6. Parámetros hematológicos

La Tabla 9 representa los parámetros hematológicos del pargo flamenco después de 10 semanas de bioensayo de alimentación. Se incluyen los valores del análisis de los organismos antes de comenzar el bioensayo de crecimiento.

7.6.1. Triglicéridos

Existieron variaciones entre los datos arrojados para el nivel de triglicéridos en los organismos. En el análisis estadístico, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para todas las dietas, la dieta con nivel más elevado estadísticamente fue la GM-40 ($248.53 \pm 56.7 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$) y la más baja perteneció a los organismos de la dieta GM-60 con $409.94 \pm 195.1 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ (Tabla 9).

7.6.2. Colesterol

Los niveles de colesterol en plasma variaron significativamente ($P < 0.05$) (Tabla 9). Los peces alimentados con la dieta GM-80 ($312.81 \pm 85.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y GM-100 ($324.61 \pm 79.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) fueron los que presentaron un menor nivel. La dieta GM-60 no presentó diferencias con ninguno de los tratamientos. Los alimentados con la dieta GM-20 ($490.61 \pm 70.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) arrojaron el nivel más alto de colesterol.

Tabla 9. Parámetros hematológicos del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) alimentado con dietas experimentales por 10 semanas.

Parámetros	Peces iniciales	Dietas					
		GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
Triglicéridos (mg·dl ⁻¹)	326.25±54.0	289.01±57.9 ^{ab}	402.63±319.9 ^{ab}	248.53±56.7 ^a	409.94±195.1 ^b	319.27±105.4 ^{ab}	448.72±180.5 ^b
Colesterol (g·L ⁻¹)	335.52±41.2	458.84±41.5 ^a	490.61±70.2 ^a	479.31±84.1 ^a	409.83±62.2 ^{ab}	312.81±85.6 ^b	324.61±79.9 ^b
Glucosa (mg·dl ⁻¹)	272.16±46.8	163.04±26.7 ^a	166.30±20.5 ^a	168.59±31.3 ^a	182.52±43.6 ^a	175.04±19.6 ^a	176.04±21.1 ^a
Hematocrito (%)	56±4.0	73.8±8.46 ^a	80.7±10.54 ^a	70.4±8.42 ^{ac}	61.55±5.73 ^{bc}	55.8±7.39 ^{bd}	44.6±10.46 ^d
Proteína (g·L ⁻¹)	48.16±3.4	58.89±6.1 ^{ab}	64.28±5.9 ^a	62.75±5.0 ^a	60.71±6.1 ^a	51.89±7.1 ^b	51.97±4.6 ^b
Hemoglobina (g·dl ⁻¹)	9.40±1.3	7.78±1.5 ^a	7.70±1.7 ^a	8.24±1.3 ^a	7.91±2.9 ^a	6.95±1.4 ^{ab}	4.47±1.7 ^b

Los valores son la media y desviación estándar de n=10. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas (P<0.05).

7.6.3. Glucosa

El nivel de glucosa no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) entre ninguno de los tratamientos al final del bioensayo, siendo la dieta GM-60 la que arrojó el valor más alto ($182.52\pm 43.6 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$). Sin embargo, la glucosa de los peces iniciales fue más elevada ($272.16\pm 46.8 \text{ mg}\cdot\text{dl}^{-1}$) que los organismos que recibieron tratamientos (Tabla 9).

7.6.4. Hematocrito

En la Tabla 9, se presenta el porcentaje de hematocrito en sangre; los peces alimentados con los tratamientos GM-0, GM-20, GM-40 no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) entre sí. Sin embargo, hubo una disminución entre los otros porcentajes; la dieta GM-40 ($70.4\pm 8.42 \%$) no presentó diferencias con la dieta GM-60 ($61.55\pm 5.73 \%$), así mismo, la dieta GM-60 fue significativamente igual a la dieta GM-80 ($55.8\pm 7.39 \%$) y GM-100 ($44.6\pm 10.46 \%$) fue significativamente igual a la dieta GM-80.

7.6.5. Proteína plasmática

En la Tabla 9, se observa que aumentó el nivel hasta un $64.28\pm 5.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el tratamiento GM-20 comparado con los peces iniciales ($48.16\pm 3.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0.05$) la proteína más baja fueron los de la dieta GM-80 ($51.89\pm 7.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), la cual no presentó diferencias ($P>0.05$) con las dietas GM-100 y GM-0.

7.6.6. Hemoglobina

Entre los niveles de hemoglobina hasta la dieta GM-80 no existieron diferencias significativas ($P>0.05$). No obstante, en los organismos alimentados con la dieta GM-100 ($4.47\pm 1.7 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$) se observó una disminución considerable ($P<0.05$) comparada con el resto de los tratamientos (Tabla 9).

7.7. Digestibilidad de nutrientes

7.7.1. Óxido de cromo en heces

En la Figura 8, se presenta el resultado de los contenidos porcentuales de óxido de cromo de heces de cada una de las muestras de los seis tratamientos. Se puede observar que el menor porcentaje de óxido de cromo fue del tratamiento GM-100 (0.65 ± 0.03 %) significativamente diferente a la dieta GM-0 y GM-20. El valor más alto encontrado fue en la dieta GM-20 (0.98 ± 0.02 %) estadísticamente igual a GM-0, GM-40 y GM-60.

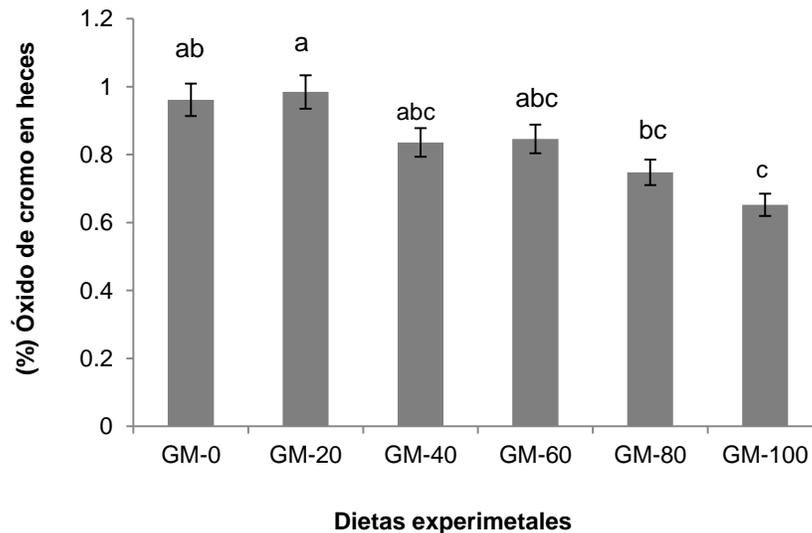


Figura 8. Resultado de óxido de cromo en heces de los seis tratamientos experimentales. Los datos son una media con una $n=3$. Superíndice distinto denota diferencia significativa entre los tratamientos ($P<0.05$).

7.7.2. Coeficiente de digestibilidad aparente *in vivo* de proteína cruda (CDA-PC), lípidos crudos (CDA-LC) materia seca (CDA-MS) y energía (CDA-E).

Los resultados de CDA-PC se muestran en la Tabla 10, el porcentaje más elevado fue en la dieta GM-20 (85.28 ± 0.18 %) la cual, sólo presentó diferencias

significativas ($P>0.05$) con GM-40 ($81.35\pm 0.36\%$); sin embargo, ésta última tampoco tuvo diferencias ($P>0.05$) con las dietas GM-0, GM-60, GM-80 y GM-100.

La dieta GM-0 ($99.66\pm 0.0\%$) presentó el valor más alto de porcentaje de lípidos crudos, sin haber diferencias estadísticas con GM-20. El CDA-LC en los tratamientos GM-60 y GM-80 no presentaron diferencias significativas entre sí, ni con el resto de los tratamientos. El más bajo CDA-LC se observó en GM-100 ($95.41\pm 0.27\%$) que fue diferente ($P<0.05$) con la dieta GM-0 y GM-20. (Tabla 11).

En la Tabla 10, el CDA-MS no presenta diferencias significativas de GM-0 ($55.64\pm 0.24\%$) y la dieta GM-20 ($52.42\pm 0.58\%$). Se presentó una notable disminución de materia seca en el resto de los tratamientos ya que el porcentaje más bajo significativamente resultó en GM-100 ($14.78\pm 5.10\%$). El CDA de energía en las dietas redujo significativamente ($P<0.05$) conforme aumentaba la inclusión de GM resultando con los niveles más bajos los tratamientos GM-80 ($76.62\pm 2.15\%$) y GM-100 ($75.76\pm 1.45\%$).

Tabla 10. Coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda, lípidos crudos, materia seca y energía de las dietas experimentales.

CDA (%)	Dietas					
	GM-0	GM-20	GM-40	GM-60	GM-80	GM-100
Proteína cruda	84.14 ± 0.09^{ab}	85.28 ± 0.18^a	81.35 ± 0.36^b	83.41 ± 0.22^{ab}	83.35 ± 1.53^{ab}	83.09 ± 1.01^{ab}
Lípidos crudos	99.66 ± 0.0^a	99.26 ± 0.0^{ab}	97.68 ± 0.04^{bc}	98.37 ± 0.02^{abc}	98.87 ± 0.10^{abc}	95.41 ± 0.27^c
Materia seca	55.64 ± 0.24^a	52.42 ± 0.58^a	35.20 ± 1.25^{bc}	41.29 ± 0.77^b	30.04 ± 6.43^c	14.78 ± 5.10^d
Energía	84.86 ± 0.08^a	83.75 ± 0.2^{ab}	79.04 ± 0.41^{ab}	82.45 ± 0.23^{ab}	76.62 ± 2.15^b	75.76 ± 1.45^b

Los datos son la media y desviación estándar de $n=3$. Los valores con superíndices diferentes denotan que se presentaron diferencias significativas entre los tratamiento ($P<0.05$). Energía (kcal/g) fue calculada en función de los valores fisiológicos de proteína, 5.7 kcal/g; lípidos, 9.4 kcal/g; y extracto libre de nitrógeno, 4.1 kcal/g (Shiau and Chou, 1991).

VIII. DISCUSIONES

En el presente estudio, el reemplazo de la proteína de harina de pescado por el gluten de maíz en la alimentación para juveniles de pargo flamenco, demostró que hasta un nivel de 40% existe un efecto positivo en los índices biológicos, el estado de salud y la digestibilidad aparente de nutrientes.

8.1. Determinación de aminoácidos esenciales

Normalmente la sustitución total de la proteína de pescado por el GM o la harina de soya en la alimentación de la lubina europea y el pargo flamenco respectivamente; no es propiamente asimilada por estos peces carnívoros, debido a las deficiencias de los aminoácidos lisina y metionina (Regost *et al.*, 1999; Silva-Carrillo *et al.*, 2011).

En éste estudio, se suplementaron los aminoácidos de lisina y metionina como ingredientes exógenos en las dietas GM-80 y GM-100, ya que en el gluten de maíz se encontraron deficiencias en ambos. Por lo que no se mostraron desequilibrios relevantes entre las dietas, y de esa forma, no disminuyó la TCA de los organismos al asimilarse los AA's de manera adecuada.

De igual modo, en un experimento con lubina europea (especie carnívora) Messina *et al.* (2013) evaluaron tres proteínas vegetales (gluten de trigo, guisantes y soya) conforme se sustituía la proteína de HP, se adicionaron aminoácidos; encontraron que una sustitución de hasta el 70% de HP por harina de gluten de trigo en dietas no afecta la ingesta de alimento ni el crecimiento del organismo.

8.2. Análisis proximal de la carcasa de los organismos

Se buscó que las dietas tuvieran un equilibrio de macronutrientes, lo que repercutió positivamente en el crecimiento y la utilización del alimento. En los resultados de la composición proximal en la carcasa de juveniles de pargo flamenco, hubo respuesta positiva en la fijación de proteína en los organismos de los distintos tratamientos, ya que se presentó una tendencia a aumentar su nivel. Resultado que concuerda con Silva-Carrillo *et al.* (2011) quienes encontraron en la misma especie (*Lutjanus guttatus*) un nivel de proteína más alto con el aumento de la harina de soya comparado con su dieta control al ser asimilada por el organismo.

La disminución de los lípidos crudos en la carcasa final conforme aumentaba la inclusión de proteína vegetal en las dietas en el presente estudio, pudo deberse a que se el organismo satisficó su requerimiento energético y también que el aminoácido de lisina no fue deficiente, por lo que desempeñó adecuadamente la biosíntesis de carnitina (Bremer, 1990). Ya que la presencia de lisina en el organismo, disminuye el contenido total de los lípidos en el músculo como se presentó en los organismos del presente estudio. Éstos resultados concuerdan con los descritos por Silva *et al.* (2011) en pargo flamenco, donde los lípidos crudos disminuyen significativamente en las dietas con un reemplazo de 60% de harina de soya con adición de AA's, aunque ellos atribuyen el bajo contenido de lípidos a la reducción de peso de los peces. Del mismo modo, en lubina europea, Dias *et al.* (2005) reportan que una sustitución de HP por GM hasta un 80% suplementadas con aminoácidos en las dietas no afectaron la composición del cuerpo de los organismos.

No obstante, en juveniles de bagre rayado (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Güroy *et al.*, 2012) y lubina japonesa (Men *et al.*, 2014) los organismos alimentados con dietas que contenían los niveles más altos de GM (75 y 100% de sustitución proteica respectivamente) presentaron de manera significativa niveles elevados de lípidos en carcasa; donde Güroy *et al.* (2012) atribuyen que

posiblemente afectó la reducción del nivel de lisina y otros AA's en relación con el aumento de la inclusión GM en las dietas.

8.3. Evaluación biológica nutricional

En el presente estudio, se logró una sustitución de hasta un 60% de la proteína de HP por la proteína de GM hasta (que equivale al 33.55% del material en la formulación), ya que no se encontraron diferencias significativas en los parámetros biológicos de crecimiento (PF y TCE) del *Lutjanus guttatus*.

Estudios realizados con diferentes especies de peces carnívoros, muestran al igual que en el presente trabajo que el GM puede sustituir una proporción importante de la dieta a base de proteína de HP sin obstaculizar el crecimiento y la eficiencia del alimento (Regost *et al.*, 1999; Men *et al.*, 2014), mientras que las dietas con alto contenido de GM sean complementadas con aminoácido lisina.

En el presente estudio, la TCE de los organismo alimentados con las dietas hasta la GM-60 no mostraron diferencias; indicadores similares presentaron Men *et al.* (2014) quienes suplementaron AA's cristalinos en las dietas para lubina japonesa, demostraron que se puede sustituir la HP hasta en un 60% por el GM (33.6% como ingrediente en su formulación) sin afectar la TCE; coincidiendo con Pereira y Oliva-Teles (2003), quienes señalan que la proteína de HP pudo reemplazarse hasta un 60% por GM en las dietas para juveniles de dorada sin mostrar efectos negativos sobre el rendimiento de los organismos.

Considerando fuentes proteicas vegetales en dietas para pargo flamenco, recientemente Olmeda-Guerrero (2014) realizó un estudio en el cuál demostró que la proteína de la harina de canola puede sustituir hasta en un 30% a la proteína de la HP sin afectar los parámetros biológicos de crecimiento; sin embargo, los resultados de la TCE de los organismos en su estudio (1.65 ± 0.03 ,

1.61±0.05 y 1.55±0.02) al sustituir 15, 30 y 45 % de la proteína de HP por harina de canola fueron inferiores a los arrojados en el presente estudio.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en el CAI probablemente porque existió un balance de nutriente cumpliendo con el requerimiento para *Lutjanus guttatus*. Sin embargo, se observó una tendencia a disminuir el consumo de las dietas conforme aumentaba el nivel de inclusión, posiblemente por los altos niveles de energía en las dietas. Los resultados difieren con los obtenidos por Sánchez-Rodríguez (2013) quien determinó para la misma especie de pargo (*Lutjanus guttatus*) una sustitución de HP por una mezcla proteica de harinas soya-krill. Encontró que el CAI disminuye significativamente en un reemplazo del 30% de harina de soya en la formulación.

La misma tendencia se presentó en bagre rayado (Güroy *et al.*, 2012) donde disminuyó la TCE (1.11±0.02 a 0.46±0.05) hasta un reemplazo total de HP por GM y la TCA aumentó (de 1.07±0.05 a 2.84±0.33). No obstante, Kikuchi (1999) cuando sustituyó la HP por proteína de GM (equivalente al 43.0% del material en la formulación) observó que la alimentación del lenguado japonés fue considerablemente menor a su dieta control.

La supervivencia no varió estadísticamente entre los tratamientos del presente estudio. Los resultados obtenidos fueron más bajos a los presentados por Men *et al.* (2014) quienes alimentaron lubina japonesa con un 75% de reemplazo de HP por GM y no mostraron diferencias (98.67% de S); considerando que su bioensayo se llevó a cabo en jaulas flotantes, donde las condiciones ambientales probablemente fueron más favorables que en condiciones de cautiverio.

En las dietas GM-60, GM-80 y GM-100, se muestra la disminución significativa del IEP conforme disminuyó la proteína de la HP. Resultados

similares al presente estudio se observaron en la dorada (Robaina et al 1997.), rodaballo (Regost *et al.*, 1999), lenguado japonés (Kikuchi, 1999) y bagre rayado (Güroy *et al.*, 2012) al aumentar en sus dietas la proteína de GM por la HP disminuye el IEP. Ya que, el aprovechamiento del alimento está relacionado con el nivel de proteína incluida en la dieta y la disponibilidad de las fuentes de energía (lípidos y/o carbohidratos) que pudieron ser consumidos por los organismo efectuando un "ahorro de proteínas " (Yun *et al.*, 2014).

8.3 Índices biológicos corporales

Las dietas tuvieron una respuesta positiva en el organismo a pesar de ser una especie carnívora, ya que el FC y RGI no se vieron afectados por la sustitución de la proteína de pescado por el GM (como en otros estudios Messina *et al.*, 2013). A pesar de que la energía calculada (ELN) proporcionada por las dietas experimentales, se elevó conforme aumentaba la inclusión de proteína vegetal, no se presentaron cambios en los índices. Por lo que los organismos posiblemente no sólo utilizaron la proteína como energía metabólica, sino también un porcentaje de carbohidratos proporcionados por el GM (Lewis *et al.*, 2008).

En el HSI no hubo diferencias entre los tratamientos. No obstante, se encontraron niveles más altos que en bagre rayado (Güroy *et al.*, 2012), los mismos autores reportan un aumento significativo en el VSI (9.64 ± 0.93) en la dieta con 100% de reemplazo de GM.

8.4. Parámetros hematológicos

Con respecto a los parámetros hematológicos no se han determinado niveles óptimos en especies marinas carnívoras. Sin embargo, es indispensable determinarlos, ya que por ejemplo los niveles de hemoglobina y hematocrito son indicadores importantes de salud de los peces. En el presente experimento, los resultados indican que la disminución en los valores hematológicos coincidió con el bajo rendimiento del crecimiento, especialmente en organismos

alimentados con las dietas donde disminuía la HP (GM 80 y 100). La hemoglobina de los organismos alimentados con GM-80 y GM-100, no se encontraron dentro de los intervalos señalados en pargo flamenco por Del Rio Zaragoza, *et al.* (2011). Los valores de hematocrito disminuyeron aunque coincidieron con los reportados por Del Rio Zaragoza, *et al.* (2011). Del mismo modo, en lenguado japonés disminuyó el hematocrito significativamente en la dieta con GM (43.0% de inclusión en su dieta) comparado con su dieta control a base de HP. Sin embargo, a diferencia de los resultados arrojados en el presente estudio, los niveles de triglicéridos en lenguado japonés disminuyeron (Kikuchi, 1999).

Güroy *et al.* (2012) explican mediante una hipótesis, que la disminución de hematocrito y hemoglobina en bagre rayado, pudo deberse a los niveles bajos de hierro en dietas con GM, en comparación con las dietas basadas en HP. Los niveles de hierro en GM son apreciablemente más bajos que los niveles de hierro de HP (con un contenido de aproximadamente 400-800 mg·kg⁻¹) (Watanabe *et al.*, 1997; Cheng y Hardy 2003). Tales signos de la deficiencia de hierro causa anemia hipocrómica microcítica, la cual, se manifiesta en un crecimiento reducido, mala conversión alimenticia y el porcentaje reprimido de hematocrito y hemoglobina que son notorio en peces alimentados con dietas con alto proteína vegetal (Lall, 2002).

Los autores Silva-Carrillo *et al.* (2012) y Sánchez- Rodríguez (2013) mencionan que no existió variación en ninguno de los parámetros hematológicos en estudios de la misma especie (*Lutjanus guttatus*) cuando los organismos se alimentaron con dietas a base de harina de pescado y con dietas a base de proteína vegetal; soya y una mezcla kril-soya respectivamente.

8.5. Digestibilidad de nutrientes y materia seca

El óxido de cromo en las heces disminuyó significativamente conforme aumentaba la inclusión de GM. De acuerdo a lo establecido por la NRC (2011);

la proteína de GM se considera de buena digestibilidad, lo cual se demuestra en el presente estudio, ya que hasta la dieta GM-60 no se mostraron diferencias. Cuando existe una mayor concentración de óxido de cromo en heces significa que el nutriente es más digestible. Esto se debe, a que el marcador se concentra en las heces y los nutrientes son absorbidos por el organismo.

El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) de proteína de los seis tratamientos sólo mostró diferencias entre dos de sus dietas; sin embargo, las altas inclusiones no afectaron. Coincidiendo con los resultados reportados por Robaina *et al.* (1997) y Pereira y Oliva-Teles (2003) en dorada, donde se demostró que la sustitución de proteína de HP por GM en las dietas no tuvo efectos adversos en el CDA de las proteínas. Por otro lado, en lubina japonesa (Men *et al.*, 2014) y lubina europea (Dias *et al.*, 2005), el CDA de proteína disminuyó significativamente en peces alimentados con dietas que contenían hasta un 75 y 80% de proteína a partir de GM respectivamente.

Respecto al CDA de lípidos y CDA de materia seca en el presente estudio, existió una disminución significativa de ambos coeficientes conforme aumentaba la inclusión de proteína vegetal. En contraste con los resultados reportados en lubina japonesa por Men *et al.* (2014) donde el CDA de lípidos incrementó con el aumento de los niveles de GM en el alimento en comparación con su grupo control, de la misma manera no encontraron diferencias significativas del CDA de materia seca entre los tratamientos dietéticos hasta un 75% de la proteína de GM.

Probablemente la disminución significativa del CDA de materia seca en las dietas con inclusión de la proteína vegetal; y de forma más notoria en GM-100, fue debido a que el reemplazo total de la HP disminuyó el contenido de ceniza (4.44 ± 0.05) en las dietas, por lo que favoreció la digestibilidad de los nutrientes (Tabla 3).

IX. CONCLUSIONES

- Con las dietas experimentales evaluadas se concluye, que un nivel de inclusión de hasta el 40% de la proteína de gluten de maíz en sustitución de la proteína de harina de pescado puede ser posible en la nutrición del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).
- Los índices corporales (FC, HSI, VSI y RGI) de los organismos no presentaron problemas por el reemplazo de la proteína de harina de pescado por la proteína de gluten de maíz, a pesar de ser una especie carnívora.
- Los organismos alimentados con dietas por debajo del 60% de inclusión de proteína vegetal, no manifestaron una variación en los parámetros hematológicos; no obstante, el aumento de la inclusión disminuyó los niveles de hematocrito y hemoglobina.
- El CDA de proteína más alto lo presentó la dieta con 20% de inclusión de la proteína de gluten de maíz. Sin embargo, los resultados fueron similares entre todas las dietas.
- El menor costo unitario de alimentación (precio de la dieta) para pargo flamenco, se obtuvo con las dietas que incluyen gluten de maíz y considerando la más baja tasa de conversión alimenticia, la mejor opción es la dieta con el 40% de reemplazo de HP por GM generando un índice de ganancia de 6.45 MXN.

X. RECOMENDACIONES

- Considerar la evaluación de otras fuentes vegetales como ingredientes proteicos alternos que poseen un buen valor nutritivo para sustituir a la harina de pescado como: la harina de guisantes, harina de semilla de lupino o harina de trigo.
- Evaluar parámetros histológicos en el hígado e intestino de pargo flamenco al utilizar dietas elaboradas con gluten de maíz para poder tener un panorama general del estado de salud y saber su efecto en los tejidos del organismo.
- Investigar sobre el efecto que tiene el gluten de maíz en la coloración del pargo flamenco, ya que al ser alimentados con las dietas experimentales a partir de un 60% de inclusión, mostraron una coloración amarilla que pudo ser, por la posible presencia de luteína. Esto desfavorece su aceptación comercial, ya que una de las características de la especie es su coloración rosa-rojiza en la piel.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdo de la Parra, I., Rodríguez-Ibarra, E.G., Hernández, C., Hernández-Mendoza, K., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I., García-Ortega, A., 2010. Effect of dietary and lipid level on growth performance and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 45(3):433-439.
- Allen GR. 1985. Snappers of the world an annotated and illustrated catalogue of lutjanide species known to date. *FAO Fisheries Synopsis* 125 (6): 1-208.
- AOAC, 2011. Association Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 14 th ed. The association: Arlington, VA, 1141 pp.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture* 13, 265–272.
- Bremer, J. 1990. The role of carnitine in intracellular metabolism. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* 28, 297-301.
- Catacutan, M. R., Pagador, G. E., Teshima, S. 2001. Effects of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal, 1755). *Aquaculture Research* 32, 811-818.
- Cheng, Z.J. y Hardy, R.W., 2003. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutr.*, 9, 77–83.
- Cho, C.Y., Slinger, S., 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for *rainbow trout*. In: Halver, J.E., Tiews, K. (Eds.), *Finfish Nutrition and fishfeed Technology*, vol. II. Heenemann GmbH, Berlín, pp. 239-247.

- Clifford, H. C., 1992. Marine shrimp pond management: a review. In: Wyban, J. (Ed.), Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming. World Aquaculture Society, 111-137.
- de la Higuera, M., García-Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suárez, M.D., Moyano, F.J., 1988. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout, (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 71, 37– 50.
- Del Rio-Zaragoza, O. B., Fajer-Ávila, E. J., Almazán-Rueda, P., Abdo de la Parra, M. I. 2011. Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. Tissue and Cell 43, 137-142.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Arzel, J., Corraze, G., Diez, A., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 2005. Dietary protein source affects lipid metabolism in the European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology 142, 19–31.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497– 509.
- Furukawa, H., 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 fed. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish 32(6):502-508.
- Güroy, B., Şahin, I., Kayali, S., Mantoglu, S., Canan, B., Merrifield, D., Davies, S., Güroy, D., 2012. Evaluation of feed utilization and growth performance of juvenile striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) fed diets with varying inclusion levels of corn gluten meal. Aquacult Nutr. 19; 258–266.
- Hernández, C., Varillas, P., Olvera-Novoa, M., Márquez, D., Hardy, R., González, B. 2010. Apparent digestibility of various protein ingredient in diets for spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. X Symposium International on Aquatic Nutrition. México.
- Hernández, C., Varillas, P., Olvera-Novoa, M., Márquez, D., González-Rodríguez, B., 2010. Apparent digestibility of various protein ingredient in diets for spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. X Simposio

- Internacional de Nutrición Acuícola. X Symposium on aquatic Nutrition. Noviembre 8-10, 2010. San Nicolás de la Garza, Nuevo León, México. Pp 67.
- Hepher, B., 1988. Nutrition of pond fishes. Cambridge University Press, Cambridge, G. B., 388 pp.
- Hopkins, K.D., 1992. Reporting fish growth: A review of the basics. J. World Aquac. Soc. 23(3):173-179.
- Ibarra-Castro, L., Duncan, N. J. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Aquaculture 272:737–746.
- Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L. 2009. An improved induced-spawning protocol for spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. The Israeli journal of aquaculture, 61 (2), 121-133.
- Kader Md. y Koshio S., 2012. Effect of composite mixture of seafood by-products and soybean proteins in replacement of fishmeal on the performance of red sea bream, *Pagrus major*. Aquaculture 368–369, 95–102.
- Lagler, K.F., 1978. Freshwater Fishery Biology, 2nd ed. Brown, WMC. Company Publishers, Dubuque, IA, USA.
- Lall, S. P., 2002. The minerals, In: Fish Nutrition, (Halver, J. E. & Hardy, R. W. eds), pp. 259–308. Elsevier Science, Orlando, FL.
- Lewis, H.A., Kohler, C.C., 2008. Corn gluten meal partially replaces dietary fish meal without compromising growth or fatty acid composition of sunshine bass. N. Am. J. Aquac. 70, 50–60.
- Kikuchi, K., 1999. Partial replacement of fish meal with corn gluten meal in diets for Japanese flounder *Paralichthys olivanceus*. J. World. Aquac. Soc., 30, 357–363.
- Men, K., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., 2014. Effects of dietary corn gluten meal on growth, digestion and protein metabolism in relation to IGF-I gene expression of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*. Aquaculture 428–429, 303–309.

- Messina, M., Piccolo, G., Tulli, F., Messina, C.M., Cardinaletti, G., Tibaldi, E., 2013. Lipid composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed diets containing wheat gluten and legume meals as substitutes for fish meal. *Aquaculture* 376-379, 6–14.
- Miller, C. L., Davis, D.A., Phelps, R. P. 2005. Effects of dietary protein and lipid on growth and body composition of juvenile red snapper *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture Research* 36: 52-60.
- National Research Council, N.R., 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academy, Washington.
- Nengas, I., Alexis, M.N., Davies, S.J. 1996. Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diets for the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture Research* 27, 147– 156.
- Olmeda- Guerrero, L. 2014. Diseño y evaluación de dietas a base de pasta de canola para la alimentación del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869): efecto en crecimiento, digestibilidad y estado de salud. Tesis de maestría UNAM, Mazatlán, México. 80 pp.
- Pereira, T.G. y Oliva-Teles, A., 2003. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquacult. Res.*, 34, 1111–1117.
- Pongmaneerat, J., Watanabe, T., 1992. Utilization of soybean meal as a protein source in diets for rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1983–1990.
- Quinn, G. G. P. y Keough, M.J., 2002. Experimental design and data analysis for biologists, Cambridge University Press.
- Refstie, S., Korsøen, Ø.J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., Roem, A.J., 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190, 49–63.
- Regost, C., Arzel, J., Kaushik, S.J., 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180, 99–117.

- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219–233.
- Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 157, 343–355.
- Salze, G., McLean, E., Battle, P., Schwarz M., Craig S. 2010. Use of soy protein concentrate and novel ingredients in the total elimination of fish meal and fish oil in diets for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 298 294–299.
- Sánchez-Rodríguez, J. 2013. Efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por una mezcla de krill-soya en la dieta de juveniles de pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Tesis de maestría. UNAM, Mazatlán, México. 59 pp.
- Shiau, S. Y. y Chou, B. S. 1991. Effects of dietary protein and energy on growth performance of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 2271-2276.
- Silva-Carrillo, Y., Hernández, C., Hardy, W., González-Rodríguez, B., Castillo-Vargasmachuca, S. 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture* 364–365, 180–185.
- Sitjà-Bobadilla, A, Peña-Llopis, T., Gómez -Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on on-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387–400.
- Tacon, A.G.J., Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285(1-4), 146-158.
- New, M. B., 1996. Responsible use of aquaculture diets. *Aquaculture Asia* 1 (1), 3-15.

- Nutrition and Fishfeed Technology, Hamburg 20-23 June, 1978. Vol. 2, pp. 437-443.
- Utne, F., 1979. Standard methods and terminology in finfish nutrition. Proc. Symp. on Finfish.
- Vázquez-Ortiz, F., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., Hernández, G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in shrimp. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 18, 2059-2068.
- Villa-López, A. 2005. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos en el crecimiento y sobrevivencia del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1896) (Pisces: Lutjanidae). Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias del Mar, Mazatlán, México. 61pp.
- Vincke, M. 1969. Compte-Rendu d'activite Annee 1969. Division d Recherches Piscicoles, Tananarive.
- Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151 185-207.
- Watanabe, W. O., Ellis, S.C., Chaves, J. 2001. Effects of dietary lipid and energy to protein ratio on growth and feed utilization of juvenile mutton snapper *Lutjanus analis* fed isonitrogenous diets at two temperatures. *Journal of the World Aquaculture Society* 32: 30-40.
- Woyewoda, A.D., Shaw, S.J., Ke, P.J., Burns, B. G., 1986. Recommended Laboratory Methods for assessment of fish quality. Canadian Department of fisheries and Oceans. Nova Scotia, Canada. Technical Report of fisheries and Aquatic Sciences No. 1448: 15-20.
- Yun, B., Xue, M., Wang, J., Sheng, H., Zheng, X., Li, J. 2014. Fishmeal can be totally replaced by plant protein blend at two protein levels in diets of juvenile Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Bradt. *Aquaculture Nutrition* 20; 69-78.
- Zar, J. H. (1984) *Biostatistical Analysis*. 2nd edn., 718 pp. Prentice-Hall, Eng.