



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

**Evaluación del crecimiento, actividad quitinolítica y
coloración del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*)
alimentado con harina de cabezas de camarón**

Por:

IBQ. Adriana Osuna Salazar

TESIS APROBADA POR LA:

COORDINACIÓN DE ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS

Mazatlán, Sinaloa.

Diciembre de 2015

Hermosillo, Sonora, Diciembre, 2015

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso 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).

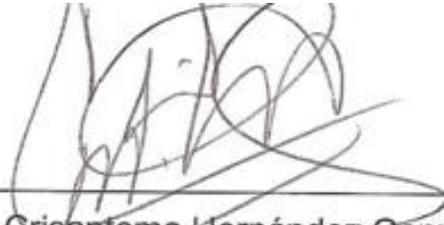
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong

Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité asignados para revisar la tesis de Adriana Osuna Salazar, la han encontrado satisfactoriamente y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Crisantema Hernández González
Directora de Tesis



M. en C. Ana C. Puello Cruz
Asesora



Dr. Leonardo Ibarra Castro
Asesor



Dra. Gabriela Gaxiola Cortés
Asesora



Dr. Bruno Gómez-Gil Rodríguez Sala

Asesor

AGRADECIMIENTOS

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

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental**, por todas las facilidades y el apoyo otorgado para llevar a cabo este trabajo.

A la **Dra. Crisantema Hernández González** por aceptarme en su equipo de trabajo, dirigir mi proyecto de tesis, ya que ha sido parte fundamental de mi formación académica.

A los miembros de mi comité: **Crisantema Hernández González, M. en C. Ana C. Puello Cruz, Dr. Leonardo Ibarra Castro, Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés y Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala**, por aportar sus conocimientos y experiencia en sus observaciones y recomendaciones para enriquecer este trabajo.

A la **Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez** por el apoyo técnico brindado en la realización de los análisis proximales, determinación de carotenoides, medición del color y determinación de actividad quitinolítica. A la **Biol. Blanca González Rodríguez** apoyo técnico en análisis químicos proximales. Al **Biol. Alan Jesús Humberto González Santos** por el apoyo en la construcción del sistema experimental y en la etapa de bioensayo. Al **M. en C. Emyr Saúl Peña Marin** por el aporte de sus conocimientos, apoyo técnico en los muestreos, disección y actividad enzimática.

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. Leonardo Ibarra Castro y su equipo de trabajo** de producción de peces marinos por los peces utilizados en este trabajo y el apoyo técnico en el área de bioensayo.

A la **Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala**, por permitirme realizar mi análisis bacteriológico en el laboratorio de bacteriología, así como el uso de equipo y material de trabajo. A la **QFB Carmen Bolan** por la capacitación y apoyo técnico en los análisis realizados.

A mis compañeros de laboratorio **Carolina, Samuel, Daniel, Perla, Sergio, Juan Luis y José** por el apoyo durante el experimento, por su amistad y convivencia.

A mis compañeros de posgrado **Andrés Arcos Méndez, Martín Esteban Castillo Salas, Marian Del Valle Herrera, Alejandra Ochoa González, Eveline Tirado Flores, Luz Adriana Rochín Terán y Daniela Rodríguez Aguirre** por su apoyo técnico, científico y su amistad.

Al **IBQ. Martin Castillo Salas** por el apoyo incondicional en la realización de dietas y biometrías durante el experimento, por dedicar su tiempo a la realización y revisión de mi trabajo.

A mis profesores de CIAD Unidad Mazatlán: **Dr. Miguen Betancourt Lozano, Dr. Pablo Almazán Rueda, Dr. Cesar Alejandro Berlanga Robles, Dr. Omar Calvario Martínez, M. en C. Héctor Plascencia González, M. en C. Ana C. Puello Cruz, Dra. Crisantema Hernández González, M. en C. Isabel Abdo de la Parra, M. en C. Luz Estela Rodríguez Ibarra, M. en C. Gabriela Velasco Blanco, M. P. A. Noemí García Aguilar, Dra. Emma Josefina Fajer Ávila, Dr. María Morales Covarrubias, Dr. Luz María García de la Parra, Dra. María Cristina Chávez Sánchez, M. en C. Selene María Abad Rosales, Dr. Sonia Araceli Soto Rodríguez, Dr. Leobardo Montoya Rodríguez, Dr. Francisco Javier Martínez Cordero, Dr. Juan Madrid Vera, Dr. Neptali Morales Serna y Dr. José Alfredo Castillo Guerrero** por brindar sus conocimientos, experiencias y ser parte de mi formación académica.

A cada persona que directa o indirectamente colaboraron y apoyaron en la realización de este proyecto, Gracias.

DEDICATORIA

Dedicado este y cada uno de mis logros a mis padres Elvira Salazar Flores y Alfredo Osuna Quiñero porque en ustedes encuentro mi inspiración y motivación para salir adelante día con día, gracias a su apoyo, comprensión y amor.

A mis hermanos Erik Osuna Salazar y Julio Osuna Salazar, por ser mi oasis en el desierto y una tormenta en un vaso de agua a la vez, mi vida sería aburrida sin ustedes.

A Martín Esteban Castillo Salas mi apoyo y soporte incondicional, por siempre mostrarme la luz al final del túnel y ser un remanso de paz y amor en mi vida.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	¡Error! Marcador no definido.
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1. Características de la familia <i>Lutjanidae</i>	5
2.2. Requerimientos proteicos en peces.....	5
2.3. Enzimas digestivas de peces.....	6
2.3.1 Enzimas quitinolíticas.....	8
2.4. Microflora gastrointestinal de los peces.....	9
2.5. Actividad quitinolítica endógena y bacteriana en peces alimentados con subproductos de crustáceos.....	10
2.6. Carotenoides y pigmentación en peces.....	12
2.6.1. Astaxantina en subproductos de crustáceos	15
2.7. Pigmentación en peces alimentados con subproductos de crustáceos..	16
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. HIPOTESIS	21
V. OBJETIVO GENERAL.....	22
5.1. Objetivos particulares	22
VI. METODOLOGÍA.....	23
6.1. Elaboración y composición de la HCC.....	23
6.2. Formulación y elaboración de dietas experimentales	24
6.2.1. Análisis proximal de los ingredientes, las dietas y la carcasa de los peces.....	26
6.3. Diseño experimental	27
6.3.1. Organismos de estudio.....	28
6.3.2. Régimen alimenticio	28
6.3.3. Parámetros ambientales.....	28

6.4. Evaluación de crecimiento.....	28
6.5. Evaluación de los índices corporales.....	29
6.6. Análisis bacteriológico	32
6.6.1. Agar TSA.....	32
6.6.2. Agar TCBS	33
6.6.3. Agar marino.....	33
6.6.4. Agar quitina	33
6.6.5. Preparación de las muestras	34
6.7. Análisis de coloración en peces.....	35
6.7.1. Determinación de carotenoides en dietas y harina de cabeza de camarón	37
6.8. Análisis estadístico	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
7.1. Calidad del agua.....	39
7.2. Evaluación biológica	39
7.2.1. Ganancia de peso	40
7.2.2. Tasa de crecimiento específica	42
7.2.3. Tasa de conversión alimenticia	44
7.2.4. Supervivencia	44
7.3. Índices biológicos corporales.....	45
7.3.1. Factor de condición (FC)	46
7.3.2. Índice hepatosomático (IHS)	47
7.3.3. Índice viscerosomático (IVS)	47
7.3.4. Relación de grasa intraperitoneal (RGI)	48
7.4. Actividad quitinolítica en intestinos y estómagos del pargo flamenco alimentado con HCC.....	48
7.5. Análisis bacteriológico en intestino de pargo flamenco alimentado con HCC.....	52
7.6. Coloración de la piel del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>), rojo (a*), amarillo (b*) y Luminosidad (L*)	54
7.6.1. Coloración de la cabeza (zona I)	54
7.6.2. Coloración del vientre (Zona II).....	56

7.6.3. Coloración del medio (Zona III)	58
7.6.4. Coloración del dorso (Zona IV)	60
7.6.5. Aleta caudal zona (V)	61
VIII. CONCLUSIONES	64
IX. RECOMENDACIONES.....	65
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de la HCC en base seca.....	24
Tabla 2. Formulación y composición proximal de las dietas experimentales con HCC para el pargo flamenco.....	25
Tabla 4. Índices biológicos corporales del pargo flamenco alimentado con HCC.	46
Tabla 5. Análisis cuantitativo de la flora intestinal del pargo flamenco alimentado con HCC con y sin antibiótico.	52
Tabla 6. Parámetros de la coloración de la cabeza (zona I) del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) alimentado con HCC en un periodo de 12 semanas.....	55
Tabla 7. Parámetros de la coloración del vientre (zona II) del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.	57
Tabla 8. Parámetros de la coloración del medio (zona III) del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.	58
Tabla 9. Parámetros de la coloración del dorso (zona IV) del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.	60
Tabla 10. Parámetros de la coloración de la aleta caudal (zona V) del pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la quitina (Gómez y Fornaguera, 2004).	9
Figura 2. Estructura de algunos carotenoides en peces.	13
Figura 3. Metabolismo de carotenoides, astaxantina y cantaxantina en salmónidos.....	15
Figura 4. Diagrama de flujo de elaboración de de HCC.....	23
Figura 5. Diagrama de flujo de elaboración de dietas experimentales de HCC.	26
Figura 6. Sistema experimental para la alimentación del pargo flamenco.	27
Figura 7. Análisis de actividad quitinolítica en estómago e intestinos de pargo flamenco alimentado con HCC.	31
Figura 8. Curva de calibración de pH 5, para las muestras de estómagos de pargo flamenco alimentado con HCC.	32
Figura 9. Curva de calibración de pH 7, para las muestras de intestinos de pargo flamenco alimentado con HCC.	32
Figura 10. Análisis bacteriológico de los intestinos de pargo flamenco alimentados con HCC.	35
Figura 11. Espacio del color L* a* b*	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Zonas de medición del color en el pargo flamenco alimentado con HCC.	37
Figura 13. Incremento en peso del pargo flamenco, alimentados con dietas de HCC en un periodo de 10 semanas.....	41
Figura 14. Actividad quitinolítica en intestinos de pargo flamenco alimentado con HCC.	49
Figura 15. Actividad quitinolítica en intestinos de pargo flamenco alimentado con HCC.	50

RESUMEN

En el presente estudio se utilizó harina de cabeza de camarón (HCC) como fuente alternativa de proteína de origen marino y se analizó su efecto en el crecimiento, actividad quitinolítica (endógena y bacteriana) y pigmentación del pargo flamenco. Se formularon cuatro dietas experimentales isolipídicas (15%) e isoprotéicas (45%), sustituyendo a la harina de pescado (HP) por HCC: 100% HP y 0% HCC (D-CTRL), 90% HP y 10% HCC (D-10% HCC), 80% HP y 20% HCC (D-20% HCC), 70% HP y 30% HCC (D-30% HCC). Cada tratamiento se evaluó por triplicado en un periodo de 10 semanas, durante las cuales se evaluó crecimiento, índices nutricionales e índices corporales. Los resultados obtenidos muestran que los peces alimentados con la dieta la D-20% HCC obtuvieron diferencias significativas en peso final, peso ganado, tasa de crecimiento y tasa de crecimiento específico respecto a los alimentados con la dieta D-CTRL; el tratamiento D-30% HCC fue el más consumido por los organismos, presentando diferencias significativas con los peces de la dieta D-CTRL. También se midió la actividad quitinolítica endógena y bacteriana para lo cual se utilizó antibiótico (10g/kg) para eliminar la posible microbiota y la actividad quitinolítica resultante fue comparada con la de los peces alimentados con una dieta idéntica sin antibiótico. La actividad quitinolítica se presentó mayormente en estómagos que en intestinos, los resultados mostraron que los peces alimentados con dietas con antibiótico no presentaron diferencias respecto a los peces alimentados con dietas que no se les fue adicionado, lo que sugiere producción endógena de enzimas quitinolíticas. La coloración fue medida en la doceava semana para disminuir el estrés en los organismos muestreado, donde se observó que la coloración en las distintas zonas presentó mejores resultados en los tratamientos D-20% HCC y D-30% HCC, ya que presentaron mayor enrojecimiento (a^*) y amarillez (b^*), aunque no lo suficiente para igualar al pargo silvestre, por lo que sugiere un mayor tiempo de suplementación (de 120 a 180 días) con dichos tratamientos. En conclusión, el uso de HCC en dietas como sustituto parcial de la harina de pescado resulta favorable en pargo flamenco, ya que beneficia su crecimiento, y este tiene la

capacidad de degradar y asimilar quitina en inclusiones hasta del 30%, además la HCC provee la pigmentación necesaria para su aceptación en el mercado, evitando así el uso de pigmentos artificiales que elevan los costos de producción.

Palabras clave: Pargo flamenco, harina de cabezas de camarón, crecimiento, actividad quitinolítica y coloración.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura crece más rápido que cualquier otro sector productivo de alimentos de origen animal, su tasa de crecimiento anual ha sido 8.8% a partir de 1970. Mientras que la pesca ha crecido 1.2%; la producción de carne en tierra ha crecido al 2.8%. Se estima que el 40% del total de alimentos de origen marino usado en acuicultura fue para peces carnívoros, el 35% para los no carnívoros y 25% para crustáceos. Dado el rápido incremento actual del cultivo en especies carnívoras, se cree que existirá en el futuro una fuerte competición por las limitadas fuentes de harinas de pescado a nivel mundial (FAO, 2010).

Así mismo, la producción de harinas de pescado está localizada en determinadas regiones del planeta, por lo tanto se hace cada vez más caro y difícil para muchos países obtenerlas. La necesidad de encontrar fuentes alternativas de proteínas para reemplazar las harinas de pescado, es objeto de numerosas investigaciones en la actualidad, especialmente para el cultivo de peces carnívoros que demandan gran cantidad de proteína en su alimento (Pérez *et al.*, 2003).

El pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) es una especie pelágica, encontrada en aguas tropicales y subtropicales distribuidos desde las costas mexicanas hasta Perú. Son peces de gran demanda y de elevado costo en el mercado nacional (Allen, 1985). Respecto a su alimentación, es un pez carnívoro oportunista, depredador activo que en su etapa juvenil se alimenta de crustáceos, y en su etapa adulta se alimentan principalmente de peces (Rojas-Herrera y Chiappa-Carrara, 2002).

El pargo es una especie que fácilmente se adapta a condiciones de cautiverio y reproducción controlada (Ibarra y Duncan, 2007). Los estudios para generar la biotecnología de su cultivo, iniciaron a partir del 2003 en el CIAD Mazatlán,

enfocados en lograr el control de la reproducción en cautiverio, así como aspectos de sanidad y larvicultura. Actualmente el CIAD cuenta con una planta piloto con una capacidad de producción sostenida de 100,000 juveniles anuales. No obstante, la producción comercial de esta especie está limitada por la escasa producción de alimentos balanceados diseñados para condiciones de cautiverio (SAGARPA, 2013).

Un problema que enfrenta el pargo flamenco producido en laboratorio y cultivado en jaulas es la ausencia de la coloración rojiza que presentan en el medio natural. Los peces de cultivo muestran un gris oscuro que conduce al rechazo por parte del consumidor debido a que las dietas formuladas no aportan los carotenoides necesarios para obtener su color característico. Los pargos silvestres obtienen su pigmentación a base del consumo de crustáceos y otros componentes de su dieta en su ambiente natural. Los estudios realizados en especies como *Pagrus pagrus* han demostrado que la inclusión de harina de cascaras de camarón, harina de cabezas de camarón y harina de camarón entero, es efectivo para pigmentar la piel de los peces (Cejas *et al.*, 2003; Kalinowski *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2007; Tejera *et al.*, 2007).

En países de clima tropical, se produce una gran cantidad de residuos a partir de la acuicultura, pesca así como del procesamiento de productos a partir del pescado, además de la fauna de acompañamiento y otras pérdidas ocasionadas por la manipulación, procesamiento, almacenamiento y comercialización del pescado fresco, por lo que es de vital importancia utilizar tecnologías simples y de baja inversión, que permita aprovechar dicha proteína de origen animal y de tal manera disminuir la contaminación del ambiente (Toledo y Llenez, 2006).

Un ejemplo es la cabeza de camarón, que es un subproducto obtenido de la industrialización de dicho crustáceo, generándose en enormes cantidades, por lo que se puede obtener sin costo alguno. Este subproducto cuenta con alta

disponibilidad en las regiones del noroeste, el noreste y en la península de Yucatán, obteniendo volúmenes mayores a las 7,000 toneladas por año, de tal manera que puede utilizarse en toda la zona norte y sur del país, siendo la transportación el único costo. Se calcula que en México, el 5% de las cabezas de camarón es convertido a harina y lo restante es desechado a los cuerpos de agua o áreas cercanas al sitio de cultivo, causando un impacto ecológico negativo, por el excesivo volumen de desechos (Palomo y Arriaga, 1993).

Dicho subproducto del camarón, contiene componentes orgánicos muy importantes tales como: proteínas, carbohidratos, grasas, pigmentos, minerales, quitina, entre otros, que al aprovecharse pueden constituir una excelente materia prima para la obtención de productos de gran interés a nivel industrial. Por tal motivo ofrece excelentes ventajas para su utilización como suplemento en dietas acuícolas, como son los bajos costos de inversión para su obtención y transformación a harina (Belandria y Morillo, 2013).

En cuanto a la harina de cabeza de camarón (HCC), han demostraron que son una excelente fuente de aminoácidos esenciales y no esenciales. Además tienen una gran variedad de estimulantes de alimentación o quimioattractantes, convirtiéndolas en una excelente alternativa de alimento protéico en la acuicultura. También se ha utilizado como fuente pigmentante en el cultivo comercial de varias especies de salmónidos, ya que puede constituir una fuente importante de carotenoides, como la astaxantina. Aunque cuentan con altos niveles de minerales (calcio) y quitina lo que podría limitar su valor nutricional, se han encontrado adaptaciones biológicas en algunas especies de peces asociadas a la secreción de ácido o enzimas en el sistema digestivo que les da la habilidad de digerir este tipo de ingredientes (García-Romero *et al.*, 2014).

De acuerdo a estudios realizados con anterioridad, se presume que algunas especies de peces marinos, obtienen resultados favorables con la sustitución por HCC en cuanto al crecimiento y digestibilidad (por la presencia de enzimas

quitinolíticas). Específicamente en la familia Lutjanidae aporta la coloración rojiza característica, por lo que el presente estudio se enfoca a evaluar el crecimiento, actividad quitinolítica (endógena y bacteriana), coloración del pargo flamenco alimentado con HCC.

II. ANTECEDENTES

2.1. Características de la familia Lutjanidae

Los pargos pertenecientes a la familia Lutjanidae, son peces de gran demanda en el mercado y de elevado costo. Dichas especies son demersales, habitan en aguas poco profundas de arrecifes coralinos, aunque también pueden encontrarse a más de 90 m de profundidad en fondos rocosos. En vida silvestre generalmente son solitarios o viven en pequeños cardúmenes, los juveniles viven en desembocaduras de ríos y estuarios (Allen, 1985).

El pargo flamenco se distribuye naturalmente desde el Golfo de California, hasta el norte de Perú. Es un carnívoro oportunista, depredador activo que se alimenta durante la noche, principalmente de pequeños peces, calamares, y en ocasiones de crustáceos, como camarones y cangrejos. Esta especie tiene facilidad para adaptarse a condiciones de cautiverio (Rojas, 1997).

2.2. Requerimientos proteicos en peces

La nutrición proteica es indudablemente el área más estudiada de la nutrición acuícola, ya que desde los inicios del uso de alimento balanceado en piscicultura, se ha trabajado por encontrar el óptimo nivel proteico en las dietas. Siendo dicho nivel más alto que en aves o mamíferos (Guillaume *et al.*, 2004).

En la actualidad más de 30 especies de peces han sido estudiadas (tilapias, carpas, truchas, etc.) y los resultados muestran una gran uniformidad en cuanto al requerimiento de proteína en sus dietas, oscilando en un rango de 24-57%, que equivale al 30-70% del contenido energético de la dieta en forma de proteína.

Los elevados requerimientos proteicos en peces son consecuencia de sus hábitos alimenticios carnívoro/omnívoro y al uso preferencial de la proteína dietética sobre los carbohidratos como fuente de energía. A diferencia de los animales terrestres, los peces obtienen más energía metabolizable a partir de las proteínas que de los carbohidratos (Tacon, 1989).

En algunas especies de la familia Lutjanidae como huachinango y pargo rojo se utilizan dietas comerciales en la etapa de engorda con 40% de de proteína y 15% de lípidos (SAGARPA, 2013). En el caso particular del pargo flamenco, se ha demostrado que los peces alimentados con las dietas de 45 y 50% de proteína obtienen mayor incremento en peso corporal. Estos resultados indican que los juveniles de pargo requieren por lo menos 45% de proteína y 9% de lípidos totales en la dieta, para su mayor crecimiento y supervivencia (Abdo de la Parra *et al.*, 2010).

2.3. Importancia de las enzimas digestivas en la nutrición acuícola

El tipo y funcionalidad de las enzimas digestivas presentes en cualquier especie acuática es el resultado de un proceso evolutivo en el que el principal factor de selección ha sido el régimen alimenticio, tanto desde el punto de vista de la composición de los alimentos ingeridos como de las pautas de alimentación. Cuando los humanos han seleccionado especies acuáticas para cría en cautiverio, con frecuencia han modificado de manera radical tanto las características del alimento suministrado en relación al alimento natural de dicha especie (tipo de ingredientes, densidad energética y proteica, aspecto

físico, palatabilidad) como las pautas de alimentación en relación con los ritmos biológicos normales o la edad de los organismos. (Moyano, 2006).

Por lo anterior es necesario otorgar a la especie a cultivar un lapso de tiempo en el cual se adapte al nuevo alimento, para que las enzimas digestivas se adecuen, lo que se convierte en un factor a considerar en cualquier cambio de alimento (Castelló, 1993).

Los peces poseen tres tipos de enzimas digestivas, las cuales son:

-Enzimas secretadas como zimógenos (gástricas y pancreáticas): encontradas como gránulos de zimógeno o proenzimas inactivadas en una mezcla de jugos digestivos de composición iónica y pH específico. Dichas enzimas son activadas en el estómago, principalmente en el duodeno. Las principales enzimas de este tipo son las proteasas, peptidasas, glucosidasas, lipasas y nucleasas (Guillaume *et al.*, 2004)..

-Enzimas intestinales de membrana: son encontradas en el quimo en pequeñas cantidades, que actúan solamente en condiciones normales, unidas a las membranas de microvellosidades. Estas enzimas tienen como función degradar los fragmentos de macromoléculas filtradas por el glicocalix (Guillaume *et al.*, 2004)..

-Enzimas de células del tubo digestivo localizadas fuera de la pared, como son los lisosomas. Puede ser difícil determinar si estas enzimas participan en la digestión extracelular ya que su actividad puede detectarse *in vitro* después de la lisis de la célula (Guillaume *et al.*, 2004).

El equipamiento de enzimas digestivas no es igual para todas las especies. Por ejemplo, la pepsina siempre está ausente en los peces agástricos y la quitinasa se ha encontrado solo en algunas especies. En el caso del pargo flamenco se han caracterizado las proteasas digestivas en distintas etapas del pez: Temprana (21.3 g), media (190 g) y juvenil tardía (400 g), donde los resultados muestran un aumento en la actividad de proteasas acidas y alcalinas conforme aumenta la edad del pez, mientras que la actividad de la tripsina disminuye, esto por la diversificación de enzimas conforme el pez crece (Peña *et al.*, 2015).

2.3.1 Enzimas quitinolíticas

La quitina es un polisacárido formado por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina, donde el grupo acetilo se encuentra sobre el nitrógeno amínico; unidas por enlace β -1-4-glucosídicos (Figura 1), es el polisacárido más abundante después de la celulosa, se encuentra principalmente en crustáceos, insectos, hongos y algas. Aproximadamente el 10% de los desembarques mundiales de la pesca consta de organismos ricos en quitina (10-55% en peso seco), obteniendo más de 80 000 toneladas anuales de dicho compuesto a partir de los desechos marinos (Klages, 1968; Shaikh y Deshpande, 1993; Patil *et al.*, 2000).

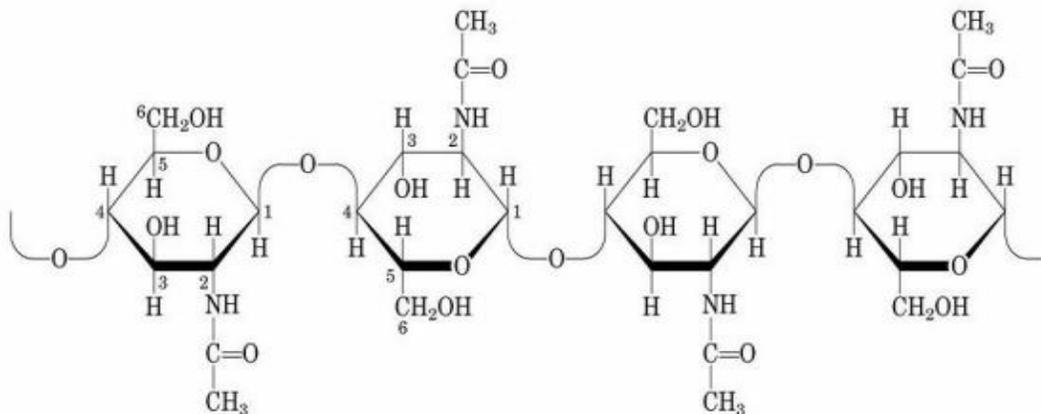


Figura 1. Estructura química de la quitina (Gómez y Fornaguera, 2004).

La hidrólisis enzimática completa de la quitina para liberar N-acetil-D-glucosamina (NAG), es realizada por un conjunto de enzimas, que consta de dos hidrolasas, donde su acción es consecutiva. La quitinasa (poli- β -1,4-D-glucosida glicanohidrolasa), hidroliza los polímeros de NAG incluyendo tetrámeros, en menor medida trímeros. Quitobiasa (quitobiasa acetamidodeoxyglucohidrolasa) hidroliza la quitobiosa y quitotriosa, que son los dímeros y trímeros del NAG (Jeuniaux, 1966).

La quitinasa y la quitobiasa forman parte de las enzimas digestivas de algunos peces, la primera es secretada por el páncreas en forma de proenzima y es activada en el estómago; Pertenece al grupo de las glucosidasas y se asocia a los peces que se alimentan de crustáceos, principalmente los que engullen a su presa sin previa masticación. Mientras que la quitobiasa, pertenece a las enzimas intestinales de membrana, que hidrolizan fragmentos de quitina concluyendo en la formación del monómero NAG, directamente absorbible (Guillaume *et al.*, 2004).

2.4. Microbiota gastrointestinal de los peces

La nutrición y salud de los peces se ve influenciada por la microbiota gastrointestinal, por lo que al ser modificada afecta el estado fisiológico del pez como crecimiento, inmunidad y calidad final del producto. Estos organismos no poseen microbiota intestinal definida, sino que esta se encuentra en una constante interacción con el ambiente. Los peces de cultivo se encuentran en un medio controlado para obtener mejor crecimiento, sin embargo se encuentran rodeados por microorganismos patógenos que comparten su ambiente (Al-Harbi y Uddin, 2005; Escobar-Briones *et al.*, 2006).

Se ha descrito la microbiota aislada a partir de huevos, piel, branquias y los intestinos, en un reducido número de especies de peces. Por lo general, la clase de bacterias aisladas está relacionada con el hábitat acuático del pez, varía con factores como la salinidad y la carga bacteriana del agua. La microbiota intestinal de los peces parece variar con la complejidad de su sistema digestivo; los géneros que se presentan generalmente son los de su alimento o el medio ambiente, que pudieron sobrevivir y multiplicarse en el tracto intestinal (Cahill, 1990).

Aunado a esto, se ha encontrado que las diferentes poblaciones de bacterias que conforman la microbiota intestinal, representan distintos grupos metabólicos, de tal forma que favorecen la capacidad de digestión del organismo (Ringo y Olsen, 1999).

Los intestinos de peces suelen ser microaerófilos, donde la microbiota endosimbiótica degrada los compuestos por vías fermentativas, reduciendo la glucosa u otros monómeros a productos absorbibles por el huésped, como lo es el acetato y demás ácidos grasos de cadena corta, los cuales son utilizados para generar energía (ATP), por lo que son de gran importancia en el aprovechamiento del alimento del pez (Karasov y Martínez del Río, 2007).

2.5. Actividad quitinolítica endógena y bacteriana en peces alimentados con subproductos de crustáceos.

Gabriel *et al.* (1984), encontraron niveles altos de actividad de quitinasa en los estómagos y de quitobiasa en los intestinos de *Salmo gairdneri*, alimentadas con 0, 4, 10 y 25% de quitina extraída de caparazones de cangrejo. Dichas actividades enzimáticas fueron similares en todos los especímenes, independientemente de la inclusión de quitina en sus dietas. En otro experimento a la dieta 10% se les suministró antibiótico (Tribisaen) y a otro lote bacterias quitinolíticas (*Vibrio alginolyticus*), las actividades de quitinasa y

quitobiasa no disminuyeron en las dietas con antibiótico. Mientras que con la adición de las bacterias quitinolíticas no aumento la actividad; estas bacterias se recuperaron únicamente desde el intestino. Lo que indica la presencia de enzimas quitinolíticas endógenas del tracto gastrointestinal en las truchas. Además la presencia del antibiótico o bacterias en la dieta no tuvo efecto sobre la digestibilidad de quitina.

Un estudio realizado por Gutowska *et al.* (2004), midieron las actividades de quitinasa y quitobiasa a partir de los estómagos e intestinos en 13 especies de peces marinos encontrados a diferentes profundidades, presentado mayor actividad en los estómagos, cabe resaltar que en la mayoría de los peces se encontró material quitinoso, lo que supone que los crustáceos se encontraban en sus hábitos alimenticios. Sus resultados también muestran valores similares en la actividad de quitobiasa y quitinasa en peces de aguas profundas, se cree que las quitinasas de estómago tienen una función digestiva indirecta, ayudando a la descomposición del exoesqueleto de presa, que permite a otras enzimas digestivas acceso a tejidos internos blandos. Mientras que quitobiasa se asocia generalmente con el intestino de los peces, y por romper dímeros de quitina en monómeros absorbibles de β N-acetil-glucosamina

La actividad quitinolítica en estómago, ciegos pilóricos e intestinos de juveniles de *Rachycentron canadum*, fue evaluada en un ensayo de seis semanas con la sustitución de harina de pescado por harina de subproductos de camarón, en inclusiones de 0, 10, 20 y 25 %. La actividad quitinolítica fue muy alta en el tejido de los ciegos pilóricos respecto al estómago e intestinos de la cobia en todos los tratamientos; solo se presentó un ligero aumento de la actividad en los intestinos de la dieta 10% respecto a las demás dietas (Lu y Ku, 2013).

Otro estudio en juveniles de *Rachycentron canadum*, diseñado para determinar la presencia y la fuente de enzimas quitinolíticas, ya sea por bacterias o endógena en los intestinos, ciegos pilóricos y estómagos de peces alimentados

con camarón. Para esto se elaboró una dieta con camarón café y se le adicionó antibiótico para eliminar la posible microbiota intestinal quitinolítica y una dieta control de igual formulación sin antibiótico, donde los resultados solo mostraron actividad en los estómagos tanto de quitinasa como de quitobiasa. En tanto los valores de los tratamientos control y con antibiótico no fueron significativamente diferentes, lo que sugiere que la mayoría de la actividad fue endógena, ya que la actividad enzimática por parte de las bacterias no generó diferencias en la medición (Fines y Holt, 2010).

2.6. Carotenoides y pigmentación en peces

Los carotenoides son compuestos derivados de ocho unidades de isoprenos (C_5H_8), que por lo regular cuentan con anillos y cierto número de dobles enlaces conjugados; tradicionalmente se les considera como compuestos de 40 carbonos en su esqueleto. Además, son liposolubles y muestran una coloración que va del amarillo al rojo, encontrándose ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en plantas como en animales (Ege, 1998).

Los carotenoides son clasificados de acuerdo con su estructura química, en los que contienen solo carbono e hidrogeno como el β -caroteno y los carotenos que contienen oxígeno, como los oxicarotenoides o xantofilas. La brillantez del color de estos compuestos se debe al cromatóforo de la molécula la cual consiste en una cadena de dobles enlaces conjugados. Una reducción en la conjugación produce formas amarillas, mientras una oxidación da formas rojas. Los factores que afectan la estabilidad de los carotenoides son:

- Temperatura: altas temperaturas fragmentan la molécula de caroteno en los puntos de unión de los anillos de ionona.
- Ácidos orgánicos: se reduce la molécula en presencia de ácido ascórbico.
- Agentes quelantes: el EDTA es un secuestrante de los metales que inducen la oxidación y se usa para evitar pérdidas de vitaminas y cambios en los colores.

-Oxígeno: en presencia de oxígeno los carotenoides se oxidan (García-Garibay *et al.*, 1993).

Estos compuestos no son considerados nutrientes, sino sustancias que los animales no pueden sintetizar; pero tanto en invertebrados como vertebrados, pueden tener diversas funciones que todavía no se conocen del todo y cuyo papel más evidente es el de la pigmentación. En el caso de algunos peces y de crustáceos, se han realizado estudios sobre la pigmentación debido a su importancia económica ya que se considera la coloración como un componente de la calidad. En estos casos, el color se debe a ciertos pigmentos carotenoides de origen alimentario siendo los más importantes dos ceto-carotenoides, la cataxantina y la astaxantina (Figura 2). Los peces, a diferencia de los crustáceos, no pueden sintetizar estos últimos pigmentos a partir de carotenoides más simples. En la naturaleza, las presas naturales aportan carotenoides. En acuicultura intensiva, se aportan en el alimento (Guillaume, 2004).

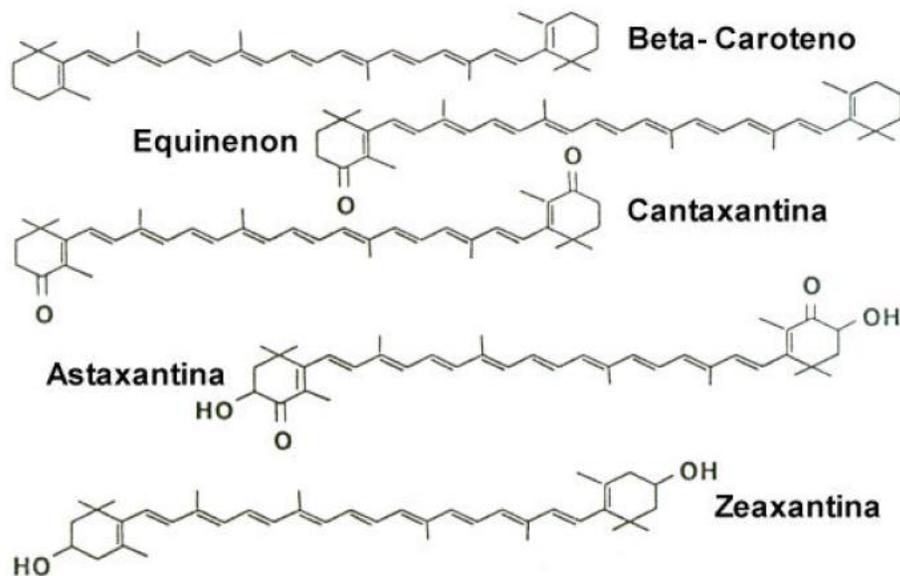


Figura 2. Estructura de algunos carotenoides en peces.

Existen tres categorías generales para clasificar la capacidad de convertir los carotenoides dietarios en astaxantina por los organismos marinos.

-Los que no pueden oxidar el anillo β -ionone y deben consumir derivados oxigenados específicos como astaxantina para su depósito (salmón, trucha, sea bream, red sea bream) son llamados *salmónidos* o del tipo "*sea bream*".

-Los que oxidan los enlaces 4 y 4' del anillo β -ionone y pueden convertir la zeaxantina de la dieta a astaxantina, depositando la mayoría de los carotenoides dietarios inalterados (goldfish, carpa roja, fancy red carp, golden-yellow carp) son nombrados del tipo *carpa*.

-Los que oxidan los enlaces 3 y 3' y 4 y 4' del anillo β -ionone del β -caroteno y pueden convertir β -caroteno, zeaxantina o intermedios a astaxantina (la mayoría de los crustáceos) son nombrados del tipo *crustáceos* (Meyers y Chen, 1982).

Estudios de varios isómeros de astaxantina indican que la composición estereoisomérica de la astaxantina dietaría puede influenciar la capacidad de absorción y biodisponibilidad de la astaxantina total. Investigaciones actuales comprenden estudios sobre los mecanismos de absorción y transporte de diferentes isómeros de astaxantina y los factores que gobiernan su capacidad de absorción en salmónidos (Figura 3). Los trabajos han mostrado que la absorción intestinal de la astaxantina fue facilitada por los niveles altos de grasa en la dieta (Meyers, 2000).



Figura 3. Metabolismo de carotenoides, astaxantina y cantaxantina en salmónidos.

2.6.1. Astaxantina en subproductos de crustáceos

La astaxantina es una xantofila roja de tipo carotenoide, su nombre se deriva del género del cangrejo *Astacus astacus*, químicamente es conocida como 3,3'-dihidroxicaroteno-4,4'-diona, siendo una molécula que presenta 40 carbonos (C₄₀H₅₂O₄), configurada con dos grupos funcionales alcohol y dos cetonas. En la naturaleza, puede existir bajo cuatro configuraciones debido al arreglo asimétrico de los carbonos 3 y 3' (Gajardo *et al.*, 2011).

Esta xantofila se presenta en microalgas (*Haematococcus pluvialis* y *Chlorella zofingiensis*) en la levadura (*Phaffia rhodozyma*), crustáceos (camarón y langostino), peces (salmón) y algunas aves (flamingo). En estos organismos la astaxantina se encuentra ligada a una proteína mediante enlaces no covalentes, que forman compuestos estables e hidrosolubles de color azul-grisáceo o verdoso llamados carotenoproteínas. Al hidrolizarse estos compuestos, ya sea por calentamiento (como sucede durante la cocción de los invertebrados comestibles), o por solventes orgánicos, la astaxantina es

liberada exhibiendo su característico color rojo-naranja. En algunos casos, el compuesto puede estar asociado firmemente con el material tegumentario como la quitina o el carbonato de calcio, impidiendo su completa extracción aún con solventes orgánicos (Carranco-Jáuregui *et al.*, 2011).

El exoesqueleto de muchos crustáceos, como el camarón, poseen compuestos de gran valor como proteínas (35-50%), quitina (15-25%), sales minerales (10-15%) y pigmentos. Estos desechos pueden llegar a ser un aporte importante de carotenoides, como la astaxantina (Armenta y Guerrero, 2009).

Los pigmentos carotenoides que se encuentran en los residuos de crustáceos presentan estructuras parecidas entre sí, que globalmente se conocen como astaxantinas. Tres estructuras corresponden a los esteroisómeros de la astaxantina (3D, 3'S astaxantina; 3R, 3'S astaxantina; 3R, 3'R astaxantina), y la restante a la cataxantina. La astaxantina se encuentra unida a una proteína, la estructura espacial de la cual determina la coloración del complejo; por ejemplo, en el caso del camarón se produce una coloración rosa-anaranjada (Guerrero, 2009).

La astaxantina en cualquiera de sus formas, es el carotenoide más abundante en los crustáceos, este puede ser una fuente natural de pigmentos para las dietas de cultivos de pargo rojo y pargo flamenco en forma fresca o deshidratada, lo cual mejoraría la calidad organoléptica, produciendo pigmentación de la piel en diferentes grados de intensidad (Cejas *et al.*, 2003; Kalinowski, *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2007; Tejera *et al.*, 2007).

2.7. Pigmentación en peces alimentados con subproductos de crustáceos.

El aspecto más importante de los acuicultores y fabricantes de alimento acuícola es la eficiencia pigmentaria de los carotenoides. Esta viene determinada por su estructura, su color específico, su digestibilidad, su

conversión metabólica y su afinidad específica por un tejido concreto (Guillaume *et al.*, 2004).

En estudios recientes, se ha sustituido la harina de pescado con harina de cascara de camarón, aprovechando las propiedades otorgadas en la coloración en el *Pagrus pagrus* como lo argumenta Kalinowski *et al.* (2005) donde probó diferentes dietas con colorantes y otras con harina de cascara de camarón, obteniendo mejores resultados con la inclusión de 16% de harina del total de alimento y sin efectos adversos en el crecimiento.

En tanto, Cejas *et al.* (2003) suministraron a especímenes de *Pagrus pagrus* una dieta con 12% de camarón entero en un periodo de cuatro meses, donde se observaron coloraciones rosas rojizas al término del experimento similares al espécimen silvestre, por lo que, alevines de pargo rojo son capaces de utilizar eficientemente los carotenoides naturales proporcionados por la suplementación dietética de camarón.

Tejara *et al.* (2007) utilizaron colorantes artificiales y una dieta basal de 88% y 12% de camarón para ver el efecto de la suplementación de astaxantina en los niveles de peróxido y composición lipídica de la piel, con lo que concluyen, que los alevines de *Pagrus pagrus* son capaces de utilizar eficientemente la astaxantina natural y sintética, además de depositar el pigmento en su forma esterificada para adquirir el color rojizo característico.

Por otra parte, Kalinowski *et al.* (2007) realizaron la sustitución de harina de pescado, por harina de cascara de camarón (16%) en *Pagrus pagrus* de edad adulta, como dietas de finalización, se alimentaron tres grupos a diferentes periodos de tiempo: 180, 120, 60 y 0 días antes de la cosecha. El mejor resultado se encontró en los peces alimentados durante el periodo más largo, ya que presentó el mejor crecimiento y coloración de la piel.

Recientemente Osuna-Osuna (2014) evaluó la pigmentación del pargo flamenco en un periodo de 90 días bajo cultivo en jaulas flotantes, alimentado con distintas fuentes de astaxantina (75/mg/kg), utilizando una fuente sintética (carophyll® pink), otra de origen animal (cabeza de camarón) y una vegetal (flor de cempasúchil) encontrando que los carotenoides de origen animal y vegetal adicionados a la dieta para el pargo flamenco tuvieron un efecto igual que los pigmentos sintéticos en la coloración de la piel.

III. JUSTIFICACIÓN

La alimentación constituye una importante inversión en la producción acuícola, donde se utiliza harina de pescado como la principal fuente de proteína. Dicho ingrediente es gran importancia para el adecuado crecimiento de los organismos cultivados y al mismo tiempo constituye el insumo más caro de la dieta, por lo cual se ha buscado sustituir ingredientes que impacten directamente el costo del alimento, como lo es la fuente de proteína.

Hoy en día, la harina de pescado se utiliza en la formulación de alimento balanceado debido a su alto contenido de proteína bruta y perfil de aminoácidos esenciales, así como su alta digestibilidad de materia seca, energía y nitrógeno. Sin embargo, su alto costo y poca disponibilidad en el mercado internacional, hace necesario evaluar otras fuentes de proteínas alternativas.

Además de los altos costos de alimentación, el cultivo intensivo de especies como el pargo flamenco presenta el problema de la falta de coloración rojiza característica de los peces silvestres, volviéndose grises en cautiverio. Esta situación demerita su valor comercial. Buscando solucionar dicho problema se ha optado por la adición de pigmentos de origen sintético, sin embargo, eso encarece aún más el costo del alimento.

Por otra parte, es conocido que los residuos pesqueros, a pesar del gran valor nutritivo que poseen, son desechados causando graves problemas de contaminación. Un ejemplo son las cabezas de camarón las cuales poseen un apreciable valor proteico y pigmentos.

Por lo que el presente estudio, se enfocó en la utilización de HCC como fuente alternativa de proteína de origen marino y análisis de su efecto en el crecimiento, actividad quitinolítica y pigmentación del pargo flamenco.

IV. HIPOTESIS

La harina de cabezas de camarón constituye una excelente fuente de proteínas y lípidos lo que permite reemplazar parcialmente la harina de pescado sin efectos adversos en el crecimiento de juveniles de pargo flamenco, además de tener una efecto positivo en la coloración por el aporte de carotenoides en inclusiones hasta del 30%; y presenta actividad quitinolítica endógena ya que los crustáceos forman parte de su alimentación en el medio natural (Fines y Holt, 2010).

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el crecimiento, la actividad quitinolítica y la coloración del pargo flamenco alimentado con harina de cabezas de camarón.

5.1. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la sustitución de harina de pescado por harina de cabezas de camarón en inclusiones de 0%, 10%, 20% y 30% mediante la respuesta en el crecimiento, índices nutricionales e índices corporales del pargo flamenco.
- Evaluar la actividad quitinolítica del pargo flamenco, en estomago e intestino cuando es alimentado con inclusiones de 0%, 10%, 20% y 30% de harina de cabezas de camarón en su dieta.
- Cuantificar las bacterias quitinolíticas en el intestino del pargo flamenco alimentado con inclusiones de 0%, 10%, 20% y 30% de harina de cabezas de camarón en su dieta.
- Evaluar la pigmentación de la piel del pargo flamenco cultivado alimentado con inclusiones de 0%, 10%, 20% y 30% de harina de cabezas de camarón en su dieta.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Elaboración y composición de la HCC

Las cabezas de camarón utilizadas para la elaboración de la HCC provenían de la congeladora de camarón Gandhi S.A. de C.V., en Mazatlán. Estas se trasladaron en refrigeración al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán (CIAD), donde se congelaron hasta su procesamiento. Los cabezas de camarón se cocieron por 10 min a 95 °C; después fueron secadas en horno a 65 °C por 6 horas; y por último se molieron finamente, como se muestra en la Figura 4. Posteriormente se le realizaron los análisis bromatológicos correspondientes (Andrade *et al.*, 2007)



Figura 4. Diagrama de flujo de elaboración de de HCC.

En la Tabla 1 se muestra la composición proximal de la HCC, utilizada para la elaboración de las dietas experimentales.

Tabla 1. Composición proximal de la HCC los valores están expresados en base seca.

Composición proximal de HCC (%)	
Proteínas	49.5±0.14
Lípidos	6.1±0.04
Cenizas	23.6±0.04
Humedad	9.1±0.11
ELN	11.7±0.23
Carotenoides (mg/kg)	114.22±0.22

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. ELN incluyendo fibra, obtenido por diferencia. Los datos son la media de una n = 3 ± DE.

6.2. Formulación y elaboración de dietas experimentales

Se formularon cuatro dietas experimentales isolipídicas (15%) e isoproteicas (45%), sustituyendo a la harina de pescado (HP), con la harina de cabezas de camarón HCC: dieta D-CTRL con 100% de HP y 0% de HCC; dieta D-10% HCC con 90% de HP y 10% de HCC; dieta D-20% HCC con 80% HP y 20% de HCC; dieta D-30% HCC con 70% de HP y 30% de HCC. Como fuente de lípidos se utilizó el aceite de pescado. El nivel de inclusión de harina de calamar, harina de krill, gluten de trigo, antioxidante, lecitina de soya, premezclas de vitaminas y minerales fue constante en las cuatro dietas. Se utilizó alginato de sodio como aglutinante y dextrina de maíz para ajustar al 100% (Tabla 2).

Tabla 2. Formulación y composición proximal de las dietas experimentales con HCC para el pargo flamenco.

Ingredientes	D-CTRL	D-10% HCC	D- 20% HCC	D- 30% HCC
H. de pescado	51.73	44.24	36.76	29.28
H. de calamar	6.00	6.00	06.00	6.00
H. de krill	7.59	7.59	07.59	7.59
H. de camarón	0.00	10.00	20.00	30.00
Gluten de maíz	2.00	2.00	2.00	2.00
A. de pescado	9.17	9.24	9.30	9.37
Dextrina	10.28	10.28	10.28	10.28
Vitamina Premix	0.60	0.60	00.60	0.60
Mineral Premix	0.230	0.230	0.230	0.230
Antioxidante	0.05	0.05	00.05	0.05
Lecitina de soya	1.50	1.50	01.50	1.50
Vitamina C	0.10	0.10	00.10	0.10
Alginato	3.00	3.00	03.00	3.00
Celulosa	7.75	5.17	02.59	0.00
Suma	100.00	100.00	100.00	100.00
Composición proximal (%)	D-CTRL	D-10% HCC	D-20% HCC	D-30% HCC
Proteína cruda	42.27 ± 0.36	44.42 ± 0.53	45.45 ± 0.08	43.85 ± 0.07
Lípidos	15.16 ± 0.10	15.83 ± 0.08	15.41 ± 0.23	15.29 ± 0.20
Cenizas	11.38 ± 0.07	12.22 ± 0.03	12.51 ± 0.04	13.36 ± 0.22
Humedad	8.84 ± 0.02	5.94 ± 0.28	5.94 ± 0.33	7.28 ± 0.14
ELN	22.35 ± 0.04	21.59 ± 0.07	20.69 ± 0.11	20.22 ± 0.09
Carotenoides (mg/kg)	22.44±1.15	37.76±2.61	42.12±2.12	48.46±1.16
Energía bruta (cal/g)	4451.57±6.60	4406.93±10.12	4435.92±13.02	4408.14±22.77

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. ELN incluyendo fibra, obtenido por diferencia. Los datos son la media de una n=3±DE. D-CTRL=dieta con 100% de HP y 0% de HCC; D-10% HCC=dieta con 90% de HP y 10% de HCC; D-20% HCC= dieta con 80% HP y 20% de HCC; D-30% HCC= dieta con 70% de HP y 30% de HCC.

Las dietas experimentales se elaboraron en la planta de alimentos CIAD Unidad Mazatlán, todos los ingredientes se pesaron de acuerdo a la formulación estipulada y se mezclaron de forma homogénea en batidora. Primeramente se agregaron los ingredientes secos y después el aceite de pescado, esto para obtener una mezcla homogénea.

Una vez obtenida la mezcla homogénea se elaboraron los pellets de alimento utilizando un molino de carne, posteriormente se colocaron en charolas para ser secados durante 24 horas en un secador de aire forzado a una temperatura de 28-30 °C. Por último se dio la presentación final al alimento con cortes de aproximadamente 1 cm, que se colocaron en bolsas plásticas negras con su respectiva etiqueta y se almacenaron a 4 °C hasta su uso (Figura 5)



Figura 5. Diagrama de flujo de elaboración de dietas experimentales de HCC.

6.2.1. Análisis proximal de los ingredientes, las dietas y de los peces.

El análisis proximal se realizó por triplicado en las dietas experimentales, ingredientes y carcasas de los peces al inicio y al final del experimento. La determinación fue realizada en el Laboratorio de bromatología del CIAD Unidad de Mazatlán, utilizando la metodología descrita en AOAC (1984).

En la medición de proteínas se utilizó el método descrito por Woyewoda *et al* (1986), con el equipo micro kjendahl. El contenido lipídico se determinó por

medio de la extracción con éter de petróleo utilizando el método micro soxhlet (AOAC, 1998).

La determinación de humedad se llevó a cabo por gravimetría; las muestras se secaron en una estufa a 105 °C durante 12 horas. Las cenizas se calcularon calcinando las muestras en una mufla a 550 C de igual manera por un periodo de 12 horas (AOAC, 1984).

6.3. Dispositivo experimental

El bioensayo se realizó por triplicado utilizando 12 tanques cilíndricos de 3000 L, pero a 1500 L de volumen de trabajo. Dichos tanques tuvieron un suministro de agua en la parte superior mientras que la salida se encuentra en la base y en el centro del tanque. Se utilizaron mallas de plástico negras para cubrir los contenedores y evitar la pérdida de peces, además de minimizar la radiación solar sobre los organismos. También se suministró aire de forma constante por medio de piedras aireadoras y se mantuvo el flujo continuo de agua salada (Figura 6)



Figura 6. Sistema experimental para la alimentación del pargo flamenco.

6.3.1. Organismos de estudio

Se utilizaron 20 juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) por cada tanque, producidos en la planta piloto de producción de peces marinos del CIAD Mazatlán. Los especímenes del bioensayo fueron provenientes de un solo desove y se tomaron para el bioensayo una vez que alcanzaron aproximadamente 77 g de peso promedio.

6.3.2. Régimen alimenticio

Los organismos se alimentaron *ad libitum* dos veces al día (9:00 am y 4:00 pm) y se midió la ración consumida. Los fondos de los tanques se limpiaron y sifonearon diariamente, para evitar la acumulación de materia orgánica y la contaminación de los tanques.

6.3.3. Parámetros ambientales

Se realizó un registro de la temperatura, salinidad y oxígeno disuelto diariamente en los tanques, para este último se usó un multimedidor marca YSI Modelo 85.

6.4. Evaluación de crecimiento

Para medir el crecimiento de los peces se les realizaron biometrías cada mes, los organismos se pesaron y se les midió su longitud total utilizando un ictiómetro. Con los datos obtenidos se calcularon los siguientes índices nutricionales:

-Incremento de peso = peso final (g) - peso promedio inicial (g)

-Tasa de crecimiento: TC (%) = peso ganado (g) / peso inicial (g) * 100

-Tasa de crecimiento específica: TCE = 100 * (ln de peso final (g) - ln de peso inicial (g)) / tiempo (días)

-Supervivencia: S (%) = (total de peces al final / total de peces inicial) * 100

-Tasa de conversión alimenticia: TCA= Alimento consumido/peso ganado

-Tasa de eficiencia proteica: TEP=Peso ganado/proteína consumida.

6.5. Evaluación de los índices corporales

Para la evaluación de los índices corporales, al final del experimento se sacrificaron 9 peces por tratamiento. Con ayuda de un ictiómetro se midió la longitud total del organismo, para después ser pesado y eviscerado. Después se obtuvieron el peso de las vísceras, hígado y grasa intraperitoneal, para el cálculo de los índices corporales, que tienen las siguientes formulas:

-Factor de condición: FC= (Peso del pez/longitud del pez).

-Índice hepatosomático: IHS=(Peso del hígado/peso del pez)*100.

-Índice vicerosomático: IVS= (Peso de vísceras/peso del pez)*100.

-Relación de grasa intraperitoneal: RGI= (Peso húmedo de la grasa/peso del pez)*100 (Abad *et al.*, 2014).

6.6. Análisis de la actividad quitinolítica

Para la obtención de las muestras, se tomaron 6 peces de cada tratamiento al final del bioensayo, se mantuvieron en inanición durante 24 horas antes de su disección, para dar tiempo de digerir el alimento consumido y vaciar su sistema digestivo. Los organismos fueron sacrificados en un baño de hielo y agua, después se disectaron para extraer el estómago e intestinos. Los órganos se pesaron y congelaron para después ser liofilizados en una liofilizadora LABCONCO (Fines y Holt, 2010).

Para evaluar la actividad endógena de los órganos del pez sin la intervención de bacterias se analizaron 6 peces por tratamiento añadiendo antibiótico en sus dietas. Para lo anterior se adicionó antibiótico bactrim a las dietas de cada

tratamiento, en una proporción de 10 g/kg, y se suministró este alimento a los peces por cinco días, en los horarios habituales de alimentación, para eliminar la presencia de bacterias de su intestino. La toma de muestras (intestino y estomago) se llevó a cabo como se describió para el primer lote (Fines y Holt, 2010).

Una vez liofilizados los órganos se siguió la metodología de Jeuniaux, (1966) para la evaluación de la actividad quitinolítica; para lo cual se pesaron 50 mg de cada muestra, se les adicionó 1.5 ml de agua destilada, y se reservó en hielo, para ser homogenizado en ultraturax a 10 000 rpm, después se centrifugó por 20 min a 13 000 rpm, se tomó 0.5 ml del sobrenadante con micropipeta, al cual se agregó 0.5 ml de suspensión de quitina (5 mg/ ml) y 0.5 ml solución tampón, dicha solución fue diferente para cada órgano; para los estómagos se utilizó como solución amortiguadora ácido cítrico al 0.15 M con un pH de 5 y para los intestinos se adiciono Na_2HPO_4 al 0.3 M con un pH de 7.

Después las muestras fueron incubadas a 37 °C en baño maría por 3 horas, terminado este lapso se hirvieron por 10 minutos para detener la reacción, posteriormente se centrifugaron por 15 min, del sobrenadante obtenido se tomaron dos muestras de 0.5 ml, se les añadió 0.1 ml de tetraborato de potasio y se hirvieron por 3 minutos, una vez frías se agregó 3 ml de solución de dimetilaminobenzaldehído (DMAB), mezclando perfectamente y se dejó reposar 20 min a 37 °C, después se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 585 nm en menos de 10 minutos para evitar la pérdida del color, como se observa en la Figura 7.

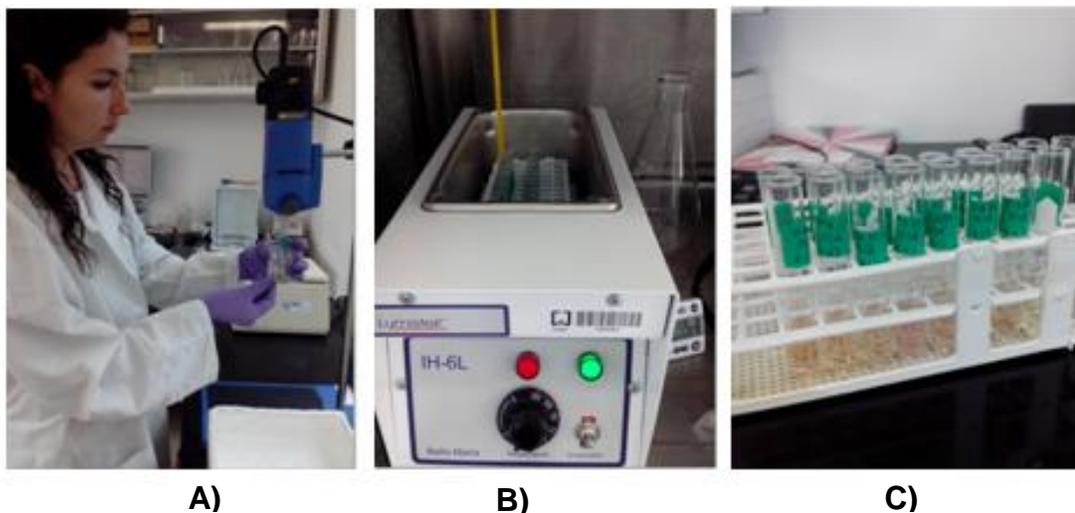


Figura 7. A) Homogenizado de muestras en ultraturrax; **B)** Muestras en baño María; **C)** Muestras coloridas para su lectura en espectrofotómetro.

Para los cálculos, se elaboró una solución estándar de 50 μg de NAG que se diluyó hasta las concentraciones de 5, 10, 15 y 20 μg de NAG en soluciones tampón de pH 5 para los estómagos por ser la fase ácida de la digestión y pH 7 en intestinos (fase alcalina), con las cuales se construyeron las curvas estándar. La pendiente de cada una de las curvas estándar se utiliza para convertir la absorbancia a μg de NAG. La actividad quitinolítica se expresa en unidades de μg NAG / g de peso húmedo / hr (Lu y Ku, 2013).

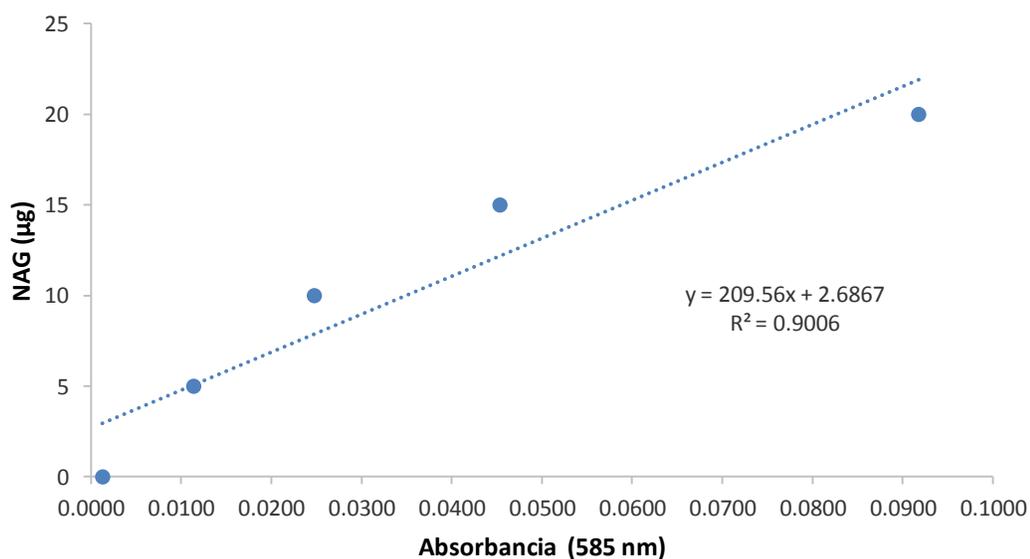


Figura 8. Curva de calibración de pH 5, para las muestras de estómagos de pargo flamenco alimentado con HCC.

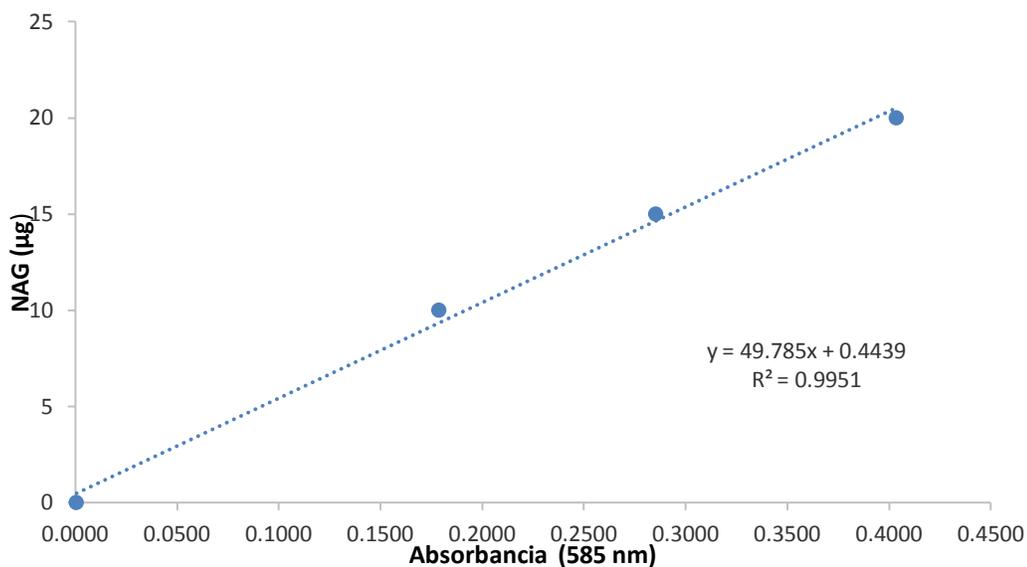


Figura 9. Curva de calibración de pH 7, para las muestras de intestinos de pargo flamenco alimentado con HCC.

6.6. Análisis bacteriológico

Al final del experimento se realizó un análisis cuantitativo de la microbiota intestinal del pargo flamenco, donde una fracción del intestino fue sembrada en agar TCBS, agar marino, agar TSA y por último en agar quitina. Dicha medición se realizó en los peces de los distintos tratamientos y en los peces a los que se les suministro antibiótico.

6.6.1. Agar TSA

Agar tripticaseína de soya, es un medio para el crecimiento de todo tipo de bacterias. Para su preparación se pesaron 40 g de agar, se disolvió en un litro

de solución salina al 2% y se calentó en un termoagitador magnético hasta que hirviera y se observara un líquido completamente cristalino. Después se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos, se dejó enfriar hasta una temperatura de 45 °C para ser vertido en las cajas petri. Se esperó a la solidificación del medio para ser almacenados en un horno a 30 °C durante 24 h.

6.6.2. Agar TCBS

El medio tiosulfato citrato bilis sacarosa es el medio diferencial para el género *Vibrio sp.* Para su elaboración se disolvió de 88 g de agar por cada litro de agua de acuerdo a lo estipulado por el fabricante. Después fue calentado en un termoagitador magnético, hasta llegar al punto de ebullición y se dejó enfriar hasta una temperatura de 45 °C aproximadamente. Posteriormente se vació en las cajas petri estériles, se esperó a que el medio gelificara para secarlo en un horno a 30 °C por un día.

6.6.3. Agar marino

Este medio no es selectivo por lo que crece todo tipo de bacterias; se diluyó 55.2 g por cada litro de agua destilada y se puso a calentar en un termoagitador magnético hasta el punto de ebullición para disolverlo completamente, después se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos, se dejó reposar hasta que la temperatura llegó a 45 °C y se vertió en cajas petri. Una vez gelificado el medio se metió a secar en horno a 30 °C durante 24 horas (González *et al.*, 2003).

6.6.4. Agar quitina

El agar quitina se utilizó como medio para la identificación de bacterias quitinolíticas, las cuales se caracterizan por presentar zonas claras alrededor del crecimiento bacteriano, lo que indica que la quitina ha sido hidrolizada.

La quitina se añadió en una proporción del 0.25%, en agar blando al 0.5%, y se le añadió 2% de NaCl, se mezcló hasta que el medio estuvo homogéneo y se esterilizó a 115 °C por 30 minutos, se dejó enfriar hasta los 45 °C y se vertió 3 ml de dicho agar en cajas petri con agar TSA, mezclando en movimientos circulares hasta homogenizar. Una vez gelificadas son puestas a secar en un horno a 30 °C (Linsay *et al.*, 1984).

6.6.5. Preparación de las muestras

Se utilizaron seis peces por tratamiento, de los cuales tres fueron tratados con antibiótico como se señala en el apartado de enzimas quitinolíticas, los organismos fueron disectados asépticamente dentro de una campana de flujo laminar, donde se les extrajo el aparato digestivo del cual se tomó una pequeña parte de intestino.

La muestra fue pesada y puesta en un tubo eppendorf con 1 ml de solución salina al 2.5%, donde se maceró, después se tomaron 0.1 ml de la solución con la muestra macerada y se puso en otro tubo eppendorf con 0.9 ml de solución salina, después se volvió a tomar 0.1 ml de la primera dilución y se vierte en otro tubo con 0.9 ml de solución salina. De tal forma que la solución con la muestra es la dilución 10^{-1} , el segundo tubo es 10^{-2} y el último 10^{-3} .

Las cajas fueron sembradas por la técnica de barrido, con un rastrillo de vidrio agregando 0.1 ml de la solución correspondiente, los medios TSA, TCBS y agar marino se sembraron en 2 cajas petri con disoluciones de 10^{-2} y 10^{-3} de cada pez y fueron almacenadas en una incubadora a 37 °C de 24 a 48 horas, para el conteo de las colonias. Del agar quitina se sembraron 4 cajas petri por muestra, 2 aerobias y 2 anaerobias, con diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} , se almacenaron en una incubadora a 37 °C por 13 días. Pasado el tiempo de incubación se procede a realizar el conteo de colonias para establecer las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) (Figura 10).

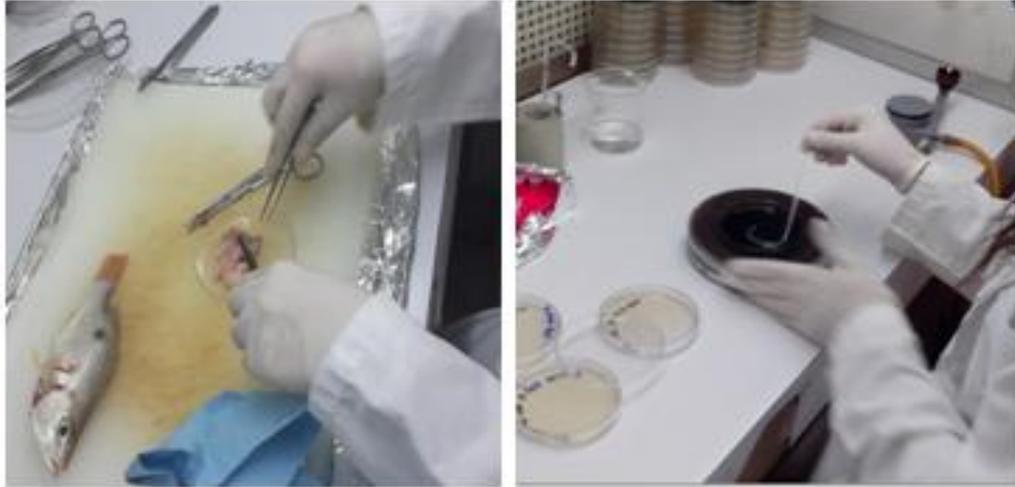


Figura 10. Análisis bacteriológico de los intestinos de pargo flamenco alimentados con HCC.

6.7. Análisis de coloración en peces

Durante un periodo de 12 semanas de experimento, se realizaron tres mediciones de la coloración de la piel en los peces, estas fueron al inicio, en medio (sexta semana) y al final (12 semanas), para lo cual se tomaron 9 peces por tratamiento. Asimismo, se realizó la medición del color referencia a un grupo de 10 peces silvestres. Los peces fueron anestesiados con esencia de clavo de olor, para su manipulación, ya que el estrés de los peces afecta la medición. Se utilizó un espectrofotómetro CR-300 (Minolta, Japón) para la medición en las zonas ya establecidas del pez. Después se colocan en un tanque con abundante oxígeno para su pronta recuperación y posteriormente se colocaban en su tanque correspondiente.

El color se cuantificó de acuerdo a la escala de color CIE cuyas variables son L^* , a^* y b^* , (también llamado CIELAB). En esta escala, L^* indica luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad. En la siguiente figura se muestra el diagrama de cromaticidad que indica la dirección de los colores: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y

-b* es la dirección del azul. El centro es acromático; a medida que los valores de a* y b* aumentan y el punto se separa del centro, la saturación del color se incrementa. Mientras que L* representa blanco en la parte superior de la esfera y negro en la parte inferior, tal como se indica en la Figura 11.

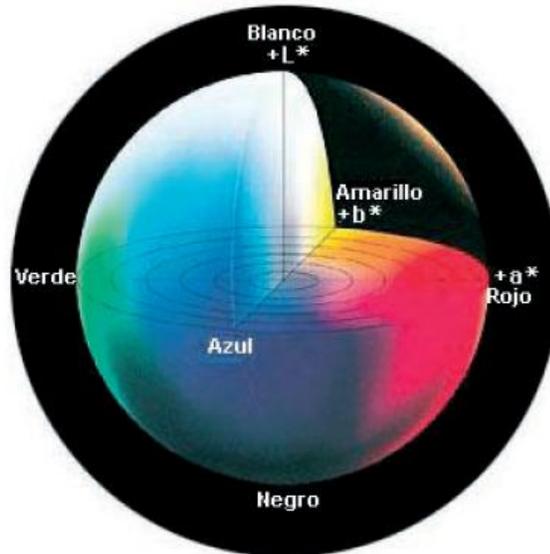


Figura 11. Espacio del color L* a* b*

Las variables de coloración fueron medidas en cinco zonas del lado izquierdo de cada organismo (Figura 12). Los puntos se establecieron al dibujar un par de líneas horizontales a lo largo del cuerpo del pez, la primera une la mandíbula inferior a la parte inferior del pedúnculo caudal, la segunda a partir de la cabeza arriba del ojo hasta la parte posterior de la aleta dorsal pasando por el lunar. También se dibujaron dos líneas verticales, una al inicio de la aleta pélvica y la otra en la zona del pedúnculo caudal. La cabeza se identificó como Zona I, Zona II el vientre, Zona III el medio, Zona IV y la aleta caudal se tomó como la Zona V, en las cuales se realizaron tres mediciones. En cada una de las zonas medidas se obtuvo un promedio.



Figura 12. Zonas de medición del color en el pargo flamenco alimentado con HCC.

6.7.1. Determinación de carotenoides en dietas y harina de cabeza de camarón

Para determinar la cantidad de carotenoides de las dietas y la HCC se pesaron 10 gr de muestra seca, la cual fue transferida a matraces Erlenmeyer de 250 ml cubiertos en su totalidad por papel aluminio, se agregaron 70 ml de la mezcla acetona-metanol (1:1), agitándose vigorosamente por 15 minutos, después se filtró con ayuda de un matraz quitazato y embudo buchner, los filtros usados fueron Wathman No. 1., la harina seca se transfirió de nuevo al matraz Erlenmeyer y se repitió el procedimiento tres veces más, posteriormente se pasó a un embudo de separación, donde se le adicionó 10 ml de agua desionizada fría, se agitó y se dejó reposar por 10 minutos o hasta que se apreciarían las diferentes capas, donde se eliminó la capa inferior. Por último se pasó a una celda y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 470 nm. La concentración de carotenoides totales se calculó mediante la ecuación (1):

$$(1) \dots \dots \dots \frac{\mu g}{g} = \frac{10000 * V * A}{W * E_{1\%, 1cm}}$$

Donde V es el volumen tomado de la solución madre, A es la absorbancia a 446 nm, W es el peso de la muestra y $E_{1\%,1\text{cm}}^{2100}$ es el coeficiente de extinción molar para astaxantina (Booth *et al.*, 2004).

6.8. Análisis estadístico

A los datos que se obtuvieron en las variables de color (a^* , b^* , L^*) y de crecimiento se les realizó pruebas de homocedasticidad y normalidad, con la prueba Levene. Para datos normales y homocedásticos se aplicó una ANOVA de una vía, con un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa Sigma Plot 11.0, siendo las diferencias entre medias comparadas por el test de Tukey. En el caso de datos no normales ni homocedásticos, se aplicó Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95% (Zar 1996).

Para el análisis de actividad quitinolítica se verificó la normalidad y homogeneidad de los resultados obtenidos, al ser datos paramétricos se sometieron a un análisis de varianza factorial, ANOVA de dos vías cuyos factores fueron los tratamientos y la adición de antibiótico, mediante el programa Sigma Plot 11.0. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó una prueba de rangos múltiples de Tukey. La significancia estadística de todas las pruebas aplicadas fue considerada como 95% ($P < 0,05$) (Zar 1996).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Calidad del agua

En un periodo de 10 semanas los parámetros ambientales se monitorearon diariamente por la mañana. El promedio durante todo el experimento para temperatura fue de 24.6 ± 2.1 °C, oxígeno disuelto 5.83 ± 0.68 mg/L y salinidad 34 ± 1.6 ‰.

7.2. Evaluación biológica

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos para crecimiento, así como la eficiencia del alimento de los peces alimentados con HCC en sustitución de la harina de pescado y una dieta control.

Tabla 3. Evaluación biológica del pargo flamenco alimentado con dietas formuladas con HCC en un periodo de 10 semanas de experimento.

Índices nutricionales (Peso húmedo))	D-CTRL	D-10% HCC	D-20% HCC	D-30% HCC
PI	77.73±0.06 ^a	77.53±0.24 ^a	77.32±0.08 ^a	77.53±0.26 ^a
PF	100.59±5.39 ^b	113.63±5.12 ^{ab}	115.46±6.82 ^a	113.004±6.17 ^{ab}
PG	22.85±5.41 ^b	36.09±4.89 ^{ab}	38.15±6.79 ^a	35.47±5.91 ^{ab}
TC	29.40±6.97 ^b	45.34±6.15 ^{ab}	47.04±8.77 ^a	45.73±7.48 ^{ab}
TCE	0.37±0.08 ^b	0.55±0.06 ^{ab}	0.57±0.08 ^a	0.54±0.07 ^{ab}
CAI	40.59±3.43 ^b	57.77±7.02 ^{ab}	57.61±7.67 ^{ab}	61.79±9.52 ^a
TCA	1.82±0.26 ^a	1.60±0.03 ^a	1.52±0.14 ^a	1.75±0.15 ^a
S	83.33±2.89 ^a	95.00±5.00 ^a	98.33±2.89 ^a	98.33±2.76 ^a
TEP	1.40±0.22 ^a	1.57±0.03 ^a	1.50±0.14 ^a	1.39±0.12 ^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. Valores con superíndices distintos en la misma fila denotan las diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Simbología: PI= peso inicial promedio; PF=peso final promedio; PG=peso ganado; CAI= consumo de alimento individual; TC= Tasa de crecimiento; TCE= Tasa de crecimiento específica; TCA=Tasa de conversión alimenticia aparente; S= supervivencia; TEP= Tasa de eficiencia proteica.

Los peces del tratamiento D-20%HCC presentaron diferencias significativas respecto a los peces del tratamiento D-CTRL en peso ganado, tasa de crecimiento y tasa de crecimiento específico. Mientras que los peces del tratamiento D-30% HCC presentaron diferencias significativas con los organismos del D-CTRL en el consumo de alimento individual.

7.2.1. Ganancia de peso

En la figura 13 se muestra el crecimiento del pargo flamenco durante el bioensayo, donde se puede observar que los organismos alimentados con la dieta D-20% HCC registraron el mayor incremento de peso (38.15 ± 6.79 g) al final del experimento, sin embargo, no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) con los peces alimentados con los tratamientos D-10% HCC y D-30% HCC. Mientras que los peces alimentados con la D-CTRL presentaron menor peso (22.85 ± 5.41) comparado con los demás tratamientos, obteniendo diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto a los organismos que recibieron la dieta D-20% HCC.

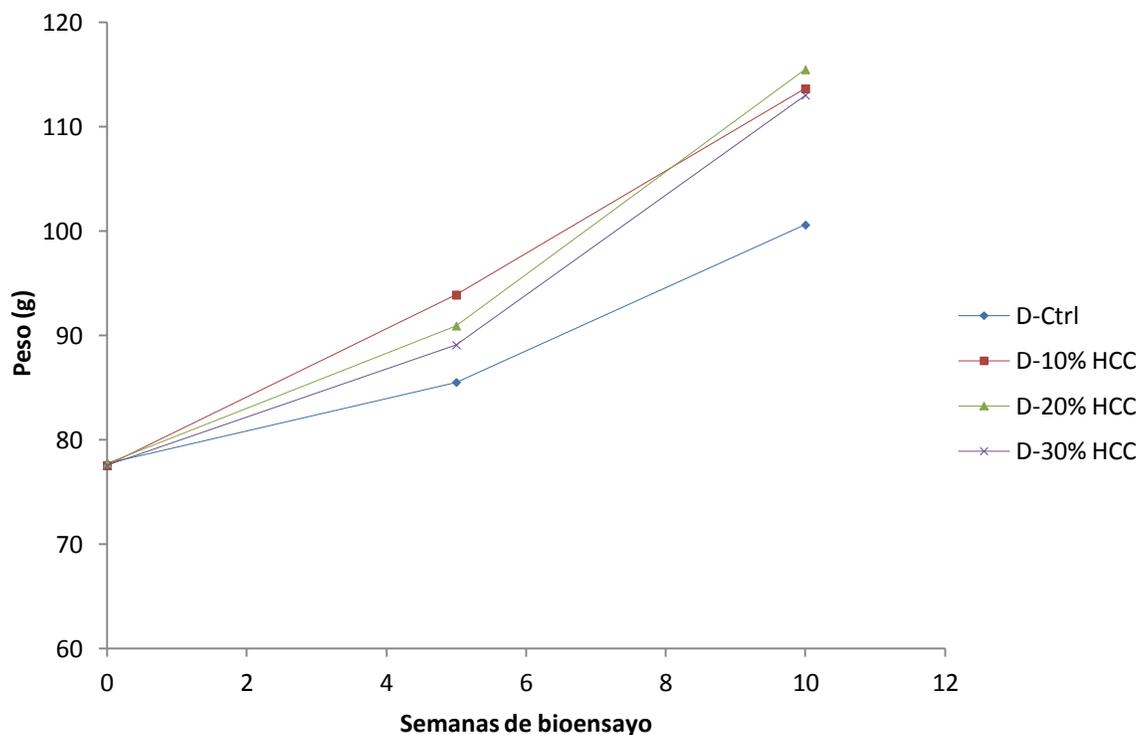


Figura 13. Incremento en peso del pargo flamenco, alimentados con dietas de HCC en un periodo de 10 semanas.

La adición de HCC a las dietas mostró resultados favorables en la ganancia de peso, tal como reporta Lu y Ku (2012) en juveniles de *Rachycentron canadum*, que obtuvieron un mejor crecimiento en inclusiones hasta del 25% de harina de cascaras de camarón en un periodo de seis semanas, resultados similares se obtuvieron en juveniles de *Totoaba macdonaldi*, donde las dietas con 15% y 30% de HCC superaron al tratamiento control aunque no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en 57 días de bioensayo (Espinosa *et al.*, 2015); Kalinowski *et al.* (2007), varió el tiempo de suministro de dietas con 16% de harina de cascaras de camarón en un periodo de 180 días de alimentación en *Pagrus pagrus*, obteniendo mejor crecimiento cuando la harina de cascaras de camarón estuvo presente más tiempo en su dieta.

En un estudio en *Pagrus pagrus* el crecimiento no muestran diferencias significativas ($P>0.05$) con la adición de 16% de harina de cascara de camarón respecto a los peces que se les suministro una dieta sin harina de cascara de camarón, no obstante los organismos con dicha inclusión obtuvieron mayor crecimiento que resto de los tratamientos en 105 días de experimento (Kalinowski *et al.*, 2005).

Mientras que Cejas *et al.* (2003), alimentaron a alevines de *Pagrus pagrus* con 12% de camarones (*Pleisonika sp.*) y 88% de una dieta comercial en su ración habitual, aunque los peces si obtuvieron mayor crecimiento en 4 meses de experimento no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$) respecto a la dieta control, resultado que coincide con Tejera *et al.* (2007) donde utilizaron camarones congelados en la misma inclusión y por el mismo lapso de tiempo.

La ganancia elevada de peso en peces alimentados con HCC, se puede atribuir al mayor consumo de estas dietas, aunque solo la D-30%HCC presentó diferencias significativas con la D-CTRL, los otros tratamientos también fueron superiores en cuanto a la cantidad de alimento consumido, esto debido a que la HCC es una excelente fuente de aminoácidos esenciales y no esenciales y posee una variedad de estimulantes de alimentación o quimioattractantes, que mejora la palatabilidad del alimento (García-Romero *et al.*, 2014).

7.2.2. Tasa de crecimiento específico

La tasa de crecimiento específico fue mayor en los peces alimentados con la dieta D-20%HCC (0.57 ± 0.08), sin presentar diferencias significativas con los organismos alimentados con la dieta D-10% HCC con un valor de 0.55 ± 0.06 y los de la dieta D-30% HCC con 0.54 ± 0.07 . Sin embargo a los peces que se les proporcionó la dieta D-CTRL fueron los que obtuvieron la TCE más baja (0.37 ± 0.08) presentando diferencias significativas con los peces alimentados con la dieta D-20%HCC (Tabla 3).

Kalinowski *et al.* (2005) obtuvieron TCE de 0.91 ± 0.06 en juveniles de *Pagrus pagrus* de 44g en inclusiones de 16% de harina de cascara de camarón, mientras que Cejas *et al.* (2003) presentaron valores de 2.04 ± 0.04 con inclusiones de 12% de camarón, en alevines de 2.8 gr de la misma especie, ambos valores mayores que los resultados en este experimento, esto debido posiblemente a que la tasa de crecimiento es más alta en alevines.

En otro estudio de Kalinowski *et al.* (2007), mostraron valores de 0.48 ± 0.04 , 0.44 ± 0.01 , 0.42 ± 0.01 y 0.39 ± 0.02 , en *Pagrus pagrus* de 185 gr, alimentados con 16% de cascara de camarón en periodos de 180, 120, 60 y 0 días respectivamente, donde el tratamiento que solo se le suministró dieta control (0 días) presentó el menor valor, con diferencias significativas respecto al tratamiento de 180 días, es decir con un mayor tiempo de suministró dietas adicionadas con harina de cascara de camarón mejoró significativamente el crecimiento. Mientras que para la *Totoaba macdonaldi*, la inclusión de HCC hasta un 30% mejoró significativamente el crecimiento respecto a los peces que consumieron dietas sin HCC, esto en juveniles de 26 gr, en un periodo de 57 días (Espinosa *et al.*, 2015).

Los valores encontrados de TCE varían en todos los estudios, ya que dependen de la especie, la edad además de las condiciones fisiológicas y ambientales en las que se encuentre el pez, pero la mayoría de los autores coinciden en el aumento del crecimiento en los peces alimentados con inclusiones de camarón (cascara, cabeza o entero) en su dieta, en *Pagrus pagrus* se ha sustituido hasta 16%, mientras que otras especies como la *Totoaba macdonaldi* y la *Rachycentron canadum* han utilizado hasta 25 y 30% de harina de subproductos de camarón. (Kalinowski *et al.*, 2005; Kalinowski *et al.*, 2007; Tejera *et al.*, 2007; Lu y Ku, 2013; Espinosa *et al.*, 2015).

7.2.3. Tasa de conversión alimenticia

La tasa de conversión alimenticia fue similar en todos los tratamientos al no presentar diferencias significativas ($P > 0.05$). Sin embargo, los peces alimentados con D-20% HCC presentaron la TCA más baja (1.52 ± 0.14) respecto a los demás tratamientos, seguida de los organismos alimentados con la dieta D-10% HCC (1.60 ± 0.03), después los de la dieta D-30% HCC (1.75 ± 0.15) y finalmente los peces del tratamiento D-CTRL, que registraron el valor de TCA mayor (1.82 ± 0.26). De igual forma Kalinowski *et al.* (2005), no encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en juveniles de *Pagrus pagrus*, obteniendo TCA de 1.2 a 1.5 en inclusiones de 0 %, 8% y 16% de cáscaras de camarón, valores de TCA menores a los obtenidos en este trabajo (1.52 a 1.82). Otros estudios en *Pagrus pagrus* alimentados con cáscaras de camarón y camarón entero obtuvieron TCA mas altos que los del presente estudio de 2 a 2.5, sin diferencias significativas entre los mismos (Kalinowski *et al.*, 2007; Cejas *et al.*, 2003).

Para especies como la *Totoaba macdonaldi* (Espinosa *et al.*, 2015) y la *Rachycentron canadum*, se registraron diferencias significativas en TCA, cuando se alimentaron con dietas de HCC y cascaras de camarón respecto a las dietas control, los valores de TCA oscilaron entre 4.1 - 1.6 en *Totoaba macdonaldi* y 0.94 - 1.1 en *Rachycentron canadum* (Lu y Ku, 2013).

7.2.4. Supervivencia

En la Tabla 3 se observa que la supervivencia no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos, donde el grupo de peces alimentados con las dietas D-20% HCC y D-30% HCC presentaron $98.33 \pm 2.89\%$ y $98.33 \pm 2.76\%$ de supervivencia respectivamente. Seguidos por los peces a los que se les suministraron las dietas D-10% HCC (95%) y D-CTRL (83.33). Resultados similares fueron observados en *Pagrus pagrus* (Cejas *et al.* 2002; Tejera *et al.*, 2007), *Rachycentron canadum* (Lu y Ku, 2013)

y *Totoaba macdonaldi* (Espinosa *et al.*, 2015) cuando fueron alimentados con subproductos de camarón.

7.2.5. Tasa de eficiencia proteica

La tasa de eficiencia proteica no presentó diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos. Los valores de la TEP oscilaron entre 1.39 ± 0.12 ; que corresponde a los peces alimentados con la dieta D-30% HCC; y 1.57 obtenida en los organismos a los que se les suministró la dieta D-10% HCC. En *Pagrus pagrus* se presentaron valores de 0.98 a 1.4 para TEP con una inclusión de 16% de harina de cascara de camarón en distintos periodos (0, 60, 120 y 180 días) obteniendo los mejores resultados en periodos de sustitución más prolongados (120 y 180 días) (Kalinowski *et al.*, 2007).

Espinosa *et al.* (2015) encontraron en juveniles de *Totoaba macdonaldi* valores de 0.5-1.13, presentando el valor más bajo el tratamiento control y el más alto en el tratamiento con 30% de HCC. Contrario a lo reportado por Lu y Ku (2013), observaron en juveniles de *Rachycentron canadum*, que los valores de TEP decrecieron, con el aumento de la inclusión de harina de cascara de camarón.

7.3. Índices biológicos corporales

En la Tabla 4 se muestran los índices biológicos corporales, en los que se encontraron los organismos al final del bioensayo tales como: el factor de condición que indica el grado de robustez, índice hepatosomático que se refiere al tamaño del hígado, índice vicerosomático que es el tamaño del paquete visceral y por último la relación de grasa intraperitoneal que mide la grasa visceral del pez. Los valores presentados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las dietas ($P>0.05$).

Tabla 4. Índices biológicos corporales del pargo flamenco alimentado con HCC.

Índices somáticos o corporales	D-CTRL	D-10% HCC	D-20% HCC	D-30% HCC
FC	1.75±0.25 ^a	1.65±0.11 ^a	1.70±0.12 ^a	1.71±0.16 ^a
IVS	9.41±1.89 ^a	7.99±1.28 ^a	8.38±1.34 ^a	8.70±1.53 ^a
IHS	1.28±0.41 ^a	0.95±0.27 ^a	1.02±0.25 ^a	1.25±0.33 ^a
RGI	5.65±1.42 ^a	5.05±1.42 ^a	5.28±1.16 ^a	5.41±1.63 ^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=3. Valores con superíndices distintos en la misma fila denotan las diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05). Simbología FC: Factor de condición. IHS: Índice hepatosomático. IVS: Índice viscerosomático. RGI: Relación de grasa intraperitoneal.

7.3.1. Factor de condición (FC)

El FC es usado como una estimación aproximada de la robustez de los peces, dado que describe la relación que existe entre la longitud del pez y su peso, por lo que se relaciona directamente con la alimentación, estado reproductivo y estrés al cual se ha sometido (Cifuentes *et al.*, 2012).

En la tabla 4 se presentan los resultados del factor de condición de los peces alimentados con los distintos tratamientos los cuales no presentaron diferencias significativas (P>0.05) De los resultados obtenidos, el FC menor se presentó en los organismos alimentados con la dieta D-10% HCC (1.65±0.11); mientras que el FC mayor se registró en el tratamiento D-30% HCC con 1.71±0.16.

Resultados similares presentaron Abdo *et al.* (2010) en pargo flamenco, en dietas con inclusiones optimas de proteína (45-50%) para esta especie, con un FC de 1.6, mientras que Tejara *et al.* (2007), mostraron en especímenes de *Pagrus pagrus*, valores más altos de FC de 2.56 en dieta control y 2.68 en dietas con 12% de camarón, sin presentar diferencias significativas entre sus tratamientos.

7.3.2. Índice hepatosomático (IHS)

Este parámetro estima el estado de salud del pez, dado que describe la relación entre el tamaño del cuerpo y el tamaño del tejido hepático. Los resultados del índice hepatosomático no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) para ninguno de los tratamientos, sin embargo, los organismos alimentados con la D-CTRL obtuvieron el IHS más alto, con un valor de 1.28 ± 0.41 y la dieta D-10% HCC fue la que presentó el menor IHS con 0.95 ± 0.27 .

Los presentes resultados coinciden con lo reportado para *Totoaba macdonaldi* (Espinosa *et al.*, 2015), que presentaron valores de 1.23 a 1.37 cuando fueron alimentados con HCC. Sin embargo, los índices publicados por Lu y Ku (2013) para *Rachycentron canadum* alimentada con subproductos de camarón fueron mayores, con valores que oscilaron entre 4.9 a 10.3. Donde el mayor valor de IHS fue en las dietas con 20 y 25% de sustitución de HCC. La diferencia puede atribuirse a las características de la especie y al aumento de quitina digerible, ya que un aumento de carbohidratos eleva el contenido de glucógeno, que se traduce en hígados más grandes con respecto al tamaño del pez.

7.3.3. Índice viscerosomático (IVS)

El peso de las vísceras, respecto al peso total del cuerpo del pez, fue mayor en los peces alimentados con la D-CTRL, con un valor de IVS de 9.41 ± 1.89 , sin embargo estas no fueron estadísticamente diferentes ($P>0.05$) de las dietas con menor índice (D-10% HCC), con la cual se obtuvo un IVS de 7.99 ± 1.28 , seguida por la D-20% HCC (8.38 ± 1.34) y la D-30% HCC (8.70 ± 1.53).

Un estudio en *Pagrus pagrus* de aproximadamente 205 g, con inclusiones de 0%, 10 y hasta 20% de *P. cuvieri* en su dieta, registró valores de 4.98 a 5.99 para el IVS, lo que coincide con la tendencia del presente trabajo. El tratamiento control registró el mayor índice viscerosomático (García-Romero, *et al.*, 2014).

7.3.4. Relación de grasa intraperitoneal (RGI)

La relación de grasa intraperitoneal de los peces no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, la RGI mayor fue para los que consumieron la D-CTRL (5.65 ± 1.42), seguida por la dieta D-30% HCC (5.41 ± 1.63) y la D-20% HCC (5.28 ± 1.16), mientras que los organismos que presentaron la menor RGI (5.05 ± 1.42), consumieron la D-10% HCC, lo que indica que tiene menor contenido de grasa visceral.

Un estudio realizado en pargo flamenco donde se utilizó una dieta de 45% de proteína, 9% de lípidos y 18% de carbohidratos, a base de harina de pescado presentó un valor de RGI de 1.86 ± 0.40 , que es significativamente menor a los resultados de este experimento, esto posiblemente a que en las dietas elaboradas se utilizó un porcentaje de lípidos mayor (15%) para favorecer la pigmentación (Benítez-Hernández, 2013).

7.4. Actividad quitinolítica en intestinos y estómagos del pargo flamenco alimentado con HCC

En este apartado se muestran los resultados de la actividad quitinolítica en los intestinos y los estómagos de los peces con las distintas inclusiones de HCC, y se comparan los tratamientos con los organismos a los que se les suministro antibiótico, para conocer la actividad enzimática endógena, sin la intervención de bacterias que puedan degradar la quitina.

La actividad quitinolítica fue reportada en μg de NAG/gramo de muestra húmeda/hora. En la Figura 14, se muestran los resultados obtenidos en intestinos, en los peces expuestos a los distintos tratamientos con antibiótico y sin antibiótico.

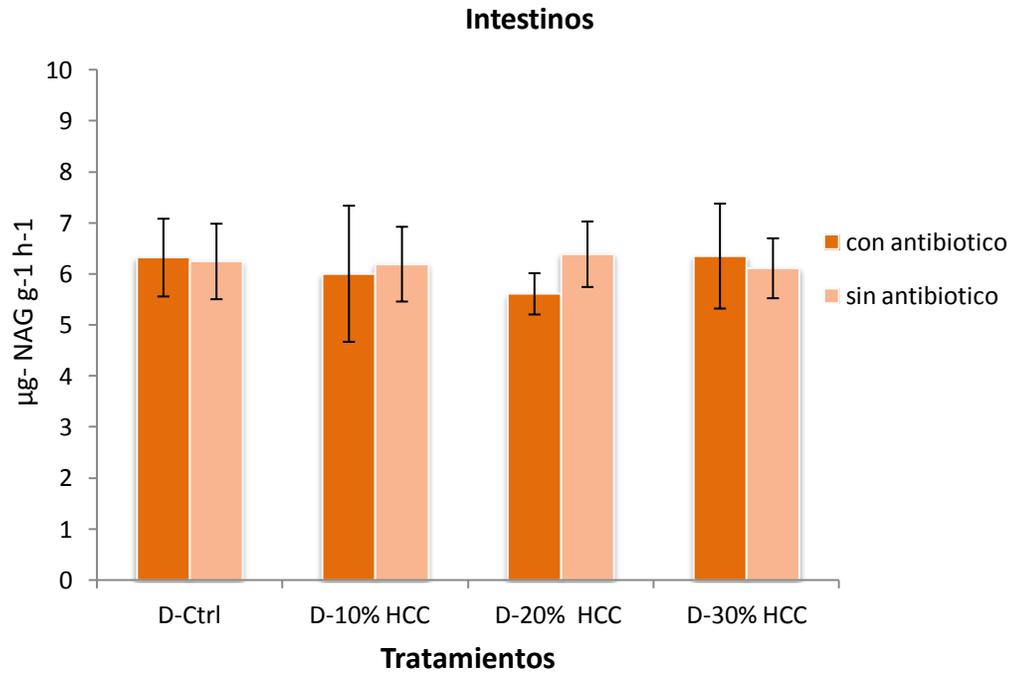


Figura 14. Actividad quitinolítica en intestinos de pargo flamenco alimentado con HCC.

Los resultados obtenidos para intestino no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos medicados y los no medicados. En relación a las diferentes inclusiones, tampoco presentaron diferencias significativas, se obtuvieron valores promedio de 5.61 a 6.39 de $\mu\text{g-NAG g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

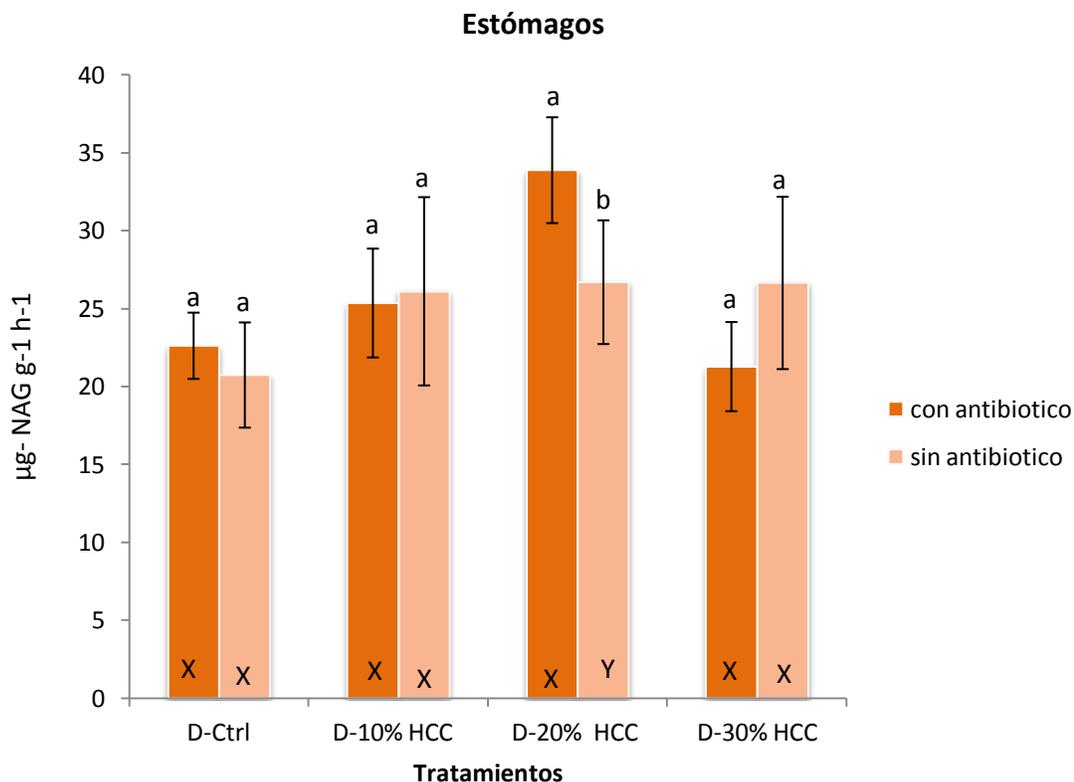


Figura 15. Actividad quitinolítica en estómagos de pargo flamenco alimentado con HCC. Las barras representan la actividad quitinolítica de estómagos promedio por tratamiento \pm error estándar de $n=6$. Promedios con diferentes letras sobre la barra mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre la dieta con antibiótico y la dieta sin antibiótico. Promedios con diferentes letras dentro de la barra mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos.

Por otro lado, los resultados obtenidos para las muestras de estómagos presentaron actividades mayores que las obtenidas en intestinos de los peces en los distintos tratamientos, con valores promedios de 20.75 a 33.89, donde la D-HCC 20% presentó diferencias significativas respecto a los peces tratados con antibiótico y los peces a los que no se les fue suministrado antibiótico, presentando mayor actividad quitinolítica los peces tratados, mientras que el resto de los tratamientos no mostraron diferencias. En la comparación de las dietas sin antibiótico no se observaron diferencias, mientras que en las dietas con antibiótico, nuevamente la D-HCC 20% difirió con la D-HCC 10%, D-HCC 30% y D-CTRL al presentar diferencias significativas (Figura 15).

Se observa menor actividad quitinolítica en intestinos, respecto a la presentada en estómagos, esto concuerda con lo reportado por Gutowska *et al.* (2004), en un análisis realizado a 13 especies diferentes de peces marinos, donde muestran que la actividad quitinolítica en los estómagos es 2 o 3 veces mayor que en los intestinos, una situación que se repitió en la mayoría de las especies muestreadas. La actividad quitinolítica registrada para los peces del presente estudio fue baja comparada con lo reportado, sin embargo coincide con la actividad promedio más baja equivalente a 38 unidades reportada en el estudio de las trece especies muestreadas. Gutowska *et al.* (2004) explicaron que este resultado, es debido al corto intestino del pez, lo que conlleva a un breve tiempo de digestión, el cual puede no ser lo suficiente para digerir y absorber de manera eficiente la quitina, en el caso de los peces en cautiverio donde su alimentación es en episodios regulares y *ad libitum* la digestión se vuelve más rápida.

Lu y Ku (2013), utilizaron HCC en inclusiones de 0, 10, 20 y 25 % en cobia, registrando mayor actividad en ciegos pilóricos, respecto a estómago e intestino, a diferencia de lo reportado en totoaba, en algunas especies de aguas profundas y lo obtenido en este estudio, donde el órgano que presentó los valores más altos fue el estómago. Además, los tratamientos presentaron actividades muy similares, sin observar tendencias relacionadas con las inclusiones de la HCC.

En cuanto a la adición de antibiótico, no presentó diferencias significativas en la actividad quitinolítica en los intestinos y estómagos lo cual coincide con lo reportado por Fines y Holt (2010) en juveniles de cobia alimentados con subproductos de camarón, que al suministrar antibiótico a una de las dietas no obtuvo diferencias significativas entre el tratamiento medicado y el no medicado. Esto sugiere una producción endógena sustancial y que la actividad, en su caso, a partir de bacterias quitinolíticas no es significativa.

7.5. Análisis bacteriológico en intestino de pargo flamenco alimentado con HCC.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del análisis cuantitativo de la flora intestinal del pargo flamenco, donde una fracción del intestino fue sembrada en agar TCBS (medio selectivo para *Vibrio*), agar marino y agar TSA (medios no selectivos) y por último en agar quitina (medio selectivo para bacterias quitinolíticas). Dicha medición se realizó en los distintos tratamientos con y sin antibiótico bactrim.

Tabla 5. Análisis cuantitativo de la flora intestinal del pargo flamenco alimentado con HCC con y sin antibiótico en distintos medios de cultivo.

	TCBS s/a	TCBS c/a	TSA s/a	TSA c/a	A. Marino s/a	A. Marino c/a
D-CTRL	5.00×10^3	0	18.81×10^5	9.5×10^2	28.24×10^5	0
D-10%HCC	0	0	21.06×10^3	6.4×10^2	17.37×10^4	15.35×10^2
D-20%HCC	4.33×10^4	0	34.77×10^3	0	22.34×10^4	23.88×10^2
D-30%HCC	0	0	13.73×10^5	3×10^2	78.49×10^4	3.03×10^2

Los valores son la media de n=3. Simbología: TCBS= medio tiosulfato citrato bilis; TSA= agar tripticaseína de soya; A. Marino= agar marino; s/a= sin antibiótico; c/a=con antibiótico.

El agar TCBS, selectivo para las distintas especies de vibrios, obtuvo un nulo crecimiento en la D-10% HCC y D-30% HCC, mientras que la D-CTRL obtuvo 5.00×10^3 UFC/g y 4.33×10^4 en la D-20%HCC, en las muestras con antibiótico de este medio no se presentó crecimiento bacteriano en ningún tratamiento.

En el medio TSA (agar no selectivo), las poblaciones bacterianas variaron de 21.06×10^3 a 18.81×10^5 UFC/g en los distintos tratamientos, en cuanto a los peces cuyos tratamientos fueron medicados se registró un número menor de bacterias en un rango de 0 a 24×10^2 UFC/g.

Por último el agar marino presentó un crecimiento que osciló entre 28.24×10^5 y 17.37×10^4 UFC/g en los tratamientos sin antibiótico, mientras que los organismos tratados sus poblaciones disminuyeron considerablemente incluso en su totalidad erradicadas (D-CTRL), los valores se encontraron de 0 a 23.88×10^2 .

En los antecedentes se demuestra que el número de bacterias intestinales viables fluctúan entre 10^4 y 10^7 UFC/g de contenido intestinal en salmónidos. Lo que indica que los datos obtenidos se encuentran dentro del rango esperado. La presencia de bacterias en el intestino puede variar por las condiciones presentes en el ambiente, ya sea la salinidad del agua, la temperatura, el número de bacterias presentes en el agua entre otras variables. Además otros autores han establecido que el número de bacterias puede ser afectado por condiciones intrínsecas del pez como la dieta, el estado del desarrollo, madurez, entre otras (Cahill, 1990; Ringo *et al.*, 1995).

En el agar quitina no se observó crecimiento de bacterias quitinolítica, estas fueron medidas en condiciones aerobias y anaerobias, en un periodo de 13 días, en los intestinos de peces alimentados con tratamientos medicados y no medicados con antibiótico, pero en ningún caso se obtuvo crecimiento de las mismas identificadas principalmente por un halo de inhibición alrededor de la colonia.

Esto concuerda con lo descrito por Fines y Holt (2010), que en juveniles de cobia realizaron un análisis cuantitativo de las bacterias quitinolíticas, en ambiente aerobio y anaerobio registrando solamente 3 colonias en el medio anaerobio, mientras que a otro tratamiento se le adicionó antibiótico por lo que el crecimiento fue nulo después de 13 días, además la presencia de estas bacterias no aumentó significativamente la actividad quitinolítica.

7.6. Coloración de la piel del pargo flamenco (*L. guttatus*), rojo (a*), amarillo (b*) y Luminosidad (L*)

La coloración en la piel del pargo flamenco, está asociada directamente con su aceptación en el mercado, ya que los especímenes silvestres exhiben un color rojizo, a diferencia de los peces producidos en cautiverio, desde que nacen presentan un color gris claro que bien puede tender a rosado, sin embargo, cuando son confinados en jaulas flotantes para su engorda, el color se torna oscuro, lo que provoca el rechazo por parte del consumidor, en consecuencia su valor en el mercado disminuye.

Los valores obtenidos en la coloración de la piel del pargo flamenco, evaluados en el espacio de color L*a*b* (también llamado CIELAB). Donde +a* representa los tonos rojos, +b* tonos amarillos y L* la luminosidad. Las mediciones fueron realizadas en el flanco izquierdo del cuerpo de los peces de los distintos tratamientos, en cinco zonas distintas: cabeza (zona I), vientre (zona II), medio (zona III), dorso (zona IV) y aleta caudal (zona V), dichas mediciones fueron comparadas con el pargo silvestre.

7.6.1. Coloración de la cabeza (zona I)

En la Tabla 6, se observan los valores de coloración para la zona I, donde se observa que el valor de a* al inicio del experimento fue de 0.79 ± 0.97 que se encuentra en colores grises, en un tono apagado, el cual se incrementó al final del estudio en las dietas con inclusión de 20% y 30% de HCC. Al concluir las 12 semanas de estudio el valor de a* fue incrementando hacia tonos más rojizos, siendo la D-20% HCC (3.22 ± 1.55) la que alcanzó el valor más alto, seguida por la dieta D-30% HCC (3.05 ± 1.61), la más baja fue la dieta D-CTRL con un valor de 1.67 ± 1.33 , sin embargo los tratamientos no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$), pero si respecto a los peces silvestres.

Tabla 6. Parámetros de la coloración de la cabeza (zona I) del pargo flamenco (*L. guttatus*) alimentado con HCC en un periodo de 12 semanas.

Tiempo (Semanas)	DIETAS	a*	b*	L*
0		0.79±0.97	8.71±1.32	67.58±3.74
6	D-CTRL	-1.04±1.09 ^a	7.08±1.42 ^a	79.23±5.27 ^a
	D-10%HCC	-0.49±0.63 ^a	6.59±1.34 ^a	76.62±3.38 ^a
	D-20%HCC	0.02±0.93 ^a	7.78±1.55 ^a	75.38±5.53 ^a
	D-30%HCC	-0.67±1.06 ^a	7.26±1.85 ^a	79.52±2.72 ^a
12	D-CTRL	1.67 ±1.33 ^a	10.12±2.47 ^a	75.32±4.49 ^a
	D-10%HCC	2.57±0.78 ^a	9.27±2.28 ^a	75.04±4.88 ^a
	D-20%HCC	3.22±1.55 ^a	10.70±1.56 ^a	72.89±4.41 ^a
	D-30%HCC	3.05±1.61 ^a	10.52±2.36 ^a	77.43±2.66 ^a
	Silvestre	10.05±3.67 ^b	10.72±2.63 ^a	74.43±3.48 ^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=9. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas (P>0.05). Simbología: L representa la luminosidad (0 = negro a 100 = blanco); a* representa del verde (-60) al rojo (+60); b* representa del azul (-60) al amarillo (+60).

En cuanto al parámetro b* inició en un valor de 8.71±1.32, con colores amarillos apagados, los tratamientos no presentaron diferencias significativas (P<0.05) en los tiempos de muestreos (sexta y doceava semana), la dieta que alcanzó el valor más alto al final del bioensayo fue la D-20% HCC, seguida de la D-30% HCC, con valores de 10.70±1.56 y 10.52±2.36 respectivamente. Sin embargo, cabe señalar que se alcanzó el tono amarillo, más claro que el inicial igual al tono que presenta el pargo silvestre.

Los valores de luminosidad no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, incluso con respecto al pargo silvestre, se registraron tonalidades claras. L* al inicio fue de 67.58±3.74 y se observó un aumento del mismo igualando al pez silvestre, orientado a tonalidades aún más claras pero no se marcó una tendencia en los distintos tratamientos.

La capacidad de la astaxantina natural a partir de cabezas de camarón, para otorgar coloración rojiza a la cabeza del pez (zona I), concuerda con lo

observado por Osuna-Osuna (2014), que trabajó con la misma especie cultivada en condiciones de jaulas flotantes y alimentados con diferentes extractos en la dieta. El autor, usó una dieta con 75 mg/kg de carotenoides a partir del extracto de cabezas de camarón y otra dieta con extracto de la flor de cempasúchil, por un periodo de 90 días. Los valores de a^* , b^* y L^* se elevaron, respecto a las mediciones iniciales y a la dieta sin carotenoides, un similar efecto fue obtenido en el presente estudio. Aunque cabe mencionar, que los valores de las variables de coloración a^* y b^* obtenidas por este autor fueron mayores; la diferencia puede ser atribuida a la cantidad significativamente menor de carotenoides presentes en las dietas evaluadas en el este estudio. La dieta D-30% HCC con mayor inclusión de material, presentó una concentración de 48.45 ± 1.15 mg/kg de carotenoides.

7.6.2. Coloración del vientre (Zona II)

Los resultados obtenidos en la zona II (vientre) se muestran en la Tabla 7, donde los valores de a^* iniciaron dentro de las tonalidades grises (-3.23 ± 0.22), en la semana 6 se registró un aumento en dicho valor, sin presentar diferencias entre las dietas, al término del bioensayo los peces alimentados con la D-20% HCC (-1.64 ± 0.87), presentaron el mayor valor de a^* , precedidos por la D-30% HCC (-1.67 ± 0.71), mientras que los pargos silvestres mostraron colores naranjas en tonos claros, presentando diferencias significativas respecto a los grupos alimentados con los tratamientos ($P < 0.05$).

Los valores de b^* de la zona II arrojados en esta investigación en el primer muestreo fueron de 10.73 ± 2.07 , presentando un color amarillento y apagado, los cuales aumentaron a la semana 6 donde las dietas con inclusiones de HCC obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto a la D-CTRL, y terminaron con coloraciones amarillas opacas con un pequeño aumento al final del experimento, la dieta que presentó el mayor valor fue la D-20% HCC con 19.36 ± 3.13 , seguida por la D-30% HCC con 16.50 ± 3.51 , mientras que el menor

valor lo obtuvo la D-CTRL con 14.52 ± 3.24 , la cual no presentó diferencias significativas con el resto de los tratamientos ni con el pargo silvestre.

Tabla 7. Parámetros de la coloración del vientre (zona II) del pargo flamenco (*L. guttatus*) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.

TIEMPO (Semanas)	DIETAS	a*	b*	L*
0		-3.23 ± 0.22	10.73 ± 2.07	84.05 ± 1.06
6	D-CTRL	-3.24 ± 0.38^a	9.10 ± 2.45^b	85.75 ± 1.39^a
	D-10%HCC	-3.20 ± 0.41^a	13.29 ± 2.05^a	84.83 ± 1.66^a
	D-20%HCC	-03.23 ± 0.30^a	14.67 ± 2.15^a	83.61 ± 1.75^a
	D-30%HCC	-2.93 ± 0.33^a	12.57 ± 3.67^a	84.39 ± 3.01^a
12	D-CTRL	-1.97 ± 0.79^b	14.52 ± 3.24^a	85.73 ± 1.60^a
	D-10%HCC	-2.01 ± 0.79^b	15.98 ± 3.19^a	84.28 ± 2.52^a
	D-20%HCC	-1.64 ± 0.87^b	19.36 ± 3.13^a	84.43 ± 2.20^a
	D-30%HCC	-1.67 ± 0.71^b	16.50 ± 3.51^a	85.98 ± 1.82^a
	Silvestre	4.12 ± 1.04^a	17.21 ± 4.77^a	88.05 ± 0.95^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=9. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas ($P > 0.05$). Simbología: L representa la luminosidad (0 = negro a 100 = blanco); a* representa del verde (-60) al rojo (+60); b* representa del azul (-60) al amarillo (+60).

En cuanto a los datos de luminosidad, no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos, manteniéndose sin cambios desde el inicio del bioensayo, hasta concluir el mismo, con tonos claros que oscilaron en valores de 83.61 ± 1.75 y 85.98 ± 1.82 , sin presentar diferencias ($P < 0.05$) con el pargo silvestre (Tabla 4).

Booth *et al.* (2004), encontraron que en pargo australiano (*Pagrus auratus*) inclusiones de astaxantina entre 36 y 72 mg/kg, ya sea en forma libre (Carophyll Pink) o esterificada (Naturoset), son adecuadas para proporcionar la coloración requerida en la zona del medio por estos peces. La astaxantina en forma

esterificada, es como se presenta en los subproductos de camarón por lo que se le atribuyen propiedades pigmentantes.

De igual forma Osuna-Osuna (2014), utilizó astaxantina esterificada extraída de las cabezas de camarón (70 mg/kg), lo que permitió obtener una coloración rojiza aceptable en esta área del pez, incluso igual a la coloración de astaxantina extraída de fuentes vegetales (flor de cempasúchil) o artificial (carophyll pink®), en un periodo de 90 días.

7.6.3. Coloración del medio (Zona III)

La Tabla 8 muestra los valores de los parámetros de color a^* , b^* y L^* , de la zona III del pargo flamenco alimentado con HCC.

Tabla 8. Parámetros de la coloración del medio (zona III) del pargo flamenco (*L. guttatus*) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.

TIEMPO (Semanas)	DIETAS	a^*	b^*	L^*
0		-0.82±0.67	8.05±1.22	64.74±4.25
6	D-CTRL	-1.69±0.99 ^b	6.69±0.83 ^b	76.73±3.17 ^a
	D-10%HCC	-1.19±0.53 ^{ab}	7.79±1.06 ^{ab}	73.71±4.44 ^a
	D-20%HCC	-0.55±0.86 ^{ab}	8.28±0.90 ^a	71.18±6.48 ^a
	D-30%HCC	-0.12±1.16 ^a	8.42±1.67 ^a	73.18±4.91 ^a
12	D-CTRL	-0.05±1.23 ^b	8.09±2.47 ^b	72.39±2.46 ^a
	D-10%HCC	0.35±0.45 ^b	8.16±1.97 ^{ab}	71.02±1.97 ^a
	D-20%HCC	0.59±0.97 ^b	8.52±1.48 ^{ab}	70.40±1.49 ^a
	D-30%HCC	0.85±1.39 ^b	9.52±1.43 ^{ab}	72.49±1.52 ^a
	Silvestre	9.18±3.47 ^a	10.03±3.22 ^a	74.74±1.58 ^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=9. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas ($P>0.05$). Simbología: L representa la luminosidad (0 = negro a 100 = blanco); a^* representa del verde (-60) al rojo (+60); b^* representa del azul (-60) al amarillo (+60).

Los valores de a^* , mostrados en la Tabla 8 iniciaron en -0.82±0.67 (coloración gris), en la sexta semana estos valores disminuyeron para la D-CTRL y D-10% HCC, mientras que las D-20% HCC y D-30% HCC aumentaron, siendo esta

última significativamente mayor a la control. En la doceava semana la D-30% HCC presentó el valor más alto con 0.85 ± 1.39 , orientado hacia coloraciones rojizas apagadas, mientras que la D-CTRL fue la más baja con -0.05 ± 1.23 , aunque no presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre ellas. Sin embargo, cuando se contrastaron con los peces silvestres, todos los tratamientos fueron diferentes significativamente ($P < 0.05$), lo que indica que no alcanzaron la tonalidad rojiza presentada en la zona media de los pargos del medio natural.

Por otro parte, el parámetro b^* , en el primer muestro obtuvo 8.05 ± 1.22 en la zona III (tonalidades amarillas opacas), en el segundo muestreo la D-20% HCC (8.28 ± 0.90) y la D-30% HCC (8.42 ± 1.67), valores que mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con la dieta D-CTRL, que presentó el valor más bajo (6.69 ± 0.83), hacia el último muestreo los especímenes con inclusiones de HCC en su dieta, no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los peces silvestres igualando su tonalidad amarilla; mientras que la D-CTRL si presentó. La luminosidad aumentó para la sexta semana, manteniéndose hasta la última medición, sin mostrar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos y el pargo silvestre.

Kalinowski *et al.* (2005), probaron diferentes periodos de suplementación de harina de cascaras de camarón, en un periodo de 180 días, donde los tratamientos eran 0, 60, 120 y 180 días alimentados con inclusiones de 16% de harina de cascaras de camarón antes del término del periodo de experimentación, obteniendo mejores resultados, con los especímenes alimentados en los periodos de 120 y 180 días, coincidiendo este estudio con los resultados obtenidos para esta zona el periodo de 60 días, por lo que los especímenes requieren más tiempo (de 120 a 180 días) para lograr una pigmentación adecuada con inclusiones de HCC. En cuanto a L^* , se obtuvo valores más bajos que los obtenidos en este estudio.

7.6.4. Coloración del dorso (Zona IV)

Como se aprecia en la Tabla 9, en la zona IV el valor de a^* en el día 0 fue de 0.16 ± 0.48 ubicado en colores grisáceos, el cual fue aumentando hacia colores rojizos tenues, en la sexta semana los tratamientos no presentaron diferencias ($P < 0.05$) y en el último muestreo la dieta D-30% HCC obtuvo un valor de 1.38 ± 1.31 siendo la más alta, con colores rojizos apagados, seguida por la dieta D-20% HCC (1.34 ± 0.79) y el valor mínimo lo mostró la dieta control (0.29 ± 0.86), no se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, pero si respecto a los peces silvestres.

Tabla 9. Parámetros de la coloración del dorso (zona IV) del pargo flamenco (*L. guttatus*) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.

TIEMPO (Semanas)	DIETAS	a^*	b^*	L^*
0		0.16 ± 0.48	-0.30 ± 0.58	30.84 ± 2.54^a
6	D-Ctrl	0.28 ± 1.08^a	3.885 ± 0.14^a	46.277 ± 5.05^a
	D-10%HCC	0.64 ± 0.60^a	4.055 ± 0.23^a	43.423 ± 3.93^a
	D-20%HCC	1.03 ± 0.54^a	4.570 ± 0.42^a	40.499 ± 6.69^a
	D-30%HCC	0.94 ± 0.77^a	5.070 ± 0.35^a	44.764 ± 2.67^a
12	D-CTRL	0.29 ± 0.86^b	3.55 ± 0.97^b	42.26 ± 5.59^a
	D-10%HCC	0.84 ± 0.82^b	4.79 ± 1.71^b	44.29 ± 5.96^a
	D-20%HCC	1.34 ± 0.79^b	4.87 ± 1.25^b	37.51 ± 4.63^a
	D-30%HCC	1.38 ± 1.31^b	4.63 ± 1.15^b	42.35 ± 3.89^a
	Silvestres	5.55 ± 1.83^a	6.33 ± 1.88^a	40.68 ± 2.87^a

Los valores son la media y desviación estándar de $n=9$. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas ($P > 0.05$). Simbología: L representa la luminosidad (0 = negro a 100 = blanco); a^* representa del verde (-60) al rojo (+60); b^* representa del azul (-60) al amarillo (+60).

Mientras que el valor b^* se mantuvo en tonalidades amarillas, pero más bajas que el resto de las zonas muestreadas, a la mitad del experimento se registró un aumento donde la D-30% HCC obtuvo el mayor valor de este parámetro (5.070 ± 0.35), seguida de la dieta D-20% HCC (4.570 ± 0.42) sin presentar diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos ($P < 0.05$). En

tanto, la última medición la D-20% HCC fue la más alta, seguida por la D-30% HCC mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto a los peces silvestres.

En cuanto a luminosidad presentó un aumento desde el día cero hasta la sexta semana, manteniéndose hasta el final del bioensayo, pero no presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos ni los peces silvestres. Esta zona obtuvo los valores más bajos de luminosidad, esto se atribuye a que es la parte del pez más expuesta a los rayos solares, causando una producción excesiva de melanina y por ende su obscurecimiento.

Kalinowski *et al.* (2005), realizaron inclusiones de harina de cascara de camarón 8 y 16%, además de inclusiones de cataxantina (40 y 100 mg/kg), en dietas de pargo rojo, en un periodo de 105 días; de las cuales solo la inclusión de 16% (40 mg/kg de astaxantina) de harina de cascara de camarón, que se encuentra en forma esterificada, pudo otorgar el color rojo característico, lo que sugiere que se presenta una mejor utilización de la astaxantina esterificada para esta especie. En cuanto a los valores de luminosidad también se mostraron bajos en el área del dorso, respecto a las mediciones de las otras áreas en este estudio. En este estudio la zona dorsal también mostró coloraciones más bajas, debido al obscurecimiento de la piel en esa área.

7.6.5. Aleta caudal zona (V)

En la aleta caudal los valores de a^* iniciaron en 1.49 ± 0.75 (rojo apagado), al concluir la sexta semana los valores aumentaron, la D-20% HCC presentó el valor más alto con 8.36 ± 4.04 , orientado hacia colores rojos claros, sin presentar diferencias significativas respecto a los demás tratamientos; en la semana 12 los valores no presentaron diferencias significativas entre las dietas ($P < 0.05$), pero si presentaron diferencias con los peces silvestres.

El parámetro b^* inicio en 6.59 ± 1.84 , el cual se incrementó en la sexta y en la doceava semana, el valor más alto corresponde a la D-30% HCC con

14.32±2.37, y el valor más bajo fue la D-CTRL (13.01±3.74). Sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05), ni con los peces silvestres.

Tabla 10. Parámetros de la coloración de la aleta caudal (zona V) del pargo flamenco (*L. guttatus*) alimentado con dietas con inclusiones de HCC en un periodo de 12 semanas.

TIEMPO (Semanas)	DIETAS	a*	b*	L*
0		1.49±0.75	6.59±1.84	53.61±3.72
6	D-CTRL	6.28±4.29 ^a	12.49±1.43 ^a	60.833±10.265 ^a
	D-10%HCC	7.44±3.40 ^a	11.99±2.37 ^a	60.143±6.412 ^a
	D-20%HCC	8.36±4.04 ^a	11.73±2.093 ^a	54.557±8.861 ^a
	D-30%HCC	6.22±3.44 ^a	11.497±2.557 ^a	61.369±7.912 ^a
12	D-CTRL	7.01±3.87 ^a	13.01±3.74 ^a	55.26±3.37 ^a
	D-10%HCC	9.61±2.39 ^a	14.16±2.75 ^a	59.96±3.41 ^a
	D-20%HCC	9.98±1.89 ^a	13.26±1.98 ^a	53.73±2.54 ^a
	D-30%HCC	9.96±2.75 ^a	14.32±2.37 ^a	63.02±3.47 ^a
	Silvestre	21.89±4.44 ^b	15.55±3.39 ^a	58.75±4.29 ^a

Los valores son la media y desviación estándar de n=9. Superíndices diferentes para cada parámetro denotan diferencias significativas (P>0.05). Simbología: L representa la luminosidad (0 = negro a 100 = blanco); a* representa del verde (-60) al rojo (+60); b* representa del azul (-60) al amarillo (+60).

La luminosidad en el día 0 se encontró en 53.61±3.72, aumentando en las semanas subsecuentes el valor máximo se presentó en la dieta D-30% HCC (63.02±3.47), pero no presentó diferencias significativas respecto los demás tratamientos y los peces silvestre.

En esta zona Kalinowsky *et al.* (2005), reportaron coloraciones más rojizas para los peces alimentados con cáscaras de camarón, que las dietas con cataxantina, aunque la luminosidad no presentó cambios a lo largo del experimento. Mientras que Osuna-Osuna (2014), también observó un aumento

en los valores de a^* (rojos) y de b^* (amarillos), con una concentración de 70 mg/kg de carotenoides presente en el extracto de cabezas de camarón y la luminosidad fue en aumento hasta el final del experimento.

En general, la coloración de la Zona I presentó un aumento mayor en el valor de a^* (tonos rojos) y de b^* (tonos amarillos) en los tratamientos D-20% HCC y D-30% HCC. En cuanto a la luminosidad (L^*) permaneció similar en todos los tratamientos sin observarse ninguna tendencia, igualando a la presentada en el pargo silvestre, esta situación se repitió para la Zona II, Zona III, Zona IV y Zona V. Se sugiere un mayor tiempo de suplementación (de 120 a 180 días) con dichos tratamientos como lo propone Kalinowski *et al.* (2007), para obtener mejores resultados. Otro factor que influye en la coloración es el estrés del organismo, provocado por la manipulación, los cambios de temperatura o enfermedades. Tales condiciones, pueden dar una pobre coloración en la piel del pargo flamenco durante la cosecha (Bjerkeng, 2000).

VIII. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que la adición de HCC en niveles de 10%, 20% y 30% en sustitución de la harina de pescado, en dietas para el pargo flamenco por un periodo de 10 semanas, tuvo un efecto favorable en el rendimiento productivo y eficiencia proteica, además de una buena aceptación del alimento, siendo la dieta D-20% HCC la optima al presentar los mejores resultados en cuanto a crecimiento en los especímenes de pargo flamenco.

Se presentó una mayor actividad quitinolítica en el estómago del pargo flamenco comparado con los intestinos, lo que indica su capacidad endógena para degradar y asimilar la quitina encontrada en la HCC en inclusiones hasta del 30%, sin afectar el crecimiento del organismo.

La inclusión de la HCC como sustituto de la harina de pescado, no afectó la microbiota del pez, al mantenerse en los rangos normales de UFC reportados. No se encontraron bacterias quitinolíticas, por ende, la capacidad de degradar la quitina en el pargo flamenco se atribuye principalmente a la acción de enzimas digestivas en el organismo.

La pigmentación se vio favorecida por las inclusiones de HCC de 20% y 30%, al aumentar las tonalidades rojas (a*) y amarillas (b*) en un periodo de 12 semanas, sin embargo es recomendable que el suministro de estas dietas se realice por un periodo mayor para obtener mejores resultados.

El uso de HCC en dietas como sustituto parcial de la harina de pescado resulta favorable en pargo flamenco, ya que beneficia el crecimiento, tiene la capacidad de degradar y asimilar quitina en inclusiones hasta del 30% sin afectaciones, además posee una concentración de 42.12 y 48.46 mg/kg carotenoides (dietas D-20% HCC y D-30% HCC), que proveen la pigmentación necesaria para su aceptación en el mercado, evitando el uso de pigmentos artificiales que elevan los costos de producción.

IX. RECOMENDACIONES

Se recomienda investigar el periodo necesario de suministro de dietas con inclusiones de HCC, con el cual se obtenga la coloración similar a la del pargo silvestre.

Evaluar los coeficientes de digestibilidad aparente de los nutrientes en juveniles de pargo flamenco alimentados con dietas con diferentes inclusiones de harina de cabezas de camarón.

Realizar el análisis de actividad quitinolítica y bacteriológico en especímenes silvestres de pargo flamenco, para realizar una comparación con los peces en cautiverio alimentados con HCC.

Evaluar las propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de la HCC en pargo flamenco.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, D., Rincón, D., Poleo, G. 2014. Índices de rendimiento corporal en moroco *Piractus brachypomus* cultivado en sistemas biofloc. *Zootecnia Trop.* 32 (2): 119-130 p.
- Abdo de la Parra, I., Rodríguez-Ibarra, E.G., Hernández, C., Hernández-Mendoza, K., González-Rodríguez, B., Martínez-Rodríguez, I. y García-Ortega, A. 2010. Effect of dietary and lipid level on growth performance and survival of juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía.* 45(3):433-439 p.
- Al-Harbi, A., Uddin, N. 2005. Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture.* 250: 556-572 p.
- Allen GR. 1985. Snappers of the world an annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. *FAO Fisheries Synopsis.* 125 (6): 1-208 p.
- Andrade, R., Chavez, B., Naar, V. 2007. Evaluación de las etapas de cocción y secado en la obtención de harina de cabezas de camarón de cultivo (*Penaeus Sp*). *Redalyc.* 74 (153): 181-186 p.
- AOAC., 1984. Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 14 th ed. The association: Arlington. Washington. 1141 pp.
- Armenta, R., Guerrero, I., Huerta, S. 2002. Extracción de carotenoides a partir de residuos de camarón fermentados. *Rev. Mex. Ing, Química.* 1 (2): 49-55 p.
- Belandria J., Morillo N. 2013. Perfil de aminoácidos y contenido de pigmentos en las harinas de residuos de camarón. *Zootecnia Trop.* 31(1): 24-34 p.
- Benítez-Hernández, A. 2013. Evaluación de diferentes proporciones de proteína y carbohidratos sobre la respuesta fisiológica y metabólica de juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1986). Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A. C. Mazatlán. 63 pp.
- Bjerkeng, B., 2000. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes - recent progress. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Mérida, Yucatán. 71-89 p.
- Booth, M. A., Warner-Smith, R. J., Allan, G. L., Glencross, B. D., 2004. Effects of dietary astaxanthin source and light manipulation on the skin colour of

Australian snapper *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider, 1801). *Aquaculture Research*. 35: 458-464 p.

Cahill, M., 1990. Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*. 19(1): 21-41 p.

Carranco-Jáuregui, M.E., Calvo-Carrillo, M.C., Perez-Gil, R., 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 61(3): 233-241p.

Castelló F. 1993. *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. Ediciones Universidad Barcelona. Primera edición. Barcelona. 735 pp.

Castro R., Alvarez A., Machado E., Mendoza M., Gomez R. y García P. 2011. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia sp.* Biomi-36706 usando quitina coloidal como sustrato. *Rev Soc Quim Peru*. 77 (2): 101 pp.

Cejas, J.R., Almansa, E., Tejera, N., Jerez, S., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2003. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. *Aquaculture*. 218: 457–469 p.

Cifuentes, R., Gonzalez, J., Montoya, G., Jara, A., Ortíz, N., Piedra, P., Habit, E. 2012. Relación longitud- peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *SciELO*. 76 (1). 101-110 p.

Ege, S. 1998. *Química orgánica: Estructura y reactividad, volumen II*. Editorial Reverté. Primera edición. 720 pp.

Escobar-Briones, L., Olvera-Novoa, M. A., Puerto-Castillo, C. 2006. Avances sobre la ecología microbiana del tracto digestivo de la tilapia y sus potenciales implicaciones. En: Puello-Cruz, A.C., García-Ortega, A. *Avances en nutrición acuícola VIII*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey. 107-129 p.

Espinosa-Chaurand, L.D., Silva-Loera, A., García-Esquivel, Z., Lopez-Acuña. 2015. Uso de harina de cabeza de camarón como reemplazo proteico de harina de pescado en dietas balanceadas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890). *Lat. Am. J. Aquat. Res*. 43(3): 457-465 p.

FAO. 2010. *El estado mundial de la pesca y acuicultura 2010*. Departamento de la pesca y Acuicultura de la FAO. Roma. 219 pp.

Fines, B., Holt, G. 2010. Chitinase and apparent digestibility of chitin in the digestive tract of juvenile cobia, *Rachycentrom canadum*. *Aquaculture*. 300: 34-39 p.

- Gabriel, J., Lindsay, M., Walton J., Adron, Thelma, C., Fletcher, C., Cho, Cowey. 1984. The growth of rainbow trout (*salmo gairdner*) given diets containing chitin and its relationship to chitinolytic enzymes and chitin digestibility. *Aquaculture*. 37: 315-334 p.
- Gajardo, S., Benites, J., López, J., Burgos, N., Caro, C., Rojas, M. 2011. Astaxantina: antioxidante de origen natural con varias aplicaciones en cosmética. *Biofarbo*. 19 (2): 6-12 p.
- García-Garibay, M., Quintero-Ramirez, R., Lopez-Mungía, A. 1993. *Biología alimentaria*. Ediciones Limusa. Primera edición. México. 636 pp.
- García-Romero, J., Ginés, R., Izquierdo, M., Haroun, R., Badilla, R., Robaina, L. 2014. Effect of dietary substitution of fish meal for marine crab and echinoderm meals on growth performance, ammonia excretion, skin colour, and flesh quality and oxidation of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*. 422: 239-248 p.
- González, J., Prado, P., Quiñonez, D. 2003. Técnicas de bacteriología, análisis en fresco, calidad de agua y buenas prácticas de manejo y bioseguridad en granjas de camarones. CESASIN. Mazatlan. 114 pp.
- Gómez, G., Fornaguera, J. 2004. *Bioquímica: la ciencia de la vida*. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia. Primera edición. Costa Rica. 340 pp.
- Guerrero, I. 2009. *Tecnología de productos de origen acuático*. Editorial Limusa. Primera edición. México. 532 pp.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. y Metailler, R. 2004. *Nutrición de peces y crustáceos*. Ediciones Mundi-Prensa. Tercera edición. Madrid. 473 pp.
- Gutowska, M., Drazen, J., Robinson, B., 2004. Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. 139: 351–358.
- Ibarra, L., Duncan, N. 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*. 272: 737-746 p.
- Jeuniaux, C., 1966. Chitinases. In: Neufeld, E.F., Ginsburg, V. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 8. Academic Press, New York. 644– 650 p.
- Karasov, W. H., Martínez del Rio, C. 2007. *Physiological ecology: how animals process energy, nutrients, and toxins*. Princeton University. Press. 1-46 p.
- Klages, F. 1968. *Tratado de química orgánica*. Editorial reverté. Segunda edición. España. 830 pp.
- Kalinowski, C. T., Robaina, L. E., Fernández-Palacios, H., Schuchardt D., Izquierdo, M. 2005. Effect of different carotenoid sources and their dietary levels

on red porgy (*Pagrus pagrus*) growth and skin colour. *Aquaculture*. 244: 223–231p.

Kalinowski, C.T., Izquierdo, M.S., Schuchardt, D., Robaina, L.E., 2007. Dietary supplementation time with shrimp shellmeal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration. *Aquaculture*. 272: 451–457p.

Lu, C. H., Ku, C. C. 2013. Effects shrimp waste meal on growth performance and chitinase activity in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*. 44: 1190-1195 p.

Meyers, S.P., Chen, H.M. 1982. Astaxanthin and its role in fish culture. En: Stickney, R. R., Meyers, S. P. *Warmwater Fish Culture Workshop*. World Mariculture Society Special. South Carolina. 153-165 p.

Meyers, S. P. .2000. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E. *Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*. La Paz, B.C.S. 473-491 p.

Moyano, F. 2006. Bioquímica digestiva en especies acuicultivadas: Aplicaciones en nutrición. *Avances en Nutrición Acuicola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* 15-17 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.

Osuna-Osuna, L. G. 2014. Efecto de los carotenoides de origen animal y vegetal sobre la coloración de la piel del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*). Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. A. C. Mazatlan. 66 pp.

Palomo, G., Arriaga, B. 1993. Atlas de ubicación de productos agropecuarios utilizables en la planificación y desarrollo de la acuicultura en México. FAO. Segunda edición. México. 582 pp.

Patil, R., Ghormade, V., Deshpande, M. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*. 26: 473-483 p.

Peña, E., Hernández, C., Alvarez-Gonzalez, C. A., Ibarra-Castro, L., Puello-Cruz, A., Hardy, R. 2015. Comparative characterization of protease activity in cultured spotted rose snapper juveniles (*Lutjanus guttatus*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43(4): 641-650 p.

Perez, J., Wick, G., Moyano, F., Alarcon, F. 2003. Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina; Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrer (*Odontesthes bonaeriensis*). *CIVA*. 442-454 p.

Ringo, E., Olsen, R.E. 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). J Appl Microbiol., 86: 22-28 p.

Ringo, E., Sperstad, S., Myklebust, R., Refstie, S. and Krogdahl, A. 2006. Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. Aquaculture. 261: 829-841p.

Rojas, M.J.R. 1997. Dieta del "pargo colorado" *Lutjanus colorado* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 45(3). 1173-1183 p.

Rojas-Herrera, A., Chiappa-Carrara, X. 2002. Hábitos alimenticios del flamenco *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en la costa de Guerrero, México. Redalyc. 28 (2): 133-147 p.

SAGARPA. 2013. Carta Nacional Acuícola. Diario Oficial. 1-68 p.

Shaikh, S., Deshpande, V. 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. World journal of microbiology and biotechnology. 9(4): 468-475 p.

Tacon, A. 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de capacitación. Tomo I. FAO-ITALIA. Proyecto Aquila II. Documento de campo No. 4. Brasil. 176 pp.

Tejera, N., Cejas, J.R., Rodríguez, C., Bjerkgeng, B., Jerez, S., Bolaños, A., Santamaría, F.J., Lorenzo, A., 2007. Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources. Aquaculture. 270: 218–230 p.

Toledo, P., Llenez, J. 2006. Estudio comparativo de los residuos de pescado ensilados por vías bioquímica y biológica. Revista AquaTIC. 25: 28-33 p.

Woyewoda, A., Shaw, S., Ke, P., Bums B. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. Can Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.1448, Fisheries and Oceans, Canada. 361pp.

Zar JH. 1996. Biostatistical analysis, 662 pp. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.