



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

**REQUERIMIENTO NUTRICIONAL DE RIBOFLAVINA Y
EFECTOS DE SU DEFICIENCIA EN JUVENILES DE
PARGO FLAMENCO *Lutjanus guttatus* (Steindachner,
1869).**

Por:

Sara Gabriela Reyna Andrade

TESIS APROBADA POR LA:

UNIDAD MAZATLÁN
ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa

del año 2016

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

APROBACIÓN


Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de IBQ. Sara Gabriela Reyna Andrade, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Directora de Tesis



Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa
Asesor



Dra. Crisantema Hernández González
Asesora



M. en C. Selene María Abad Rosales
Asesora

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para realizar el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, por permitirme utilizar las instalaciones y equipos durante el periodo de estudios de la maestría.

Al proyecto de Ciencia Básica CONACyT No. 82991 “Determinación de los Requerimientos de Algunas Vitaminas Hidrosolubles en Peces Marinos de Importancia Comercial”, que aportó el apoyo financiero para la realización del estudio.

A la Dra. María Cristina Chávez Sánchez por todos los conocimientos y consejos compartidos. Por haberme brindado su confianza desde el principio para realizar este trabajo de investigación. Por ser una excelente guía y directora de tesis.

A los miembros de comité: Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa, Dra. Crisantema Hernández González y M. en C. Selene María Abad Rosales. Por el apoyo, las observaciones y aportaciones a la realización de este trabajo.

A la M. en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez por realizar el procedimiento de determinación de vitamina en dietas e hígados por HPLC.

A la M. en C. Selene María Abad Rosales por el apoyo técnico en la última biometría para la recolección de órganos y en el proceso histológico de los peces experimentales en el laboratorio.

A la Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez por la ayuda técnica otorgada durante los análisis hematológicos y bromatológicos, iniciales y finales. Por todas las enseñanzas brindadas.

Al Biol. Alan Jesús Humberto González Santos por su apoyo técnico en la siembra de peces y la manufactura por el proceso de extrusión del alimento. Por su paciencia, tiempo y consejos.

Al Dr. Milton Espanoupulos Hernández por permitirme realizar el análisis de cuantificación de proteínas en el laboratorio de Nutrición Acuícola del Instituto Tecnológico de Mazatlán.

Al Dr. Emyr Saúl Peña Marín por el apoyo técnico en el análisis de cuantificación de proteínas. Por todos los consejos brindados en el proceso de experimentación.

A la IBQ. Alejandra Marcos por sus consejos y ayuda, durante el trabajo experimental y análisis estadístico. Gracias por la excelente amistad brindada.

A todos los que me apoyaron en algún momento para llevar a cabo las biometrías: Ale, Rosita, Nayeli, Ahtziri, Evita, Majo. En especial a Jordi Reyna y Karen Zepeda, que estuvieron en todos los muestreos. Muchas gracias a todos por su paciencia y tiempo.

A mis compañeros de generación: Karen, Dennise, Ely, Piña, Rafa y Germán. Por hacer amenas las clases y cada momento juntos. Me quedo con su valiosa amistad.

DEDICATORIA

A mis padres, Jorge y Sarita, por inculcarme el valor de la educación. Porque siempre han estado junto a mí para apoyarme y nunca darme por vencida. Son mi ejemplo a seguir de perseverancia, inteligencia y grandeza. Por el cariño y ayuda que siempre me han dado. Los amaré siempre.

A mi tía, Idalia Reyna de la Rosa. Por ser siempre una guía y apoyo. Gracias por siempre estar presente de cualquier manera cuando necesito ayuda, por aconsejarme en mis estudios y estar al pendiente de mis logros. Te quiero, siempre serás como mi segunda madre.

A mi novio, Hanzel Martínez. Por siempre estar junto a mí en todo momento. Por decirme casi a diario “échale ganas, tú puedes”, por todo el apoyo emocional y el amor que das diario. Muchas gracias. Te amo.

CONTENIDO

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	ii
APROBACIÓN	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA	6
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Acuicultura	16
2.2 Pargo flamenco (<i>Lutjanus guttatus</i>)	17
2.3 Riboflavina	19
2.4 Requerimientos de riboflavina y signos de su deficiencia en peces	21
2.5 Análisis hematológicos para determinar deficiencias de vitaminas.....	25
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION.....	28
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos particulares	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Periodo experimental	31
6.2 Dieta experimental	31
6.3 Sistema experimental	34
6.4 Organismos experimentales	35
6.5 Variables de respuesta	36
6.6 Parámetros sanguíneos.....	38
6.6.1 Extracción de la muestra de sangre	38
6.6.2 Recuento de eritrocitos	39

6.6.3	Recuento de leucocitos	40
6.6.4	Hematocrito	40
6.6.5	Hemoglobina	41
6.6.6	Química sanguínea	42
6.7	Análisis histológico.....	42
6.8	Análisis químicos	44
6.8.1	Determinación de riboflavina	44
6.9	Análisis estadísticos.....	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1	Análisis proximal y concentración de riboflavina en las dietas experimentales	46
7.2	Análisis proximal de la carcasa	48
7.3	Variables de respuesta	49
7.3.1	Peso ganado	51
7.3.2	Supervivencia.....	52
7.3.3	Requerimiento óptimo de riboflavina (vitamina B2)	53
7.4	Determinación de concentración de riboflavina en hígados de organismos experimentales.....	56
7.5	Signos clínicos externos	58
7.6	Análisis hematológico	60
7.7	Análisis histológico.....	65
8.	CONCLUSIONES	68
9.	RECOMENDACIONES	69
10.	BIBLIOGRAFÍA	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de la riboflavina (vitamina B ₂) frente a factores ambientales.....	20
Tabla 2. Investigaciones sobre requerimiento de riboflavina en peces de agua dulce y salada	23
Tabla 3. Aporte de riboflavina en premezclas de diferentes estudios en peces marinos	24
Tabla 4. Intervalo de los parámetros sanguíneos del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) en estado saludable	26
Tabla 5. Valores promedio \pm D.E. de los parámetros hematológicos evaluados en diversos estudios de <i>L. guttatus</i> del laboratorio de nutrición del CIAD unidad Mazatlán	27
Tabla 6. Dieta basal para la determinación de requerimiento de riboflavina en juveniles de <i>L. guttatus</i>	32
Tabla 7. Análisis proximal y contenido de riboflavina en las dietas experimentales (valores promedio \pm D.E.)	47
Tabla 8. Composición proximal del cuerpo de los peces que recibieron diferentes niveles de riboflavina en su dieta (valores promedio \pm D.E. expresados en base húmeda).....	48
Tabla 9. Resultados de las variables de desempeño evaluadas en juveniles de <i>L. guttatus</i> (valores promedio \pm D.E.)	50
Tabla 10. Requerimientos de riboflavina basados en peso ganado en diferentes especies de peces	55
Tabla 11. Requerimientos de riboflavina basados en almacenamiento de vitamina en hígado de peces marinos	56
Tabla 12. Variables hematológicas evaluadas en juveniles de <i>L. guttatus</i> (valores promedio \pm D.E.)	61
Tabla 13. Conteo de células sanguíneas en juveniles de <i>L. guttatus</i> (valores promedio \pm D.E.).....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pargo flamenco (<i>Lutjanus guttatus</i>)	17
Figura 2. Estructura química de la riboflavina	19
Figura 3. Alimento elaborado en el extrusor	33
Figura 4. Extrusor Brabender TSE 20/40 (Plastic-Corder)	34
Figura 5. Sistema experimental	35
Figura 6. Ejemplar inicial de juvenil de pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>)	35
Figura 7. Extracción de sangre de juvenil de pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>).....	39
Figura 8. Muestras de sangre en tubos capilares para hematocrito	40
Figura 9. Lector para microhematocrito SOL-BAT	41
Figura 10. a) Muestras de hemoglobina con el kit colorimétrico. b) Lectura con espectrofotómetro	41
Figura 11. Tubo ejemplar con muestra de sangre coagulada tras centrifugación para la obtención del suero.....	42
Figura 12. Extracción de órganos de los peces.	43
Figura 13. Crecimiento de los juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentaos con dietas con diferentes niveles de riboflavina.....	51
Figura 14. Requerimiento nutricional de riboflavina para juveniles de <i>L. guttatus</i>	54
Figura 15. Concentración de riboflavina en el hígado de los juveniles de <i>L.</i> <i>guttatus</i>	57
Figura 16. Ejemplo de organismo experimental final con aletas, piel y ojos normales	59
Figura 17. Ejemplo de organismo experimental final con bajo crecimiento, oscurecimiento de piel y de iris.....	60
Figura 18. Ejemplo de lente de un organismo experimental de la dieta R40 sin alteraciones histológicas debido a la dieta. H & E	66
Figura 19. Monocapa de células epiteliales de un ejemplar de <i>L. guttatus</i> sin daños en la lente. H & E	66

RESUMEN

La riboflavina (B₂) es una vitamina hidrosoluble perteneciente al complejo B. Es precursora de dos coenzimas flavin mononucleótido (FMN) y flavin dinucleótido (FAD) que colaboran en procesos redox, metabolismo de algunas vitaminas, carbohidratos, proteínas y grasas, absorción de aminoácidos y síntesis de hormonas. Una deficiencia de riboflavina en la alimentación de peces puede provocar diversos signos clínicos: cataratas, hemorragia en ojos, fotofobia, descoordinación, poco apetito, anemia, bajo crecimiento. En este trabajo se elaboraron siete dietas isoproteicas e isolipídicas con diferentes inclusiones de riboflavina (0, 5.88, 11.65, 18.66, 36.32, 77.82 y 118.27 mg kg⁻¹) para determinar el requerimiento óptimo en juveniles de *Lutjanus guttatus* con un peso inicial de 9.8 g ± 0.1. Los resultados se evaluarán en términos de parámetros hematológicos, alteraciones histológicas, signos clínicos, crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia y reserva de vitamina en el hígado. Los peces alimentados con deficiencia de vitamina (0 a 18.66 mg kg⁻¹) mostraron diferencias en el nivel de hematocrito, hemoglobina, conteo de eritrocitos y leucocitos, en comparación a los organismos de las dietas altas. No se encontraron daños a nivel histológico en ningún tratamiento. Entre la inclusión de riboflavina y su almacenaje en el hígado, resultó una correlación positiva al mostrar diferencias significativas entre la primera dieta y las de mayor inclusión (18.66 a 118.27 mg kg⁻¹). Aparecieron signos clínicos en peces deficientes (0 a 18.66 mg kg⁻¹): bajo crecimiento, erosión en aletas, oscurecimiento de piel e iris y nado errático. Se concluye que el requerimiento óptimo de riboflavina para juveniles de *Lutjanus guttatus* es de 34.17 mg kg⁻¹ de dieta, para mantener una salud en los parámetros hematológicos, optimizar su crecimiento y evitar signos clínicos.

Palabras clave: riboflavina, *Lutjanus guttatus*, requerimiento nutricional, deficiencia, signos clínicos.

ABSTRACT

Riboflavin (B2) is a water soluble vitamin that belongs to the B complex. It is a precursor of two coenzymes (FMN and FAD) that collaborate in redox processes, metabolisms of vitamins, carbohydrates, proteins and fats, amino acid uptake and hormone synthesis. A deficiency of riboflavin in fish food origins various clinical signs: cataracts, hemorrhage in eyes, photophobia, incoordination, poor appetite, anemia, low growth. In this investigation seven isoprotein and isolipidic diets were elaborated with different riboflavin inclusions (0, 5.88, 11.65, 18.66, 36.32, 77.82 and 118.27 mg kg⁻¹) to determine the optimal requirement in juveniles of *Lutjanus guttatus* with an initial weight of 9.8 ± 0.1 g. The results will be evaluated in terms of hematological parameters, histological alterations, clinical signs, growth, survival, feeding efficiency and vitamin reserve in the liver. Fish fed with vitamin deficiency diets (0 to 18.66 mg kg⁻¹) showed differences in hematocrit, hemoglobin, erythrocyte and leukocyte counts compared to organisms fed with high inclusion of riboflavin. Histological damage was not found in any treatment. Between inclusion of riboflavin and its storage in the liver exists a positive correlation with significant differences, the livers without vitamin B2 had a lower result than those with the highest inclusion (18.66 to 118.27 mg kg⁻¹). The clinical signs that appeared in deficient fish (0 to 18.66 mg kg⁻¹) were: low growth, erosion in fins, dark skin and iris and erratic swimming. The optimum riboflavin requirement for juveniles of *Lutjanus guttatus* is 34.17 mg kg⁻¹ of diet, to maintain healthy hematological parameters, optimize its growth and avoid clinical signs.

Key words: riboflavin, *Lutjanus guttatus*, nutritional requirement, deficiency, clinical signs.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la acuicultura es de gran importancia debido al aporte en la generación de empleos y alimento para la población. Es uno de los sectores de producción alimenticia con mayor crecimiento mundial, ya que representa aproximadamente el 50% de la producción de pescado. Una de las ventajas es el aporte nutricional que otorga al ser humano, por lo tanto el alimento de organismos acuáticos juega un papel importante en la seguridad alimentaria, la reducción de pobreza y el bienestar general (FAO, 2014). Mediante su consumo, se contribuye a disminuir los problemas que se asocian a la obesidad y a una alimentación desbalanceada que favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes (Norzagaray *et al.*, 2012). El pescado es uno de los productos para consumo humano más comercializados mundialmente (FAO, 2014).

México es uno de los principales países en el mundo donde investigadores han estudiado diversas especies de importancia comercial (Norzagaray *et al.*, 2012). En el CIAD Unidad Mazatlán, se han realizado por varios años trabajos sobre el pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) debido a que es un pez marino con gran importancia económica tanto en México como en varios países de Latinoamérica (Rojas-Herrera, 2001; Abdo de la Parra *et al.*, 2010). *L. guttatus* es un pez carnívoro que se distribuye por la costa del Pacífico del continente americano (Rojas-Herrera, 2001; Silva-Carrillo *et al.*, 2012) que tiene características óptimas para su cultivo tales como buena demanda comercial, se adapta fácilmente a condiciones de cautiverio y actualmente hay control de su reproducción (Ibarra-Castro y Duncan, 2007; Abdo de la Parra *et al.*, 2010;

Ibarra-Castro y Alvarez-Lajonchere, 2011; Silva-Carrillo *et al.*, 2012). Actualmente existe una importante demanda por juveniles para su cultivo comercial. En las costas del Pacífico mexicano, varias organizaciones pesqueras han cultivado *L. guttatus* en jaulas marinas juveniles silvestres capturados (Avilés-Quevedo 2006; Castillo-Vargasmachuca *et al.*, 2007). Hernández *et al.* (2016) realizó un estudio en las costas de Sinaloa, México, con juveniles de pargo flamenco criados en la planta piloto de reproducción de peces marinos del CIAD unidad Mazatlán, para ser cultivados en jaulas flotantes y evaluar la rentabilidad y el rendimiento del crecimiento de los peces. Por otro lado, varios productores de camarones realizaron ensayos de crecimiento con juveniles producidos en el CIAD (Chávez-Sánchez *et al.*, 2014).

Uno de los aspectos importantes a estudiar para su cultivo son los requerimientos nutricionales de cada especie. Abdo de la Parra *et al.* (2010) mencionan que para cultivar peces con un máximo crecimiento con objetivo comercial, es necesario desarrollar estrategias de cultivo eficientes y elaborar dietas prácticas. Para que la producción acuícola sea económicamente rentable con animales sanos y un impacto ambiental limitado, es necesario mejorar las tasas de crecimiento y la eficacia de la alimentación (Figueras y Novoa, 2014).

Dentro de los requerimientos nutricionales que hay que conocer para formular las dietas de los peces se encuentran los de vitaminas, ya que son importantes para la vida animal. Estos nutrientes se separan en hidrosolubles (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₈, B₉, B₁₂ y C) y liposolubles (A, D, E y K). Entre las vitaminas hidrosolubles se encuentran las pertenecientes al complejo B, las cuales son necesarias en cantidades mínimas en la dieta pero son importantes para el crecimiento, fisiología y metabolismo de los organismos (Halver, 2002).

Con el objetivo de elaborar dietas apropiadas para la especie de pargo flamenco, el grupo de nutrición del CIAD decidió estudiar los requerimientos de

vitaminas. En el proyecto de ciencia básica “Determinación de los Requerimientos de Algunas Vitaminas Hidrosolubles en Peces Marinos de Importancia Comercial”, se decidió comenzar por el estudio de los requerimientos de la vitamina C, pantotenato de calcio y riboflavina.

El objetivo de este trabajo, es determinar el requerimiento nutricional de la riboflavina. La riboflavina o vitamina B2, es ligeramente soluble en agua, se distribuye en plantas y tejidos animales glandulares, es estable al calor y se descompone tras irradiación con rayos UV o luz visible. Los requerimientos van a depender de: especie, talla, ambiente, estrés fisiológico, balance con otros ingredientes dietarios, energía de la dieta y condiciones ambientales (Hidalgo y Morales, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1 Acuicultura

La acuicultura es uno de los sectores alimenticios a nivel mundial que han presentado un rápido crecimiento a través de los años. En 2011, por primera vez en la historia, la producción de peces en el mundo logró superar a la de ganado vacuno (Figueras y Novoa, 2014). Durante el año 2012, se registró una producción mundial pesquera de 158 millones de toneladas. La acuicultura contribuyó con 66.6 millones de toneladas de 567 especies registradas. Dicho producto se ha convertido en algo indispensable para el consumo humano, esto se debe a que la carne del pescado es un componente nutricional esencial por la cantidad de proteínas y otros nutrientes que contiene el músculo del pez (FAO, 2014).

El pescado es uno de los alimentos más comercializados mundialmente. El consumo mundial aparente de pescado por cada individuo ha aumentado durante el transcurso de los años. En 1960 era de 9.9 kg, en el decenio del 2000 fue de 17 kg, en el 2010 de 18.9 kg y en el año 2012 el consumo promedio anual por persona fue de 19.2 kg. Mientras que en México, el pescado como alimento durante el periodo de 2008-2010 varió en 10 a 20 kg/año. Éste producto es necesario para la dieta del ser humano, debido a que una porción de 150 g de pescado aporta de 50% a 60% en el requerimiento proteico de un adulto. Además, representa aproximadamente el 17% de la ingesta de proteínas animales en la población mundial (FAO, 2014).

La acuicultura se ha expandido en todos los continentes, hacia nuevas áreas y abriéndose a la oportunidad de producir diversas especies, para poder satisfacer las necesidades de los consumidores (FAO, 2014). La acuicultura en México es de suma importancia debido a que es una fuente de obtención de alimento y empleo (Amezcuca y Soto, 2014). Es una actividad que va creciendo año con año (Figueras y Novoa, 2014).

2.2 Pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*)

La familia de los lutjánidos se conforma de 108 especies distribuidas alrededor del mundo (Hudson *et al.*, 2012). En México, el cultivo de pargos (*Lutjanus* spp.) comenzó en el año de 1990 en el Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP-La Paz-INAPESCA) en Baja California Sur (INAPESCA, 2011). En el año 2000, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (Unidad Mazatlán), iniciaron las investigaciones acerca del cultivo de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) (Figura 1) (Abdo de la Parra y Rodríguez-Ibarra, 2011).



Figura 1. Pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*)

El pargo flamenco se distribuye desde Baja California hasta Perú (Allen, 1995). A este pez también se le conoce como pargo lunarejo o de la mancha. Los peces adultos habitan en arrecifes costeros con una profundidad de 30 m, donde forman cardúmenes, mientras que los juveniles se encuentran en

estuarios y desembocaduras de ríos (Allen, 2005; Abdo de la Parra y Rodríguez-Ibarra, 2011). Esta especie carnívora se alimenta de organismos demersales, como crustáceos y peces (Allen, 1995; Abdo de la Parra y Rodríguez-Ibarra, 2011; Silva-Carrillo *et al.*, 2012).

Este organismo tiene un alto potencial para el sector acuícola, en México y otros países de Latinoamérica. A pesar de que se tiene dominado su ciclo biológico, es necesario optimizar el cultivo y una de las partes más importantes es la alimentación. Una dieta adecuada a la especie requiere el conocimiento de las necesidades nutricionales de proteínas, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales.

En *L. guttatus*, especie de interés del presente trabajo, se han realizado investigaciones sobre requerimientos de dos vitaminas en juveniles. En el primer estudio, se determinó el nivel de requerimiento de vitamina C. Se realizaron seis dietas experimentales con inclusiones de ácido ascórbico 0, 7, 19, 29, 62 y 250 mg kg⁻¹ de dieta. La alimentación de los peces, con peso inicial de 8 ± 1.85 g, duró 13 semanas. Se observaron signos clínicos en los tratamientos con deficiencia: erosión de aletas, oscurecimiento de piel, descamación, nado errático, alteraciones en branquias, hígado y cerebro. El requerimiento estimado fue de 29 mg kg⁻¹ de ácido ascórbico (AA) basado en ganancia de peso y tasa específica de crecimiento, pero indicaron que se requiere más de 250 mg kg⁻¹ de AA para eliminar señales clínicas de deficiencia y lesiones histopatológicas (Chávez *et al.*, 2014). En el segundo estudio, se determinó un requerimiento de 45.5 mg kg⁻¹ de pantotenato de calcio en juveniles de *L. guttatus* tras 18 semanas de experimentación. Los peces deficientes de la vitamina presentaron signos clínicos: bajo crecimiento, erosión de aleta caudal, hemorragia, descamación y epidermis más clara (Pimentel, 2011)

2.3 Riboflavina

La riboflavina (7,8-dimetil-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahidroxipentil) isoaloxazina) (Figura 2) es una vitamina hidrosoluble. Pertenece al complejo de vitaminas B, es la vitamina B₂. Tiene un peso molecular de 376.36 g mol⁻¹ es estable al calor, sensible a la alcalinidad y la luz (Kohlmeier, 2003). Se encuentra involucrada en una serie de reacciones redox en diversas rutas metabólicas y en procesos de transferencia de electrones (Powers, 2003; Lienhart, Gudipati y MacHeroux, 2013; Tang *et al.*, 2015).

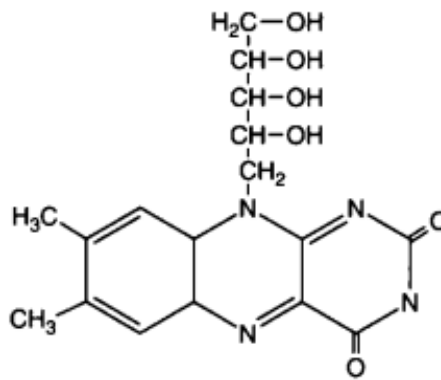


Figura 2. Estructura química de la riboflavina

Esta vitamina es el precursor del flavin mononucleótido (FMN) y de flavin adenin dinucleótido (FAD), los cuales sirven como cofactores para diversas enzimas importantes para la β -oxidación y fosforilación oxidativa, colaboran en la defensa antioxidante, el metabolismo de varias vitaminas (ácido fólico, niacina, vitamina A, C, B₆ y B₁₂), absorción de aminoácidos, síntesis de hormonas (Kohlmeier, 2003), así como en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas (Mollinedo y Carrillo, 2014).

Halver (2002) menciona que es importante la adecuada aportación de riboflavina en la dieta de diferentes especies de peces porque se involucra en su forma de coenzimas (FMN y FAD) en la oxigenación de los tejidos, en diversos procesos redox, en la respiración y vascularización de la córnea, en la pigmentación de la retina para que el ojo se pueda adaptar a la luz y para evitar

la fotofobia. En la Tabla 1 se muestran las características de resistencia o sensibilidad que presenta esta vitamina hacia diversos factores ambientales como humedad, oxidación, reducción, minerales traza, calor, luz y niveles de pH. Se recomienda tener protegida a esta vitamina de la luz en bolsas negras o pequeños contenedores oscuros y cerrados.

Tabla 1. Características de la riboflavina (vitamina B₂) frente a factores ambientales

Vitamina	H	O	R	T	C	L	A	N	B
Riboflavina	R	R	MS	R	R	MS	R	MS	S

H – Humedad; **O** – Oxidación; **R** – Reducción; **T** – Minerales traza; **C** – Calor; **L** – Luz; **A** – pH ácido; **N** – pH neutro; **B** – pH básico. **R** – Resistente; **MS** – Medianamente sensible; **S** – Sensible. Según Coelho (1991) y Tacon (1995).

Tacon (1987) menciona en su libro sobre nutrientes esenciales en peces y camarones las mismas funciones de la vitamina B₂ a las ya señaladas y solamente añade que la riboflavina es particularmente importante para la respiración de los tejidos pobremente vascularizados tales como córnea, y en conjunción con la piridoxina (vitamina B₆) para la conversión de triptófano en ácido nicotínico. Por lo tanto, a continuación se describe un resumen de cómo se lleva a cabo la absorción, el metabolismo y la excreción de la riboflavina en los humanos al ser consumida en la alimentación, descrita por el Institute of Medicine (1998). Aunque los peces presentan un tipo de metabolismo diferente que los mamíferos por ser poiquilotermos, nos da una idea de la importancia de esta vitamina.

Absorción

Cuando el organismo ingiere la riboflavina el mecanismo de absorción en el cuerpo es el siguiente: primero se absorbe en el duodeno, que es la primera sección del intestino delgado a través de un sistema de transporte rápido. De dicha ingesta, una parte de la riboflavina circula a través del sistema enterohepático (Merrill *et al*, 1981; McCormick, 1994;), otra se absorbe en el

intestino grueso (Sorrell *et al.*, 1971). En el torrente sanguíneo, entra en el plasma para combinarse con la albúmina. También se involucra con otras proteínas, principalmente inmunoglobulinas (Innis *et al.*, 1985). La riboflavina puede entrar en el plasma desde el intestino delgado como en su forma libre o como FMN (Powers, 2003).

Metabolismo

El metabolismo de la riboflavina es un mecanismo bastante controlado que va a depender de la cantidad de vitamina ingerida (Lee y McCormick, 1983), para poder convertirse en FMN y FAD en el citoplasma celular de los tejidos, principalmente del intestino delgado, hígado, corazón y riñón (Darby, 1981; Brown, 1990). El metabolismo de la riboflavina empieza con la fosforilación dependiente de ATP de la vitamina a FMN, el cual puede conjugarse con apoenzimas específicas para formar una variedad de flavoproteínas, sin embargo, la mayoría se convierte a FAD por medio de la FAD sintetasa. Debido a esto, FAD es la flavocoenzima predominante en los tejidos del cuerpo (McCormick y Greene, 1994).

Excreción

No existe un problema de toxicidad de esta vitamina, debido a que al ser absorbida en exceso, lo necesario se absorbe en los tejidos corporales y el resto se excreta principalmente en la orina (Chastain y McCormick, 1987; McCormick, 1989; Powers, 2003) en forma de metabolitos de riboflavina, 7-hidroximetilriboflavina y lumiflavina (Chastain y McCormick, 1987).

2.4 Requerimientos de riboflavina y signos de su deficiencia en peces

El conocimiento de los requerimientos de vitaminas en peces es importante para que permanezcan sanos y obtengan un crecimiento máximo, sin presentar signos por deficiencia. En el caso de la riboflavina, se cuenta con mayor información sobre requerimientos para peces de agua dulce, mientras que para

peces marinos las investigaciones son muy escasas, por lo que es necesario seguir investigando más sobre las demandas vitamínicas de estos organismos.

En las primeras investigaciones sobre deficiencias vitamínicas se midieron los niveles de riboflavina en el hígado, ciegos pilóricos, riñón y músculo, para tener una base de la cantidad de vitamina presente en dichos órganos para estudios posteriores de requerimientos de vitaminas en trucha (Tunison *et al.*, 1942 citado en Halver, 2002).

En algunos estudios con juveniles de salmón se utilizaron dietas con deficiencia de vitamina B₂ y se observó que después de 10 a 12 semanas, la reserva de riboflavina en los tejidos se agota. Se presentaron signos como poco apetito, fotofobia, cataratas en uno o los dos ojos, vascularización en córnea, ojos hemorrágicos, descoordinación, anemia, constricciones estriadas en la pared abdominal, pigmentación anormal en la piel e iris (Halver, 1953; Aoe *et al.*, 1967, citados en Halver, 2002).

En un estudio sobre requerimiento de riboflavina con bagre, se obtuvo bajo crecimiento en los organismos experimentales alimentados con un bajo nivel de vitamina B₂ (Murai y Andrews, 1978, citado en Halver, 2002). Una deficiencia también puede ocasionar problemas en la vascularización de la córnea y generar opacidad en ella, así como producir cataratas (Hughes *et al.*, 1981; Wintrobe *et al.*, 1994; Powers, 2003). Halver (2002) menciona algunas especies que tienen su primer signo de deficiencia de riboflavina en ojos como salmón, carpa (Aoe *et al.*, 1967), bagre (Dupree, 1966) y anguila (Arai *et al.*, 1972). Algunos estudios sobre requerimientos de riboflavina en peces de agua dulce y marinos, reportan niveles en el intervalo de 3 a 25 mg kg⁻¹ de dieta (Tabla 2).

Tabla 2. Investigaciones sobre requerimiento de riboflavina en peces de agua dulce y salada

Riboflavina	Requerimiento B2 (mg/kg dieta)	Referencia
Salmón del Pacífico (<i>Oncorhynchus</i> spp.)	20-25 7	Halver (1972) Leith <i>et al.</i> (1990)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	5-15 6 3 3.6 2.7	McLaren <i>et al.</i> (1947) Takeuchi <i>et al.</i> (1980) Hughes <i>et al.</i> (1981) Woodward (1985) Amezaga and Knox (1990)
Bagre (<i>Ictalurus punctatus</i>)	9 6	Murai and Andrews (1978) Serrini <i>et al.</i> (1996)
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	4 6.2 7	Aoe <i>et al.</i> (1967) Aoe <i>et al.</i> (1967) Takeuchi <i>et al.</i> (1980)
Dorado (<i>Seriola lalandi</i>)	11	Shimeno (1991)
Tilapia azul (<i>Oreochromis aureus</i>)	6	Soliman and Wilson (1992)
Tilapia roja híbrida (<i>Oreochromis mossambicus</i> x <i>Oreochromis niloticus</i>)	5	Lim <i>et al.</i> (1993)
Lobina híbrida (<i>Morone chrysops</i> x <i>Morone saxatilis</i>)	4.1	Deng and Wilson (2003)
Carpa Jian (<i>Cyprinus carpio</i> var. Jian)	5	Li <i>et al.</i> (2010)

Datos tomados de NRC (2011).

Debido a la falta de estudios de requerimientos de vitamina B₂ en peces marinos y el desconocimiento de los niveles que se deben evaluar para *L. guttatus* y determinar su requerimiento, se analizó la cantidad de riboflavina que se incluyó a las dietas de diferentes especie de peces marinos en otros estudios. Se consideró la cantidad de riboflavina presente en la premezcla de vitaminas utilizada para cada especie, la etapa de vida y el peso inicial de los organismos al principio del experimento, incluida la cantidad que presenta la

premezcla de vitaminas que se utiliza actualmente en las dietas para el pargo flamenco en el CIAD (Tabla 3), para tener un parámetro aproximado de la cantidad máxima a utilizar en el presente estudio. La aportación mínima a la dieta de las diferentes especies es de 8.7 mg kg⁻¹ y la mayor de 160.3 mg kg⁻¹.

Tabla 3. Aporte de riboflavina en premezclas de diferentes estudios nutricionales en peces marinos

Especie	Inclusión riboflavina (mg/kg)	Etapas de organismo en estudio	Referencia
<i>Sparus macrocephalus</i>	22	Juvenil 9.10 - 9.13 g	Zhou <i>et al.</i> , 2010
<i>Pagellus bogaraveo</i>	25	37.6 g	Figueiredo-Silva <i>et al.</i> , 2010
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	22	Juvenil 10.7 g	Ngandzali <i>et al.</i> , 2011
<i>Sparus aurata</i>	10.8	172 ± 9 g	Gültepe <i>et al.</i> , 2011
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	70	849 ± 99 g	Alves <i>et al.</i> , 2011
<i>Solea senegalensis</i>	25	Juvenil 6.4 g	Guerreiro <i>et al.</i> , 2012
<i>Lutjanus guttatus</i>	8.7	17.75 ± 0.03 g	Silva-Carrillo <i>et al.</i> , 2012
<i>Seriola quinqueradiata</i>	100	Juvenil 123.4	Sarker <i>et al.</i> , 2012
<i>Pagrus major</i>	160.3	3.4 g	Gao <i>et al.</i> , 2013
<i>Trachinotus ovatus</i>	20	Juvenil 4.7 g	Wang <i>et al.</i> , 2013
<i>Rachycentron canadum</i>	45	Juvenil 6.23-6.29 g	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>Lates calcarifer</i>	100	7.94-7.96 g	Chotikachinda <i>et al.</i> , 2013
<i>Trachinotus ovatus</i>	45	Juvenil 12.40 g	Niu <i>et al.</i> , 2013

2.5 Análisis hematológicos para determinar deficiencias de vitaminas

Los análisis hematológicos son importantes y necesarios para este estudio porque otorgan información sobre agentes estresores o enfermedades en peces, como por ejemplo deficiencias nutricionales. Esto se puede observar según los valores que se obtendrán en los parámetros a analizar (Shigdar *et al.*, 2007; Del Río-Zaragoza *et al.* 2011).

En el trabajo de investigación de Del Río-Zaragoza *et al.* (2011) en pargo flamenco, se establecieron intervalos en los parámetros hematológicos de la especie en condiciones saludables para ser utilizados en estudios posteriores. Los parámetros analizados fueron: tiempo de coagulación, tasa de sedimentación, hematocrito, glóbulos rojos, volumen corpuscular principal, hemoglobina corpuscular principal, concentración de hemoglobina corpuscular principal, glóbulos blancos, trombocitos, leucocitos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y neutrófilos (Tabla 4).

Desde hace años se ha estudiado la problemática que puede traer la deficiencia de riboflavina con relación a la hematología. En animales se ha encontrado que puede ocasionar daños en el sistema hematopoyético, generar anemia, alteración en la producción de eritrocitos (Foy y Kondi, 1968) y puede interferir con el metabolismo del hierro (Powers, 2003).

Tabla 4. Intervalo de los parámetros sanguíneos del pargo flamenco (*L. guttatus*) en estado saludable

Parámetros	Intervalo de referencia de <i>L. guttatus</i> sanos
Tiempo de coagulación (seg)	40.90 – 84.20
Tasa de sedimentación (mm h ⁻¹)	0.08 – 1.32
Hematocrito	33.53 – 71.14
Glóbulos rojos (x10 ⁶ mm ³)	0.75 – 3.71
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	7.29 – 17.03
Volumen corpuscular principal (fl)	135.66 – 369.80
Hemoglobina corpuscular principal (pg)	20.01 – 91.47
Concentración de hemoglobina corpuscular principal (g dL ⁻¹)	11.16 – 31.09
Glóbulos blancos (x10 ³ mm ³)	25.19 – 111.22
Trombocitos (%)	37.37 – 68.57
Leucocitos (%)	26.83 – 67.16
Linfocitos (%)	82.58 – 100.00
Monocitos (%)	0.55 – 5.37
Eosinófilos (%)	0.64 – 7.8
Neutrófilos (%)	0.19 – 8.40
Proteína total (g L ⁻¹)	44.01 – 117.50

Obtenido de: Del Río-Zaragoza *et al.* (2011).

En el laboratorio de nutrición del CIAD unidad Mazatlán se han realizado diversos estudios en pargo flamenco para evaluar diferentes fuentes de proteína, así como la búsqueda de requerimientos de varios nutrientes esenciales para la dieta de *L. guttatus*. En dichas investigaciones se procura que la nutrición de los peces sea en base a los valores de proteína y lípidos que el pargo necesita para optimizar su crecimiento y que lleve a cabo sus funciones metabólicas indispensables para la especie. Por eso, uno de los análisis que se realizan para comprobar la buena nutrición y salud de los organismos experimentales es el análisis sanguíneo.

En la Tabla 5 se muestran los promedios obtenidos en algunos estudios realizados en el laboratorio para hacer una comparación de los valores registrados en juveniles sanos de *L. guttatus* con los de este trabajo (Benítez, 2013; Sánchez, 2013; Osuna, 2014; Quintero, 2015). Se tomaron en cuenta los datos del análisis sanguíneo final, el peso final y que hayan sido alimentados con la dieta a base de harina de pescado utilizada en el laboratorio de Nutrición.

Tabla 5. Valores promedio \pm D.E. de los parámetros hematológicos evaluados en diversos estudios de *L. guttatus* del laboratorio de nutrición del CIAD unidad Mazatlán

Parámetros	Promedio de <i>L. guttatus</i> sanos
Hematocrito %	46.94 \pm 5.92
Proteína (g dL ⁻¹)	5.02 \pm 0.49
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	9.15 \pm 0.62
Triglicéridos (mg dL ⁻¹)	258.04 \pm 39.75
Glucosa (g L ⁻¹)	127.11 \pm 89.29

(Benítez, 2013; Sánchez, 2013; Osuna, 2014; Quintero, 2015).

Debido a los daños que se han encontrado con anterioridad en estudios de animales con una deficiencia de riboflavina, se considera importante realizar un análisis hematológico y conteo de células sanguíneas para tener una visión más amplia del estado de salud de los organismos al iniciar y finalizar el experimento.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION

- ¿Cuál es el requerimiento óptimo de vitamina B₂ para los juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*)?
- ¿Cuáles son los signos clínicos que puede presentar la especie por una deficiencia de riboflavina?
- ¿Cuál es el efecto que tiene la riboflavina sobre el crecimiento, la eficiencia alimenticia y la supervivencia dependiendo de la cantidad de inclusión?
- ¿Cuál es el efecto en los parámetros hematológicos al variar la concentración de riboflavina en la dieta?
- ¿Existe un daño en los órganos y tejidos a nivel histopatológico al variar la concentración de riboflavina en la dieta?
- ¿Cuál es la concentración de riboflavina que se puede almacenar en el hígado de los juveniles de *L. guttatus*?

4. HIPÓTESIS

Si *Lutjanus guttatus* tiene un requerimiento de riboflavina (vitamina B₂), su deficiencia en la dieta propiciará la aparición de signos clínicos, bajo crecimiento, daño a nivel histológico y alteraciones en los niveles hematológicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Establecer el requerimiento nutricional de riboflavina y los efectos que provoca su deficiencia, en juveniles de *Lutjanus guttatus*.

5.2 Objetivos particulares

- Establecer el requerimiento de riboflavina en la dieta para juveniles de *L. guttatus* para su óptimo crecimiento.
- Evaluar los signos clínicos derivados de la deficiencia de riboflavina en juveniles de *L. guttatus*.
- Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de riboflavina en los parámetros hematológicos de juveniles de *L. guttatus*.
- Identificar los efectos histopatológicos provocados por la deficiencia de riboflavina en juveniles de *L. guttatus*.
- Determinar la concentración de riboflavina en el hígado de los juveniles de *L. guttatus*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Periodo experimental

El estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán. Durante el periodo de agosto a noviembre del 2015.

6.2 Dieta experimental

Las dietas experimentales se elaboraron con base a la utilizada por Chávez-Sánchez *et al.* (2014), de la cual se cambiaron las harinas de soya y harina de krill por harina de camarón y calamar para poder utilizar para este experimento dietas con nulo nivel de riboflavina. Con respecto a los niveles óptimos de proteína y lípidos, fueron preparadas de acuerdo a los resultados obtenidos por Abdo de la Parra *et al.* (2010) para juveniles de esta especie (Tabla 6). Se prepararon siete dietas con niveles crecientes de riboflavina para suministrar 0 (R0), 5 (R5), 10 (R10), 20 (R20), 40 (R40), 80 (R80) y 160 (R160) mg kg⁻¹ de la vitamina. Se utilizó riboflavina proporcionada por Trouw Nutrition México. S.A. de C.V. Se suministró un 26% adicional en cada una de las dietas, para compensar la pérdida de vitamina durante el proceso de elaboración de las dietas experimentales (Tacon, 1995; NRC, 2011). La cantidad de riboflavina que se añadió, se restó a la dextrina para ajustar un 100% de ingredientes en la dieta. La premezcla de vitaminas que se incluyó en las dietas fue libre de riboflavina.

Tabla 6. Dieta basal para la determinación de requerimiento de riboflavina en juveniles de *L. guttatus*

Ingredientes	%
Harina de pescado	41.05
Harina de camarón	22.60
Harina de calamar	11.00
Dextrina	13.40
Aceite de pescado	8.00
Premezcla Vitamina	0.10
Premezcla Minerales	0.10
Cloruro de colina	0.15
Lecitina de soya	1.50
Vitamina C	0.10
Alginato	2.00

***Vitaminas:** Riboflavina, 0 mg/kg; Acido Pantoténico, 22.22 mg/kg; Niacina, 10 mg/kg; vitamina B12, 1 mg/kg; Colina, 1538.46 mg/kg; Biotina, 10 mg/kg; Tiamina, 1.08 mg/kg; Piridoxina, 7.31 mg/kg; Inositol, 153.84; Ácido Fólico, 4.08; Vitamina C, 0 mg/kg; Vitamina A, 0.75 mg/kg; Vitamina E, 30 mg/kg; Vitamina D, 0.06 mg/kg; Vitamina K; 16.5 mg/kg.

****Minerales:** Cobre, 12 mg/kg; Yodo, 11 mg/kg; Hierro, 375 mg/kg; magnesio, 20.96 mg/kg; Zinc, 41.66 mg/kg; Selenio, 30 mg/kg. Fuente de vitaminas y minerales proporcionados por: Trouw Nutrition México, S.A. de C.V.

Las dietas fueron elaboradas en la planta de alimentos del CIAD-Unidad Mazatlán, en el cual las harinas fueron molidas en un molino de martillo SIEMENS con un tamiz con orificios de 250µm de diámetro. Posteriormente cada uno de los ingredientes (harinas y micronutrientes) fue pesado en una báscula digital Scout Pro SP2001 (Ohaus, Suiza) con una precisión de 0.001g.

Una vez pesados todos los ingredientes, fueron incorporados en una mezcladora con 5 kg de capacidad Hobart AT-200 (HOBART, USA). Primero se agregaron las harinas de pescado, camarón y calamar. Se mezclaron por 10 min y después se agregó la dextrina, de nuevo se mezcló por 10 min. Después, se agregaron los micronutrientes y se mezcló de nuevo por 10 min. Por último se agregaron los ingredientes líquidos, aceite de pescado y lecitina de soya, y

se dejó mezclar por otros 10 min. Al terminar la mezcla homogénea se elaboró el alimento en pellets (Figura 3) con la ayuda de un extrusor Brabender TSE 20/40 (Plastic-Corder), donde se dosifica la dieta de forma manual para que pase por seis diferentes secciones de temperatura en el barril del extrusor (30, 50, 70, 100, 100, 100 °C) a una velocidad de extrusión de 40 rpm y una presión por debajo de 15 bar (Figura 4), después se colocó el alimento en un secador a 40° durante 12 h. Cuando los pellets ya estaban secos se almacenaron herméticamente en bolsas y envases (previamente etiquetados) en refrigeración a 4°C, para prevenir la degradación de las vitaminas y mantener la calidad del alimento. Se tomó una muestra de 10 g de cada dieta para la realización posterior de los análisis químicos correspondientes.



Figura 3. Alimento elaborado en el extrusor de doble tornillo TSE 20/40



Figura 4. Extrusor Brabender Mod. TSE 20/40

6.3 Sistema experimental

Se utilizó un sistema de circulación con flujo continuo de agua marina, compuesto por 21 tanques de fibra de vidrio de 300 L cada uno. Cada tanque se mantuvo con aireación. El agua marina se bombeó de la playa, y se pasó por un filtro de arena, cartuchos de 16 micrómetros y un filtro UV para evitar la presencia de parásitos y organismos ajenos al sistema. El fotoperiodo fue de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. Diariamente se sifonearon los tanques para evitar acumulación de heces y alimento, para no afectar la calidad del agua. Se midió oxígeno, temperatura y salinidad todos los días a las 11:00 hrs (Figura 5).



Figura 5. Sistema experimental

6.4 Organismos experimentales

Los peces experimentales se obtuvieron de la planta piloto para la producción de juveniles de peces marinos ubicada en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán. Se utilizaron juveniles de pargo flamenco (*L. guttatus*). En cada tanque se sembraron 15 organismos con un peso inicial de 9.38 ± 0.01 g (Figura 6) a una densidad de 50 peces/m³.



Figura 6. Ejemplar inicial de juvenil de pargo flamenco (*L. guttatus*)

Los peces se aclimataron al sistema experimental durante los primeros siete días, en este periodo se alimentaron con una dieta comercial para peces marinos. A partir del octavo día se les proporcionaron las dietas experimentales. La alimentación fue de forma manual, a saciedad aparente y tres veces al día (9:00, 13:00 y 17:00). Se registró la cantidad de alimento consumido por tanque al día y se observó durante todo el experimento, la aparición de signos clínicos en los organismos y su comportamiento.

Al inicio del experimento se tomaron muestras de sangre de 10 organismos para realizar análisis hematológicos y conteo de células sanguíneas. A estos mismos peces se les extrajeron los órganos (ojos, branquias, hígado, cerebro, bazo, riñón, intestino) para análisis histológicos iniciales.

Se realizaron biometrías cada 14 días. Todos los peces se pesaron, midieron y observaron presencia de posibles signos clínicos. Se extrajeron los peces de los tanques con red para llevarlos a un contenedor para anestésarlos con aceite de clavo diluido al 50% con alcohol etílico de 96°, en una dosis de 0.05 mL L⁻¹ de agua de mar. Se pesaron los organismos en una balanza Mettler Toledo y se midieron con un ictiómetro convencional (Aquatic Eco-System, Inc).

6.5 Variables de respuesta

Se evaluó el efecto de la riboflavina en cada tratamiento mediante los resultados de crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia, signos clínicos por deficiencia, parámetros sanguíneos, reserva de vitamina en hígado y alteraciones histológicas en órganos. El crecimiento de los peces se evaluó con los datos de peso y longitud, obtenidos durante cada biometría del bioensayo. Con estos datos y los de consumo de alimento se calculó el desempeño en crecimiento y eficiencia alimenticia utilizando los parámetros de peso ganado, tasa de crecimiento específico, alimento consumido, tasa de conversión

alimenticia, y supervivencia, utilizando las fórmulas propuestas por Hernández *et al.* (2016):

Peso ganado (g)

$$PG (g) = Pf - Pi$$

Donde:

PG = Peso ganado (g)

Pf = Peso promedio final (g)

Pi = Peso promedio inicial (g)

Tasa de crecimiento específico (%/día)

$$TCE (\%/día) = 100 \left(\frac{\ln Pf - \ln Pi}{t} \right)$$

Donde:

TCE = Tasa de crecimiento específico (g/día)

Pf = Peso promedio final (g)

Pi = Peso promedio inicial (g)

t = Tiempo (días)

Ln = Logaritmo natural

Tasa de conversión alimenticia

$$TCA = \frac{ACI}{PGI}$$

Donde:

TCA = Tasa de conversión alimenticia

ACI = Alimento consumido individual (g) / tiempo (días)

PGI = Peso ganado individual (g) / tiempo (días)

Supervivencia (%)

$$S (\%) = 100 \left(\frac{\text{No. final de organismos}}{\text{No. inicial de organismos}} \right)$$

6.6 Parámetros sanguíneos

6.6.1 Extracción de la muestra de sangre

El análisis sanguíneo inicial se realizó con un muestro aleatorio de diez organismos del lote de peces para la siembra. Al final del experimento las muestras de sangre se obtuvieron de tres peces por tanque. Para ambos casos, los organismos no se alimentaron durante las 24 horas previas. Antes de la toma de muestra, los peces se anestesiaron con extracto de clavo como anestésico diluido al 50% con alcohol etílico de 96°, en una dosis de 0.05 mL L⁻¹ de agua de mar. La extracción se realizó en la vena caudal con jeringas para tuberculina (TERUMO) de 1 ml (Figura 7); para el análisis de hemoglobina y para el recuento de células sanguíneas, se depositó la muestra en tubos con K₂EDTA (BD Microtrainer). Para el hematocrito, se utilizaron tubos capilares para hematocrito y para la química sanguínea se utilizaron tubos Eppendorf para depositar la sangre y después obtener el suero por medio de centrifugación.



Figura 7. Extracción de sangre de juvenil de pargo flamenco (*L. guttatus*)

6.6.2 Recuento de eritrocitos

Se contó el número de glóbulos rojos por milímetro cúbico de la sangre. El recuento se realizó por el método de tinción de Natt-Herrick: se agregaron 4 mL de colorante Natt-Herrick en un tubo de 5 mL, después se le adicionaron 20 μ L de la sangre con anticoagulante para una dilución 1:200, se mezcló y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Se colocó una gota de la solución en la cámara Neubauer; después de 5 min de sedimentación, se realizó el recuento celular con un microscopio a 40X.

El número de eritrocitos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de eritrocitos} = \left(\text{Número de eritrocitos total} \frac{1}{1(0.02)} \right) (\text{Factor de dilución})$$

Factor de dilución= 200

6.6.3 Recuento de leucocitos

De la misma manera como en el recuento de eritrocitos, se basó en el método de tinción de Natt-Herrick. El recuento de leucocitos se realizó en los extremos más grandes de la cámara de Neubauer.

El número de leucocitos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Número de leucocitos} = \frac{\text{Número total de células blancas}}{8} (200)$$

6.6.4 Hematocrito

Se tomaron las muestras de sangre en tubos para hematocrito hasta completar 2/3 del tubo, un extremo fue tapado con plastilina (Figura 8). El tubo se colocó en una centrífuga SOL-BAT P600 durante 10 minutos. Después se determinó el paquete celular según el volumen total con un lector para microhematocrito SOL-BAT (Figura 9).



Figura 8. Muestras de sangre en tubos capilares para hematocrito



Figura 9. Lector para microhematocrito SOL-BAT

6.6.5 Hemoglobina

Se determinó el contenido de hemoglobina por medio de un kit colorimétrico marca RANDOX, según el método de la cianometahemoglobina y mediante un espectrofotómetro se obtuvieron las lecturas de las muestras a 540 nm (Figura 10).

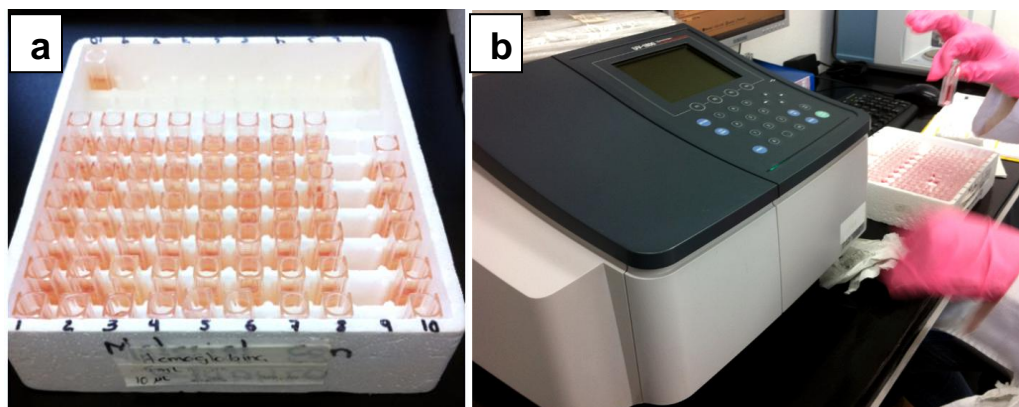


Figura 10. a) Muestras de hemoglobina con el kit colorimétrico. b) Lectura con espectrofotómetro

6.6.6 Química sanguínea

Los valores de proteína total, triglicéridos, glucosa y colesterol se determinaron del suero sanguíneo. El suero se obtuvo tras centrifugar la sangre coagulada durante 5 min (Figura 11). La proteína total se midió con un kit colorimétrico (Spinreact) basado en el método de Biuret, con un espectrofotómetro se tomaron las lecturas de las muestras a 545 nm. Los triglicéridos se determinaron con un kit para cuantificación de Triglicéridos-LS (Grupo MexLab) y las lecturas se obtuvieron mediante un espectrofotómetro a 520 nm. Para la glucosa (GLUC) se utilizó un kit colorimétrico (Randox) y en el espectrofotómetro se leyeron los resultados a 500 nm. Por último, para el colesterol total LS se cuantificó con un kit (Grupo MexLab) y con el espectrofotómetro se realizaron las lecturas a 505 nm.



Figura 11. Tubo con muestra de sangre coagulada tras centrifugación para la obtención del suero

6.7 Análisis histológico

Para conocer el estado de los organismos se sacrificaron tres peces por tanque al final del experimento (nueve por tratamiento), por medio de una sobredosis

de aceite de clavo. Se extrajeron los órganos necesarios para el análisis (ojos, branquias, hígado, cerebro, bazo, riñón, intestino) (Figura 12), se colocaron en formalina al 10% durante 24 h, después se lavaron y fueron conservados en una solución de alcohol al 70% hasta su procesamiento mediante las prácticas convencionales de histología (Lee y Luna, 1968; Drury y Wallington, 1980; Tonguthai *et al.*, 1999). Se colocaron en un molde (Tissue-Tek unicassette #4170-01). Para permitir la facilidad del corte y evitar artefactos, las branquias y los ojos fueron descalcificados. Posteriormente se deshidrataron todos los órganos con alcoholes seriados (70, 80, 96 y 100%) y se aclararon con xilol para facilitar la impregnación de la parafina (Histoembebedor Leica-Jung, USA) en los tejidos. En un micrótomero rotatorio (Jung Histocut Leica #820), se realizaron cortes a 5 micras, se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y se montaron con resina CYTOSEAL 60 (Lee y Luna, 1968; y Drury y Wallington, 1980). Se utilizó un microscopio compuesto Olympus (CH-30 RF100, USA) y una cámara Olympus Qimage, para las imágenes digitales.

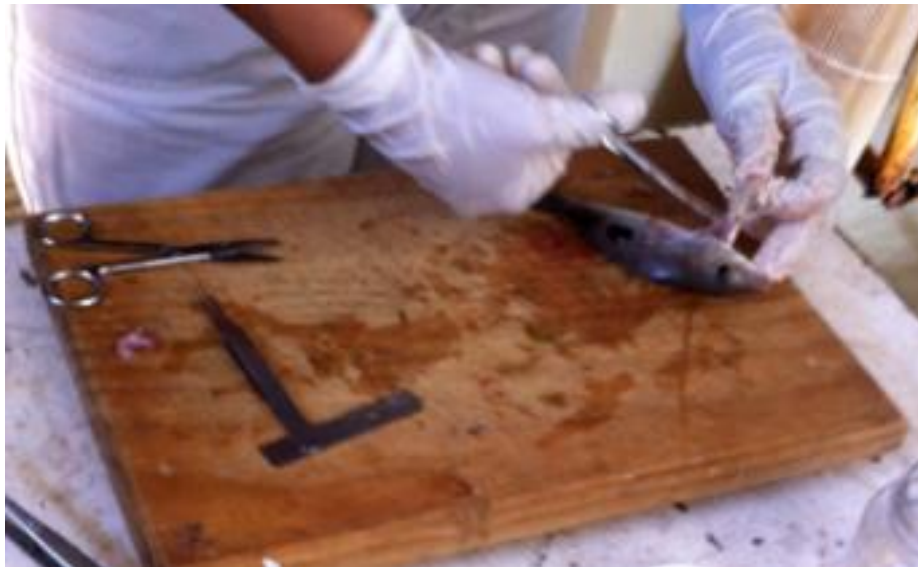


Figura 12. Extracción de órganos de los peces.

6.8 Análisis químicos

Los análisis de caracterización de las dietas y de carcasa inicial y final, se llevaron a cabo en el laboratorio de bromatología del CIAD-Unidad Mazatlán, siguiendo las técnicas estandarizadas por la AOAC, (2011).

6.8.1 Determinación de riboflavina

El contenido de riboflavina de cada uno de los ingredientes utilizados para elaborar el alimento, en las siete dietas y en los hígados de los peces se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), mediante el método de Anyakora *et al.* (2008).

Se utilizó un cromatógrafo líquido HP150 con inyección manual, un detector de UV visible y una columna de fase reversa Zorbax SB C18 (5 μ m X 4.6 X 150mm), con un flujo de 1 ml/min y a una longitud de onda de 254 nm, a temperatura ambiente. Se calibró preparando un estándar de riboflavina de alta pureza a diferentes concentraciones.

Se utilizaron solventes de grado HPLC, la fase móvil fue el 70% buffer ácido hexanosulfónico 0.5 mM (sal sódica) y 30% metanol. Se preparó el buffer pesando 1.8822 g de ácido hexansulfónico (sal sódica), se colocó en un matraz de 2 L y se disolvió con 1.5 L de agua HPLC, después se adicionó 20 ml de ácido acético glacial y se llevó a 2 L con agua HPLC.

Para la preparación de las muestras de los ingredientes, las dietas y los hígados de los peces experimentales, se pesaron 5 g de muestra sólida en un matraz volumétrico, se disolvió con 100 ml de buffer de ácido hexanosulfónico, se agitó durante una hora a temperatura ambiente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se filtró con un filtro de membrana de 0.22 μ m y por último será inyectado en el HPLC.

6.9 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de los parámetros calculados que se obtuvieron de crecimiento, supervivencia, consumo alimenticio y eficiencia alimenticia, se realizó una prueba ANOVA de una vía, con un nivel de significancia de 95%, con los datos paramétricos se utilizó un análisis de Tukey para la comparación entre grupos. Se utilizó el programa estadístico SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc). Para determinar el requerimiento de riboflavina, se realizó un modelo de regresión lineal con punto de quiebre basado en la concentración de riboflavina en las dietas y el peso ganado (Ai *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2009; Yu-Hung *et al.*, 2011; Chávez-Sánchez *et al.*, 2014).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis proximal y concentración de riboflavina en las dietas experimentales

El análisis proximal de las dietas no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos. Las dietas se formularon en base a los requerimientos de proteína (50%) y lípidos (12%) para el pargo flamenco (*L. guttatus*) y los resultados obtenidos fueron muy cercanos a los calculados teóricamente, por lo que las dietas se consideraron isoproteicas e isoenergéticas.

En la tabla 7 se presentan los contenidos de riboflavina de cada una de las dietas. En el tratamiento R0 que no se le añadió riboflavina, no se detectó la vitamina. El resto de las dietas presentaron resultados muy cercanos al calculado, a excepción del último tratamiento (R160) que el análisis dio 118.27 mg/kg a pesar de que a todas se les suministró un 26% adicional para compensar la pérdida de vitamina durante el proceso de elaboración del alimento (NRC, 1983 y Tacon, 1995). Sin embargo, debido a que el valor fue elevado no se considera que haya afectado el desempeño del diseño experimental ni de los organismos.

Tabla 7. Análisis proximal y contenido de riboflavina en las dietas experimentales (valores promedio \pm D.E expresados en base húmeda)

Composición	Dietas						
	R0	R5	R10	R20	R40	R80	R160
Humedad	8.20 \pm 0.1 ^a	8.56 \pm 0.12 ^a	8.23 \pm 0.2 ^a	8.36 \pm 0.2 ^a	8.21 \pm 0.1 ^a	8.54 \pm 0.1 ^a	8.29 \pm 0.0 ^a
Proteína	50.04 \pm 0.1 ^a	50.99 \pm 0.0 ^a	49.97 \pm 0.6 ^a	50.19 \pm 0.0 ^a	49.40 \pm 0.1 ^a	50.12 \pm 0.1 ^a	49.81 \pm 0.2 ^a
Lípidos	12.74 \pm 0.2 ^a	12.44 \pm 0.1 ^a	12.48 \pm 0.1 ^a	12.79 \pm 0.1 ^a	12.09 \pm 0.6 ^a	12.22 \pm 0.1 ^a	12.79 \pm 0.1 ^a
Ceniza	20.24 \pm 0.2 ^a	20.88 \pm 0.5 ^a	20.94 \pm 1.1 ^a	20.81 \pm 0.4 ^a	21.56 \pm 1.2 ^a	21.37 \pm 1.0 ^a	21.12 \pm 1.0 ^a
ELN	8.78 \pm 0.0	7.14 \pm 0.5 ^a	8.38 \pm 0.4 ^a	7.85 \pm 0.2 ^a	8.74 \pm 0.4 ^a	7.76 \pm 1.1 ^a	7.99 \pm 0.9 ^a
Contenido de Vitamina B2 (mg/kg)							
Calculado	0	5	10	20	40	80	160
Analizado	0.00 \pm 0.00	5.88 \pm 0.31	11.65 \pm 0.19	18.66 \pm 0.70	36.32 \pm 1.36	77.82 \pm 2.13	118.27 \pm 5.25

Valores con mismo superíndice en cada fila no son significativamente diferentes (P>0.05).

7.2 Análisis proximal de la carcasa

Se realizó un análisis proximal del cuerpo de los peces para determinar la composición de los organismos experimentales según la inclusión de riboflavina en cada tratamiento (Tabla 8).

Tabla 8. Composición proximal del cuerpo de los peces que recibieron diferentes niveles de riboflavina en su dieta (valores promedio \pm D.E. expresados en base húmeda)

Dietas	Inclusión Riboflavina (mg/kg de dieta)	Humedad	Proteína	Lípidos	Ceniza
Inicial	-	73.76 \pm 0.39	14.97 \pm 0.10	5.30 \pm 0.03	4.77 \pm 0.08
R0	0	67.63 \pm 0.5 ^a	16.10 \pm 0.6 ^a	8.38 \pm 0.7 ^a	4.98 \pm 0.1 ^a
R5	5.88	67.07 \pm 0.3 ^a	17.10 \pm 0.2 ^b	9.25 \pm 0.4 ^b	4.63 \pm 0.3 ^b
R10	11.65	67.01 \pm 0.1 ^a	17.98 \pm 0.4 ^c	9.41 \pm 0.3 ^b	4.56 \pm 0.3 ^b
R20	18.66	66.09 \pm 2.5 ^a	18.20 \pm 1.3 ^c	9.64 \pm 0.6 ^{bc}	4.27 \pm 0.3 ^b
R40	36.32	67.65 \pm 0.1 ^a	18.87 \pm 0.6 ^d	9.98 \pm 0.1 ^c	3.08 \pm 0.2 ^c
R80	77.82	67.58 \pm 0.5 ^a	19.01 \pm 0.0 ^d	9.78 \pm 0.2 ^c	4.10 \pm 0.6 ^c
R160	118.27	67.48 \pm 0.0 ^a	19.12 \pm 0.6 ^d	9.74 \pm 0.1 ^c	4.02 \pm 0.3 ^c

Valores con mismo superíndice en cada columna no son significativamente diferentes ($P > 0.05$).

Los resultados de proteína corporal se incrementaron significativamente ($P < 0.05$) en función del nivel de inclusión de riboflavina en la dieta, los últimos tres tratamientos (R40 a R160) ya no mostraron diferencias significativas con respecto a los primeros (R0 a R20). Por otro lado, los resultados de lípidos mostraron valores sin diferencias significativas desde la dieta R40 hasta la R160. En ambos análisis se encontraron diferencias en el tratamiento R0 (sin riboflavina) en comparación con el resto de las dietas.

Uno de los papeles importantes de la riboflavina es que participa en su forma de coenzimas (FMN y FAD) en diversos procesos metabólicos, como por ejemplo: la absorción de aminoácidos (Kohlmeier, 2003) y el metabolismo de proteínas (Mollinedo y Carrillo, 2014). Dichas coenzimas van a involucrarse en el metabolismo proteico en la primer fase: digestión, aquí es donde se van a degradar las proteínas provenientes de los alimentos iniciando en el tracto gastrointestinal con la ayuda de varias enzimas. La segunda fase a involucrarse es en la absorción de aminoácidos hacia el enterocito, que es la principal célula del epitelio intestinal (Torres, 2014).

7.3 Variables de respuesta

Se realizó una evaluación de las variables biológicas para observar como influyó cada una de las dietas en el crecimiento de los organismos experimentales según la inclusión de riboflavina que recibieron en el alimento (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de las variables de desempeño evaluadas en juveniles de *L. guttatus* (valores promedio \pm D.E.)

Dieta	Inclusión*	Parámetros						
		PI (g)	PF (g)	PG (g)	TCE (% día ⁻¹)	CAI (g pez ⁻¹)	TCA	S(%)
R-0	0	9.39 \pm 0.01 ^a	51.69 \pm 2.4 ^a	42.30 \pm 2.4 ^a	1.52 \pm 0.04 ^a	66.70 \pm 0.6 ^a	1.58 \pm 0.08 ^a	95.56 \pm 3.9 ^a
R-5	5.88	9.37 \pm 0.01 ^a	55.90 \pm 1.5 ^b	46.52 \pm 1.5 ^b	1.59 \pm 0.02 ^b	72.65 \pm 1.0 ^b	1.56 \pm 0.07 ^{ab}	91.11 \pm 10.2 ^a
R-10	11.65	9.38 \pm 0.02 ^a	60.68 \pm 0.8 ^c	51.30 \pm 0.8 ^c	1.67 \pm 0.01 ^c	73.73 \pm 1.4 ^{bc}	1.44 \pm 0.04 ^{abc}	91.11 \pm 7.7 ^a
R-20	18.66	9.38 \pm 0.01 ^a	61.74 \pm 0.1 ^c	52.37 \pm 0.1 ^c	1.68 \pm 0.00 ^c	73.47 \pm 1.3 ^{bc}	1.40 \pm 0.03 ^{bc}	90.00 \pm 14.1 ^a
R-40	36.32	9.38 \pm 0.02 ^a	68.97 \pm 0.8 ^d	59.59 \pm 0.8 ^d	1.78 \pm 0.01 ^d	82.70 \pm 2.5 ^d	1.39 \pm 0.06 ^c	86.67 \pm 6.7 ^a
R-80	77.82	9.37 \pm 0.00 ^a	67.01 \pm 1.6 ^d	57.63 \pm 1.6 ^d	1.76 \pm 0.02 ^d	77.61 \pm 0.8 ^{ce}	1.35 \pm 0.04 ^c	95.55 \pm 3.9 ^a
R-160	118.27	9.38 \pm 0.00 ^a	66.88 \pm 0.8 ^d	57.50 \pm 0.8 ^d	1.75 \pm 0.01 ^d	78.13 \pm 1.3 ^e	1.36 \pm 0.04 ^c	93.33 \pm 11.6 ^a

Valores con mismo superíndice en cada columna no son significativamente diferentes (P>0.05)

Los datos son promedios \pm SD

* Inclusión de riboflavina a la dieta (mg kg⁻¹)

PI: Peso Inicial

PF: Peso Final

PG: Peso Ganado

TCE: Tasa de Crecimiento Específica

CAI: Consumo de Alimento Individual

TCA: Tasa de Conversión Alimenticia

S: Supervivencia

7.3.1 Peso ganado

Durante este experimento de 16 semanas (112 días), se realizaron ocho biometrías para evaluar el progreso del crecimiento en cada uno de los tratamientos (Figura 13). A partir del día 28 hubo una separación en la tendencia de las primeras dos dietas (R0-R5), debido a que las últimas cuatro (R10-R160) empezaron a favorecer en el aumento de peso en los peces experimentales. Desde el día 98 se produjo otra marcada separación de los tres tratamientos con mayor contenido de riboflavina (R40-R160), la cual permaneció constante hasta el final del experimento, dichos tratamientos fueron los que presentaron mayor peso ganado sin diferencias significativas ($P > 0.05$). Los peces que recibieron el alimento sin inclusión de riboflavina (R0), tuvieron un peso promedio significativamente menor ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos.

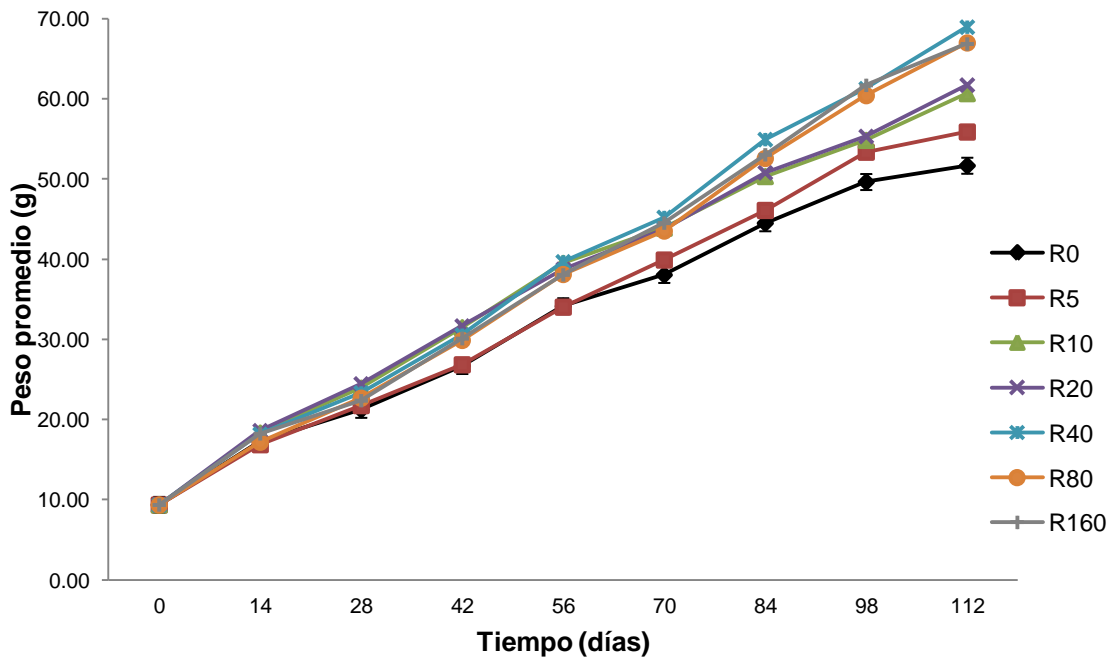


Figura 13. Crecimiento de los juveniles de *L. guttatus* alimentados con dietas con diferentes niveles de riboflavina

Cada especie de peces puede tener diferentes signos por deficiencia (aunque se trate de encontrar el requerimiento de la misma vitamina), lo cual va a depender de la edad, la talla o los factores ambientales (NRC, 2011). Existen distintos trabajos sobre requerimiento de riboflavina en peces que obtienen resultados con una importante diferencia de crecimiento en peso en los tratamientos que tienen baja o nula riboflavina con el resto de las dietas (Murai y Andrews, 1978; Hughes *et al.*, 1981; Woodward, 1984, 1985; Soliman y Wilson, 1992; Deng y Wilson, 2003). Esto concuerda con los resultados de peso ganado en este trabajo.

A pesar de que el bajo crecimiento es un signo de deficiencia común en este tipo de estudios, va a depender de la especie, edad y el tiempo que se necesita para presentar diferencias significativas entre tratamientos. Woodward (1985) evaluó el requerimiento de riboflavina en trucha arcoíris con peso inicial de 2 g en un experimento de 16 semanas. A partir de la semana 4, los peces alimentados con la dieta sin inclusión de riboflavina empezaron a mostrar un crecimiento reducido, acompañado de otros signos de deficiencia. Por otro lado, Hughes *et al.* (1981) también realizó un estudio de 20 semanas sobre requerimiento de riboflavina en trucha arcoíris con un peso inicial de 11.2 g. Los resultados de crecimiento en peso permanecieron iguales las primeras 14 semanas, a partir de ahí los peces alimentados con la dieta sin suplementación de riboflavina empezaron a reducir su crecimiento y fue hasta la semana 20 donde se encontraron diferencias significativas ($P < 0.01$) entre la primer dieta sin inclusión de riboflavina y el resto de los tratamientos. En el presente estudio se necesitaron 16 semanas para que se presentaran diferencias significativas entre las dietas con o sin vitamina, en peces con un peso inicial de 9.38 g.

7.3.2 Supervivencia

Durante las 16 semanas se presentaron casos de mortalidad, sin embargo algunos fueron por causas externas a las dietas, por lo que en los resultados de

supervivencia (Tabla 9) no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en esta investigación.

De igual manera que en este trabajo experimental, Murai y Andrews (1978) evaluaron el requerimiento de riboflavina en bagre (*Ictalurus punctatus*); donde reportaron poca mortalidad, la cual no fue relacionada a la dieta. Realizaron dos experimentos: en el primero, los peces con un peso inicial de 9 g fueron alimentados con cinco dietas que contenían diferentes niveles de riboflavina (0, 20, 40, 80 y 120 mg/kg) durante 20 semanas. La dieta sin inclusión de vitamina B₂, presentó la mayor mortalidad de un 13.3%. En el segundo de 12 semanas, los peces iniciales tenían un peso de 6.3 g en seis tratamientos con diferente inclusión de riboflavina (0, 3, 8, 20, 40 y 80 mg/kg). No se encontraron diferencias significativas entre dietas en la mortalidad, la cual iba de 2% a 8% y no estaba relacionada a la dieta. A pesar de que se han reportado altas mortalidades en estudios con salmónidos (Halver, 1957; Kitamura *et al.*, 1962; Steffens, 1970); existen resultados similares al presente con baja tasa de mortalidad en bagre (Dupree, 1966), carpa (Orgino, 1967; Aoe *et al.*, 1967), anguila (Arai *et al.*, 1972) y trucha arcoíris (Amezaga y Knox, 1990).

7.3.3 Requerimiento óptimo de riboflavina (vitamina B2)

En base al método que diversos autores han utilizado para buscar requerimientos de diferentes nutrientes (Ai *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2009; Yu-Hung *et al.*, 2011; Chávez-Sánchez *et al.*, 2014), se obtuvo el requerimiento óptimo de riboflavina para juveniles de *L. guttatus* por medio de un análisis de regresión lineal con punto de quiebre entre la concentración de riboflavina en las dietas y el peso ganado de los organismos experimentales (Figura 14).

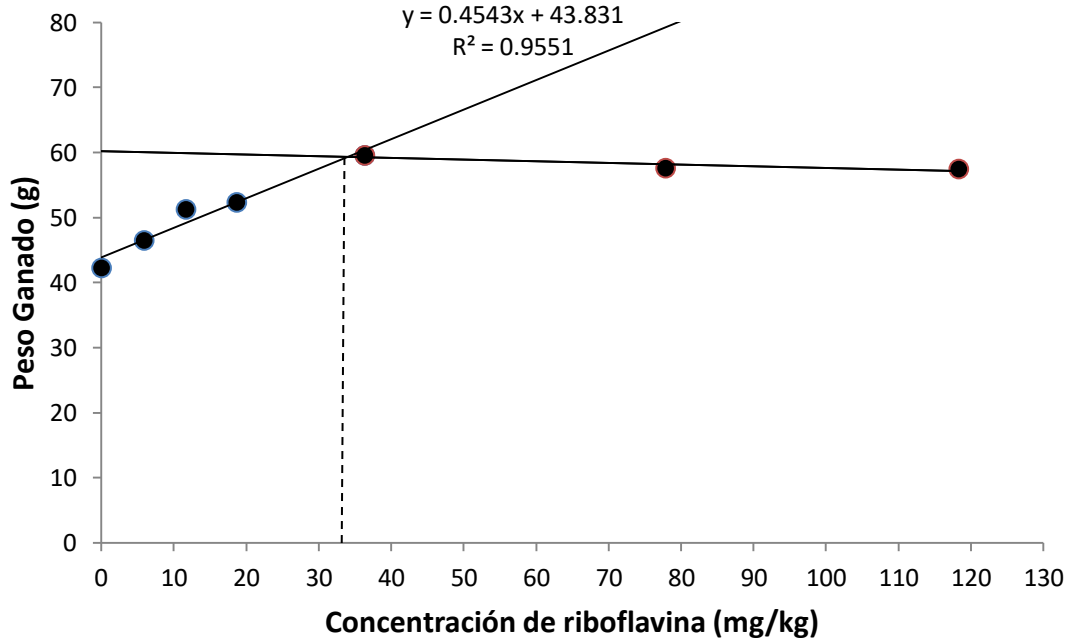


Figura 14. Requerimiento nutricional de riboflavina para juveniles de *L. guttatus*

En la Figura 14 se observa una correlación positiva entre la concentración de riboflavina (mg kg^{-1} de dieta) y el peso ganado (g), por lo que se deduce que el aumento de la vitamina B₂ en la dieta de los juveniles de *L. guttatus* favorece en la ganancia de peso hasta permanecer en un nivel estable.

Con la ayuda del análisis de regresión lineal con punto de quiebre se pudo encontrar el requerimiento óptimo de riboflavina para juveniles de pargo flamenco, el cual fue establecido en 34.17 mg kg^{-1} .

Los requerimientos vitamínicos van a depender de varios factores: edad, talla, tasa de crecimiento, factores ambientales y una interrelación de nutrientes. Incluso se han reportado diferentes valores de requerimientos para la misma especie (NRC, 1993; Halver, 2002). Existen trabajos de otras especies de peces, donde se basan en diversas variables para obtener el requerimiento de riboflavina; por ejemplo: máximo almacenamiento de vitamina en el hígado,

peso ganado, ausencia de signos por deficiencia y actividad enzimática. En la Tabla 10 se muestran los requerimientos de cinco especies tomando en consideración el peso ganado, como se realizó en este trabajo.

Tabla 10. Requerimientos de riboflavina basados en peso ganado en diferentes especies de peces

Especie	mg riboflavina/ kg dieta	Referencia
Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	5-15	McLaren <i>et al.</i> (1947)
Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	4	Aoe <i>et al.</i> (1967)
Bagre de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	9	Murai y Andrews (1978)
Salmón del Pacífico (<i>Oncorhynchus spp.</i>)	20-25	Halver (1972)
Tilapia azul (<i>Oreochromis aurea</i>)	6	Soliman y Wilson (1992)

Obtenido de: NRC (2011)

Se puede observar en la Tabla 10 que el requerimiento más alto de riboflavina es en el salmón del Pacífico, el único pez marino donde se ha obtenido el requerimiento de vitamina B₂ basándose en el peso ganado, el cual es de 20-25 mg kg⁻¹ de dieta.

Los requerimientos de riboflavina que se han reportado sobre peces marinos solamente son dos y están basados en el almacenamiento de la vitamina en el hígado (Tabla 11).

Tabla 11. Requerimientos de riboflavina basados en almacenamiento de vitamina en hígado de peces marinos

Especie	mg riboflavina/ kg dieta	Referencia
Salmón del Pacífico (<i>Oncorhynchus spp.</i>)	7	Leith <i>et al.</i> (1990)
Dorada (<i>Seriola lalandi</i>)	11	Shimeno, 1991

Obtenido de: NRC (2011)

Con los valores de la Tabla 10 y la Tabla 11, se puede observar que en ambos casos las cantidades requeridas de vitamina B₂ son más bajas que la obtenida para *L. guttatus*. Sin embargo, es difícil hacer una comparación exacta debido a que las especies, tamaño de los organismos, ámbitos acuáticos y condiciones experimentales son diferentes.

7.4 Determinación de concentración de riboflavina en hígados de organismos experimentales

Se realizó un análisis en los hígados de los peces experimentales para conocer la cantidad de riboflavina que se almacenó en el órgano de acuerdo a cada una de las dietas utilizadas en el experimento (Figura 15).

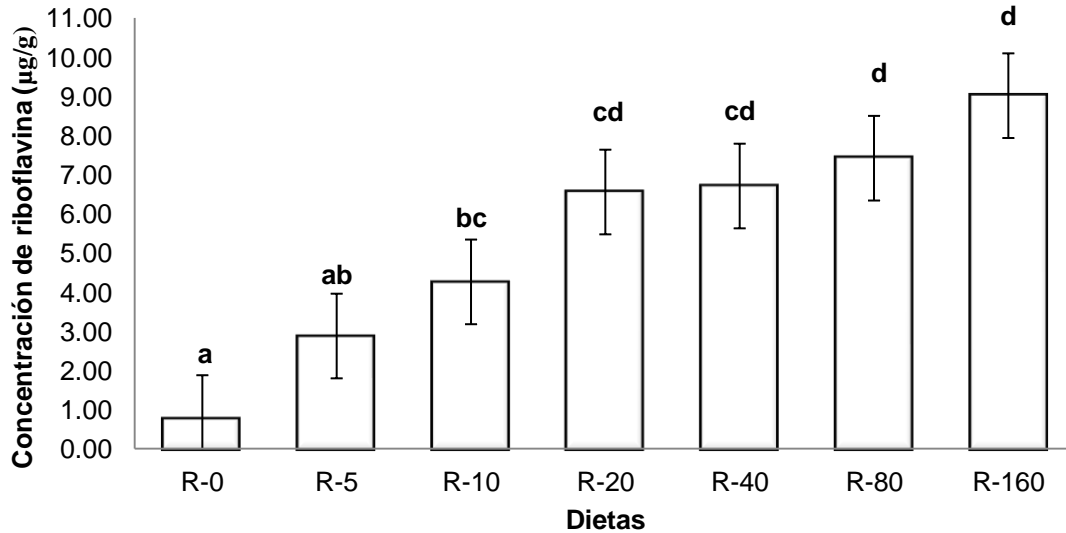


Figura 15. Concentración de riboflavina en el hígado de los juveniles de *L. guttatus*

Se puede observar que en los valores de la concentración de vitamina B₂ en los hígados, existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el primero y el resto de las dietas. Los hígados de los peces de los últimos dos tratamientos (R80 y R160) almacenaron la mayor cantidad de riboflavina (7.43 y $9.03 \mu\text{g g}^{-1}$). Algunos autores reportan resultados similares sobre la correlación positiva de un aumento de riboflavina en la dieta con su almacenaje en el hígado. Hughes *et al.* (1981) reportaron en su investigación sobre la inclusión de riboflavina requerida para trucha arcoíris, que los hígados de la dieta sin inclusión de riboflavina generaron un resultado significativamente menor ($P < 0.05$) en comparación con los de las otras dietas que si contenían vitamina B₂, donde la correlación entre aportación de riboflavina y su almacenamiento en el hígado era positiva. De la igual manera, Woodward (1985) realizó dos experimentos para encontrar el requerimiento de riboflavina en trucha arcoíris con un peso inicial de 2 g y 1.8 g, respectivamente. Encontró diferencias significativas en la cantidad de vitamina B₂ almacenada en los hígados de los primeros tratamientos con escasa cantidad de riboflavina y los últimos tres tratamientos, donde la inclusión a la dieta era de 4 a 8 mg kg^{-1} . El hecho de que la riboflavina se incremente en el hígado de los peces de todos estos trabajos conforme se

aumenta su cantidad en la dieta, significa que este órgano se puede utilizar como indicador de que el organismo está recibiendo el nutriente en la dieta para mantener su almacén adecuado y de que se cubrirán sus funciones.

7.5 Signos clínicos externos

Los peces alimentados con dietas bajas en riboflavina (R0 a R20), presentaron diversos signos clínicos de deficiencia incluyendo ligera opacidad en ojo, erosión en aleta caudal, oscurecimiento de piel e iris, nado errático y bajo crecimiento. El síntoma de deficiencia más común que se presenta es el pobre crecimiento (NRC, 1993). Los organismos de las dietas R40 a R160 no mostraron signos clínicos externos (Figura 16).

En los peces de la dieta R0 apareció una ligera opacidad en los ojos del 35% de los juveniles de este tratamiento. A mayor inclusión se iba disminuyendo la proporción de peces que presentaban dicho problema. En salmones se ha reportado que el primer signo por deficiencia de riboflavina son las cataratas (McLaren *et al.*, 1947; Halver, 1957; Steffens, 1970; Takeuchi *et al.*, 1980; Hughes *et al.*, 1981 citados en NRC, 1993), acompañado de hemorragias, poca vascularización en la córnea y fotofobia. Sin embargo, en este trabajo de 16 semanas, al hacer el análisis histológico no se presentaron éstas patologías, sólo una ligera opacidad observada a simple vista. De la misma manera, en especies como bagre (Murai y Andrews, 1978) y trucha arcoíris (Woodward, 1984) no se encontraron cataratas o problemas en la córnea.

A pesar de que en los resultados la erosión de aletas no fue muy acentuada como en los trabajos reportados de trucha arcoíris (Woodward, 1984, 1985; Amezaga y Knox, 1990) y tilapia azul (Soliman y Wilson, 1992), en este estudio se observó que el 33% de juveniles de *L. guttatus* del tratamiento sin inclusión de riboflavina (R0), se presentó erosión en la aleta caudal. Sin embargo, estos resultados fueron desapareciendo con la adición de la vitamina B₂ en la dieta. Al

respecto, Deng y Wilson (2003) mencionan que en su experimento para determinar el requerimiento de riboflavina en juveniles de lubina híbrida, no se observó ningún caso de erosión de aletas.

Se ha reportado en salmón real una coloración oscura del iris (Aoe *et al.*, 1967; Halver, 1953, citados en Halver, 2002) y nado errático (Halver, 1957, en NRC, 1993). En trucha arcoíris también se presentó nado anormal (Kitamura *et al.*, 1967b; Steffens, 1970 citado en NRC, 1993; Amezaga y Knox, 1990), debido a la deficiente riboflavina en el alimento. Como ya se mencionó, en las dietas R-0 a R-20 se observó nado errático, mientras que en las dietas altas no se presentó esta señal clínica.

El oscurecimiento de piel se dio con mayor incidencia en los peces de la dieta R0 al mostrarlo el 70% del total de los peces de ese tratamiento (Figura 17). En los peces alimentados con dietas con inclusión de riboflavina la incidencia de este síntoma fue baja. Autores como Halver (1957) en salmon real, Kitamura *et al.* (1967), Steffens (1970) en trucha arcoíris y Deng y Wilson (2003) en lubina híbrida, señalan la coloración oscura.



Figura 16. Ejemplo de organismo experimental final con aletas, piel y ojos normales



Figura 17. Ejemplo de organismo experimental final con bajo crecimiento, oscurecimiento de piel y de iris

7.6 Análisis hematológico

Se llevó a cabo una evaluación de los parámetros hematológicos de los juveniles de *L. guttatus* (Tabla 12) para conocer si una deficiencia de riboflavina afecta al sistema inmunológico, debido a que se involucra en diversos procesos metabólicos. Se analizaron los valores de hematocrito, hemoglobina, proteína, triglicéridos, colesterol y glucosa.

Tabla 12. Variables hematológicas evaluadas en juveniles de *L. guttatus* (valores promedio \pm D.E.)

Parámetro	Niveles iniciales	Dieta						
		R0	R5	R10	R20	R40	R80	R160
		Riboflavina (mg kg ⁻¹)						
		0	5.88	11.65	18.66	36.32	77.82	118.27
Hematocrito (%)	38.89 \pm 14.3	51.6 \pm 2.6 ^a	50.4 \pm 1.9 ^{ab}	57.4 \pm 4.9 ^b	56.3 \pm 3.9 ^{ab}	58.0 \pm 2.5 ^{bc}	65.0 \pm 5.6 ^c	69.0 \pm 5.8 ^c
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	8.86 \pm 2.2	8.8 \pm 0.3 ^a	10.0 \pm 0.7 ^b	10.3 \pm 0.9 ^b	9.9 \pm 0.4 ^b	10.5 \pm 0.7 ^b	10.3 \pm 0.6 ^b	10.0 \pm 0.5 ^b
Proteína (g dL ⁻¹)	6.79 \pm 0.5	5.71 \pm 0.31 ^a	5.96 \pm 0.57 ^a	6.76 \pm 0.38 ^{ab}	6.47 \pm 0.36 ^{ab}	7.54 \pm 0.75 ^{bc}	7.79 \pm 0.41 ^c	7.45 \pm 0.35 ^{bc}
Triglicéridos (mg dL ⁻¹)	503.9 \pm 64	423.7 \pm 11 ^a	434.2 \pm 46 ^a	469.9 \pm 28 ^a	456.1 \pm 14 ^a	449.6 \pm 11 ^a	438.5 \pm 15 ^a	544.5 \pm 23 ^b
Colesterol (mg dL ⁻¹)	246.80 \pm 20	393.3 \pm 20 ^{ab}	355.9 \pm 27 ^a	426.5 \pm 42 ^{bc}	402 \pm 29 ^{abc}	427.6 \pm 42 ^{bc}	461.4 \pm 35 ^c	438.4 \pm 43 ^c
Glucosa (mg dL ⁻¹)	135.71 \pm 1.8	62.3 \pm 2.6 ^{ab}	60.7 \pm 5.8 ^{ab}	63.6 \pm 5.6 ^{ab}	63.0 \pm 1.7 ^{ab}	68.4 \pm 8.8 ^{bc}	63.9 \pm 3.1 ^{bc}	69.7 \pm 1.1 ^c

Los resultados que más sobresalen en el análisis sanguíneo son el de hematocrito y hemoglobina. En el primero se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) de las dietas R80 y R160 contra el resto de los tratamientos. Los resultados obtenidos en este trabajo son mayores en comparación con el promedio del laboratorio de Nutrición del CIAD unidad Mazatlán (46.94%). A pesar de esto, ningún valor se salió del intervalo marcado para hematocrito en *L. guttatus* saludables (33.53 – 71.14 %) establecidos por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011), por lo que durante el tiempo experimental, no se ocasionaron efectos en este parámetro.

Los peces alimentados con la dieta R0 presentaron un contenido significativamente menor de hemoglobina en comparación con los demás tratamientos (R5 a R160). El promedio del Laboratorio de nutrición es de 9.15 g dL⁻¹, muy parecido a los valores de R5 a R160. Además, ningún resultado estuvo fuera del intervalo permisible para pargo flamenco (7.29 – 17.03 g dL⁻¹) (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011).

Soliman y Wilson (1992) evaluaron estos dos parámetros hematológicos en juveniles de tilapia azul (*Oreochromis aureus*). Como producto de una deficiencia de riboflavina, los peces que consumían el alimento sin aportación de vitamina B₂ resultaron anémicos al finalizar el experimento de 10 semanas, presentando valores significativamente bajos en los niveles de hemoglobina y hematocrito, en comparación con el resto de los peces alimentados con dietas que si tenían la aportación vitamínica.

En el análisis de proteína las dietas R0 y R5 mostraron los valores más bajos de los resultados en comparación con las demás dietas, sin embargo los valores son más parecidos al promedio de los trabajos realizados en el laboratorio de Nutrición que es de 5.15 g dL⁻¹. A pesar de esto, ninguno de los tratamientos se encuentra dentro del intervalo para proteína de 4.40 a 11.75 g dL⁻¹ (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2011).

En los resultados de triglicéridos y colesterol se observa una tendencia a aumentar con el incremento de inclusión de la vitamina en la dieta, pero el único valor que mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) fue el de los triglicéridos obtenidos con la dieta R160. La B₂ actúa en el metabolismo de carbohidratos y grasas, de tal manera que al incrementar los niveles de la vitamina, se refleja en la elevación de grasas y carbohidratos y en consecuencia en el aumento de peso. Todos los resultados son mayores al de los trabajos realizados con pargo flamenco en el Laboratorio de nutrición. Por el contrario los datos de glucosa son menores a estos, sin embargo existe una correlación positiva entre la inclusión de riboflavina a la dieta y el valor de glucosa obtenido en el análisis.

También se realizó un conteo de células sanguíneas (eritrocitos y leucocitos) para observar si existe una variación en cuanto a la producción de células según los niveles de inclusión de vitamina B₂ (Tabla 13). Los resultados de eritrocitos no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) con los tratamientos R-20 a R-160, donde R-0 resultó con un valor menor en comparación con estas últimas cuatro dietas. Ninguno se salió del intervalo marcado para *L. guttatus* por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2011) ($0.75 - 3.71 \times 10^6 \text{ mm}^3$). Por otro lado, el nivel de leucocitos era bajo desde el inicio del experimento. El resultado con R0 fue significativamente menor al resto de las dietas y por debajo del límite establecido como normal para pargo flamenco ($25.19 - 111.22 \times 10^3 \text{ mm}^3$), sin embargo, conforme se aumentó la vitamina en las dietas se alcanzaron niveles normales. Los peces con bajos niveles de leucocitos son altamente susceptibles a enfermedades dado que la función de este grupo de células sanguíneas es el de proteger al organismo como parte del sistema inmune, pues participan activamente en defensa del organismos como células fagocitarias (Modrá *et al.*, 1998).

Tabla 13. Conteo de células sanguíneas en juveniles de *L. guttatus* (valores promedio \pm D.E.)

Parámetro	Intervalo de referencia	Niveles iniciales	Dieta						
			R0	R5	R10	R20	R40	R80	R160
			Riboflavina (mg kg ⁻¹)						
			0	5.88	11.65	18.66	36.32	77.82	118.27
Eritrocitos (x10 ⁶ mm ³)	0.75 - 3.71	2.00 \pm 0.5	1.62 \pm 0.1 ^a	1.84 \pm 0.0 ^{ab}	1.80 \pm 0.1 ^{ab}	2.20 \pm 0.3 ^b	2.34 \pm 0.3 ^b	2.16 \pm 0.0 ^b	2.38 \pm 0.2 ^b
Leucocitos (x10 ³ mm ³)	25.2 - 111.2	10.3 \pm 1.86	10.2 \pm 1.54 ^a	35.4 \pm 2.92 ^b	33.7 \pm 4.76 ^b	34.0 \pm 2.80 ^b	30.6 \pm 5.62 ^b	27.0 \pm 1.71 ^b	29.0 \pm 1.76 ^b

Como se ha mencionado anteriormente, la riboflavina es un precursor de las coenzimas FMN y FAD, las cuales se involucran en el metabolismo de vitaminas como vitamina A, ácido fólico, niacina, vitamina C y B12 (Mollinedo y Carrillo, 2014). De esta manera, existe una relación entre una absorción adecuada de la cantidad requerida de riboflavina con el resto de dichas vitaminas, pues se involucran en la producción de eritrocitos o nivelación de algunos parámetros sanguíneos.

En la revisión de NRC (2011) se mencionan algunas consecuencias de una mala absorción o deficiencia de dichas vitaminas: en trucha arcoíris se produce anemia (Kitamura *et al.*, 1967), la cual es una enfermedad que se genera al disminuir el número de glóbulos rojos en la sangre o un bajo nivel de hemoglobina. La vitamina B₁₂ se involucra en el desarrollo de eritrocitos y su maduración normal. El ácido fólico también se relaciona con la producción de eritrocitos. Al presentarse un nivel bajo de vitamina C, se ha encontrado en salmón y trucha un alto contenido de triglicéridos y colesterol en plasma (John *et al.*, 1979). La niacina en su forma de coenzimas (NAD y NADP) participa en el correcto metabolismo de grasas en conjunto con la riboflavina en una de las etapas.

7.7 Análisis histológico

Uno de los efectos de la alimentación deficiente de riboflavina en diferentes especies de peces son las cataratas, sin embargo, en este estudio no se encontraron consecuencias a nivel histológico para juveniles de *L. guttatus*. En la Figura 16 se muestra la lente de un pez alimentado con la dieta R40 sin problemas o alteraciones en su estructura. Woodward (1984) llevó a cabo un experimental con trucha arcoíris y como resultado no tuvo resultados de opacidad ocular ni cataratas.

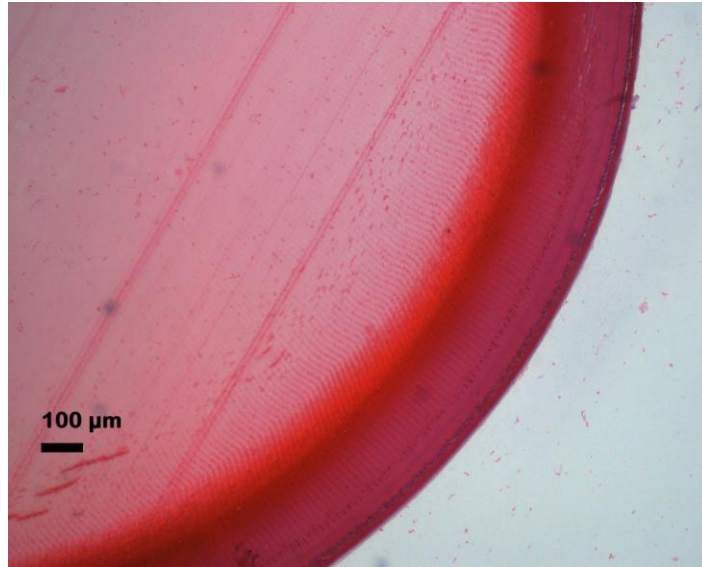


Figura 18. Ejemplo de lente de un organismo experimental de la dieta R40 sin alteraciones histológicas debido a la dieta. H & E

Watanabe y Yamada (1980) describen la estructura normal de la lente en salmón masu, la cual se conforma por la cápsula, una monocapa anterior de células epiteliales, la capa hialina y las fibras. De la misma manera, se puede observar en la Figura 19 un ejemplar de epitelio del cristalino en buen estado de un juvenil de pargo flamenco.

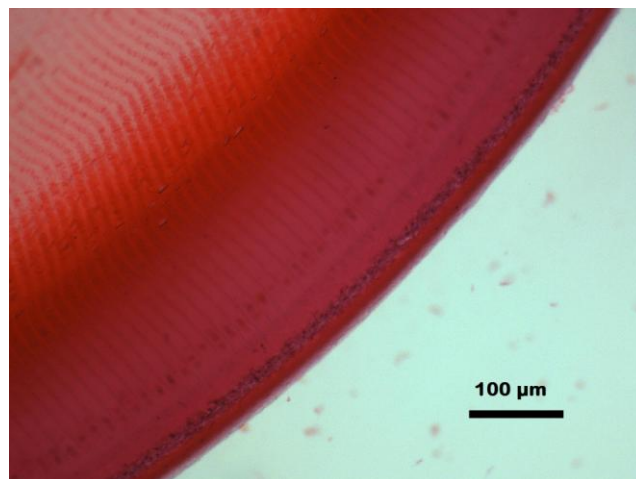


Figura 19. Monocapa de células epiteliales de un ejemplar de *L. guttatus* sin daños en la lente. H & E

También se analizaron muestras de branquias, hígado, riñón, bazo, intestino y cerebro, para conocer si una deficiencia vitamínica de B₂ podía ocasionar problemas en otros órganos, los análisis no mostraron daños a nivel histológico. De la misma manera que en este estudio, Murai y Andrews (1978) realizaron un análisis histológico en su búsqueda por el requerimiento de riboflavina en el bagre de canal (dos experimentos con peso inicial de 9 g y 6.3 g, respectivamente) observaron diversos órganos para conocer si la deficiencia o exceso ocasionaba algún daño en hígado, riñón, músculo, tracto gastrointestinal, branquias y hueso. Sin embargo, al finalizar los experimentos no encontraron daños histopatológicos. Los trabajos en investigación sobre peces que han reportado algún daño a nivel histológico debido a una deficiencia de riboflavina solamente son cataratas en ojos (Takeuchi *et al.*, 1980; Amezaga y Knox, 1990; Soliman y Wilson, 1992; Deng y Wilson, 2003), por lo que ningún estudio sobre requerimiento de riboflavina en peces ha reportado daño histológico en otro órgano diferente. Sin embargo, los experimentos para determinar los requerimientos nutricionales en peces son de tres a cuatro meses y debido a que la riboflavina se involucra como ya se mencionó en reacciones redox en diversas rutas metabólicas, en la absorción de aminoácidos y en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas (Mollinedo y Carrillo, 2014), es de esperarse que con una dieta deficiente de B₂ durante mayor tiempo experimental se observen patologías a nivel de diversos órganos como se han presentado por ejemplo en el tracto digestivo en ardillas (Pererti y Baird, 1974) y alteraciones en el cerebro, cerebelo y tejido dentoalveolar en ratas (Delgadillo y Ayala, 2009).

8. CONCLUSIONES

- La inclusión de riboflavina en la dieta de juveniles de *L. guttatus* de 34.17 mg kg⁻¹ de dieta ayuda a prevenir signos clínicos, se obtiene una mejor respuesta de crecimiento y favorece en la participación de los diferentes procesos metabólicos de nutrientes en los que se involucra.
- Una deficiencia de riboflavina en la dieta de juveniles de *L. guttatus* genera la aparición de signos clínicos como bajo crecimiento, erosión en aletas, oscurecimiento de piel e iris y nado errático.
- Los peces alimentados con las dietas altas en inclusión de riboflavina mantienen una estabilidad en los parámetros hematológicos y el conteo de células sanguíneas, mientras que una deficiencia disminuye los valores.
- Durante el periodo experimental, no se encontraron daños en órganos y tejidos a nivel histológico con ningún tratamiento.
- La concentración de riboflavina en el hígado depende de la aportación de vitamina en el alimento. Por lo que se concluye que existe una correlación positiva entre ambas.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de requerimientos de riboflavina en las diferentes etapas de vida de *L. guttatus*, debido a que se ha reportado diferentes niveles de concentración requerida en otras especies según su etapa de crecimiento.
- Es importante continuar con la investigación de los requerimientos de vitaminas hidrosolubles para la dieta de *L. guttatus*, debido a que las vitaminas participan en conjunto en diversas funciones para llevar a cabo una correcta función.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo, M. y Rodríguez-Ibarra, L. 2011. Cultivo larvario y requerimientos nutricionales del pargo flamenco. Editorial Académica Española. Saarbrücken, Alemania. 63 pp.
- Abdo, M., Rodríguez-Ibarra, L., Hernández, C., Hernández, K., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I. y García-Ortega, A. 2010. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45(3): 433-439.
- Allen, G.R. 1995. Lutjanidos (Peces óseos). En Fisher, W. I. Krupp, W. Schieider, C. Somer, K.E. Carpenter and V.H. Niem (Eds), Guía FAO para la identificación de peces Pacífico Centro-Oriental. Vol. III. Vertebrados parte 2: 1231-1244.
- Alves-Martins, D., Valente, L. y Lall, S. 2011. Partial replacement of fish oil by flaxseed oil in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) diets: effect on growth, nutritional and sensory quality. Aquaculture Nutrition 17: 671-684.
- Amezcuá, F. y Soto, M. 2014. Current state of aquaculture in Mexico. Fisheries 39 (11): 554.

- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 14th edition. Arlington, VA. 1141 pp.
- Anyakora, Ch., Afolami, I., Ehianeta, T. y Onwumere, F. 2008. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2(2): 29-36.
- Benítez, A. 2013. Evaluación de diferentes proporciones de proteína y carbohidratos sobre la respuesta fisiológica y metabólica de juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Maestría en Ciencias. Posgrado de Acuicultura y Manejo Ambiental CIAD, A.C. Unidad Mazatlán.
- Chávez de Martínez, M. 1989. Vitamin C requirement of the mexican native Cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Aquaculture* 86: 409-416.
- Chávez de Martínez, M., Escobar, B. y Olvera-Novoa, M. 1990. The requirement of *Cichlasoma urophthalmus* (Günther) fry for pantothenic acid and the pathological signs of deficiency. *Aquaculture and Fisheries Management* 21: 145-156.
- Chávez-Sánchez, M., Olvera-Novoa, M., Osuna-Durán, B., Abdo, I., Abad-Rosales, S. y Martínez-Rodríguez, I. 2014. Ascorbic acid requirement and histopathological changes due to its deficiency in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture International* 22: 1891-1909.
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T. y Kumarnsit, E. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus*

pelamis) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition* 19: 773-784.

Coelho, M. 1991. Effects of processing and storage on vitamin stability- feed international 12(12): 39-45.

Cowey, C., Adron, J. y Youngson, A. 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture Nutrition* 30: 85-93.

Del Río-Zaragoza, O., Fájér-Ávila, E., Almazán-Rueda, P. y Abdo de la Parra, M. 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.

Deng, D. F., y Wilson, R. P. (2003). Dietary riboflavin requirement of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture Nutrition* 218(1-4), 695-701.

Drury, R. y Wallington E. 1980. Carleton's Histological Techniques. 5th edition. Oxford University Press. 520 pp.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma. 3-118 pp.

Fattah, A. y Sayed, M. 2002. Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquaculture Research* 33(8): 621-626.

- Figueras, A. y Novoa, B. 2014. Biotecnología marina y acuicultura. *Arbor* 190(768): 153.
- Figuereido-Silva, A., Corraze, G., Borges, P. y Valente, L. 2010. Dietary protein/lipid level and protein source effects on growth, tissue composition and lipid metabolism of blackspout seabram (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture Nutrition* 16: 173-187.
- Gao, J., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama S., Nguyen, B. y Mamauag, R. 2013. Effect of dietary oxidized fish oil and vitamin C supplementation on growth performance and reduction of oxidative stress in Red Sea Bream *Pagrus major*. *Aquaculture Nutrition* 19: 35-44.
- Guerreiro, I., Peres, H., Castro-Cunha, M. y Oliva-Teles, A. 2012. Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutrient utilization of juvenile (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* 18: 98-106.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. y Métailler, R. 2004. *Nutrición y Alimentación de Peces y Crustáceos*. Ediciones Mundiprensa, Madrid, España, 471 pp.
- Gültepe, N., Salnur, S., Hossu, B. y Hisar, O. 2011. Dietary supplementation with Mannanoligosaccharides (MOS) from Bio-Mos growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition* 17: 482-487.
- Halver, J. 2002. The vitamins. En: Halver, J. y Hardy, R. (eds). *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, California, EUA. 62-143 pp.

- Hernández, C., González-Santos, A., Valverde-Romero, M. y Domínguez-Jiménez, P. 2016. Partial replacement of fishmeal with meat and bone meal and tuna byproducts meal in practical diets for juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture Research* 44:1-8.
- Hernández, C., Hernández, C., Martínez-Cordero, F., Castañeda-Lomas, N., Rodríguez-Domínguez, G., Tacon, A. y Aragón-Noriega, E. 2016. Effect of density at harvest on the growth performance and profitability of hatchery-reared spotted rose snapper, *Lutjanus guttatus*, cultured in floating net cages. *Journal of the World Aquaculture Society* 47(1): 51–60.
- Hidalgo, M.C. y Morales, A. 2012. Vitaminas y minerales. En: Sanz, F (Ed.). *La Nutrición y Alimentación en Piscicultura*. Paraninfo, España, 329-426 pp.
- Hudson, C., De Camargo, G., Oliveira, P., Vêras, D., Pinheiro, P., Fernandes, C., Travassos, P. y Hazin, F. 2012. Occurrence of the hybrid snapper between yellowtail snapper *Ocyurus chrysurus* (Bloch 1791) and lane snapper *Lutjanus synagris* (Linnaeus 1758) (Perciformes: Lutjanidae) in the Southwest Atlantic, Northeast Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 7(1): 45-49.
- Hughes, S., Rumsey, R. y Nickum, J. 1981. Riboflavin requirement of fingerling rainbow trout. *The Progressive Fish-Culturist* 43:4, 167-172
- Ibarra-Castro, L. y Alvarez-Lajonchere, L. 2011. GnRH α induced multiples spawns and voluntary spawning of captive spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) at Mazatlan, Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society* 42: 564-574.
- Ibarra-Castro, L. y Duncan, N. 2007. GnRH α -induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture* 272:737-746.

INAPESCA. Recuperado el 10 de mayo del 2015 de:
<http://www.inapesca.gob.mx/portal/sala-de-prensa/boletines/1-desarrollo-de-biotecnologia-para-el-cultivo-de-pargos>

Kohlmeier, M. 2003. Water-soluble Vitamins and Non-Nutrients. Nutrient Metabolism: Structures, Functions and Genetics. Academic Press, Londres. 539-642 pp.

Laining, A., Ishikawa, M., Koshio, S., Lideman. y Yokoyama, S. 2012. Dietary inorganic phosphorus or microbial phytase supplementation improves growth, nutrient utilization and phosphorus mineralization of juvenile red sea bream, *Pagrus major*, fed soybean-based diets. Aquaculture Nutrition 18,502-511.

Laining, A., Ishiwaka, M., Kyaw, K., Gao, J., Binh, N., Koshio, S., Yamaguchi, S., Yokoyama, S. y Koyama, J. 2011. Dietary calcium/phosphorus ratio influences the efficacy of microbial phytase on growth, mineral digestibility and vertebral mineralization in juvenile tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Aquaculture Nutrition 17: 267-277.

Lee, G. y Luna, H. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition. The Blackiston Division. Mac Graw-Hill Book Company. New York, Toronto, London and Sidney. 257 pp.

Liu, K., Ai, Q., Mai, K., Zhang, W, Zhang, L. y Zheng, S. 2013. Dietary manganese requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. Aquaculture Nutrition 19: 461-467.

Modra, H. y Svobodova, K. 1998. Comparison of differential leukocyte counts in fish of economic and indicator importance. Acta Vet. Bmo 67: 215-226.

- Mollinedo, M. y Carrillo, K. 2014. Absorción, excreción y metabolismo de las vitaminas hidrosolubles. *Revista de Actualización Clínica* 41: 2146–2150.
- Murai, T., y Andrews, A. W. 1978. Riboflavin requirement of channel catfish fingerlings. *The Journal of Nutrition* 192(15), 191–192.
- Ngandzali, B., Zhoy, F., Xiong, W., Shoa, Q. y Xu, J. 2011. Effect of dietary replacement of fish meal by soybean protein concentrate on growth performance and phosphorus discharging of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture Nutrition* 17: 526-535.
- Niu, J., Du, Q., Lin, H.-Z., Cheng, Y., Huang, Z., Wang, Y., Wang, J. y Cheng, Y. 2013. Quantitative dietary methionine requirement of juvenile Golden pompano *Trachinotus ovatus* at a constant dietary cystine level. *Aquaculture Nutrition* 19: 677-686.
- Norzagaray, M., Muñoz, P., Sánchez, L., Capurro, L., y Llánes, O. 2012. Acuacultura: estado actual y retos de la investigación en México. *Revista AquaTIC* (37): 20-25.
- NRC. 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academies Press, Washington, D.C. 21-25, 102, 392 pp.
- Osuna, L. 2014. Evaluación bioquímica de la aplicación de carotenoides de origen vegetal en la dieta alimentaria del pargo *Lutjanus guttatus* para incrementar la pigmentación. Maestría en Ciencias. Postgrado de Acuacultura y Manejo Ambiental CIAD, A.C. Unidad Mazatlán.
- Paul, N., Sarkar, S. y Mohanty, N. 2004. Dietary vitamin E requirement of mrigal, *Cirrhinus mrigala* fry. *Aquaculture* 242: 529-536.

- Pimentel, C. 2011. Requerimiento de pantotenato de calcio y efectos de su deficiencia en juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Maestría en Ciencias. Postgrado de Acuicultura y Manejo Ambiental CIAD, A.C. Unidad Mazatlán.
- Quintero, G. 2015. Sensibilidad fisiológica del pargo *Lutjanus guttatus* a diferentes niveles de rancidez lipídica dietaría. Efecto en el estado de salud. Maestría en Ciencias. Posgrado en Recursos Acuáticos. Facultad de Ciencias del Mar. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Qiao, Y., Tan, V., Mai, K., Ai, Q. Zhang, W. y Xu, W. 2013. Evaluation of iron methionine and iron sulphate as dietary iron sources for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Nutrition* 19: 721-730.
- Robbins, K.R., Saxton, A.M. y Southern, L.L. 2006. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *Journal of Animal Science* 84:155.
- Rojas-Herrera, A. 2001. Aspectos de Dinámica de Poblaciones del Huachinango *Lutjanus Perú* (Nicholas Y Murphy, 1922) y del Flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Pisces: Lutjanidae) del Litoral de Guerrero, México. Tesis de Doctorado, Universidad de Colima, Colima, México. 90 pp.
- Sánchez, E. 2013. Determinación del requerimiento de taurina para el crecimiento de juveniles de pargo (*Lutjanus guttatus*). Maestría en Ciencias. Postgrado de Acuicultura y Manejo Ambiental CIAD, A.C. Unidad Mazatlán.
- Sarker, M., Satoh, S., Kamata, K., Haga, Y. y Yamamoto, Y. 2012. Partial replacement of fishmeal with plant protein sources using organic acids to

practical diets for juvenile yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture Nutrition* 18: 81-89.

Silva-Carrillo, Y., Hernández, C., Hardy, R., González-Rodríguez, B. y 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.

Soliman, A., y Wilson, R. 1992. Water-soluble requirements of tilapia. 2. Riboflavin requirement of blue tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 104, 309–314.

Tacon, A. 1995. Ictiopatología Nutricional, Signos Morfológicos De La Carencia Y Toxicidad De Los Nutrientes En Los Peces Cultivados. Documento Técnico de Pesca, FAO, Roma. 77 pp.

Takeuchi, L., Takeuchi, T. y Ogino, C. 1980. Riboflavin requirements in carp and rainbow trout. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46(6), 733-737.

Wang, F., Han, H., Wang Y. y Ma, X. 2013. Growth, feed utilization and body composition of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus* fed at different dietary protein and lipid levels. *Aquaculture Nutrition* 19: 360-367.

Woodward, B. 1984. Short Communication symptoms of severe riboflavin deficiency without ocular opacity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 37, 275–281.

- Woodward, B. 1985. Riboflavin Requirement for Growth , tissue saturation and maximal flavin-dependent enzyme activity in young rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at two temperatures. *The Journal of Nutrition* 78–84.
- Zehra, S. y Mkhtar, K. 2012. Dietary vitamin c requirement of fingerling, *cirrhinus mrigala* (hamilton), based on growth, feed conversion, protein retention, hematological indices, and liver vitamin c concentration. *World Aquaculture Society* 43(5): 648-658.
- Zhou, Z., Cui, Y., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Xue, M. y Yang, Y. 2003. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization and size variation of juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Journal of Applied Ichthyology* 19(4): 244-249.
- Zhou, F., Shao, J., Xu, R., Ma, J. y Xu, Z. 2010. Quantitative L-lysine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*). *Aquaculture Nutrition* 16: 194-204.