

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"DETERMINACION DEL PERFIL DE PROTEASAS Y DE LOS  
REQUERIMIENTOS PROTEICOS DEL CARACOL MANZANO  
(Pomacea sp.) COMO BASE PARA EL DESARROLLO DE UNA DIETA  
ARTIFICIAL PARA SU CULTIVO COMERCIAL"**

**T E S I S**

Como requisito parcial para obtener el  
Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en  
**Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

**P R E S E N T A**

**BIOL. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZALEZ**

TM

Z5320

FCB

1996

A3



1020115490

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**"DETERMINACION DEL PERFIL DE PROTEASAS Y DE LOS  
REQUERIMIENTOS PROTEICOS DEL CARACOL MANZANO  
(Pomacea sp.) COMO BASE PARA EL DESARROLLO DE UNA DIETA  
ARTIFICIAL PARA SU CULTIVO COMERCIAL"**

**T E S I S**

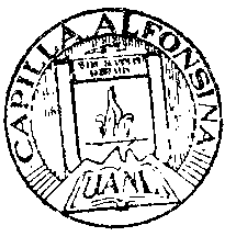
Como requisito parcial para obtener el  
Grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en  
**Recursos Alimenticios y Producción Acuícola**

**P R E S E N T A**

**BIOL. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZALEZ**

016-1843

TM  
E-3 0  
FCB  
1996  
A-



FONDO TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



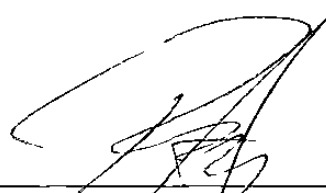
***"DETERMINACION DEL PERFIL DE PROTEASAS Y DE LOS REQUERIMIENTOS  
PROTEICOS DEL CARACOL MANZANO (*Pomacea sp.*) COMO BASE PARA EL  
DESARROLLO DE UNA DIETA ARTIFICIAL PARA SU CULTIVO COMERCIAL "***

**TESIS**

QUE PRESENTA

***BIOL. CARLOS JAVIER AGUILERA GONZALEZ***


PRESIDENTE:

  
DR. ROBERTO MENDOZA A.

SECRETARIO:

  
DR. DENIS RICQUE

VOCAL:

  
M.Sc. ARCADIO VALDES G.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Roberto Mendoza por el gran apoyo y dirección en la realización de este trabajo, por la confianza y paciencia que me ha brindado y especialmente por su amistad.

Al CONACyT por la Beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias así como el apoyo al Proyecto (4657-N9406) "Estudio de la Fisiología Digestiva del Caracol Manzano (*Pomacea sp.*) y Desarrollo de una Dieta para su Cultivo Comercial", del cual forma parte este estudio.

A la Dr. Julia Verde Star y a la División de Estudios de Postgrado de la F.C.B. por su interés y ayuda para el desarrollo de esta Tesis.

A todos los Maestros y Participantes en la Especialidad (RAPA) por su apoyo y compañerismo durante todo este tiempo.

Al Biol. Fco. Javier Alvarez por su ayuda y asesoría en la elaboración e interpretación de los cortes histológicos.

A todos mis familiares y amigos que siempre me han dado su apoyo.

A mi esposa por darme la oportunidad de hacer realidad este trabajo.

# INDICE

I	INTRODUCCION .....	1
II	OBJETIVOS.....	2
	1. Generales.....	2
	2. Específicos .....	2
III	ANTECEDENTES.....	3
	1 ASPECTOS TAXONOMICOS.....	3
	2. CULTIVO DE GASTEROPODOS.....	4
	2.1 Importancia de los gasterópodos en acuicultura.....	4
	2.2 Cultivo de caracol manzano.....	4
	2.3 Otros estudios con el caracol manzano.....	7
	3.NUTRICION. ....	9
	3.1 Estudios de nutrición en gasterópodos.....	9
	3.2 Dietas para caracol manzano.....	9
	3.3 Aparato digestivo del caracol manzano.....	14
	3.4 Hábitos alimenticios .....	14
	4. ENZIMAS DIGESTIVAS.....	15
	4.1 Enzimas en gasterópodos.....	15
IV	MATERIAL.....	17
V	METODOLOGIA.....	17
	1. DESCRIPCION HISTOLOGICA DEL APARATO DIGESTIVO.....	17
	1.2 Tiempo de Transito Intestinal.....	18
	2 DETERMINACION DE ENZIMAS DIGESTIVAS.....	19
	2.1 Obtención de los Extractos Enzimáticos.....	19
	2.2 Actividad Proteolítica Total .....	20
	2.3 Actividad Proteolítica Específica.....	21
	2.4 Actividad Amilásica.....	22
	3. REQUERIMIENTOS PROTEICOS.....	22
	3.1 Condiciones en Bioensayos.....	22
	3.2 Crecimientos con Dietas Artificiales.....	23
	3.3 Requerimientos de Proteína y Energía .....	24
VI	RESULTADOS.....	27
	1 ESTRUCTURA DEL INTESTINO.....	27
	1.1 Anatomía del Aparato Digestivo.....	27
	1.2 Histología del Tracto Digestivo.....	27
	1.3 Tiempo de Transito Intestinal.....	33
	2. ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	34
	2.1 Extractos Enzimáticos.....	34
	2.2 Actividad Proteolítica Total.....	34
	Actividad Proteolítica Acida .....	35
	Actividad Proteolítica Neutra y Básica.....	37
	2.3 Actividad Proteolítica Específica.....	38
	Tripsina.....	39
	Quimiotripsina.....	40
	Aminopeptidasa.....	40
	Carboxipeptidasas.....	40



2.4 Actividad Amilásica.....	40
3. REQUERIMIENTOS PROTEICOS.....	42
3.1 Crecimiento con Dietas Artificiales.....	42
Tipo de Alimento.....	42
Nivel de Alimentación.....	43
Edad de los Caracoles.....	44
Tasa de Crecimiento.....	45
Incremento de Longitud de la Concha.....	47
Tasa de Conversión Alimenticia.....	49
Tasa de Eficiencia Proteica.....	50
3.2 Requerimientos de Proteína y Energía.....	53
Requerimiento de Energía.....	53
Requerimiento de Proteína.....	53
Tasa de Crecimiento.....	54
Incremento de Longitud de la Concha.....	56
Tasa de Conversión Alimenticia.....	57
Tasa de Eficiencia Proteica.....	58
VII DISCUSION.....	59
1. Aparato Digestivo.....	59
Tiempo de Transito Intestinal.....	62
2. Actividad Enzimática.....	62
2.1 Proteasas Totales.....	64
2.2 Actividad Proteolítica Específica.....	65
Tripsina.....	65
Quimiotripsina.....	66
Aminopeptidasa.....	67
Carboxipeptidasas.....	67
2.3 Actividad Amilásica.....	67
3. Requerimientos Proteicos.....	69
3.1 Dietas Artificiales.....	69
Tipo de Alimento.....	69
Nivel de Alimentación.....	71
Edad de los Caracoles.....	72
3.2 Proteína y Energía.....	73
Requerimiento de Energía.....	73
Requerimiento de Proteína.....	74
Relación Proteína/Energía.....	74
4. Discusión Final.....	76
VII CONCLUSIONES.....	79
VIII LITERATURA CONSULTADA.....	80
APENDICE A.....	88

## INDICE DE TABLAS

No.	Titulo	Página
3.1	Estudios sobre el cultivo y crecimiento del caracol manzano.....	6
3.2	Estudios relacionados con el caracol manzano.....	8
3.3	Características de las dietas utilizadas en estudios de nutrición de gasterópodos.....	10
3.4	Dietas utilizadas para mantenimiento y crecimiento del caracol manzano.....	13
3.5	Estudios relacionados en gasterópodos para determinar la presencia de proteasas.....	16
5.1	Composición de las dietas utilizadas para determinar el tiempo de tránsito intestinal.....	19
5.2	Sustratos y métodos utilizados en la determinación de enzimas proteolíticas.....	21
5.3	Tratamientos utilizados para comparar alimentos.....	24
5.4	Nivel de Proteína y energía de las dietas puras .....	25
5.5	Composición de las dietas puras.....	26
6.1	Tiempo de transito intestinal en minutos por organismo.....	33
6.2	Análisis bromatológico de los alimentos utilizados.....	42
6.3	ANOVA multifactorial de la tasa de crecimiento.....	45
6.4	Resultados de tasa de crecimiento para tratamientos con diferente alimento, ración y talla inicial.....	46
6.5	ANOVA multifactorial de la variable incremento de longitud.....	47
6.6	Medias y grupos homogéneos de incremento de longitud de concha.....	48
6.7	ANOVA multifactorial para la tasa de conversión alimenticia.....	49
6.8	Medias y grupos homogéneos de la tasa de conversión alimenticia.....	50
6.9	ANOVA multifactorial de los resultados de eficiencia proteica.....	51
6.10	Medias y grupos homogéneos de la tasa de eiciencia proteica.....	52

## INDICE DE FIGURAS

No.	Titulo	Página
6.1	Morfología del aparato digestivo.....	28
6.2	Microfotografía de corte longitudinal de la masa bucal.....	29
6.3	Microfotografía de corte tranzversal del esofago anterior.....	29
6.4	Microfotografía que muestra corte transversal de estómago y glándula digestiva.....	30
6.5	Microfotografía de glándula digestiva, aumento 100x.....	31
6.6	Microfotografía de glándula digestiva, aumento 400x.....	31
6.7	Microfotografía de intestino anterior.....	32
6.8	Corte longitudinal de intestino posterior.....	33
6.9	Efecto del pH en la actividad proteolítica de extracto de aparato digestivo completo .....	35
6.10	Hidrólisis de hemoglobina a pH 2.3 de las secciones del aparato digestivo.....	36
6.11	Actividad proteolítica ácida de la sección media del tracto digestivo sobre hemoglobina.....	36
6.12	Placa de agar con caseína a pH 3.0 incubada durante 24 horas .....	37
6.13	Placa de agar con caseína a pH 7.4 incubada durante 24 horas.....	38
6.14	Placa de agar con caseína a pH 9.0 incubada durante 24 horas.....	38
6.15	Comparación de la actividad de las proteasas ensayadas en extractos de la sección media..	39
6.16	Placas de agar con almidón mostrando actividad amilásica.....	41
6.17	Respuesta de las caracoles a dos alimentos. lechuga deshidratada y alimento para peces....	43
6.18	Efecto del nivel de alimentación en el caracol manzano .....	43
6.19	Influencia de la talla inicial en el crecimiento .....	44
6.20	Tasa de crecimiento para los tratamientos con diferente alimento, ración y talla inicial.....	46
6.21	Incremento de longitud de la concha para tratamientos con diferente alimento, ración y talla inicial.....	48
6.22	Tasa de conversión alimenticia para tramientos con diferente alimento, ración y talla.....	50
6.23	Tasa de eficiencia proteica para tratamientos con diferente alimento, ración y talla inicial....	51
6.24	Respuesta de los caracoles a dietas puras con dos niveles de energía.....	53
6.25	Respuesta de los caracoles a dietas con diferentes nivel de proteína.....	54
6.26	Tasa de crecimiento con dietas a diferente nivel de proteína y energía.....	55
6.27	Incremento de longitud de concha con dietas a diferente nivel de proteína y energía.....	56
6.28	Tasa de conversión alimenticia con dietas a diferente nivel de proteína y energía.....	57
6.29	Tasa de eficiencia proteica con dietas a diferente nivel de proteína y energía.....	58

## I. INTRODUCCION

Los moluscos son organismos sedentarios o de lento movimiento, por lo cual son susceptibles de ser predados con gran facilidad, esto ha ocasionado que algunas especies se encuentren amenazadas debido a la intensa explotación a la que han estado sometidas. Paradójicamente se encuentran entre los organismos acuáticos que proporcionan mejores rendimientos en condiciones de cultivo, sin embargo, actualmente el número de especies que se explotan en sistemas controlados es aún reducido.

Por lo anterior es importante considerar las características de las especies que tienen potencial para ser cultivadas. Tal es el caso de los gasterópodos de agua dulce del género *Pomacea* (Pilidae), llamados comúnmente caracol manzano, tegogolos, totes o "caracoles misterio".

Estos gasterópodos se distribuyen en ríos y lagos de agua dulce de las zonas tropicales y subtropicales de América. A nivel nacional son explotados en algunas regiones de Veracruz y Tabasco, representando en la mayoría de los casos una pesquería local con fines de autoconsumo.

En la actualidad la explotación de este recurso se ha incrementado, particularmente en la zona de los Tuxtlas, Veracruz, alcanzando un registro de captura promedio por mes de 40.6 toneladas en 1988 y beneficia económicamente a 4000 cooperativistas de la Laguna de Catemaco, Veracruz (Ontiveros, 1989). Esto ha generado un mayor interés por el estudio de este recurso a través de programas enfocados principalmente al mantenimiento de las poblaciones naturales mediante algunos intentos de cultivo utilizando métodos convencionales (Osorio, 1987; Martínez y Farias, 1989 y Ontiveros, 1989).

La principal dificultad para llevar a cabo estos trabajos ha sido la escasa información existente sobre aspectos fundamentales de la biología de este tipo de caracoles, así como los pocos antecedentes y experiencias sobre el cultivo de gasterópodos de agua dulce. Esto ha limitado sin duda el avance en el desarrollo de las técnicas de cultivo que permitan evaluar con objetividad las posibilidades reales que tiene este recurso para ser explotado a gran escala.

Considerando lo anterior, se decidió orientar el presente trabajo al estudio de algunos aspectos particulares de su biología a fin de contar con una base para posteriores investigaciones

## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

que permitan lograr un avance en el conocimiento de un recurso natural que seguramente tiene un mayor potencial que el actualmente desarrollado.

Uno de los aspectos de mayor importancia para el cultivo de cualquier especie es el conocimiento de sus requerimientos nutricionales, ya que el alimento proporcionado en sistemas controlados resulta ser uno de los principales rubros económicos dentro del costo de producción. Por éste motivo una de las fases de este trabajo está enfocada a conocer el perfil enzimático con que cuenta el caracol manzano, para de esta forma establecer las bases para la formulación de dietas adecuadas a los requerimientos particulares de la especie.

## **II. OBJETIVOS**

### ***II.1 OBJETIVO GENERAL:***

Contribuir al conocimiento de la fisiología digestiva del caracol manzano con miras a evaluar la factibilidad que tiene este molusco para ser explotado de forma intensiva.

### ***II.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:***

- 1) Conocer la organización del aparato digestivo de la especie a nivel histológico.
- 2) Determinar la presencia y actividad de las proteasas del aparato digestivo del caracol manzano.
- 3) Establecer la relación entre los niveles de proteína y energía del alimento, utilizando dietas puras.

### III. ANTECEDENTES

#### III.1 ASPECTOS TAXONOMICOS

La familia Pilidae (Ampullaridae) agrupa 7 géneros de caracoles que se distribuyen en las zonas tropicales de Asia, Africa y América, estos organismos se caracterizan por ser de agua dulce, operculados y con un aparato respiratorio que les permite un modo de vida anfibio ya que presentan un pulmón y una branquia. Algunos llegan a alcanzar un tamaño considerable (12 cm.) y por su forma globosa se les ha denominado caracoles manzano, destacando los géneros *Pila* en Asia y *Pomacea* en América, los cuales han sido explotados para consumo humano en diferentes regiones (Banarescu, 1990).

*Pomacea* es un género que se distingue por las siguientes características: opérculo corneo, sifón largo, canal espermático interno, huevos con cubierta calcárea y pigmentados que son depositados fuera del agua y un comportamiento moderadamente anfibio (Michelson, 1961).

El genero *Ampullarius* era utilizado como sinónimo de *Pomacea* y en trabajos iniciales erróneamente se incluían especies de este genero en *Ampullaria* el cual es un sinónimo de *Pila* (Burch, 1982).

Actualmente existe cierta controversia en torno a la identificación a nivel de especies debido a que las descripciones existentes están basadas solo en aspectos morfológicos externos (Rangel, 1988). Algunos autores consideran para México una sola especie (*P. flagelata*), por lo cual se han realizado estudios citogenéticos con la intención de establecer posibles sinonimias entre las especies mencionadas (Diupotex, 1993).

A lo anterior se agrega el problema generado por la introducción de especies exóticas con fines ornamentales y de acuacultura, registrándose al menos la introducción en Norteamérica de *P. bridgesi* y *P. canaliculata* (Burch, 1982; Neck, 1986).

Debido a lo expuesto se decidió denominar a los organismos en este trabajo a nivel de género, mientras que las citas y antecedentes mencionaran el género y especie referidos por los autores.

## **III.2 CULTIVO DE GASTEROPODOS**

### **III.2.1 IMPORTANCIA DE LOS GASTEROPODOS EN ACUACULTURA**

Como se mencionó anteriormente el número de especies de gasterópodos que son cultivados es muy reducido siendo el abulón (*Haliotis spp.*) el principal organismo de este tipo que se registra en la literatura sobre acuicultura. La disminución de las poblaciones naturales y el alto precio que alcanza en el mercado este molusco son los principales factores que han impulsado la investigación para desarrollar su cultivo. Otro gasterópodo comestible que también ha sido cultivado es *Murex trunculus*, el cual es a su vez sujeto de una intensa pesquería frente a las costas de Túnez y desde hace algunos años se engorda en el lago de agua salobre Bizerata (Bardach *et al.*, 1986).

En México se encuentran en desarrollo investigaciones para el cultivo del caracol del Caribe *Strombus gigas* (Rodríguez *et al.*, 1991) con importantes avances, así como el cultivo del caracol de tinte *Purpura pansa* (Escalante *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1993).

Los anteriores ejemplos se refieren esencialmente a gasterópodos marinos mientras que en lo que concierne a caracoles de agua dulce los trabajos son aún escasos. Vale la pena mencionar el desarrollo de algunos esfuerzos de cultivo con fines de investigación, como en el caso de los caracoles de la familia Thiaridae (Maleeya *et al.*, 1990) los cuales se han utilizado como competidores de caracoles vectores de enfermedades.

### **III.2.2 CULTIVO DEL CARACOL MANZANO**

El cultivo del caracol manzano aún no es una actividad establecida, a pesar de una serie de intentos y estudios que se han venido realizando (Tabla 3.1), los cuales han sido interrumpidos por diversas causas. Las experiencias más conocidas a nivel mundial son el resultado de la introducción de *Ampullaria gigas* en el sur de China, vía Hong Kong en 1982, siendo cultivado en estanques, tanques de concreto y zanjas. De igual forma fue introducido en otros países de Asia al generar gran interés por su cultivo debido a que podía prosperar rápidamente en tanques o

en pequeños contenedores, alimentarse de material vegetal, reproducirse en los contenedores de cultivo y crecer en poco tiempo. Sin embargo este interés fué solo temporal debido al poco control que se ejerció al ser introducido en los campos de cultivo de arroz pasando posteriormente a ser considerado como plaga para este cultivo (De Silva, 1989).

Similar suerte tuvo la introducción de *Pomacea canaliculata* en Filipinas en 1983-84 el cual empezó a ser cultivado con la finalidad de producir alimento para el hombre debido a su alta y rápida producción de biomasa, sin embargo, la falta de control produjo consecuencias ecológicas y económicas negativas principalmente sobre los cultivos de arroz. Una forma práctica de solventar este problema fué la propuesta por Bombeo-Tuburan *et.al.* (1994) quienes sugieren la utilización del caracol manzano como ingrediente en la formulación de dietas para camarón (*Penaeus monodon*) considerando su alto contenido de proteína (54%), la calidad de sus lipidos, destacando su perfil de ácidos grasos poliinsaturados (18:2n-6, 18:3n-3 y 20:5n-3) los cuales resultan esenciales para *P. monodon* y su índice de aminoácidos esenciales (EAAI) de 0.84 con respecto al camarón. De esta manera se ha logrado obtener buenos resultados en crecimiento de camarón al combinar el caracol manzano con fuentes poco onerosas de carbohidratos (cassava o maíz).

*Pomacea urceus* es una especie nativa de Sudamérica la cual es capturada para consumo humano lo que ha propiciado el establecimiento de un mercado local bien establecido en Trinidad. Sobre esta especie se han realizado estudios sobre diferentes aspectos biológicos dirigidos a evaluar su potencial como especie de cultivo. Los resultados de campo han mostrando características favorables en cuanto a talla alcanzada (85 a 135 mm) (Lum y Ramnarine, 1988; Lum, 1989) y la velocidad de crecimiento (8.3 mm/mes) (Lum y Ramnarine, 1988) hasta 13.5 mm/mes (Burky, 1974; Lum, 1989), además de depender de una dieta predominantemente herbívora (Andrews, 1965). Sin embargo, los resultados en laboratorio, principalmente los concernientes a la velocidad de crecimiento (1.7 mm/mes) fueron inferiores, lo cual fue atribuido a una dieta inadecuada que consistió de restos de vegetales de consumo humano, así como a un inadecuado sistema de cultivo (Lum, 1989). Por otra parte la falta de estudios para producir crías durante todo el año (ya que esta especie se reproduce naturalmente después de un periodo de estivación) (Lum y Kenny, 1989) y falta de experiencias e interés en producir un sistema de cultivo adecuado para estos organismos ha frenado el avance en el cultivo de esta



*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

especie. De aquí que sea definitiva la selección de un régimen alimenticio adecuado y un sistema de cultivo bien diseñado y funcional.

Los estudios para cultivar caracoles del género *Pomacea* en México se iniciaron con los trabajos de Sautto y Parra en Yucatán a principios de los 80's (Ontiveros, 1989), seguidos por lo efectuado por Valdes y Aguilera (1986) quienes destacan la velocidad de crecimiento, el potencial reproductivo y la capacidad de adaptación a diferentes alimentos como características importantes para el cultivo. Posteriormente se han llevado a cabo una serie de estudios, realizados principalmente en Veracruz, con la finalidad de fomentar el cultivo de estos organismos, sin embargo, estos han carecido de una continuidad y los antecedentes sobre biología y cultivo que presentan son aún escasos, limitando por este motivo el avance.

Tabla3.1- Estudios sobre cultivo y crecimiento del Caracol manzano

ESPECIE	TIPO DE CULTIVO	ALIMENTO	CRECIMIENTO	AUTOR
<i>P. urceus</i>	Crecimiento en campo	Alimento natural	Estimado de 13.5 mm/mes	Burky, 1974
<i>P. flagellata</i>	Cultivo en estanques	---	---	Sauto, 1983
<i>P. flagellata</i>	Crecimiento	---	---	Alonzo, 1984
<i>P. paludosa</i>	Crecimiento en laboratorio	Alimento p/peces	Peso estimado de 60 g. en 15 meses	Valdes y Aguilera, 1986
<i>P. urceus</i>	Crecimiento en campo	Alimento natural	8.3 mm/mes	Lum y Ramnarine, 1988
<i>P. urceus</i>	Crecimiento en laboratorio y campo	Restos de hortalisas y alimento natural	Laboratorio 1.7 mm/mes Campo 13.52 mm/mes	Lum, 1989
<i>P. patula</i>	Estanques rusticos	Lechuga, alfalfa y berro	5.5 mm/ mes	Martines y Farias, 1989
<i>Pomacea sp.</i>	Cultivo en jaulas dentro de estanques de Tilapia	Lechuguilla ( <i>Pistia sp.</i> )	5.3 mm/mes	Ontiveros, 1989
<i>P. canaliculata</i>	Crecimiento en laboratorio	3 dietas en agar y lechuga fresca	Sin diferencias entre dietas. Estimado de 6.3 mm/mes	Estebenet y Cazzaniga, 1992
<i>P. bridgesi</i>	Crecimiento en laboratorio	Dietas con 30% proteína	7 mm/mes	Benavides, 1994
<i>P. patula</i>	Laboratorio, tanques de plastico	<i>Ipomea aquatica</i> ,	Estimado de 28 kg/m <sup>3</sup> en 133 días	Asiain y Olguin, 1995

### III.2.3 OTROS ESTUDIOS CON EL CARACOL MANZANO

Varios aspectos sobre la biología del caracol manzano de interés fundamental para el cultivo han sido desarrollados en diferentes trabajos (Tabla 3.2). El rápido crecimiento de los caracoles manzano en combinación con otras características como la adaptación a diferentes tipos de alimento, principalmente de tipo vegetal y su gran voracidad, ha propiciado que sea considerado como un agente eficaz de control biológico de malezas acuáticas. A este respecto se ha estimado que un caracol adulto de *Ampullaria canaliculata* puede llegar a consumir un promedio de 14.54 g de maleza diariamente (Cazzaniga, 1981). Sin embargo, una serie de problemas entre los que destacan las malas experiencias sobre cultivos de arroz en los lugares en donde ha sido introducido, aunado al riesgo potencial de difundir con ellos larvas de tremátodos que pueden afectar al hombre o animales domésticos, así como los escasos ensayos de esta práctica que permitan tener resultados predecibles ha producido que su utilización se encuentre muy limitada (Cazzaniga y Estebenet, 1985).

Otro uso que se ha propuesto para los caracoles manzano es su utilización como control biológico al actuar como competidores y depredadores de otros gasterópodos transmisores de enfermedades (Cazzaniga, 1990).

En los estudios que aparecen en la Tabla 3.2 se muestran una serie de resultados que se pueden apreciar las características favorables del caracol manzano como organismo de cultivo. Entre los aspectos reproductivos destacan el almacenamiento de esperma, las particularidades de los huevos en cuanto al tamaño, resistencia, tiempo de incubación y eclosión sin fases larvianas. Mientras que los estudios de hábitos alimenticios y control de malezas muestran la amplia gama de tipos y formas de alimentos a los que pueden adaptarse, así como la capacidad de ingerir grandes volúmenes de vegetales. Los estudios de poblaciones y respiración muestran la capacidad de adaptarse a densidades elevadas características de los cultivos intensivos. Por otra parte una serie de trabajos sobre aspectos fisiológicos durante la estivación de *P. urceus* muestran la posibilidad de soportar condiciones desfavorables, lo que los hace especialmente resistentes a las condiciones de manejo en los cultivos.

Tabla 3.2 Estudios relacionados con el caracol manzano.

ESPECIE	ESTUDIO	RESULTADOS	AUTOR
<i>P. urceus</i>	Reproducción	Temp. 29°C; pH 6.6-7.1; O <sub>2</sub> 6-10 ppm; 125 huevos p/puesta; alimento vegetal	Travieso y Miranda, 1971
<i>P. urceus</i>	Reproducción	Huevos grandes(11.5mm) y eclosión rápida, ventaja para estivación.	Burky, 1972
<i>P. canaliculata</i>	Reproducción	Dimorfismo sexual en apertura de concha y operculo.	Cazzaniga, 1990
<i>P. canaliculata</i>	Reproducción	Almacenamiento de esperma por un mes, iteroparo a temperatura variable.	Estebenet y Cazzaniga, 1993
Ampullaridae	Habitos alimenticios	Eurifagos rusticos con uniformidad autoecológica	Cazzaniga Y Estebenet, 1984
<i>P. fagellata</i>	Habitos alimenticios	Aparato digestivo con gl salival, gl digestiva y 3 regiones de intestino	Rangel, 1988
<i>P. canaliculata</i>	Habitos alimenticios	Adultos consumen 8 a 24 g de <i>Chara vulgaris</i> por dia	Cazzaniga, 1993
<i>A. canaliculata</i>	Control de malezas acuáticas	Adulto consume g/día: 12.5 de <i>Chara</i> , 5.6 de <i>Myriophyllum</i> y 4.9 de <i>Potamogeton</i> .	Cazzaniga, 1981
Ampullaridae	Control de malezas acuáticas	Revisión de antecedentes	Cazzaniga y Estebenet, 1985
<i>P. canaliculata</i>	Densidad de población	100 caracoles en 10l. durante 11 meses sin efectos en mortalidad.	Cazzaniga y Estebenet, 1988
<i>P. urceus</i>	Respiración	Respuesta a baja [O <sub>2</sub> ] con ventilación del pulmón.	Burky Y Burky, 1977
<i>P. urceus</i>	Estivación	metabolismo aerobio con ventajas adaptativas al bajo consumo de O <sub>2</sub> en la estivación	Pereyra y Pacheco, 1971
<i>P. urceus</i>	Estivación	Mecanismos de regulación de glucogeno durante estivación	Cedeño et. al., 1971
<i>P. urceus</i>	Estivación	Temperatura letal 40-45 °C; puede perder 62% de peso en estivación.	Burky, et al., 1972
<i>P. urceus</i>	Estivación	Utiliza los carbohidratos como reserva	Cedeño, 1984
<i>P. urceus</i>	Estivación	Baja el consumo de O <sub>2</sub> y glicogeno; Anaerobiosis, produce lactato	Thomas y Agard, 1992
<i>A. canaliculata</i>	Estimación de biomasa	Posible estimar biomasa en base a dimensiones de concha y operculo.	Guedes et al., 1981
<i>P. canaliculata</i>	Control biológico	Depredador sobre <i>Biomhalaria peregrina</i>	Cazzaniga, 1990

### III.3 NUTRICION

#### III.3.1 ESTUDIOS DE NUTRICION EN GASTEROPODOS

Dentro de las recopilaciones más informativas realizadas hasta el momento se encuentra la efectuada por Carefoot (1983). Este trabajo refleja los escasos conocimientos existentes sobre los requerimientos nutricionales para este tipo de organismos (Tabla 3.3). Por otra parte los estudios realizados hasta el momento son difíciles de comparar ya que existen muchas diferencias que van desde el tipo de alimentación entre las diferentes especies, con muchas variantes dentro de este grupo, así como del tipo de ingredientes utilizados. Sin embargo se presentan algunos resultados interesantes entre los cuales destacan la respuesta en crecimiento al utilizar altos niveles de proteína en dietas para *Halotis spp.*, así como la dificultad para determinar los aminoácidos esenciales en el caso de *Aplysia sp.*, esto a pesar de utilizar dietas a base de aminoácidos puros, lo cual sugieren como posible explicación el aporte nutricional por los microorganismos intestinales, siendo esto probable debido a la especialización del aparato digestivo que presenta esta especie para alimentarse de algas marinas (Carefoot, 1983), sin embargo, esto no es necesariamente válido para otros gasterópodos con diferente tipo de alimentación.

#### III.3.2 DIETAS PARA CARACOL MANZANO

Los alimentos utilizados para crecimiento de caracol manzano han estado basados principalmente en materia vegetal fresca (Tabla 3.4), siendo este tipo de alimento el recomendado por Estebenet y Cazzaniga (1992) en base a un estudio sobre el crecimiento de *P. canaliculata* en condiciones de laboratorio. En efecto, estos autores al comparar cuatro dietas, tres de las cuales fueron a base de harina de pescado, alimento para perro, germen de trigo, lechuga deshidratada y leche deshidratada y una cuarta dieta que se realizó a base de hojas de lechuga fresca, proporcionadas *ad libitum* no encontrar diferencias significativas en el

Tabla 3.3.- Características de las dietas utilizadas en estudios de nutrición de gasterópodos (Carefoot, 1983).

ESPECIE	PRINCIPAL FUENTE DE NUTRIENTE (% peso seco)						AUTOR
	PROTEINA	GLUCIDOS	LIPIDOS	LIGANTE	VITAMINAS Y MINERALES	OTROS	
<i>Lymnea stagnalis appressa</i>	Alimento	Preparado:	Cereal Lechuga	Cocido con y Leche	No especificado		Noland & Carriker, 1946
<i>Austrolorbis glabratus</i>	Lechuga Seca (28.5)	Leche en Polvo (14.5)		Alginato de Sodio (28.5)			Standen, 1951
<i>Austrolorbis glabratus</i>	Alimento	Preparado.	Levaduras <i>Escherichia</i>	y Cultivo de <i>coli</i>		Penicilina Estreptomicina	Chernin, 1957
<i>Halicis discus</i>	Harina de Pescado (20-60)	Almidon (5-15) Celulosa		Alginato de sodio (20-60)	"Panvitan"		Ogino & Onta, 1963
<i>Haliothis discus</i>	Harina de Pescado Delipidada (10-60)	Dextrina (12-64) Celulosa (1-2)	Aceite de Soya (1)	Alginato de Sodio (20)	"Panvitan"		Ogino & Kato, 1964
<i>Arion ater</i>	Caseina (17)	Almidon (51.5)	Aceite de olivo (6)	Agar (13)	C(2), Colina(0.4), 6 Vitaminas(0.1) , 4 Minerales (4.5)	Aureomicina (0.7)	Wright, 1973
<i>Haliothis spp.</i>	Harina de Pescado, <i>Chlorella</i> (60), Levadura (5)	Almidon (15)		Alginato de Sodio (20)			Sagara & Sagal 1974
<i>Haliothis tuberculata</i>	<i>Tetraselmis suecica</i> (60), Levadura (2)	Dextrina (15)		Alginato de Sodio (20)	No especificado (3)		Koike <i>et al.</i> , 1974
<i>Aplysia dactylomela</i>	20 Aminoácidos (4.2)	Almidon, Celulosa (56.2)	4 Ácidos Grasos (2.5)	Agar (27.6)	AIM vitamin (0.2), 14 Minerales (5.8)	Colesterol (2.5) Extracto de <i>Ulva</i>	Carefoot, 1980
<i>Aplysia kurodai</i>	20 Aminoácidos (4.2)	Almidon, Celulosa (57.2)	4 Ácidos Grasos (2.5)	Agar (27.6)	AIM vitamin (0.2), 14 Minerales (5.8)	Colesterol (2.5)	Carefoot, 1981
<i>Aplysia dactylomela</i>	20 Aminoácidos (8.3)	Almidon, Celulosa (52.4)	4 Ácidos Grasos (2.5)	Agar (27.6)	14 Vitaminas (0.2), 14 Minerales (5.8)	Colesterol (2.5), Antibióticos (0.7)	Carefoot, 1982

crecimiento de los caracoles entre los tratamientos. Esto sugirió la utilización de lechuga como el alimento más apropiado para *P. canaliculata*.

La utilización de materia vegetal fresca tiene la ventaja de resultar más económico que los alimentos formulados secos, sin embargo, presenta una serie de desventajas al utilizarse en sistemas de cultivo sobre todo en los de tipo intensivo, entre los que podemos mencionar los siguientes:

➤ Los importantes volúmenes requeridos (McVeigh, 1994). Esto debido a que este tipo de alimentos son altos en humedad y bajos en proteína por lo que deben ser consumidos en gran cantidad para obtener tasas adecuadas de crecimiento. Como un ejemplo de lo anterior vale la pena señalar que un caracol manzano puede consumir hasta 23 g de maleza por día (Cazzaniga, 1993).

➤ El grado de aceptación del producto utilizado. A esto podemos agregar que no todos los vegetales son atractivos para ser consumidos, produciendo diferencias importantes en cuanto a su ingestión (Cazzaniga, 1981) y tasas de crecimiento bajas a causa de un balance inadecuado de nutrientes (Lum, 1989).

➤ Depende de la disponibilidad estacional de alimento fresco. A título de ejemplo podemos citar el estudio desarrollado por Martínez y Farias (1989) quienes utilizaron alfalfa, berro y lechuga en un cultivo en estanques rústicos, siendo la fuente de estos alimentos los subproductos de los mercados locales, por lo cual la disponibilidad de estos productos no fué estable.

➤ Menor control en el cultivo y problemas sanitarios. Martínez y Farias (1989) utilizaron estos alimentos en estanques rústicos obteniendo una baja sobrevivencia (4 a 12%), esto en contra parte a las altas tasas de sobrevivencia en diferentes condiciones de manejo y hacinamiento demostradas por Cazzaniga (1988). Problemas similares se presentaron al sembrar el estanque de cultivo con lechuguilla (*Pistia sp.*) como alimento para el caracol, adicionalmente se registraron problemas sanitarios debido a la descomposición de restos vegetales y la alimentación tuvo que ser complementada con otros vegetales y alimento para peces (Ontiveros, 1989).

➤ Se pueden incrementar los gastos debido al almacenamiento, generalmente por refrigeración o congelación.

## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

➤ Se presentan variaciones en la composición de los productos o sub-productos (Mendoza, 1993).

Este tipo de problemas son una excepción en el caso de los cultivos a escala de laboratorio. Así, Asiain y Olguín (1995) no reportan inconvenientes al utilizar *Ipomea aquatica* fresca como alimento, utilizando contenedores de plástico y con un suministro de alimento continuo por la producción a nivel experimental de esta planta para consumo humano, siendo lógico esperar los problemas anteriores al intentar una producción de caracol a mayor escala.

En base a lo anterior se hace patente que el avance en el cultivo de caracol manzano requiere necesariamente el desarrollo de una dieta balanceada que cubra sus requerimientos nutricionales para permitir el potencial máximo de crecimiento de la especie. Esta aproximación en combinación con la búsqueda de nuevos ingredientes que puedan cubrir estos requisitos conllevará a la reducción de los costos de elaboración del alimento.

Un trabajo interesante en este sentido es el realizado por Benavides (1994) quien evaluó diferentes fuentes de proteína en dietas secas para promover el crecimiento en cultivo del caracol manzano (*P. bridgesi*), utilizando levadura de cerveza, soya y espirulina en dietas formuladas con 30 % y 330 kcal/100g tomando como referencia un alimento comercial para bagre. De este trabajo se dedujo la aceptación de los caracoles de este tipo de alimento así como la proporcionalidad entre el incremento en la tasa de crecimiento con el alto contenido de proteína, como lo han sugerido igualmente las observaciones de Ontiveros (1989) al utilizar alimento para peces. Por otra parte cabe remarcar que se encontraron mejores resultados en crecimiento con las dietas a base de levadura y soya en los periodos iniciales de la curva de crecimiento, mientras que en la parte final de la fase exponencial del crecimiento resultó mejor el alimento para bagre, aunque las diferencias entre estas dietas no fueron tan marcadas, dependiendo principalmente de la variedad de caracol utilizada.

Sin embargo, un requisito para evaluar diferentes fuentes proteicas es el conocer el requerimiento cuantitativo de proteína y energía de la especie ya que al suministrar estos por encima del requerimiento pueden enmascarar el aprovechamiento por la especie y las características de la proteína supliendo las deficiencias en algún aminoácido con el excedente, evitando que se asimilan aquellos aminoácidos que se encuentran por encima de su

requerimiento, pudiéndose producir inclusive una disminución en el crecimiento como consecuencia del gasto metabólico para eliminar este excedente de nutrientes. Por lo tanto el primer paso en la formulación de dietas es establecer los requerimientos cuantitativos de proteína y energía, siendo estos uno de los objetivos de este trabajo.

Tabla 3.4.- Dietas utilizados para mantenimiento y crecimiento del caracol manzano.

ESPECIE	DIETA	RACION	CRECIMIENTO	AUTOR
<i>A. canaliculata</i>	1) <i>Chara vulgaris</i> ; 2) <i>Myriophyllum elatinooides</i> ; 3) <i>Po. amogenton pectinatus</i>	<i>ad libitum</i>	Consumo diario por caracol: 1) 12.5g; 2) 5.6g 3) 4.9g	Cazzaniga, 1981
<i>P. canaliculata</i>	<i>Chara vulgaris</i>	<i>ad libitum</i>	Consumo por individuo: 8 a 24 g/día	Cazzaniga, 1983
<i>P. canaliculata</i>	Lechuga fresca	<i>ad libitum</i>	----	Cazzaniga y Estebenet, 1988
<i>P. flagellata</i>	Lechuga fresca	----	-----	Rangel, 1988
<i>Pomacea sp.</i>	Lechuga y espinaca	----	-----	Bever y Borgeles, 1988
<i>P. urceus</i>	<i>Brassica chinensis</i> , <i>B. oleracea</i> , <i>Colocasia esculenta</i> , <i>Lectuca sativa</i> , <i>Xanthosoma sagittifolium</i> , <i>Psidium guajava</i> , <i>Artocarpus altilis</i>	<i>ad libitum</i>	Crecimiento 1.7 mm/mes	Lum, 1989
<i>P. patula</i>	1) Alfalfa; 2) Berro; 3) Lechuga	<i>ad libitum</i>	Mayor crecimiento con alfalfa	Martinez y Farias, 1989
<i>Pomacea sp.</i>	<i>Pistia stratiotes</i> , alimento p/tilapia	<i>ad libitum</i>	5.3 mm/mes	Ontiveros, 1989
<i>P. canaliculata</i>	1) Alimento peces y CaCO <sub>3</sub> en agar; 2) Germen de trigo, lechuga deshidratada y leche en polvo en agar; 3) Alimento p/perro en agar; 4) Lechuga fresca	<i>ad libitum</i>	Sin diferencias entre dietas. Crecimiento	Estebenet y Cazzaniga, 1992
<i>P. bridgesi</i>	Dietas con 30% proteína y 330 Kcal/100g con sorgo y almidón. 1) Alimento p/bagre; 2) <i>Spirulina</i> ; 3) Soya; 4) Levadura.	2 al 8 % de biomasa por día	7 mm/mes con soya, levadura y alimento p/bagre	Benavides, 1994
<i>P. patula</i>	<i>Ipomea aquatica</i>	<i>ad libitum</i>	1.5g en 133 días	Asiain y Olguín, 1995



### **III.3.3 APARATO DIGESTIVO DEL CARACOL MANZANO**

Un aspecto fundamental para el cultivo del caracol manzano es conocer como se lleva a cabo el proceso digestivo de los alimentos. A este respecto vale la pena hacer mención de los estudios de la estructura y función del aparato digestivo de los Pilidos realizado por Andrews (1965), que describió el intestino de estos organismos como especializado para una dieta macrófaga constituida generalmente de angiospermas acuáticas. Con el esófago medio modificado en forma de buche para almacenamiento y el estómago dotado de una molleja grande para triturar, desarrollada a partir de una área gástrica calcárea, en esta zona, al mismo tiempo que el alimento es triturado, la marca como el sitio de la digestión extracelular, con enzimas producidas en la glándula digestiva. No señala evidencia alguna de digestión intracelular en el intestino. Mientras que los ductos de la glandular digestiva desembocan en una región especial del estómago, el saco estilar inicia la compactación de las heces, la cual finaliza en el intestino. Tampoco menciona evidencias de que la absorción ocurra en el epitelio intestinal y hace referencia a que los productos solubles de la digestión son conducidos dentro de la glándula digestiva en la cual ocurre la absorción, siendo complementada por amebocitos dentro del lumen del saco estilar y del intestino. Por otra parte describe dos tipos de células en la glándula, uno de los cuales produce enzimas digestivas y absorbe los productos solubles de la digestión, mientras que el otro tiene una función principalmente excretoria.

Dentro de este contexto, Rangel (1988) describió el aparato digestivo con el esófago comunicando directamente al intestino el cual divide en tres secciones, una región anterior con un ensanchamiento, que corresponde al buche en la descripción del esófago señalada por Andrews (1961). Una sección media del intestino caracterizada por ser el lugar en donde desemboca la glándula digestiva y finalmente una tercera sección del intestino la cual desemboca en el recto y ano.

### **III.3.4 HABITOS ALIMENTICIOS**

Una revisión sobre los hábitos alimenticios de la familia Ampullaridae fué realizada por Cazzaniga y Estebenet (1984), quienes describieron tres tipos de alimentación para estos caracoles con varias modalidades:

- **Macrofitófago**, que es la principal, basada en el consumo de angiospermas acuáticas.
- **Zoófago**, que va desde el consumo de cadáveres recientes (necrófago estricto) o maceradores (carroñero) hasta la depredación.
- **Micrófago**, que se realiza por raspado de superficies duras o a través de corrientes ciliares y aglutinación de partículas con mucus.

### **III.4 ENZIMAS DIGESTIVAS**

La necesidad de conocer los procesos digestivos de diferentes organismos susceptibles de ser cultivados ha generado una serie de trabajos enfocados a caracterizar las enzimas presentes en este proceso. Uno de los métodos más comúnmente utilizados para este propósito es la utilización de extractos crudos de tejido que actúan sobre sustratos específicos, los cuales revelan la actividad enzimática mediante la liberación de colorantes (Erlanger *et. al.*, 1961; Chavira *et. al.*, 1984) o por marcas sobre placas de gelatina o agar, que pueden ser evaluadas ya sea por observaciones directas (Shear y Pearse, 1963; Lowestein y Ingild, 1976; Sandholm *et. al.*, 1976) o bien utilizando técnicas más precisas como la utilización del espectrofotómetro (Baragi y Lovel, 1986; Munilla y Stark, 1990; Clark *et. al.*, 1986) o la purificación de las enzimas mediante cromatografía o electroforesis (Massahud, *et. al.*, 1988; Vega *et. al.*, 1993; Wethmar y Kleinow, 1993). Igualmente es común llevar a cabo la localización a nivel tisular y celular de los sitios de actividad utilizando cortes histológicos que actúan sobre placas de sustrato (Shear y Pearse, 1963; Hily, 1983; Cousin, 1986).

#### **4.1 ENZIMAS EN GASTEROPODOS**

La mayoría de los trabajos efectuados con gasterópodos para determinar la presencia de proteasas se han basado exclusivamente en un tipo de tejido: la glándula digestiva (Tabla 3.5), lo cual no descarta la incidencia de otras enzimas proteolíticas nivel intestinal.

*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Así mismo, en estos estudios se han contemplado los valores de pH óptimos para las proteasas reportadas y de manera general se han reportado los valores normales de pH de la cavidad intestinal, el cual muestra una correlación con el tipo de dieta. Se ha establecido un rango de pH de 5.5 - 6.8 para las glándulas salivales, esófago, estomago y glándula digestiva, un pH de 6.4 - 7.9 para el intestino y un pH de 7.8 - 8.3 para el recto (Vonk y Western, 1984).

Tabla 3.5.- Estudios realizados en gasterópodos para determinar la presencia de proteasas según Vonk y Western (1984). G.D. = Glándula digestiva, F.G. = Fluído Gastrico.

ESPECIE	ENZIMA	TEJIDO	SUSTRATO	pH
<i>Murex sp.</i>	Endopeptidasa	G.D.	Caseina	7.6-8.0
	Aminopeptidasa	G.D.	Leucil-Diglicin	7.6-8.0
	Dipeptidasas	G.D.	Glicil-Glicina	7.6-8.0
	Carboxipeptidasa	G.D.	Cloracetil-Tirosina	7.6-8.0
<i>Acnaea sp.</i> <i>Nucella sp.</i> <i>Tegula sp.</i>	Proteasas	G.D.	Hemoglobina	7.5
		G.D.	Gelatina	
		G.D.	Caseina	
<i>Cellana sp.</i>	Proteasas	G.D.	Gelatina y Caseina	5.2
<i>Viviparus sp.</i>	Proteasas	G.D.	Peptona	6.2
		G.D.	Caseina	8.3
<i>Philine sp.</i> <i>Aelidia sp.</i> <i>Jorunna sp.</i>	Proteasas	F.G.		6.0-8.5
		y G.D.		4.0-6.2
				2.2,8.8
<i>Hermisenda sp.</i> <i>Aeolidia sp.</i>	Quimiotripsina	F.G.	N-benzoil-tirosina	7.5-8.0
	Catepsina D		ethyl ester (BTEE)	2.0-2.5
	Catepsina B		N-tosil-arginina methyl ester (TAME)	5.6-6.5
<i>Helix sp.</i>	Proteasas	F.G.		5.5
<i>Helix sp.</i>	Catepsina	F.G.		
<i>Helix sp.</i>	Proteasas	Intestino	Hemoglobina	2.5,7.5
<i>Achantia sp.</i> <i>Arion sp.</i>	Proteasas	Intestino		5.6

## **IV. MATERIAL**

Para la realización del trabajo se utilizaron ejemplares de caracol manzano (*Pomacea sp.*) los cuales han sido mantenidos en condiciones de laboratorio en el Museo de Historia Natural de la F.C.B., U.A.N.L.

## **V. METODOLOGIA**

El trabajo se dividió en tres secciones agrupadas de la siguiente forma:

- A) Descripción del aparato digestivo a nivel histológico.
- B) Caracterización de proteasas digestivas.
- C) Determinación de requerimientos proteicos en la dieta mediante la técnica de dosis-respuesta.

### ***V.1 DESCRIPCION ANATOMICA HISTOLOGICA DEL APARATO DIGESTIVO DEL CARACOL MANZANO.***

Para llevar a cabo esta fase experimental se alimentó un grupo de 15 caracoles de 2 g. de peso inicial hasta alcanzar un peso de 5 g con una dieta base, la cual contenía 30% proteína. Posteriormente los animales fueron anestesiados con mentol y extraídos de su concha con la finalidad de separar el aparato digestivo, el cual fué seccionado considerando las siguientes secciones (Rangel-Ruiz, 1988):

### *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

- ♦ El complejo formado por la boca, glándulas salivales y esófago (sección anterior).
- ♦ La glándula digestiva, la cual se encuentra formando una masa compacta con el aparato reproductor (ovario o testículo) (sección media).
- ♦ El intestino formado por tres regiones (sección posterior):
  - La región anterior que se presenta como un ensanchamiento del tubo digestivo.
  - La región media en la cual desemboca la glándula digestiva.
  - La región posterior que desemboca en recto y ano.

Una vez separadas las secciones fueron fijadas en líquido de Bouin (Luna, 19) durante un tiempo mínimo de 24 hrs. Posteriormente las piezas fueron sometidas a un proceso de deshidratación y aclaración con alcohol etílico y xilol y fueron incluidas en parafina (Histotec 56 a 58 °C). Finalmente se realizaron cortes longitudinales y transversales a un espesor de 12 micras con un microtomo tipo Minot () y los cortes fueron teñidos con las técnicas a base de Hematoxilina y Eosina (H y E) y Tricomo de Gabe (TG).

#### **V.1.2 DETERMINACION DEL TIEMPO DE TRANSITO INTESTINAL**

La determinación del tiempo de tránsito intestinal permite establecer la ración destinada a los organismos y resulta indispensable para contar con un punto de referencia en pruebas de digestibilidad *in vitro* (Morales, 1996). La ingestión de alimentos formulados ha sido estudiada con la ayuda de pigmentos fluorescentes, los cuales se añaden a las dietas (Morris *et. al.*, 1990).

Para determinar el tiempo de tránsito intestinal se utilizaron 5 caracoles con peso promedio de 2 g y una longitud de concha de 2 cm, los cuales fueron marcados individualmente en la concha y colocados en un acuario de 25 litros. La temperatura se mantuvo constante (26 °C).

El alimento suministrado fue el utilizado por Morales (1996) (Tabla 5.1) el cual contenía un colorante látex fluorescente (magenta y verde) al 2% de la mezcla. Se suministró una ración diaria *ad libitum*, intercalando el color del alimento durante 5 días y se cronometró el tiempo desde la ingestión hasta el momento de iniciar la expulsión de heces del color correspondiente.

**Tabla 5.1** Composición de las dietas utilizadas para determinar el tiempo de tránsito intestinal.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>%</b>
Harina de Pescado	30
Pasta de Soya	5.59
Harina de Camarón	4
Harina de Trigo	47.85
Gluten de Trigo	5
Aceite de Pescado	3
Lecitina de Soya	1.7
Mezcla Vitaminica	0.1
Monofosfato de Sodio	2.5

## ***V.2 CARACTERIZACION DE LAS PRINCIPALES ACTIVIDADES ENZIMATICAS DEL APARATO DIGESTIVO.***

### ***V.2.1 OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO***

Se dispuso de un lote de 15 caracoles de 2.0 cm de longitud los cuales se mantuvieron durante una semana con la dieta base, para ser sacrificados y preparar de manera extemporánea los extractos. Los caracoles una vez anestesiados fueron disectados a 4 °C, separando la boca, glandulas salivales y esófago: la glándula digestiva; y el intestino, para elaborar de esta manera 3 extractos. Cada región del aparato digestivo fué homogenizada durante 15 minutos con un Potter-Elveham con 7 ml de buffer Tris - HCl 10 mM (pH 7.3) a 4 °C y posteriormente centrifugados a 8000 g durante 30 min. a la misma temperatura. El sobrenadante fué filtrado y almacenado en alicuotas de 1.5 ml en nitrógeno líquido. Estas fueron utilizadas como extracto enzimático en las pruebas para la determinación de actividad enzimática.

Adicionalmente se determinó la cantidad de proteína en los extractos por el método de Bradford (1976). Como proteína estándar se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) en concentraciones de 10 a 100 µg en 0.2 ml de buffer Tris-HCl, 10 mM (pH 7.3), las lecturas fueran realizadas a 595 nm.

## **V.2.2 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL**

Se utilizó el método propuesto por Kunitz (1946), modificado por Clark *et al.* (1986), el cual propone la utilización de una solución al 1 % de sustrato. Dicha solución se realizó a base de caseína, ovoalbúmina, albúmina bovina (BSA) o hemoglobina. La solución se realizó en diferentes buffers para obtener el pH deseado. Los buffer utilizados fueron Acetato-HCl, 0.1M en un rango de pH 1 a 5.2, Citrato-Fosfato 0.1M en pH 2.2 a 8.0 y buffer Carbonato en un rango de pH de 9.2 a 10.7. El método de preparación de estos buffers, así como los utilizados en otras pruebas se presenta en el apéndice "A".

La mezcla realizada para la determinación de la actividad proteolítica consistió en 0.5 ml de sustrato con 0.5 ml de buffer y 0.1 ml de extracto enzimático, la mezcla fue incubada a 37 °C durante un periodo de 1 a 2 hrs. Posteriormente se le agregó 2 ml de ácido Tricloracético (TCA) frío al 5% y fue mantenida a 2 °C durante 30 min para detener la reacción. Ulteriormente se centrifugó a 3500 rpm. durante 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. en un espectrofotómetro Beckman 700. Un blanco fue preparado en condiciones similares con el único cambio en el momento de añadir el ácido tricloracético, el cual fue agregado a la mezcla antes de iniciar la incubación.

La actividad enzimática fue expresada en porcentaje, como actividad relativa en función de la máxima actividad utilizando la absorbancia a 280 nm como una medida directa, o mediante la comparación con una curva estándar de tirosina y expresando la actividad enzimática en este caso, como la cantidad de tirosina liberada por minuto por mg de proteína en el extracto.

La actividad proteolítica total también se determinó utilizando azocaseína (Galgani y Nagayama, 1986) como sustrato en un rango de pH de 5 a 12. La mezcla de reacción consistió en 1 ml. de azocaseína 0.2% con 1 ml. de buffer Citrato-Fosfato o Carbonato y 0.1 ml de extracto enzimático incubado a 37 °C a diferentes tiempos. Posteriormente se agregaron 2 ml de TCA y se mantuvo la mezcla a 2 °C durante 30 min. Se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. y el sobrenadante se mezcla en proporción 1:1 con Hidróxido de Sodio 1N. Finalmente se midió la absorbancia a 420 (432) nm.

La caseína y azocaseína fueron utilizadas a pH 5 - 12, mientras que para la actividad de tipo pepsina se utilizó hemoglobina a pH 2 - 5 (Anson, 1938). La ovoalbumina y BSA fueron utilizadas a todos los rangos de pH.

#### V.2.4 ACTIVIDADES PROTEOLITICAS ESPECIFICAS

El procedimiento para cada enzima consistió en mezclar 0.5 ml de sustrato con 0.1 ml de extracto enzimático y 0.5 ml de buffer para adecuar el pH. La reacción se realizó en una celda de cuarzo, en un espectrofotómetro Beckman DU 650, con controlador de temperatura. Esta se llevó a cabo a 37 °C. La actividad enzimática fué registrada mediante el cambio en absorbancia durante 10 min. a partir de un valor establecido de longitud de onda para cada sustrato. La actividad fué expresada como unidades enzima (u.e.) por miligramo de proteína en el extracto, siendo equivalente 1 u.e. a un cambio de 0.001 en absorbancia. La enzimas probadas, así como los sustratos utilizados para su determinación y el método de referencia se presentan en la tabla (5.2).

Tabla 5.2.- Sustratos y metodos utilizados en la determinación de enzimas proteoliticas.

ENZIMA	SUSTRATO	BUFFER	A° nm	METODO
Tripsina	Na-p-tosil-l-arginina methyl ester (TAME) 0.001M	Tris 0.1M (pH 7.4) con CaCl <sub>2</sub> 0.01M	247	Hummel (1959)
Tripsina	N-benzoil-arginina pNitroanilida (BAPNA) 2mM	Tris 50 mM (pH 8.4) con CaCl <sub>2</sub> 20mM	405	Erlanger (1961)
Quimiotripsina	N-benzoil-l-tirosina ethil ester (BTEE) 0.001M	Tris 0.1M (pH 7.4) con CaCl <sub>2</sub> 0.01M	254	Hummel (1959)
Quimiotripsina	N-glutaril-fenilalanina pNitroanilida (GPNA) 2mM	Tris 50 mM (pH 8.4) con CaCl <sub>2</sub> 20mM	405	Lauff y Hofer (1984)
Aminopeptidasa	L-leucinamida 0.125 M	Tris 0.1M (pH 7.4) con CaCl <sub>2</sub> 0.01M	238	Clark <i>et al.</i> (1986)
Aminopeptidasa	L-leucina pNitroanilida (LNA) 2mM	Tris 50 mM (pH 8.4) con CaCl <sub>2</sub> 20µM	405	Lauff y Hofer (1984)
Carboxipeptidasa A	Hippuril-l-fenilalanina 0.001M	Tris-HCl 0.025M(pH 7.5), NaCl 0.5M	254	Folk y Schirmer (1963)
Carboxipeptidasa B	Hippuryl-l-arginina 0.001 M	Tris-HCl 0.025M(pH 7.5), NaCl 0.5M	254	Folk <i>et al.</i> (1960)



### **V.2.3 ACTIVIDAD AMILASICA**

Se determinó la actividad amilásica utilizando placas de agar 1%(w/v) mezclado con una solución de almidón al 1%. A las placas de 2.5 mm de espesor se les realizaron perforaciones de 2.5 mm. de diámetro en las cuales se depositaron 10 µl. de extracto enzimático. Las placas se incubaron durante un periodo de 6 a 24 horas, posteriormente fueron prensadas y teñidas con una solución de yodo para revelar los zonas claras producto de la digestión del almidón por la amilasa.

## **V.3 DETERMINACION DE LOS REQUERIMIENTOS PROTEICOS POR EL METODO DOSIS-RESPUESTA**

### **V.3.1 CONDICIONES PARA LA REALIZACION DE LOS BIOENSAYOS:**

Se efectuaron dos bioensayos para observar la respuesta en crecimiento de los caracoles a dietas con diferentes niveles de proteína y energía. Durante una fase preliminar se comparó un alimento de origen vegetal con un alimento balanceado combinando en el mismo diseño experimental el efecto en crecimiento de dos raciones de alimento y tres tallas de caracoles. En el bioensayo principal se utilizaron dietas puras con la finalidad de establecer una aproximación de los requerimientos cuantitativos de los niveles de proteína y energía. Los bioensayos tuvieron una duración de 28 días con una evaluación intermedia a los 14 días

La infraestructura en la cual se llevaron a cabo los bioensayos es la siguiente:

Acuarios de cristal con capacidad de 25 l, equipados con un sistema de aereación. Se mantuvo una temperatura promedio de 26 °C. Se llevo a cabo un recambio de agua diario del 80% del volumen. De manera cotidiana se registró la temperatura, número de caracoles por acuario y cantidad de alimento consumido, el cual fué estimado en base a los restos en el acuario.

Cada tratamiento se inició con un número de 30 caracoles repartidos al azar en tres acuarios, los individuos fueron distribuidos de tal manera que no se presentaran diferencias

significativas en los pesos de los caracoles entre los tratamientos y entre acuarios, lo cual fué determinado mediante un análisis de varianza.

Las variables que se consideraron para evaluar los tratamientos fueron las siguientes:

**-LONGITUD TOTAL DE LA CONCHA.**

**-TASA DE CRECIMIENTO**

**T.C = (Peso Final -- Peso Inicial / Peso Inicial) (100)**

**-FACTOR DE CONVERSIÓN ALIMENTICIA.-** Definido como los gramos de alimento consumido, por cada gramo de peso corporal ganado.

**F.C.A. = Alimento Ingerido\* / Peso Ganado\*\***

**-TASA DE EFICIENCIA PROTEICA (PER).-** Definida como los gramos de peso ganado por gramo de proteína consumida.

**PER = Peso Ganado\*\* / Proteína Consumida**

\* Como alimento seco suministrado; \*\* peso fresco.

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, utilizando los paquetes Statgraphics y SPSS. Para determinar la existencia de eventuales diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un ANOVA con  $P = 0.05$  y posteriormente una prueba de comparación de medias por el método de Duncan para determinar la existencia de los grupos homogéneos entre los tratamientos.

### ***V.3.2 CRECIMIENTO CON DIETAS ARTIFICIALES.***

Se realizó un bioensayo para establecer el efecto en el crecimiento probando dos tipos de alimento, en combinación con la cantidad de alimento diario (ración) y la talla de los caracoles (Tabla 5.2). El diseño experimental se estableció como un modelo factorial mediante el cual se probó el efecto de 3 factores principales definidos de la siguiente forma:

## Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano

1). **Tipo de alimento:** Se probaron dos alimentos siendo el primero lechuga deshidratada (A1), este alimento es recomendado en la literatura para el mantenimiento de estos organismos (Estebenet & Cazzaniga, 1992) y el segundo fué un alimento peletizado para peces (A2), formulado a base de harina de pescado y soya. A estos alimentos se les realizó un análisis bromatológico (AOAC, 1990 ) para conocer el contenido de nutrientes.

2). **Nivel de alimentación:** Se consideraron dos niveles a) 2% de la biomasa (R1) y b) 6% de la biomasa (R2), suministrados en una ración al día.

3). **Edad de los caracoles:** se consideraron tres tallas de caracoles al inicio del bioensayo: la talla uno (T1) con una longitud total de la concha de 0.75 cm y un peso promedio de 0.121 g ; la talla dos (T2) con una longitud de 1.26 cm y un peso promedio de 0.519 g y la talla tres (T3) con una longitud de 1.93 cm y un peso de 1.64 g.

Mediante la combinación de estos factores se constituyeron 12 tratamientos de la siguiente forma:

Tabla 5.3 Tratamientos utilizados para comparar alimentos

ALIMENTO	TALLA (mm.)			RACION
	(T1) 7.5	(T2) 12.6	(T3) 19.3	
(A1) LECHUGA DESHIDRATADA	T1 A1 R1	T2 A1 R1	T3 A1 R1	(R1) 2%
	T1 A1 R2	T2 A1 R2	T3 A1 R2	(R2) 6%
(A2) ALIMENTO P/PECES	T1 A2 R1	T2 A2 R1	T3 A2 R1	(R1) 2%
	T1 A2 R2	T2 A2 R2	T3 A2 R2	(R2) 6%

### V.3.3 REQUERIMIENTOS DE PROTEINA Y ENERGIA.

Se elaboraron 8 dietas puras en base a un diseño de dos factores mediante la combinación de 4 niveles de proteína y dos de energía (Tabla 5.4). Se utilizó caseína como fuente de proteína, dextrina como fuente de carbohidratos, aceite de pescado como fuente de lípidos, carragaenina y agar como ligantes, sacarosa como atrayente (Harada et.al., 1994), celulosa como elemento de

relleno y una premezcla de vitaminas y minerales. La composición de las dietas se muestra en la Tabla 5.5. Los niveles de energía fueron ajustados a 250 y 350 Kcal/100g de alimento, mediante variaciones en la cantidad de dextrina, la cual fue estimada en base a los valores de energía metabolizable de 5 cal/g de proteína, 4 cal/g de carbohidrato y 9 cal/g de lípidos (Shiau y Chou, 1991). Para la elaboración de las dietas los ingredientes fueron mezclados y peletizados en un molino de carne para formar pellets de 2mm de diámetro y secados durante 8 minutos a 100 °C.

Tabla 5.4.- Nivel de proteína y energía de las dietas puras. El número entre paréntesis representa los miligramos de proteína por kilocaloría en el alimento.

<b>% DE PROTEINA</b>	<b>(E1) 250 Kcal/100g</b>	<b>(E2) 350 Kcal/100g</b>
<b>(P1) 10</b>	E1P1 (40)	E2P1 (28.5)
<b>(P2) 20</b>	E1P2 (80)	E2P2 (57.1)
<b>(P3) 30</b>	E1P3 (120)	E2P3 (85.7)
<b>(P4) 40</b>	E1P4 (160)	E2P4 (114)

Se utilizaron caracoles con un peso promedio de 1.27g (= 0.52) y una talla de 1.63 cm (= 0.23), los cuales fueron distribuidos para alcanzar una densidad de 10 caracoles por acuario de 20 litros para tener una biomasa promedio de 12.7g (= 1.5) por acuario. Se utilizaron tres acuarios por dieta. Se comprobó mediante un ANOVA ( $p < 0.05$ ) la nula existencia de diferencias significativas en los pesos iniciales entre e intra tratamientos.

La ración diaria de alimento fué de 4% de la biomasa, suministrándose en una sola porción, tomando como referencia la cantidad utilizada por Benavides (1994), quien marca un consumo diario del 2 al 8% con dietas con 30% de proteína y 330 kcal./100g durante las tres fases de crecimiento. Los caracoles fueron pesados cada 7 días para ajustar gradualmente la ración de alimento. Diariamente fueron extraídos los desechos mediante recambios de agua del 30% al inicio hasta un 80% al final del ensayo.

*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Tabla 5.5.- Composición de las dietas (\*gramos de ingrediente por 100g de alimento).

Dieta	E1P1	E1P2	E1P3	E1P4	E2P1	E2P2	E2P3	E2P4
Energía Kcal/100g	250	250	250	250	350	350	350	350
Proteína%	10	20	30	40	10	20	30	40
E/P mg/kcal	40	80	120	160	28.5	57.1	85.7	114
Caseína*	11.1	22.2	33.3	44.4	11.1	22.2	33.3	44.4
Dextrina*	43.3	30.8	18.3	5.8	68.3	55.8	43.3	30.8
Aceite de pescado*	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Celulosa*	27.1	28.5	29.9	31.3	2.1	3.5	4.9	6.3
Agar *	2	2	2	2	2	2	2	2
Carragaenina*	3	3	3	3	3	3	3	3
Maltosa*	1	1	1	1	1	1	1	1
Vitaminas y Minerales*	10	10	10	10	10	10	10	10

## **VI. RESULTADOS**

### **VI.1. CARACTERISTICAS DEL APARATO DIGESTIVO**

#### **VI.1.1 ANATOMIA DEL APARATO DIGESTIVO**

La estructura anatómica del intestino se muestra en la Figura 6.1. En esta se puede apreciar la masa bucal, la cual presenta dos pares de palpos sensoriales en el exterior, mientras que en el interior se encuentran la rádula y dos pares de cartílagos con músculos alrededor de estos.

La masa bucal se continua hacia el esófago, el cual es estrecho en su parte anterior y se encuentra rodeado por las glándulas salivales, mientras que la parte posterior del esófago tiene la capacidad de dilatarse para almacenar el alimento ingerido (buche). El esófago se une a la glándula digestiva sobre la que se forma el estomago el cual produce un doblés del tubo digestivo con un área muscular bien definida, un parte calcárea y una región del intestino anterior en la que desemboca la glándula digestiva.

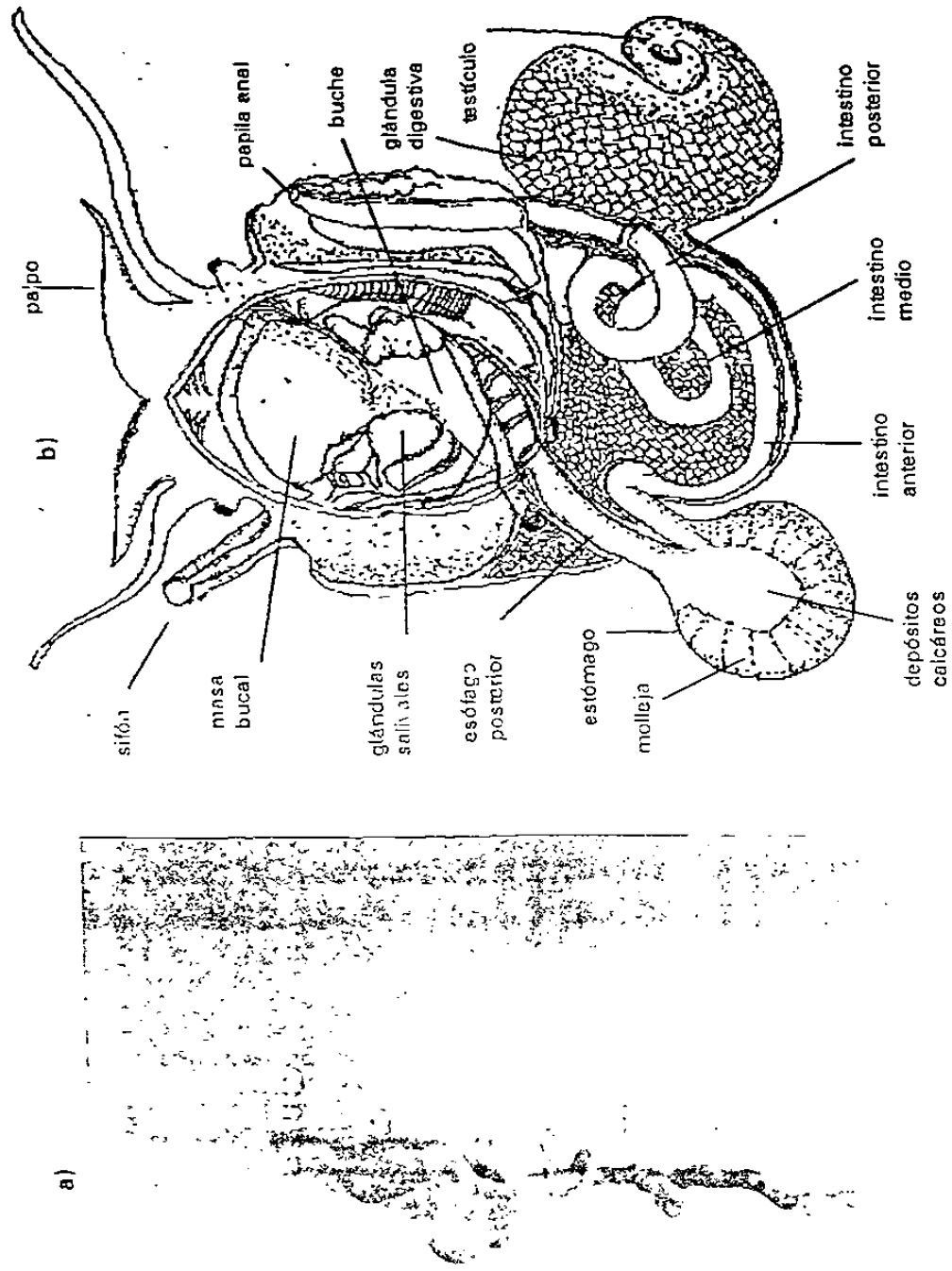
La glándula digestiva es el órgano de mayor tamaño y se ha reportado que en los organismos adultos la mitad de la masa llega a ser ocupada por el órgano reproductor (ovario o testículo) (Andrews, 1965).

El estomago se continua en el intestino siendo este más delgado en su parte anterior y a los lados del intestino posterior se encuentran una branquia y el riñón, para posteriormente desembocar en el ano.

#### **VI.1.2 HISTOLOGIA DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES DEL APARATO DIGESTIVO**

Las preparaciones histológicas de la masa bucal muestran zonas queratinizadas correspondientes a la zona de la rádula (a), la cual se caracteriza por la presencia de una túnica muscular bastante prominente (b), un epitelio pseudoestratificado con células caliciformes

Figura 6.1 Morfología del aparato Digestivo del caracol manzano: a) Fotografía del tracto digestivo; b) Esquema de su localización en el caracol (tomado de Andrews, 1965).



intercaladas entre las células (c). Este epitelio presenta una submucosa discreta de tejido conectivo (e). Además se observa tejido cartilaginoso (f) entre el músculo y tejido glandular (g) en la parte dorsal (Figura 6.2).

Figura 6.2 Microfotografía de corte longitudinal de la masa bucal. Aumento 400X, tinción con Tricomo de Gabe.



El esófago está recubierto por un epitelio pseudoestratificado ciliado de revestimiento (h, detalle en recuadro), con una túnica muscular delgada (i). entre el epitelio y la túnica muscular se encuentra una submucosa de tejido conectivo (j). En los lados de la porción anterior del esófago se observa el tejido correspondiente a las glándulas salivales (k), el cual está formado por conductos (l) y células de tipo seroso (m) con apariencia de tejido exócrino (Figura 6.3).

Figura 6.3 Microfotografía de corte transversal del esófago anterior. Aumento 100X, tinción con Hematoxilina y Eosina.





*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

El estómago está cubierto por un epitelio de revestimiento cilíndrico simple queratinizado (n) con una túnica muscular prominente (o). El estómago se encuentra junto a la glándula digestiva en la que se pueden apreciar hacinos glandulares (p) y conductos de secreción (q) (figura 6.4).

Fig. 6.4 Microfotografía que muestra corte transversal de estómago y glándula digestiva. Aumento 23X, tinción con Tricromo de Gabe.

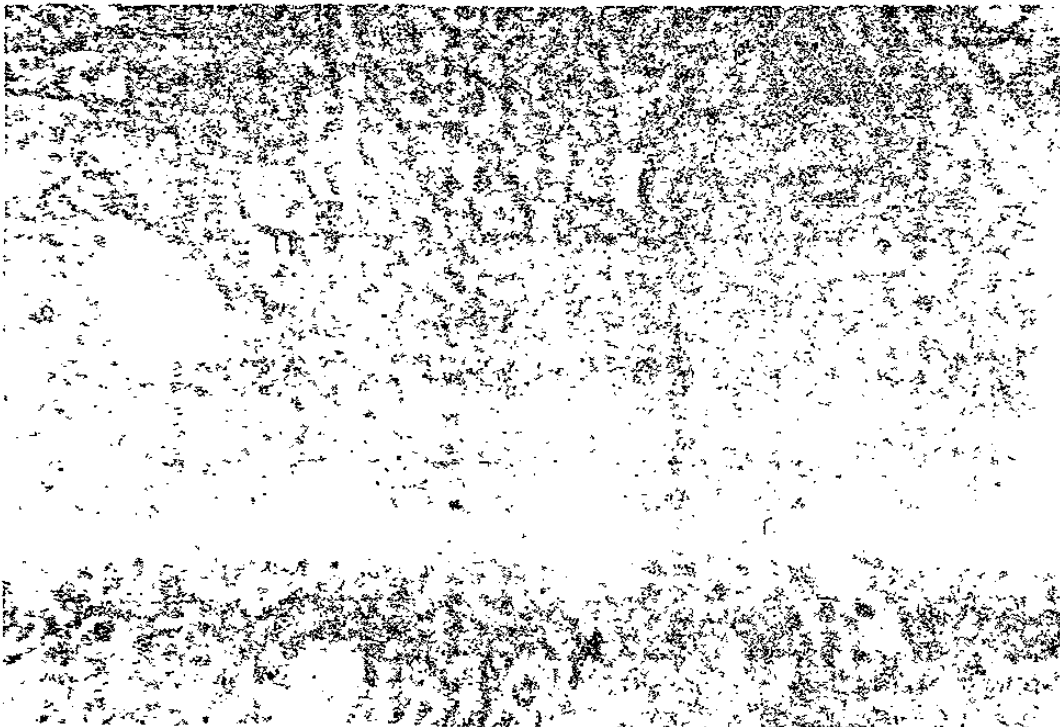


Glándula Digestiva.- En los hacinos de la glándula digestiva (figura 6.5) se observan células secretoras y células excretoras. En las células secretoras se aprecian una gran cantidad de granulos que son pigmentados por la Hematoxilina (r), estas células, que se encuentran cerca de la luz de los conductos (s), probablemente son las responsables de la absorción en fases alternadas con la secreción. Las células excretoras (t) se caracterizan por la presencia de una gran vacuola, la cual se presenta como una imagen translúcida con tinción de Hematoxilina y Eosina y con el Tricromo, dentro de esta vacuola se puede apreciar una concreción del material de excreción (u) (Figura 6.6).

Figura 6.5 Microfotografía de glándula digestiva, Aumento 100X, tinción con Hematoxilina y Eosina.



Figura 6.6 Microfotografía de hacinado glandular. Aumento 400X, tinción con Tricomo de Gabe.



*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

En el intestino no se observaron diferencias histológicas marcadas entre las tres regiones estudiadas (anterior, medio y posterior). El epitelio de revestimiento en las dos primeras secciones es cilíndrico ciliado (v), con pocas células caliciformes (figura 6.7). Se puede observar que la zona del intestino posterior el epitelio cilíndrico es simple (w) y que existe un mayor número de células caliciformes (x) (Figura 6.8). Se puede advertir que la submucosa es de tejido conectivo con abundantes células de apariencia adiposas (y) y la presencia de una túnica muscular (z).

Figura 6.7 Microfotografía de intestino anterior. Aumento 400X, tinción con Hematoxilina y Eosina.

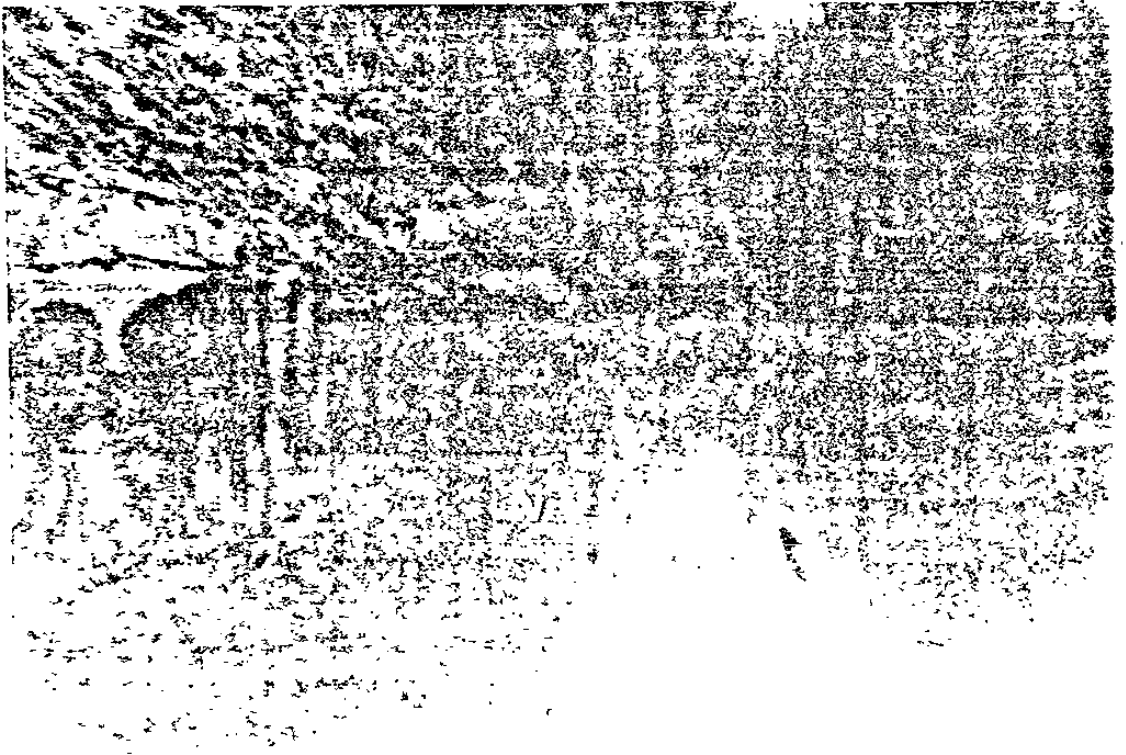


Figura 6.8 Corte longitudinal de intestino posterior. Aumento 23X, tinción con Hematoxilina y Eosina.



### VI.1.3 TIEMPO DE TRANSITO INTESTINAL.

Los tiempos registrados para cada caracol se presentan en la tabla 6.1 en la cual se muestra que el tiempo promedio fué de 229.8 minutos (Desviación Estandar 23.13).

Tabla 6.1 Tiempo de transito intestinal en minutos por organismo.

No de Caracol	Día 1	Día 2	Día 3	MEDIA
1	237	257	249	247.6
2	212	215	195	207.3
3	262	235	210	235.6
4	221	210	233	221.3
5	242	270	200	237.3
				229.8 = 23.13

## **VI.2 ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL APARATO DIGESTIVO**

### **VI.2.1 EXTRACTO ENZIMATICO**

Los extractos obtenidos como se indicó en el punto V.2.1 del capítulo de Metodología fueron mantenidos en nitrógeno líquido para evitar pérdida de actividad ya que al realizar una prueba de conservación se encontró que los extractos presentaban solo 1/4 de la actividad, con respecto a extractos frescos, al ser almacenados durante 24 hrs. a -10 °C, mientras que la pérdida de actividad era nula en aquellos almacenados en nitrógeno líquido. Por otra parte, al existir la eventual posibilidad de variaciones debido a la condición fisiológica en que se encontraban los organismos, todos los extractos utilizados fueron realizados a partir de un lote único de caracoles mantenidos en condiciones similares. Los extractos fueron almacenados en alícuotas de 1.5 ml en nitrógeno líquido hasta su utilización.

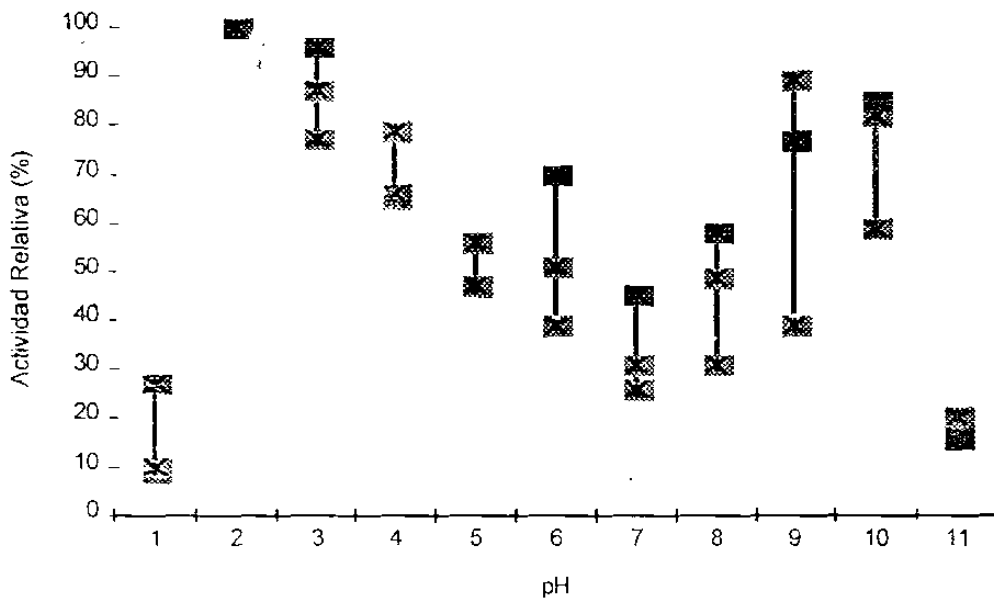
*Determinación de la concentración de proteína.-* Para determinar la concentración de proteína en el extracto enzimático se utilizó el método de Bradford (1976). Mediante esta técnica se determinó la concentración de los extractos enzimáticos los cuales presentaron 0.367 mg de proteína por ml para extractos de la sección anterior del tracto digestivo (masa bucal, glándulas salivales y esófago); 1.58 mg de proteína por ml en extractos de la sección media (glándula digestiva y estómago) y 0.41 mg de proteína por ml en extractos de sección posterior (intestino).

### **VI.2.2 ACTIVIDAD PROTEOLITICA TOTAL.**

Con la finalidad de utilizar un sustrato que cubriera una gama suficientemente amplia de los valores de pH se utilizaron dos tipos de albúmina: de huevo y albúmina de suero bovino (BSA). Para este efecto se utilizó un buffer Acetato de sodio 0.1M en un rango de pH 1 a 4, un buffer Citrato - Fosfato 0.2M en un rango de pH de 2.2 a 8 y un buffer Carbonato 0.1M para un

rango de pH de 9 a 11. Con los sustratos antes mencionados se obtuvo actividad proteolítica total en una gama de pH de 1 a 11, siendo más marcada a pH = 2 y pH = 9 como se puede observar en la figura 6.9.

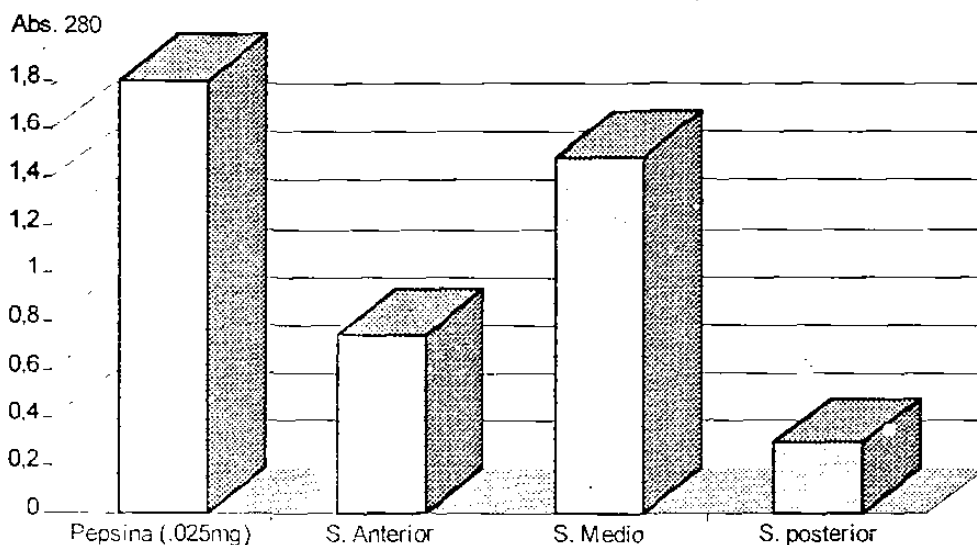
Figura 6.9 Efecto del pH en la actividad proteolítica de extracto de aparato digestivo completo sobre ovoalbumina, incubado durante 2 hrs. a 37 °C.



*Actividad proteolítica ácida.*- La actividad proteolítica a pH ácido fué confirmada utilizando Hemoglobina como sustrato, mediante el método de Anson (1938), para las diferentes regiones del tracto digestivo. Se obtuvo una mayor actividad en extractos de la sección anterior (boca, esófago y glándulas salivales) así como en la sección media (glándula digestiva y estómago), mientras que la actividad en sección posterior (intestino) fué muy baja. (figura 6.10)

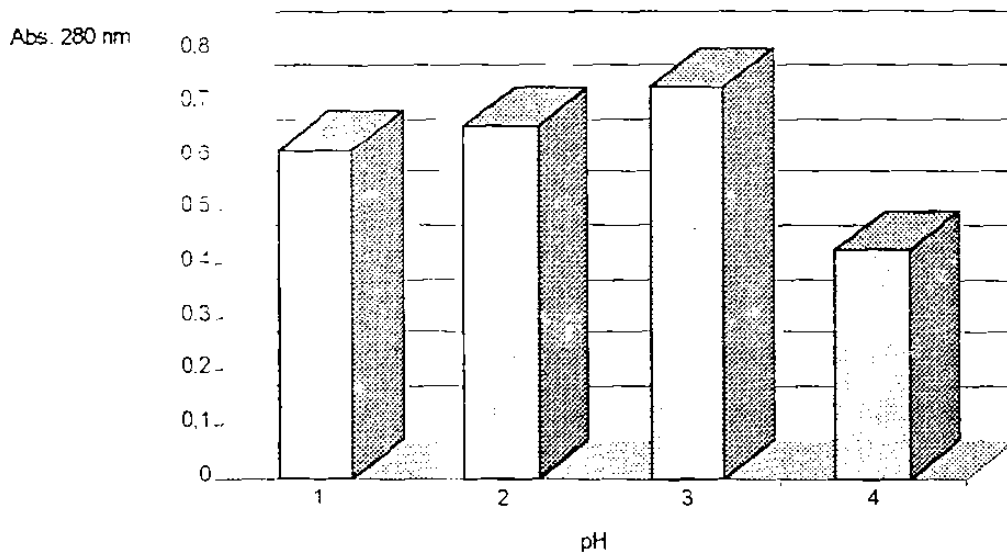
*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Figura 6.10 Hidrólisis de Hemoglobina a pH 2.3 de las secciones del aparato digestivo en comparación con pepsina bovina. la reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 1 hr.



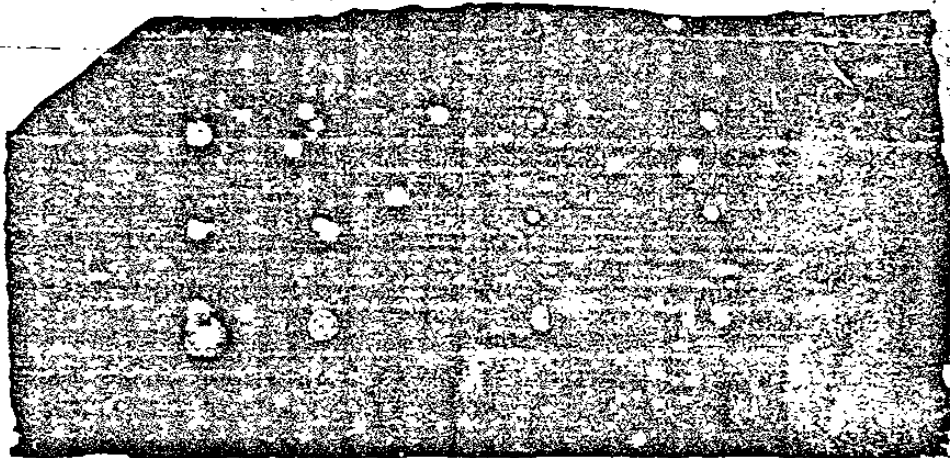
Considerando que la actividad en la sección media del tracto digestivo (glándula digestiva y estómago) fué la más importante se realizó una prueba a diferentes valores de pH obteniendo una máxima actividad en valores cercanos a pH 3 y disminuyendo a pH 4 (figura 6.11).

Figura 6.11 Actividad proteolítica ácida de la sección media del aparato digestivo con hemoglobina como sustrato.



Otra técnica empleada para observar la actividad proteolítica a pH ácido fué la relativa a la utilización de placas de agar utilizando caseína como sustrato adoptando el método de Lowenstein e Ingild (1976). Con esta técnica fué posible confirmar la actividad proteolítica ácida, a partir de extractos de la sección anterior (Boca, Glándulas salivales y Esófago) así como en la sección media (Glándula digestiva y estomago) del tracto digestivo (figura 6.12).

Figura 6.12 Placas de agar con caseína incubadas durante 24 hrs. a temperatura ambiente, con buffer acetato con fuerza ionica 0.1 y pH 3.0. Las dos filas superiores corresponden de izquierda a derecha a extractos de intestino anterior, medio, medio y posterior, la fila inferior a estándar de pepsina en diluciones 1:1 iniciando con 25 mg/ml.



**Actividad proteolítica neutra y básica.-** Una técnica similar fué utilizada para observar la actividad proteolítica a pH neutro (7.4) (figura 6.13) y alcalino (9.0) (figura 6.14) empleando el método de difusión radial utilizando tripsina como estándar según el protocolo propuesto por Sandholm *et. al.* (1976).

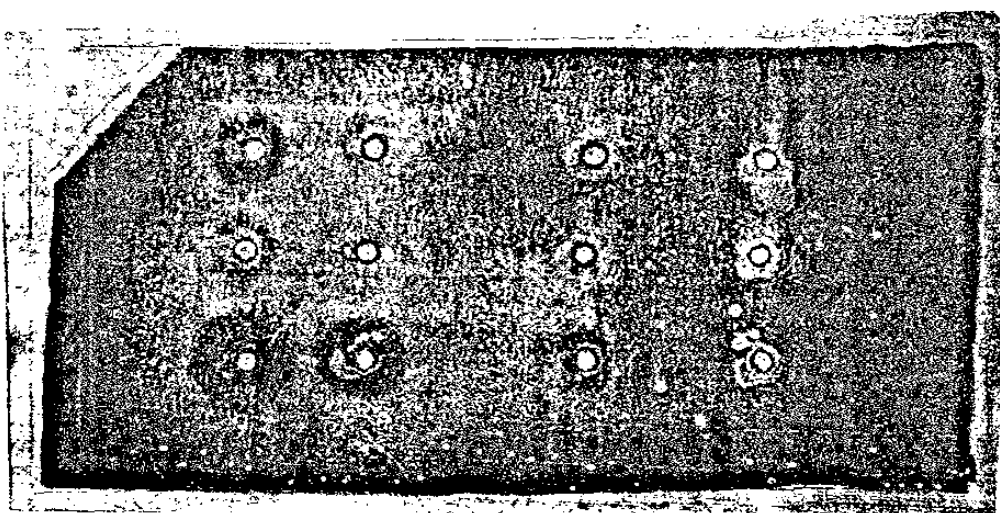


## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Figura 6.13 Placa de agar con caseína en buffer citrato-fosfato .012 M (pH 7.4) incubado por 24 hrs. a temperatura ambiente. Las primeras dos filas corresponden a los extractos de intestino anterior, medio, medio y posterior. La última fila corresponde a un estándar de tripsina bovina en diluciones 1:1 de izquierda a derecha con una concentración inicial de 0.25 mg/ml.



Figura 6.14 Placa de agar con caseína en buffer tris-HCl 0.01 M (pH 9) incubado durante 24 hrs a temperatura ambiente. La disposición de los extractos y estándar de tripsina son similares a la figura 6.22.

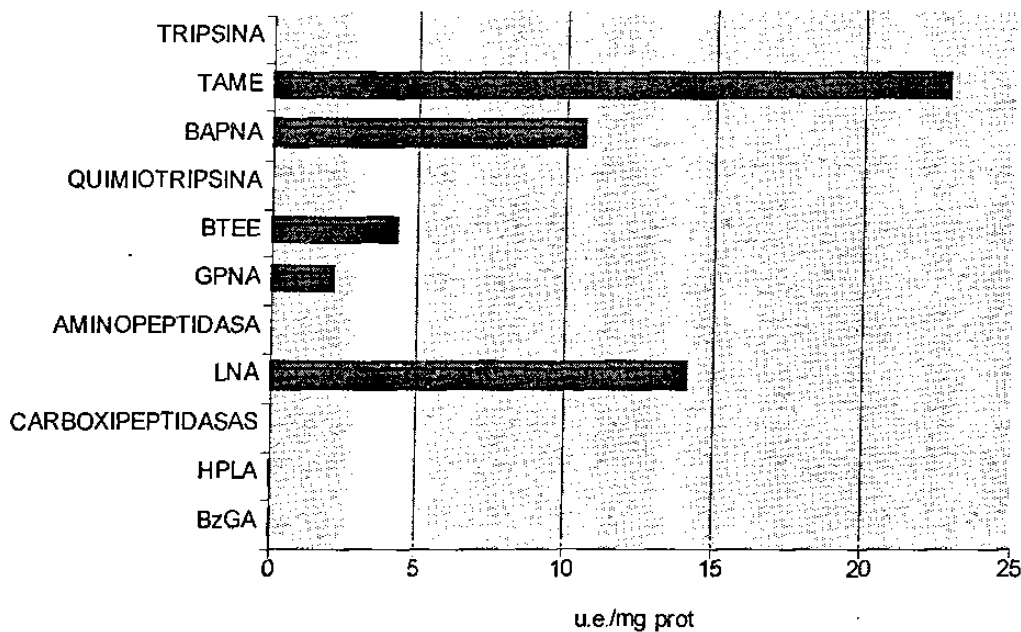


### **VI.2.3. ACTIVIDADES PROTEOLITICAS ESPECIFICAS**

Las enzimas proteolíticas detectadas se resumen en la Figura 6.15 y fueron de tipo tripsina y quimiotripsina, utilizando dos diferentes sustratos para cada una de estas, también se pudo detectar actividad de tipo aminopeptidasa, mientras que la actividad de tipo carboxipeptidasa no

fué posible detectarla bajo las condiciones experimentales utilizadas. Todos estos resultados fueron obtenidos a partir de extractos de la sección media del tracto digestivo, mientras que para las otras secciones no se obtuvieron resultados positivos.

Figura 6.15 Comparación de la actividad de las proteasas ensayadas en extractos de la sección media del tracto digestivo. La actividad se expresa en unidades enzima (D Abs/min) por mg de proteína en el extracto.



### TRIPSINA

La actividad de tipo tripsina fué detectada por el método de Hummel (1959), utilizando TAME (Na-p-tosil-l-arginina methyl ester) como sustrato, con un estimado de 22.8 unidades enzima por mg de proteína en extractos de la sección media del tracto digestivo (glándula digestiva y estómago), mientras que con extractos de las otras regiones del aparato digestivo no se detectó este tipo de actividad. Por otra parte utilizando BAPNA (N-benzoil-arginina p-Nitroanilida) como sustrato (Erlanger, 1961), se registró una actividad en extractos de la sección media del tracto digestivo con una estimación de solo 10.64 unidades enzima por mg de proteína.

### *QUIMIOTRIPSINA*

Pudo detectarse actividad de tipo quimiotripsina, por el método de Hummel (1959), utilizando BTEE (N-benzoil-tirosina ethil ester) como sustrato, registrándose 4.35 unidades enzima por mg de proteína en extractos de la sección media del tracto digestivo (glándula digestiva y estómago). Mientras que al utilizar GPNA (N-glutaril-fenilalanina p-Nitroanilida) como sustrato (Lauff y Hofer, 1984) se determinó una actividad en extracto de la sección media del tracto digestivo de 2.12 unidades enzima por mg de proteína.

### *AMINOPEPTIDASA*

Para detectar actividad de tipo aminopeptidasa se utilizó LNA (L-leucina p-Nitroanilida) como sustrato (Lauff y Hofer, 1984) con el cual se obtuvo resultados positivos en extractos de la sección media del tracto digestivo (glándula digestiva y estómago) registrándose una actividad de 14.06 unidades enzima por miligramo de proteína.

### *CARBOXIPEPTIDASA*

No se detectó actividad de tipo carboxipeptidasa en ninguno de los extractos de aparato digestivo de caracol, lo anterior utilizando HPLA (L-hipuril-fenilalanina) y BzGA (L-hipuril-arginina) como sustratos para carboxipeptidasa A y B respectivamente (Folk y Schimer, 1963; Folk et al. 1960).

### **VI.2.4. ACTIVIDAD AMILASICA.**

La actividad de tipo amilasa fué determinada utilizando placas de agar con almidón 1 %, con buffer acetato de sodio 0.05M (pH 6.0 ) en periodos de incubación de 6, 12 y 24 hrs. y posteriormente teñidos con lugol. Mediante este procedimiento se observó mayor hidrólisis del almidón a partir de extractos del intestino medio (glándula digestiva), mientras que en los extractos de intestino anterior y posterior fué reducida (Figura 6.16)

*Carlos Aguilera Gonzalez*

Figura 6.16 Placas de agar con almidón mostrando halos claros producto de la actividad amilasica de extractos de aparato digestivo y amilasa comercial. a) 12 hrs de incubación; b) 24 hrs de incubación.

a)

b)



### VI. 3. REQUERIMIENTOS PROTEICOS

#### VI.3.1 CRECIMIENTO CON DIETAS ARTIFICIALES

##### TIPO DE ALIMENTO

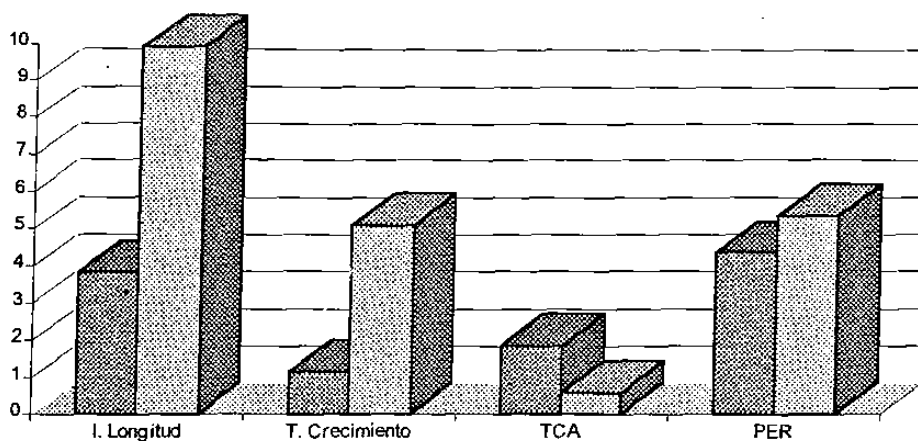
El resultado de los análisis bromatológicos de la lechuga deshidratada y el alimento para peces, utilizados en el bioensayo, se presentan en la Tabla 6.2. En esta se pueden observar principalmente los niveles inferiores de proteína (menor de la mitad), del doble de energía debido a la diferencia en proteína y lípidos, así como un contenido 6 veces mayor de fibra en la lechuga en comparación con la dieta peletizada.

Tabla 6.2 Análisis bromatológico de los alimentos utilizados, los resultados se encuentran en porcentaje de materia seca.

	LECHUGA DESHIDRATADA	ALIMENTO P/PECES
Proteína	15.35	34.83
Lípidos	2.22	3.89
Fibra	12.91	2.25
Cenizas	11.34	9.09
Carbohidratos	58.18	49.94
Energía kcal/100g	292.45	408.92
Proteína/Energía mg/kcal	45.45	85.4

Como se puede apreciar en la Figura 6.17 los tratamientos mostraron diferencias significativas en cuanto a las variables estudiadas al ser comparados mediante una prueba de t de Student en cuanto a incremento de longitud de la concha ( $t = -6.23$ ;  $gl = 30.63$ ;  $P = 0.000$ ) y tasa de crecimiento ( $t = -3.95$ ;  $gl = 18.66$ ;  $P = 0.001$ ) siendo inferior para la lechuga, al mismo tiempo el valor de conversión alimenticia ( $t = 6.35$ ;  $gl = 19.22$ ;  $P = 0.000$ ) fue menor en el caso del alimento para peces lo que indica su mejor utilización. Por otra parte no obstante que las diferencias en la tasa de eficiencia proteica no fueron significativas ( $t = -1.49$ ;  $gl = 33.58$ ;  $P = 0.145$ ), el alimento para peces mostró un PER sensiblemente más elevado que la lechuga deshidratada.

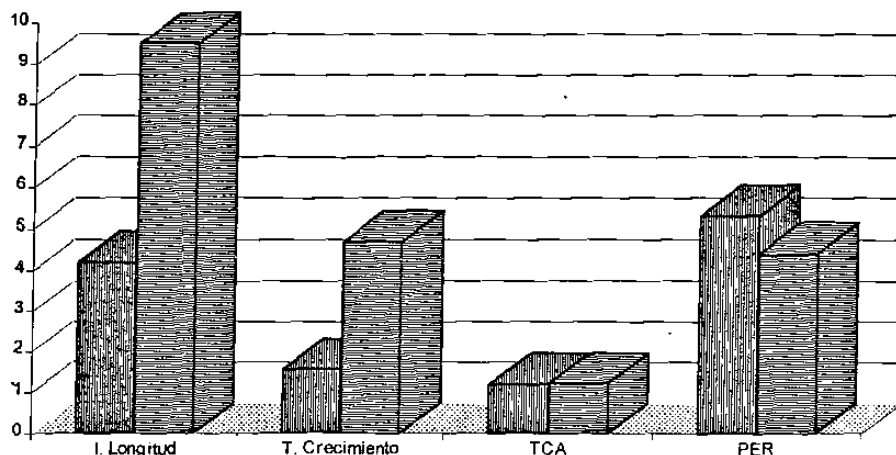
Figura 6.17 Respuesta de los caracoles a dos alimentos. Lechuga deshidratada (■), Alimento p/peces (□).



### NIVEL DE ALIMENTACION

Tomando como base una comparación de medias (t de Student), es posible apreciar en la Figura 6.18 que la cantidad de alimento suministrado fué un factor que presentó efectos muy marcados sobre la tasa de crecimiento ( $t = -2.28$ ;  $gl = 21.55$ ;  $P = 0.009$ ) así como en el incremento de longitud de la concha ( $t = -4.74$ ;  $gl = 31.49$ ;  $P = 0.000$ ), obteniendo valores más altos para aquellos tratamientos que fueron alimentados con un nivel de alimentación del 6 % de la biomasa diariamente. Por el contrario este factor no influyó en la conversión alimenticia ( $t = -0.11$ ;  $gl = 32.7$ ;  $P = 0.909$ ) ni en la tasa de eficiencia proteica ( $t = 1.32$ ;  $gl = 30.28$ ;  $P = 0.197$ ).

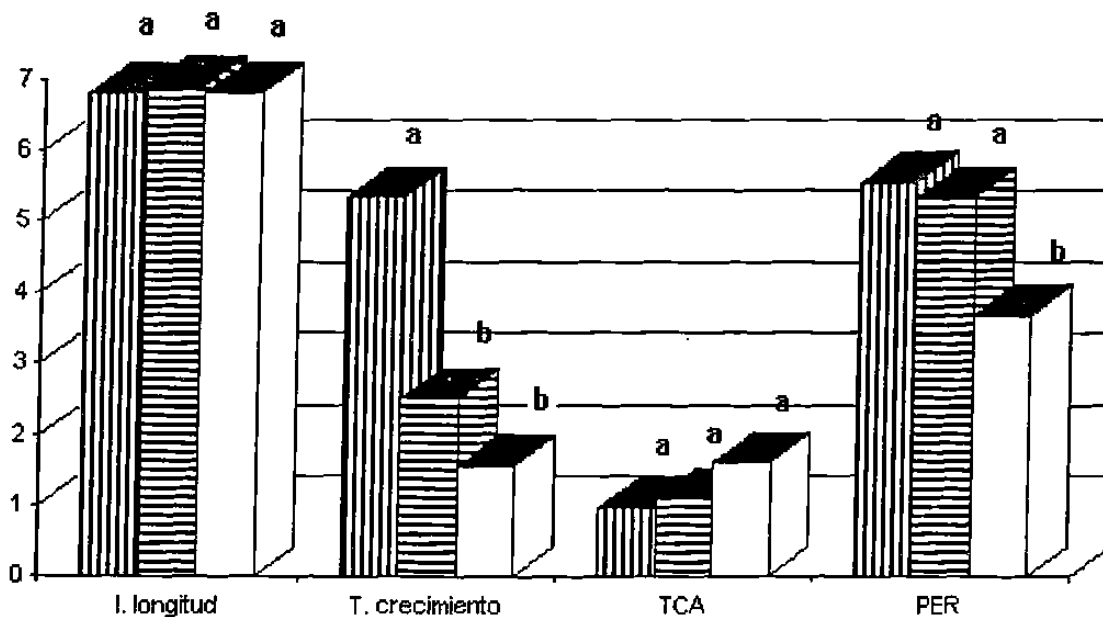
Figura 6.18 Efecto del nivel de alimentación en el caracol manzano. 2% de la biomasa diariamente (■) y 6% (=).



### EDAD DE LOS CARACOLES

Al comparar los resultados de los tratamientos con diferente talla inicial encontramos que estos presentan diferencias significativas en la tasa de crecimiento ( $F= 4.26$ ;  $P=0.0225$ ) siendo esta mayor para la talla inicial de 7.5 mm, mientras que entre las restantes dos tallas no presentan diferencias significativas para esta variable. En el mismo sentido, la tasa de eficiencia proteica fué mejor ( $F= 3.37$ ;  $P=0.0464$ ) para las tallas de 7.5 y 12.6 mm. Por otra parte, como se aprecia en la Figura 6.19, la talla de los caracoles no mostró ninguna influencia significativa sobre el incremento de longitud de la concha ( $F=0.0054$ ;  $P=0.9946$ ) ni en la tasa de conversión alimenticia ( $F= 1.854$ ;  $P=0.1724$ ).

Figura 6.19 Influencia de la talla inicial en el crecimiento. 7.5 mm (||), 12.6 mm (=) y 19.3 mm (//) de longitud total de concha.



Los resultados para cada uno de los efectos principales (tipo de alimento, nivel de alimentación y edad de los caracoles) fueron analizados igualmente mediante un ANOVA multifactorial para determinar la interacciones entre las variables observadas (Tasa de Crecimiento, Incremento de Longitud de la concha, Conversión Alimenticia y Tasa de Eficiencia Proteica) posteriormente, en el caso de encontrar diferencias significativas los grupos homogéneos fueron separados mediante una prueba de rango múltiple de Duncan.

### TASA DE CRECIMIENTO

La tasa de crecimiento, expresada como el porcentaje del incremento en peso, fué la variable que presentó el efecto más marcado para cada uno de los tres factores que se probaron (alimento, ración y talla inicial), obteniéndose diferencias significativas en todas las interacciones como se muestra en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3 ANOVA multifactorial de la tasa de crecimiento.

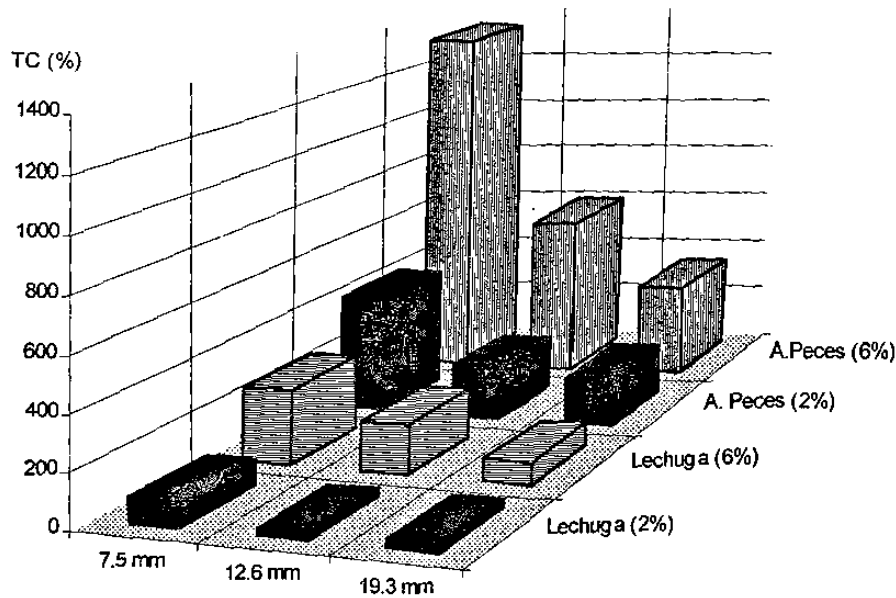
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F	P
Efectos Principales	3189746.021	4	797436.505	141,4	.000
Talla	918207.341	2	459103.670	81,46	.000
Alimento	1406793.674	1	1406793.67	249,6	.000
Ración	864745.007	1	864745.007	153,4	.000
Alimento Vs Talla Vs Ración	989453.421	5	197890.684	35,1	.000
Alimento Vs Talla	418164.907	2	209082.454	37	.000
Talla Vs Ración	280857.341	2	140428.670	24,9	.000
Alimento Vs Ración	290431.174	1	290431.174	51,5	.000
Interacciones de 3 vías	155515.974	2	77757.987	13,7	.000
Alimento Vs Talla Vs Ración	155515.974	2	77757.987	13,7	.000
Explicados	4334715.416	11	394065.038	69,9	.000
Residual	135259.607	24	5,635.82		
Total	4469975.023	35	127713.572		

El máximo crecimiento fué alcanzado al utilizar las tallas inicial de 7.5 mm y utilizando alimento artificial suministrado a un nivel de 6%, como se puede apreciar en la Figura 6.20.



*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Figura 6.20 Tasa de crecimiento, expresada en porcentaje del incremento de peso para los tratamientos con diferente alimento, ración (%) y talla inicial (mm).



Las medias de los tratamientos y su conformación en grupos homogéneos (denotados por literales iguales) al comparar la Tasa de Crecimiento ( $F= 69.92$ ;  $P=0.000$ ) se aprecian en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4 Resultados de Tasa de Crecimiento para tratamientos con diferente alimento, ración y talla inicial. Las literales iguales denotan la pertenencia a grupos homogéneos.

ALIMENTO	TALLA (mm.)			RACION
	(T1) 7.5	(T2) 12.6	(T3) 19.3	
(A1) LECHUGA DESHIDRATADA	95.6 <sup>ab</sup>	26.46 <sup>a</sup>	29.86 <sup>a</sup>	(R1) 2%
	274.3 <sup>cd</sup>	183.6 <sup>bc</sup>	85 <sup>ab</sup>	(R2) 6%
(A2) ALIMENTO P/PECES	429.3 <sup>e</sup>	197.5 <sup>bc</sup>	172.3 <sup>bc</sup>	(R1) 2%
	1331.3 <sup>f</sup>	597.3 <sup>f</sup>	339.3 <sup>de</sup>	(R2) 6%

**INCREMENTO DE LONGITUD DE LA CONCHA**

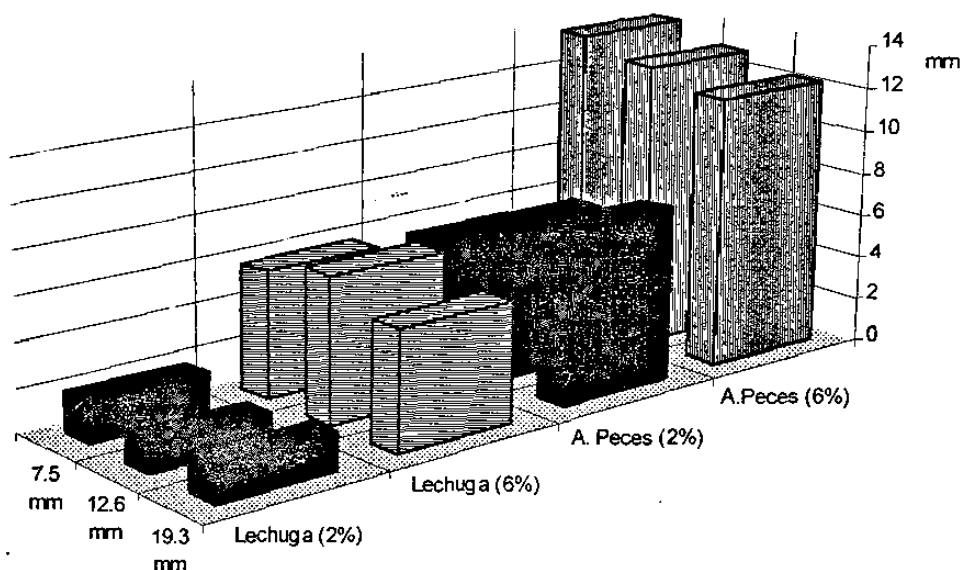
No se presentaron diferencias significativas en cuanto al Incremento de Longitud de concha entre las diferentes tallas iniciales, así como tampoco al considerar la interacción entre la talla inicial y el tipo de alimento. Por otra parte se presentaron diferencias significativas en las restantes interacciones de acuerdo a la Tabla 6.5.

Tabla 6.5 Análisis de varianza multifactorial de la variable incremento de longitud de concha.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F	P
Efectos Principales	583.6	4	145.9	167.59	0.000
Talla	0.21	2	0.1	0.12	0.889
Alimento	334.28	1	334.28	383.99	0.000
Ración	249.11	1	249.11	286.16	0.000
Interacción de 2 vías	15.63	5	3.13	3.59	0.014
Alimento Vs Talla	0.72	2	0.36	0.42	0.665
Talla Vs Ración	6.98	2	3.49	4	0.032
Alimento Vs Ración	7.93	1	7.93	9.11	0.006
Interacciones de 3 vías	6.6	2	3.3	3.79	0.037
Alimento Vs Talla Vs Ración	6.6	2	3.3	3.79	0.037
Explicados	605.83	11	55.08	63.27	0.000
Residual	20.89	24	0.87		
Total	626.73	35	17.91		

En la Figura 6.21 se aprecian los efectos en los 12 tratamientos, el incremento en longitud de concha fué mayor para los tratamientos con alimento para peces al 6 % y no se aprecian diferencias marcadas entre las tallas iniciales con el mismo alimento y nivel de alimentación. Por otra parte, esta variable presentó resultados muy cercanos entre los tratamientos de lechuga al 6 % con los de alimento para peces al 2%

Figura 6.21 Incremento de longitud total de la concha en mm. para caracoles con diferente alimento, ración (%) y talla inicial (mm).



A continuación (Tabla 6.6) se presentan las medias relativas al incremento de longitud de la concha en milímetros y los grupos homogéneos separados por el método de Duncan ( $F=63.26$ ;  $P=0.000$ ).

Tabla 6.6 Medias y grupos homogéneos (literales iguales) de incremento de longitud de concha (mm).

ALIMENTO	TALLA (mm.)			RACION
	(T1) 7.5	(T2) 12.6	(T3) 19.3	
(A1) LECHUGA DESHIDRATADA	1.9 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	1.76 <sup>a</sup>	(R1) 2 %
	5.86 <sup>b</sup>	6.63 <sup>bc</sup>	5.46 <sup>b</sup>	(R2) 6 %
(A2) ALIMENTO P/PECES	5.56 <sup>b</sup>	7.00 <sup>bc</sup>	7.9 <sup>c</sup>	(R1) 2 %
	13.83 <sup>d</sup>	12.93 <sup>d</sup>	12.3 <sup>d</sup>	(R2) 6 %

### TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA

La conversión alimenticia es una variable que no resultó afectada por la cantidad de alimento suministrado (ración), así como tampoco por la interacción de esta con el tipo de alimento. A continuación se presentan los resultados del análisis factorial (Tabla 6.7).

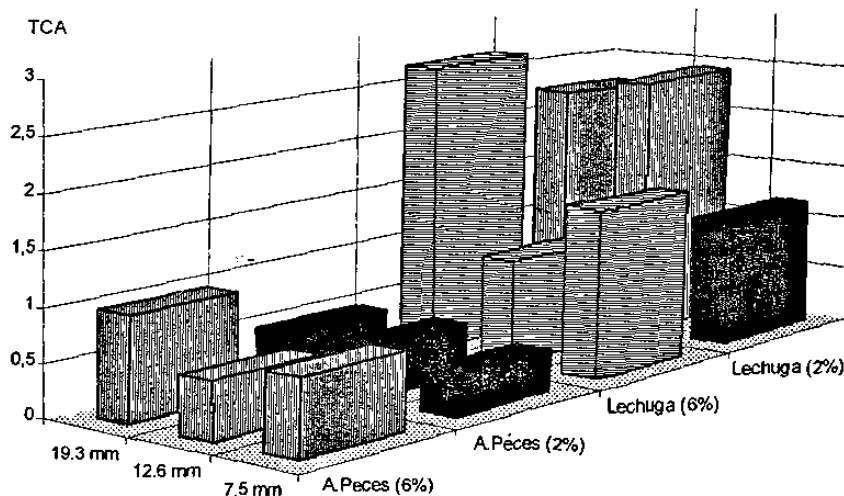
Tabla 6.7 ANOVA multifactorial para la tasa de conversión alimenticia.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F	P
Efectos Principales	17.18	4	4.3	26.22	.000
Talla	2.7	2	1.35	8.22	.002
Alimento	14.48	1	14.48	88.36	.000
Ración	0.01	1	0.01	0.06	.804
Interacción de 2 vías	4.38	5	0.88	5.34	.002
Alimento Vs Talla	1.25	2	0.63	3.82	.036
Talla Vs Ración	2.58	2	1.29	7.87	.002
Alimento Vs Ración	0.55	1	0.55	3.33	.081
Interacciones de 3 vías	1.18	2	0.59	3.6	.043
Alimento Vs Talla Vs Ración	1.18	2	0.59	3.6	.043
Explained	22.74	11	2.07	12.62	.000
Residual	3.93	24	0.16		
Total	26.67	35	0.76		

En la Figura 6.22 se observa que el factor principal que afecta la tasa de crecimiento es el tipo de alimento, obteniéndose mejores resultados en aquellos tratamientos a los que se les proporciono el alimento artificial para peces.

*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Figura 6.22 Tasa de conversión alimenticia (TCA) de los tratamientos con diferente alimento, ración (%) y talla inicial (mm).



Las promedios obtenidos para la Tasa de Conversión Alimenticia y la constitución los grupos homogéneos de acuerdo a la separación de medias por el método de Duncan ( $F= 12.61$ ;  $P= 0.000$ ) se presentan a continuación en la Tabla 6.8

Tabla 6.8 Medias y grupos homogéneos, denotados por literales iguales, de conversión alimenticia.

ALIMENTO	TALLA (mm.)			RACION
	(T1) 7.5	(T2) 12.6	(T3) 19.3	
(A1) LECHUGA DESHIDRATADA	1.19 <sup>bc</sup>	2.45 <sup>e</sup>	2.26 <sup>de</sup>	(R1) 2%
	1.58 <sup>cd</sup>	0.98 <sup>abc</sup>	2.70 <sup>c</sup>	(R2) 6%
(A2) ALIMENTO P/PECES	0.39 <sup>a</sup>	0.49 <sup>ab</sup>	0.486 <sup>ab</sup>	(R1) 2%
	0.703 <sup>ab</sup>	0.526 <sup>ab</sup>	0.97 <sup>abc</sup>	(R2) 6%

**TASA DE EFICIENCIA PROTEICA**

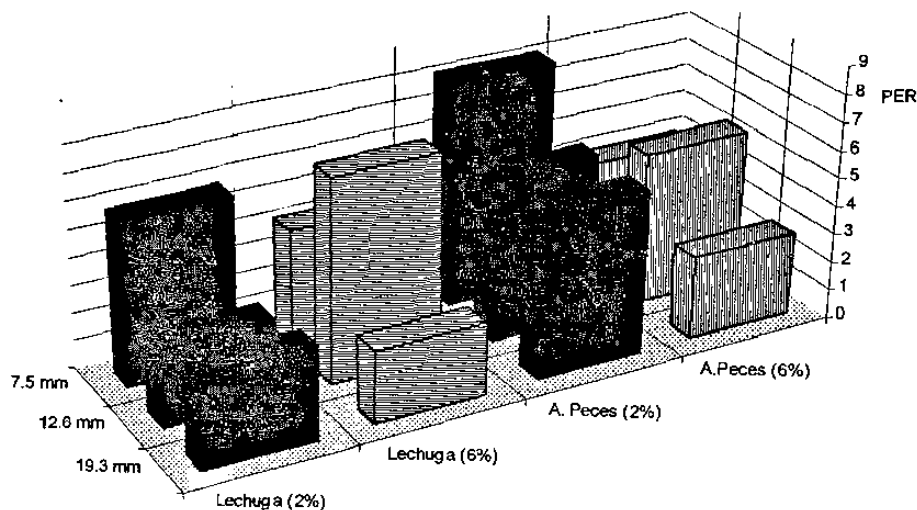
La interacción entre la talla y el tipo de alimento es el factor que no presentó diferencias significativas al analizar la tasa de eficiencia proteica mediante un ANOVA factorial (Tabla 6.9)

Tabla 6.9 ANOVA multifactorial de los resultados de eficiencia proteica.

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADO MEDIO	F	P
Efectos Principales	42.17	4	10.54	6.11	.002
Talla	25.56	2	12.78	7.41	.003
Alimento	9.27	1	9.27	5.37	.029
Ración	7.33	1	7.33	4.25	.050
Interacción de 2 vías	63.83	5	12.76	7.4	.000
Alimento Vs Talla	1.01	2	0.51	0.29	.748
Talla Vs Ración	40.3	2	20.15	11.68	.000
Alimento Vs Ración	22.51	1	22.51	13.05	.001
Interacciones de 3 vías	3.2	2	1.6	0.93	.408
Alimento Vs Talla Vs Ración	3.2	2	1.6	0.93	.408
Explained	109.21	11	9.93	5.75	.000
Residual	41.38	24	1.72		
Total	150.59	35	4.3		

La eficiencia proteica no presentó ningún efecto o tendencia marcado hacia alguno de los factores analizados, aunque en general se observan mejores resultados con los tratamientos a los cuales se les suministró alimento para peces en tallas menores (Figura 6.23).

Figura 6.23 Tasa de eficiencia proteica para tratamientos con diferente Alimento, ración (%) y talla inicial (mm).



*Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

Los grupos homogéneos para los valores de PER en los doce tratamientos se presentan a continuación en la Tabla 6.10 (F=5.75; gl= ; P= 0.0002).

Tabla 6.10 Medias y grupos homogéneos (literales iguales) por el método Duncan (P < .05).

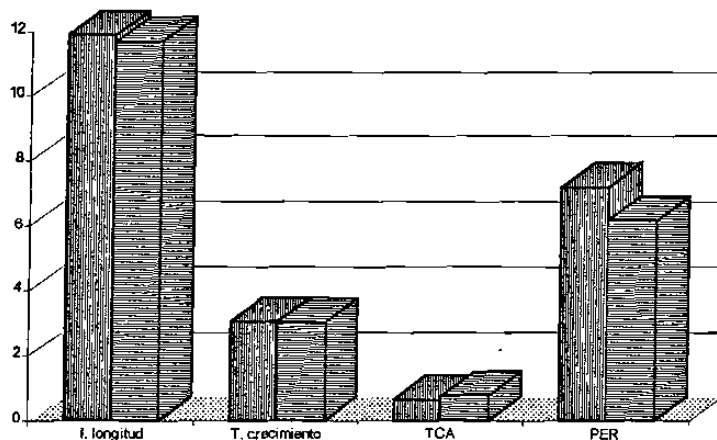
ALIMENTO	TALLA (mm.)			RACION
	(T1) 7.5	(T2) 12.6	(T3) 19.3	
(A1) LECHUGA DESHIDRATADA	5.85 <sup>cdc</sup>	2.83 <sup>a</sup>	3.33 <sup>ab</sup>	(R1) 2 %
	4.18 <sup>abc</sup>	7.27 <sup>de</sup>	2.6 <sup>a</sup>	(R2) 6%
(A2) ALIMENTO P/PECES	8.17 <sup>e</sup>	5.83 <sup>cdc</sup>	5.8 <sup>cdc</sup>	(R1) 2 %
	3.98 <sup>abc</sup>	5.43 <sup>bcd</sup>	2.93 <sup>a</sup>	(R2) 6 %

### VI.3.2 REQUERIMIENTOS DE PROTEINA Y ENERGIA

#### REQUERIMIENTO DE ENERGIA

Los resultados obtenidos con dietas puras conteniendo niveles de energía de 250 y 350 kcal/ 100 g de alimento no presentaron diferencias significativas al ser analizados mediante una comparación de medias (t de student de dos colas) para la tasa de crecimiento ( $t=0.02$ ;  $gl= 19.4$ ;  $P=0.984$ ), incremento de longitud de concha ( $t=0.32$ ;  $gl= 19.64$ ;  $P=0.751$ ), tasa de conversión alimenticia ( $t= -1.57$ ;  $gl= 20.25$ ;  $P=0.133$ ) y tasa de eficiencia proteica ( $t= 1.06$ ;  $gl= 20.6$ ;  $P=0.303$ ) (Figura 6.24).

Figura 6.24 Respuesta de los caracoles a dietas puras con dos niveles de energía. 250 kcal/100g (III) y 350 kcal/100g (=).



#### REQUERIMIENTO DE PROTEINA

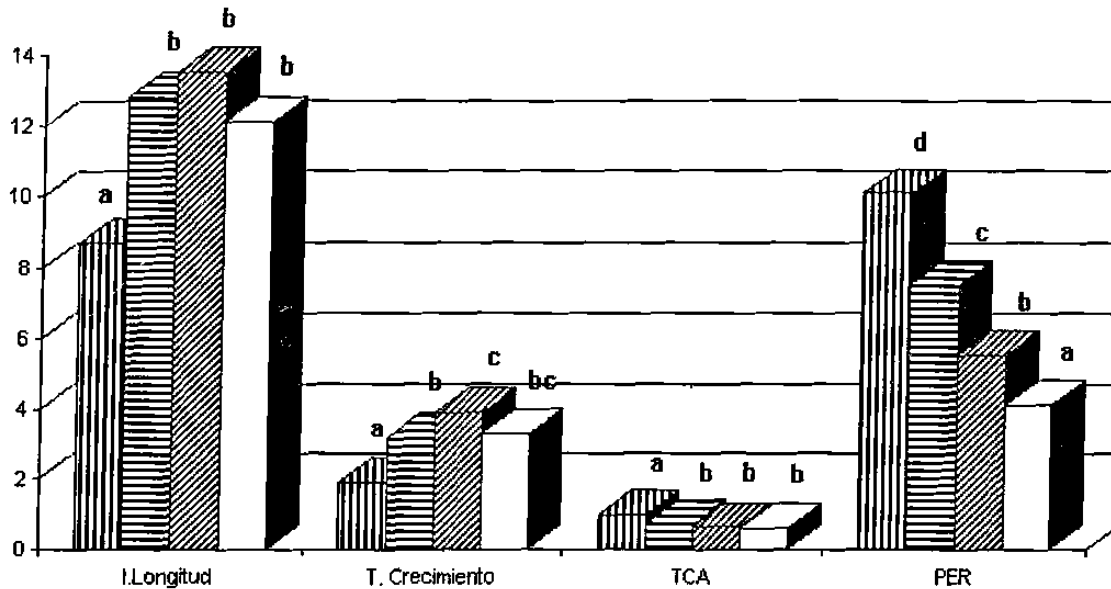
El porcentaje de proteína en las dietas puras presentó efectos marcados en todas las variables observadas, obteniéndose diferencias significativas mediante un ANOVA de una via ( $P < .05$ ). De esta forma encontramos que la tasa de crecimiento ( $F= 12.79$ ;  $gl= 3, 20$ ;  $P= .0001$ ) fué mayor en los tratamientos con 20, 30 y 40 % de proteína con respecto a los tratamientos a los cuales se les suministro 10%. El incremento de longitud de la concha ( $F= 16.24$ ;  $gl= 3, 20$ ;  $P= .000$ ) fué similar en dietas con 20, 30 y 40 % de proteína, pero superior al tratamiento con 10%.



## Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano

La tasa de conversión alimenticia ( $F= 21.21$ ;  $gl= 3, 20$ ;  $P=0.0000$ ) se comporto igual al incremento de longitud. Por otra parte la tasa de eficiencia proteica ( $F= 51.15$ ;  $gl= 3, 20$ ;  $P=0.000$ ) disminuyó gradualmente al incrementar el nivel de proteína (Figura 6.25).

Figura 6.25 Respuesta de los caracoles a dietas con diferente nivel de proteína. 10 % (||), 20% (=), 30 % (//) y 40 % de proteína (\\). Las medias con las mismas literales señalan la pertenencia a grupos homogéneos. IL en mm y TC en  $\Delta$ gr.



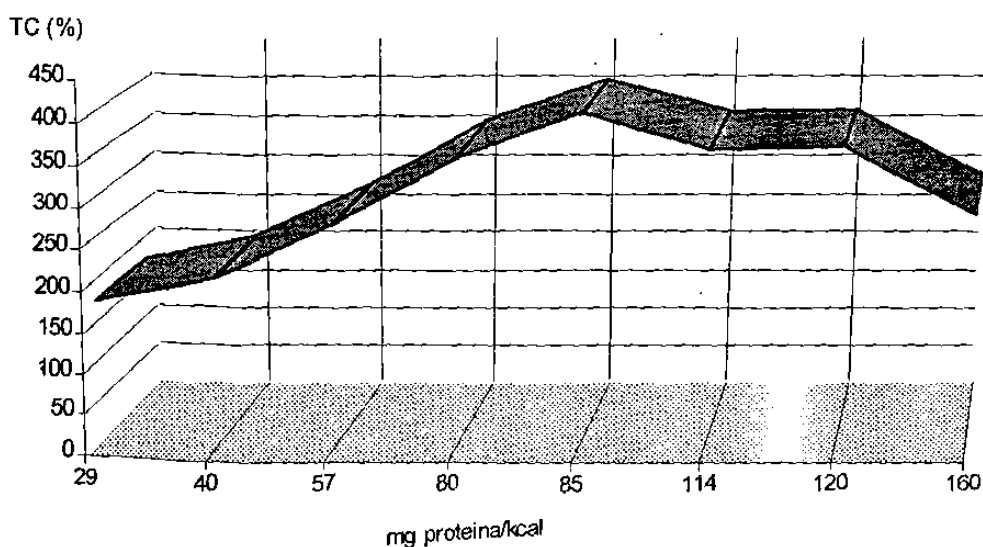
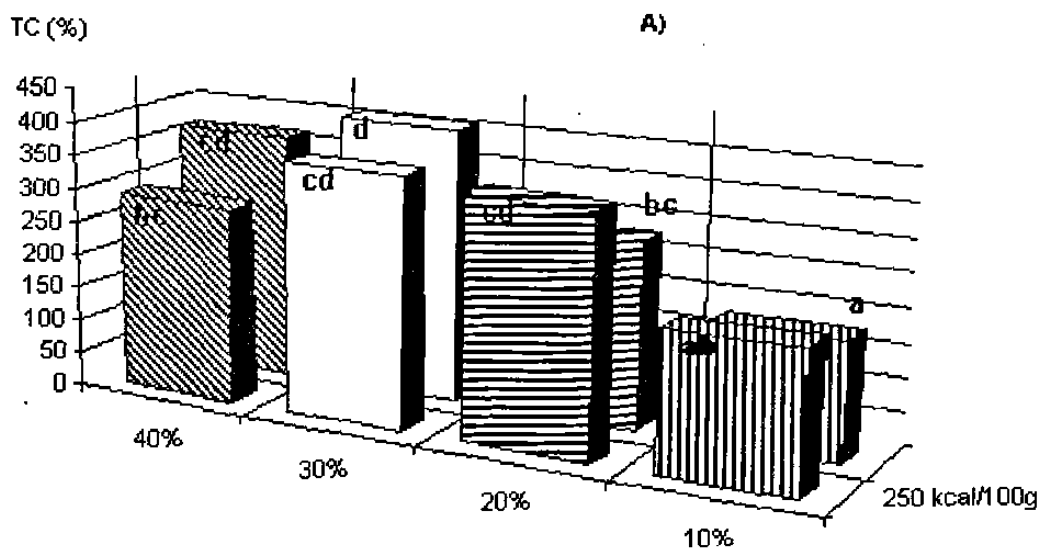
Los anteriores resultados para cada una de las variables, también fueron analizados mediante un ANOVA de una vía ( $P < .05$ ) para los ocho tratamientos y posteriormente se realizó una prueba de rango múltiple (Duncan) para separar los grupos homogéneos. Al mismo tiempo se graficaron los resultados contra la relación proteína/energía.

### TASA DE CRECIMIENTO

Los resultados en cuanto a tasa de crecimiento presentaron diferencias significativas ( $F= 7.85$ ;  $gl= 7, 16$ ;  $P=0.0003$ ), obteniendo mejores resultados en los tratamientos con 20, 30 y 40 % de proteína. Analizando estos datos en base a la relación proteína/energía (mg/kcal) se observa

que la tasa de crecimiento se incrementa proporcionalmente con esta relación hasta una máximo cercano a los 85 mg de proteína/kcal. disminuyendo posteriormente (Figura 6.26).

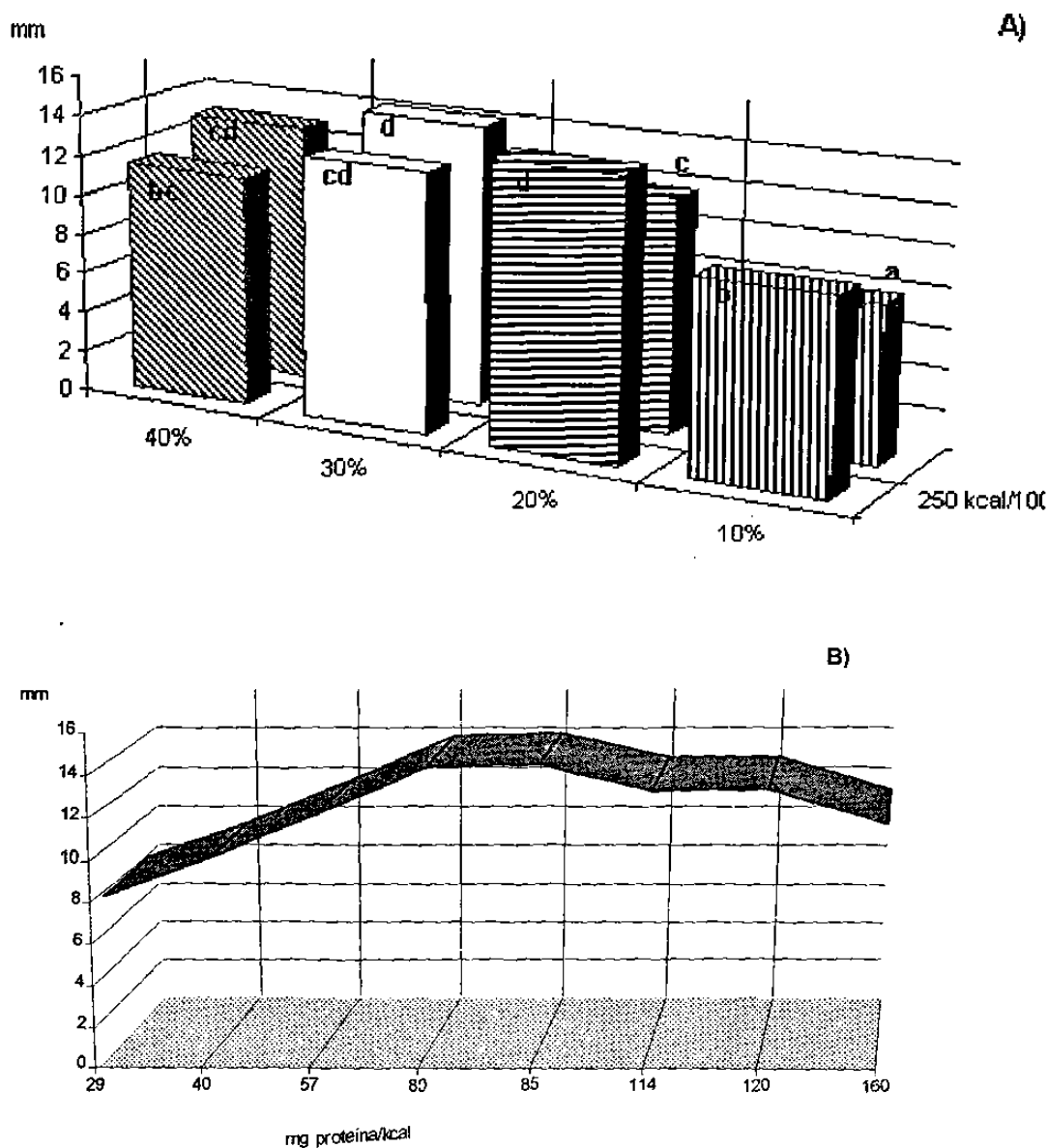
Figura 6.26 Tasa de crecimiento en porcentaje de incremento en peso. A) En los tratamientos, las literales iguales señalan grupos homogéneos. B) Respuesta en base al contenido de mg de proteína por kcal en las dietas.



### INCREMENTO DE LONGITUD DE CONCHA

Esta variable presentó resultados con tendencias similares a la obtenida para la tasa de crecimiento, encontrándose diferencias significativas ( $F= 15.28$ ;  $gl= 7, 16$ ;  $P<0.000$ ). Por otra parte los valores máximos fueron obtenidos con los tratamientos alimentados con dietas conteniendo 80 y 85 mg de proteína/kcal (Figura 6.27).

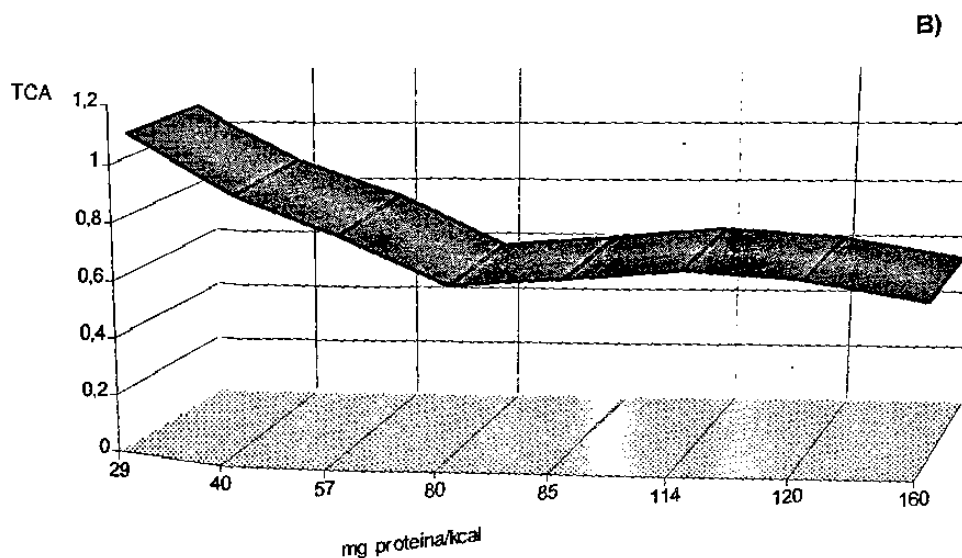
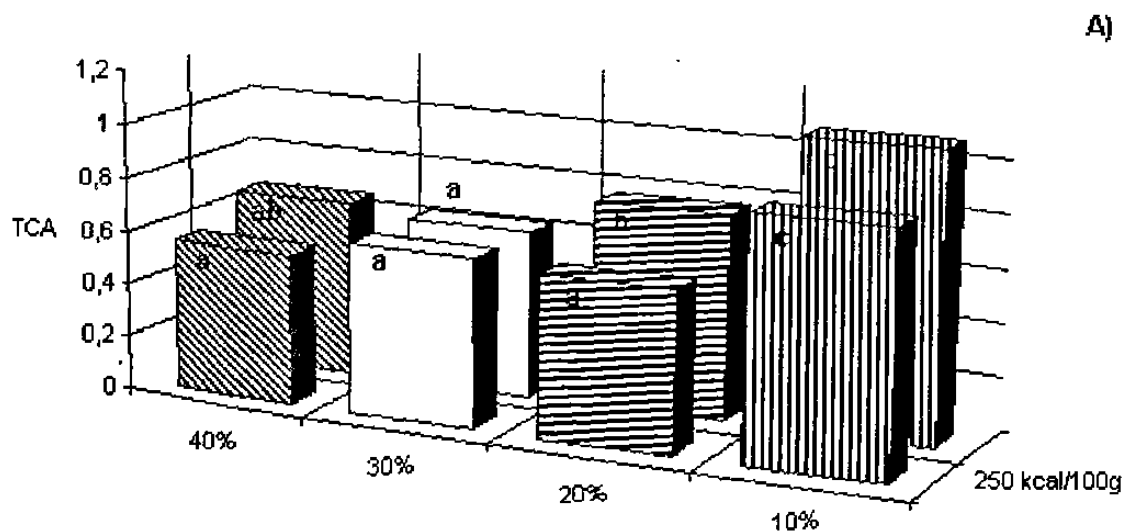
Figura 6.27 Incremento de longitud de concha de los tratamientos con diferente nivel de energía y proteína. A) medias y grupos homogéneos (literales iguales para grupos iguales). B) respuesta de acuerdo al contenido de mg proteína/kcal.



### TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA

Al igual que con las dos anteriores variables se presentaron mejores resultados en cuanto a la conversión alimenticia para los niveles de proteína superiores a 10 % ( $F=20.69$ ;  $gl= 7, 16$ ;  $P\neq 0.000$ ) obteniéndose los mejores valores en terminos de la relación proteína energía a partir de las dietas con 80 mg de proteína por kcal (Figura 6.28).

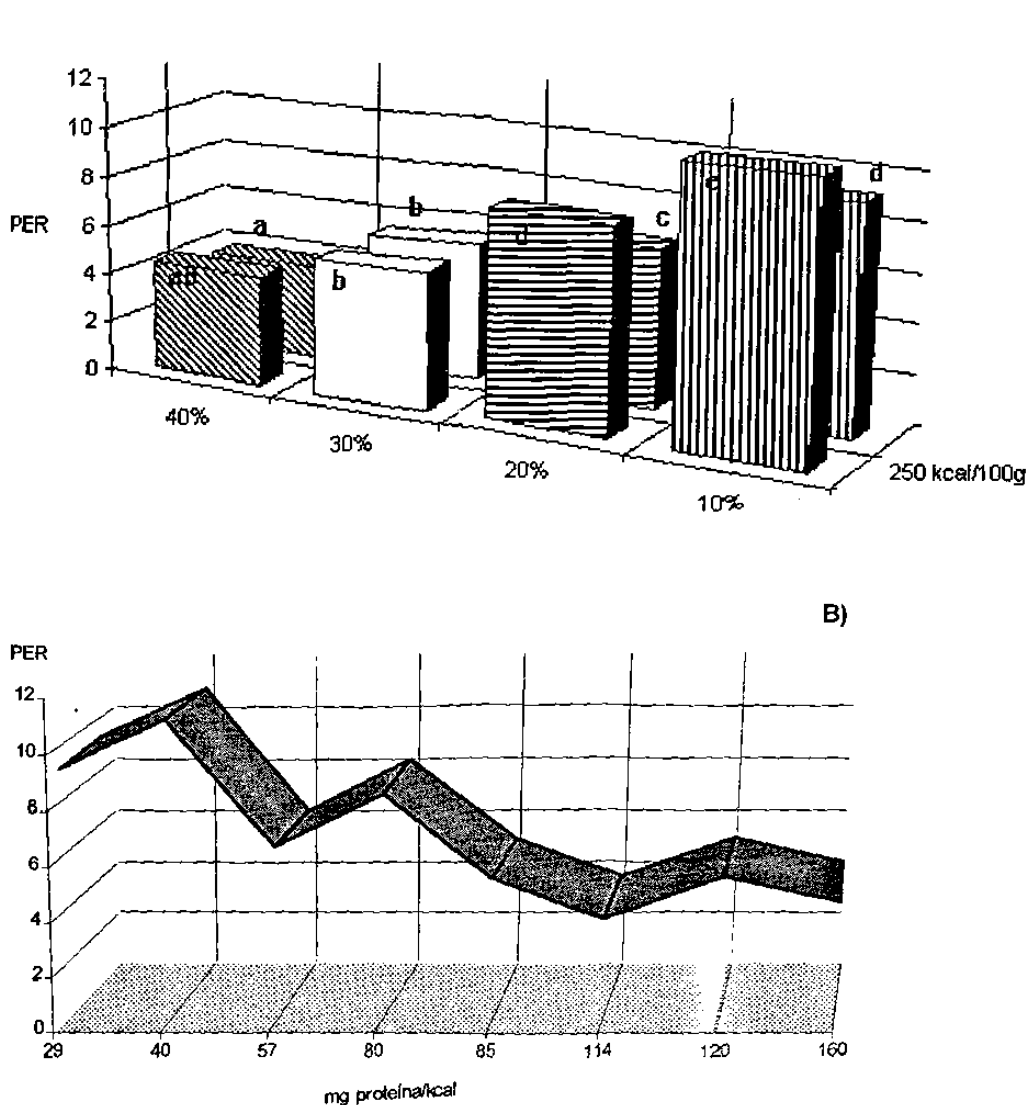
Figura 6.28 Tasa de conversión alimenticia de los tratamientos con diferente nivel de energía y proteína en las dietas. A) medias y grupos homogéneos marcados con literales iguales. B) respuesta de acuerdo a la relación proteína/energía.



### TASA DE EFICIENCIA PROTEICA

La eficiencia proteica presentó diferencias significativas ( $F=55.61$ ;  $gl= 7, 16$ ;  $P\neq 0.000$ ), las cuales se atribuyen principalmente a los niveles de proteína, obteniéndose resultados ligeramente mayores (aunque no significativas) en las dietas conteniendo 250 kcal/100g. Por otra parte al analizar los valores de PER en relación a los mg de proteína por kcal se observa que tiende a disminuir conforme aumenta esta relación (Figura 6.29).

Figura 6.29 Tasa de eficiencia proteica de los tratamientos con diferente nivel de energía y proteína. A) Medias y grupos homogéneos agrupadas por literales iguales. B) respuesta en base a la relación proteína/energía.



## VII. DISCUSION

### VII.1 DESCRIPCION DEL APARATO DIGESTIVO.

Existen muy escasos trabajos sobre la anatomía interna y en particular sobre el aparato digestivo de este tipo de caracoles siendo los más detallados los estudios realizados por Andrews (1964; 1965; 1965a) y Rangel (1988), motivo por el cual esta discusión se avoca principalmente a los resultados expuestos en estos antecedentes.

La radiación adaptativa de los gasterópodos tiene fundamento en las modificaciones que ha venido experimentando la masa bucal y principalmente la radula, lo cual les ha permitido abordar nuevos ambientes y los cambios de alimento que con estos se suscitan (Purchon, 1977). De esta forma las estructuras presentes en la masa bucal, así como las variaciones que presentan, se encuentran directamente relacionadas con el tipo de alimento, de aquí la gran variedad de adaptaciones que presentan los gasteropodos: raspadores de superficie, chupadores de contenido celular, cortadores de fronda, cazadores béntonicos, carroñeros, ecto y endoparasitos, colectores de depositos orgánicos y colectores de materia suspendida (Barnes, 1977).

En el caso de *Pomacea sp.* las observaciones realizadas en el presente estudio, así como las efectuadas por Rangel (1988) y Andrews (1965) coinciden con la presencia de palpos y una estructura radular de tipo teniogloso en la masa bucal lo que concuerda con una alimentación herbívora, Sin embargo, estas estructuras al no encontrarse altamente especializadas, les permiten tener acceso a otro tipo de alimento, tal como lo indican Cazzaniga y Estebenet (1985) quienes indican las diferentes formas en que estos caracoles pueden adaptarse para explotar diversas fuentes de alimento disponible. Por otra parte, la radula de tipo teniogloso de los prosobranquios, la cual esta constituida por un diente central, uno lateral y dos dientes marginales, ha sido considerado como el tipo de radula que ha tenido mayor éxito adaptativo hacia diversas formas de alimentación en los gasterópodos (Kohon, 1983).

Las observaciones de las glándulas localizadas en la cavidad bucal concuerdan con la descripción realizada por Andrews (1965), quien señala que estas facilitan el paso del alimento. Adicionalmente las secreciones de estas glándulas también son utilizadas para aglutinar pequeñas

## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

partículas en suspensión durante la alimentación por corriente ciliar (Cazzaniga y Estebenet, 1985).

Por otra parte la presencia de glándulas salivales, las cuales desembocan en la cavidad oral, indican que la digestión del alimento inicia desde el momento en que este es ingerido y triturado por la rádula.

La capacidad de distensión del esófago con fines de almacenar el alimento se ajusta a la descripción de Andrews (1965). No obstante, cabe hacer notar que esta estructura correspondería a la descripción del intestino anterior realizada por Rangel (1988). Cabe señalar, esta bolsa o "buche" además de almacenar alimento tiene como función regular su flujo hacia el estomago.

La importante túnica muscular y el epitelio queratinizado en el estomago indican que en este sitio continua la degradación mecánica del alimento en concordancia con lo descrito por Andrews (1965), quien además señala la presencia eventual de granos de arena, por lo cual se puede asumir que esta estructura es en forma y función semejante a una molleja. Por otra parte en esta misma región desembocan los ductos provenientes de la glándula digestiva, los cuales canalizan secreciones enzimáticas, lo que permite la digestión extracelular al momento en que el alimento se incorpora al estómago. Cabe señalar que estas secreciones pueden incorporarse al alimento desde que este se encuentra almacenado en el esófago (Andrews, 1965).

Las observaciones del tejido de la glándula digestiva muestran la marcada actividad de este órgano en la producción de secreciones digestivas y la excreción (por el citoplasma granular de las células y la presencia en los conductos de material similar). Por otra parte, Andrews (1965) menciona que la glándula digestiva es igualmente el principal sitio de absorción de los productos solubles de la digestión extracelular, función que realizan las mismas células secretoras en fases alternas.

De acuerdo a las observaciones de los autores antes mencionados el intestino no presenta evidencias de absorción de nutrientes, siendo su función principal la acumulación, compactación y conducción del material no digerido proveniente del estomago (el cual esta formado por las partículas de mayor tamaño que no fueron digeridas y que pasan al intestino sin entrar en la glándula digestiva) así como de los productos de excreción (se puede notar que las concreciones vacuolares son conspicuas) expulsados por células especializadas localizadas en la glándula digestiva. Sin embargo, el transporte de nutrientes, aminoácidos (Dean et. al., 1987) y

carbohidratos (El-Shaikh et. al., 1993), a través del intestino a sido demostrado en otros gasterópodos, aunque solo como un mecanismo secundario, siendo la glándula digestiva el principal sitio donde se realiza esta actividad.

En la primera sección del intestino el material tiene una consistencia más fluida y puede ser desplazado por movimiento ciliar, pero a medida que este es compactado en forma de pellets, por medio de la adición de mucus producido por las células caliciformes, abundantes en la región posterior del intestino, las heces son expulsadas por peristalsis.

De acuerdo a lo anterior podemos resumir el funcionamiento digestivo de la siguiente forma:

Una vez que el alimento es percibido por los palpos sensoriales este es ingerido, lo cual se puede llevar a cabo cortando fragmentos de vegetales, raspando superficies duras, ingiriendo fragmentos de tejido animal proveniente de organismos capturados o en descomposición o bien acumulando partículas en suspensión mediante corriente ciliar y adición de mucus.

Una vez que el alimento se encuentra en la cavidad bucal se le incorpora mucus de las glándulas que se encuentran en la boca así como las secreciones provenientes de las glándulas salivales. Posteriormente el alimento es conducido a través del esófago anterior, mediante movimiento ciliar o por peristalsis, hasta el buche en donde es compactado, almacenado, cubierto por más mucus, en esta probablemente se le agregan secreciones provenientes de la glándula digestiva.

Pequeñas cantidades de alimento son conducidas de forma intermitente (con la finalidad de concordar con la fase secretora de la glándula digestiva) hasta el estomago en donde es macerado por movimiento de la túnica muscular y con la contribución de las enzimas conducidas hasta esta región se produce la digestión extracelular.

Los productos solubles de la digestión en el estomago son conducidos hacia la glándula digestiva en donde son absorbidos.

Las partículas no digeridas en el estomago pasan hacia el intestino las cuales, en conjunto con los productos de excreción acumulados en las concreciones vacuolares provenientes de la glándula digestiva, son compactadas y mediante la adición de mucus se forman pellets de heces que son finalmente expulsados por el ano.



### **TIEMPO DE TRANSITO INTESTINAL**

El tiempo de transito parece estar influenciado por las características de la dieta, en particular por el contenido de fibra (siendo inversamente proporcional al contenido de esta). Por otra parte también está relacionado con el tipo y la actividad de las enzimas digestivas de tal forma que un transito rápido implica la necesidad de enzimas más específicas y con mayor actividad (Munilla y Stark, 1989). En este sentido al utilizar una dieta artificial con un menor contenido de fibra, en comparación con un alimento vegetal, se incrementa el tiempo de transito, permitiendo que el alimento tenga un mayor tiempo de digestión.

## **VII.2. ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL APARATO DIGESTIVO**

La determinación de la actividad enzimática se ve afectada por una gran cantidad de factores como son: la edad de los organismos (ontogenesis enzimática) (Munilla y Stark, 1989; Baragi y Lovel, 1986; Clark *et. al.*, 1986; Lauff y Hofer, 1984; Kamarudin *et. al.*, 1994), el estado fisiológico (Munilla y Stark, 1990; Dabrowski *et. al.*, 1992), forma de conservar y obtener el extracto enzimático (Chiou *et. al.*, 1991), el tipo de sustrato utilizado (Gildberg, 1988; Jany, 1976), las soluciones buffers utilizadas (Jany, 1976), la temperatura y tiempo de incubación así como las concentraciones de las soluciones (Sarath *et. al.*, 1989).

La cantidad de enzimas sintetizadas puede variar de manera independiente y el nivel de actividad puede verse influenciado por el nivel de alimentación así como por la composición del alimento (Samain *et al.*, 1980). En algunos moluscos es conocido que las secreciones de las células intestinales están relacionadas con factores ambientales, pudiendo llegar a producir enzimas en ciertos momentos que pueden no coincidir con el momento en que se preparan los extractos lo cual trae como consecuencia resultados negativos en la determinación de las enzimas (Vonk y Western, 1984).

Considerando lo anterior, se puede estimar que los resultados obtenidos hasta el momento son parciales y están dirigidos a tener una idea preliminar sobre la importancia que presentan las

enzimas proteolíticas en el fisiología digestiva del caracol manzano. La información más confiable con respecto a las propiedades de las enzimas digestivas se obtiene ciertamente a través de su aislamiento y purificación. Sin embargo, es difícil aplicar los resultados de la digestión *in vitro*, a menos que se conozca el momento en que aparecen estas enzimas en el proceso digestivo, el pH en el que se desenvuelven y la procedencia de las enzimas en una sección del tracto digestivo. Idealmente, parte de esta información se puede obtener por métodos histoquímicos (Vonk y Western, 1984).

Las enzimas proteolíticas en el caracol manzano no han sido estudiadas hasta el momento y únicamente Andrews (1965) ha hecho referencia a este respecto, mencionando que no pudo determinar su presencia en el intestino de *P. canaliculata* y cita que Meenakshi (1954) tuvo el mismo resultado en *Pila virens*. Sin embargo, no menciona los métodos utilizados para esto y atribuye lo anterior a la dieta herbívora, en la que los aminoácidos libres en las plantas cubrirían los requerimientos proteicos del animal, por lo cual aparentemente no habría necesidad de estas enzimas, no obstante no descarta su existencia.

En contraste con lo anterior, la elevada velocidad de crecimiento del caracol manzano, al ser alimentados con dietas secas con alto contenido de proteína, como ha sido observado por otros autores (Ontiveros, 1989; Benavides, 1994) y los resultados de los presentes bioensayos (VI.3), son un indicio de la mayor capacidad para digerir proteínas más complejas con respecto a la necesaria para mantener una dieta predominantemente herbívora. Esto implicaría que el aparato digestivo podría tener la capacidad para hidrolizar diversos tipos de proteínas, siendo necesario para esto la presencia de un espectro de mayor amplitud de enzimas proteolíticas. Lo anterior también viene a ser reforzado al analizar los hábitos alimenticios del caracol manzano descritos por Cazzaniga (1984), quien señala como principal alimento las plantas acuáticas y la amplia gama de hábitos zoófagos que van desde el consumo de cadáveres recientes hasta la depredación de peces, crustáceos, larvas de insectos y otros moluscos (Cazzaniga, 1990).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la existencia de diversas proteasas, confirmando el potencial digestivo mencionado anteriormente, contrastando con los resultados reportados por Andrews (1965), aunque no es posible discutirlos en profundidad debido a que no menciona los métodos utilizados.

Por otra parte, la sección del aparato digestivo en la cual se registró mayor actividad proteolítica fué la glándula digestiva en conjunto con el estómago, siendo estos tejidos en los cuales se han determinado la mayoría de las proteasas en otros gasterópodos (Vonk y Western, 1984).

### **VII.2.1 PROTEASAS TOTALES**

La utilización de una proteína completa como sustrato (e.g. caseína, hemoglobina) permite evaluar la actividad del conjunto de enzimas proteolíticas presentes en el extracto, dándonos una idea de la forma en que actúan en el organismo vivo. Sin embargo, esta actividad no se puede relacionar directamente con la forma en que ocurre la digestión ya que existen condiciones particulares que resultan difíciles de replicar en ensayos *in vitro* (Sarath *et. al.*, 1989) entre las que se encuentran la presencia de factores antinutricionales, la cantidad de fibra, el tipo de reacción y la diferencias en el nivel de estimación, entre otras (Mendoza, 1993).

Por otra parte cada una de las enzimas requiere condiciones particulares para expresar su actividad al máximo, siendo uno de los principales factores el pH ya que algunas proteasas presentan actividad solo en rangos muy estrechos. Este aspecto puede ser confirmado al efectuar la reacción a diferentes valores de pH pudiéndose observar que en el caso de *Pomacea sp.*, la actividad proteolítica se presenta en un rango de 2 a 10, no obstante la mayor actividad se presenta a pH 3. De la misma manera, una actividad proteolítica similar fué determinada a este pH en *Joruna sp.*, que es un gasteropodo marino, e igualmente en los gasterópodos terrestres *Aeolidia sp.* y *Helix sp.*

Las proteasas que actúan a pH ácido son de tipo aspartico siendo la Pepsina y las Catepsinas las más comunes y generalmente se atribuye una digestión extracelular para la pepsina, mientras que las catepsinas se presentan a nivel intracelular, aunque la presencia y funcionamiento de estas enzimas en invertebrados aun no es muy claro (Gildberg, 1988).

Igualmente se presentó en el caracol manzano una importante actividad en valores cercanos a pH 9, siendo a estos valores en los que actúan una mayor variedad de proteasas (de tipo tripsina y quimiotripsina), esto contrasta con lo reportado para la mayoría de los gasterópodos (7.6 a 8.8) (Vonk y Western, 1984).

Una actividad proteolítica con un patrón similar con respecto a los valores de pH ha sido determinada en los peces *Hippoglossus hippoglossus* y *Scophthalmus maximus* así como en la langosta *Hommarus gammarus* (Glass et al., 1989). La actividad proteolítica en un amplio rango de pH puede ser indicio de una dieta omnívora, lo que significaría una mayor flexibilidad para tener acceso a una mayor variedad de fuentes proteicas.

Ocasionalmente ha sido reportada la presencia de enzimas de tipo pepsina en invertebrados acuáticos (Dabrowski y Glogowski, 1977; Kimoto *et. al.*, 1986; Glass *et. al.*, 1989; Lam y Pan, 1993), sin embargo, no se ha presentado evidencia de zimógenos de pepsina en invertebrados y la mayoría de las observaciones con respecto a esta actividad es posible que este relacionada con actividad de tipo catepsina D. Aunque la actividad de las catepsinas es generalmente intracelular, ocasionalmente ha sido propuesta una posible función de digestión extracelular (Gildberg, 1987). Hoyle (1973) encontró dos picos de actividad a pH 2.5 y 5.5 al exponer caseína con extractos de glándula digestiva de *Homarus americanus*, sin embargo esta hidrólisis la atribuye a una posible falsa actividad producida por la inestabilidad de la caseína en estos valores de pH, no siendo este el caso debido a que se utilizó albumina en estas pruebas para evitar este inconveniente.

La actividad proteolítica con caseína ha sido detectada en homogenados de tracto digestivo de peces (*Dicentrarchus labrax* y *Morone chrysops* X *M. saxatilis*) mostrando un marcado pico de actividad entre pH 9 y 10, siendo atribuida a la acción de enzimas de tipo tripsina y aminopeptidasa (Eshel *et al.*, 1993)

## **VII.2.2 ACTIVIDAD PROTEOLITICA ESPECIFICA**

### **TRIPSINA**

La tripsina es una endoproteasa de tipo serina que actúa sobre el extremo carboxil de los aminoácidos básicos (lisina o arginina). Esta enzima en conjunto con la pepsina son las principales proteasas que se encuentran en la mayoría de los organismos. Su papel en la digestión radica en iniciar la hidrólisis de las proteínas produciendo pequeños péptidos los cuales son hidrolizados posteriormente por las exoproteasas y dipeptidasas.

## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

En el caso de los invertebrados la tripsina es la endoproteasa más común, conservando una estructura básica en todos los grupos zoológicos por lo que es considerada como un puente entre las serina-proteasas de procariotes y vertebrados (Zwilling y Neurath, 1981). De aquí que sea probable que la mayor parte de la actividad determinada sobre proteínas completas a pH alcalino en este trabajo y en otros estudios realizados con gasterópodos (Tabla 3.5), sea debido a esta enzima.

Por otra parte, la utilización de sustratos específicos para evaluar esta enzima (TAME y BAPNA) ha sido limitada en gasterópodos por lo cual es difícil contar un punto de referencia para comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo. Aunque la utilización de estos sustratos ha sido ampliamente utilizada en diferentes organismos, algunos autores discuten sobre la relación del TAME acerca de la actividad directa sobre proteínas debido a que este sustrato presenta un enlace tipo éster, en contraparte al enlace amida presente en el BAPNA al igual que las proteínas. Sin embargo, la actividad esterolítica ha sido bien caracterizada en las enzimas tipo tripsina y quiotripsina sobre todo en invertebrados crustáceos (Kim et. al., 1994) por lo cual puede considerarse como un indicador de este tipo de enzimas.

### *QUIMIOTRIPSINA*

La quimiotripsina es otra endoproteasa de tipo serina que actúa principalmente sobre el extremo carboxil de los aminoácidos aromáticos (Tirosina, Triptofano y Fenilalanina). Las enzimas del tipo quimiotripsina están más restringidas entre los invertebrados aunque han sido reportadas en anélidos, insectos y moluscos (Vonk y Western, 1984). En conjunto con la tripsina son las proteasas responsables del inicio de la digestión en los invertebrados por lo cual era probable su detección en el aparato digestivo del caracol manzano.

Por otra parte, a pesar de que algunos autores han señalado la presencia de quimiotripsina en crustáceos aún esta en duda (Gates y Travis, 1969; Glass et. al., 1989). Compensando su ausencia con una proteasa alcalina de bajo peso molecular que no tiene equivalente con las enzimas de los vertebrados (Vonk Y Western, 1984; Mendoza, 1993).

La actividad esterolítica de las enzimas tipo quimiotripsina se realiza utilizando BAEE mientras que la actividad amidásica ha sido determinado utilizando GPNA, presentándose

actividad de los dos tipos en el caracol manzano. La diferencia de sustratos explicaría la diferencia en actividad.

#### *AMINOPEPTIDASA*

Las aminopeptidasas son exoproteasas que actúan sobre el extremo amino de las cadenas peptídicas y han sido detectadas en varios invertebrados y dentro de estos en el gasteropodo *Murex sp.* (Vonk y Western, 1984). Actúan a pH alcalino y su presencia en el caracol manzano indica que posee un conjunto de enzimas proteolíticas bien establecido. Por otra parte existe la posibilidad de que esta enzima actúe a pH ácido ya que se ha reportado en bivalvos actividad de este tipo de enzimas utilizando L-leucinamida como sustrato a pH de 2 a 4.5 (Vonk y Western, 1984).

#### *CARBOXIPEPTIDASAS*

Las carboxipeptidasas son otro tipo de exoproteasas que actúan sobre el extremo carboxil de la cadena peptídica y también han sido detectadas en otros invertebrados incluyendo a *Murex sp.* (Vonk y Western, 1984), por lo cual los resultados negativos para determinar su presencia en este trabajo no descartan que esta se encuentre formando parte del paquete de proteasas del caracol manzano ya que las condiciones utilizadas en los ensayos se realizaron a un solo pH, con un tipo de buffer y a temperatura constante, pudiendo estar alguna de estas variables fuera del rango que permitiera su detección. Por otra parte, al igual que las aminopeptidasas también se ha atribuido una actividad a pH 4.5 en bivalvos utilizando HPLA como sustrato (Vonk y Western, 1984).

### **VII.2.3 ACTIVIDAD AMILASICA**

De la misma forma que las proteasas, las carbohidrasas han sido poco estudiadas en los gasteropodos y los estudios se han basado principalmente en extractos de la glándula digestiva. Sin embargo, en base a que muchas especies son principalmente herbívoras (en *Helix sp.* un 20% de la dieta natural son carbohidratos (Flari y Charrier, 1992)) se considera que estos organismos

### *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

presentan una amplia gama de este tipo de enzimas. Flari y Charrier (1992), encontraron que existe una variedad de enzimas responsables de la degradación de carbohidratos presentes en el tracto digestivo de caracoles pulmonados, las cuales se encuentran en el esófago, estomago, intestino y glándula digestiva. De la misma forma se demostró una variedad de carbohidrasas en el gasteropodo herbívoro marino *Dolabella auricularia* (Ansai et. al., 1991) incluyendo enzimas que degradan la celulosa (Ansai et. al., 1992).

La digestión de carbohidratos ha sido registrado en todas las regiones del tracto digestivo, así en *Helix sp.* los principales sitios de actividad son el esófago, el buche, el estomago y el intestino en este orden de importancia, mientras que con extractos de las glándulas salivales no se encontró actividad (Flari y Charrier, 1992), lo cual es explicado debido a que se observó que la actividad secretoria de las glándulas salivales es activada por la ingestión del alimento. Por otra parte Massahud et. al. (1988) demostraron la presencia de glucosidasas en todos los órganos digestivos de *Biomphalaria glabrata*, presentando una mayor actividad con extractos de glándula digestiva a pH 5.6 a 6.3.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en donde se pudo observar mayor actividad con extractos de la sección media del tracto digestivo (glándula digestiva y estomago). Por otra parte en este caso solo fué utilizado un sustrato (almidón), por lo cual es necesario ampliar la gama de sustratos para obtener un panorama más amplio de la importancia que tienen estas enzimas en la digestión, incluyendo la probable presencia de celulasas. Sin embargo, esto requiere de varias investigaciones ya que en algunos casos se ha cuestionado la procedencia de estas enzimas debido a una probable participación de bacterias en la digestión de carbohidratos (Carefoot, 1982; Flari y Charrier, 1992).

### **VII.3 REQUERIMIENTOS PROTEICOS POR EL METODO DOSIS-RESPUESTA.**

Los resultados obtenidos muestran tendencias bien definidas en los parámetros que se consideraron en ambos bioensayos, por lo cual se puede considerar de manera general que estos representan una aproximación aceptable. lo anterior tomando en cuenta que existen condiciones muy particulares en el desarrollo de cada bioensayo. En el mismo sentido, las condiciones en que se realizaron los bioensayos cubrieron los requisitos necesarios para el desarrollo de un experimento nutricional sin que se presentaran factores que pudieran alterar los resultados (eg. alta mortalidad) más allá de los factores considerados en el diseño. La baja mortalidad que se observó en los dos experimentos, sin ser significativa para ser considerada (menor al 1% de toda la muestra), fué similar a la registrada en otros experimentos realizados en condiciones de laboratorio con especies del genero *Pomacea* (Estebenet y Cazzaniga, 1992; Benavides, 1994; Asiain y Olguin, 1995), lo cual refleja la capacidad de estos organismos para adaptarse a diferentes condiciones de hacinamiento. ambientales y de alimentación. Lo anterior quedó de manifiesto en un experimento diseñado para este efecto por Cazzaniga y Estebenet (1988) quienes probaron que al tener hasta 100 organismos de *P. canaliculata* en acuarios de 10 L. durante 11 meses estos no mostraban efectos negativos en cuanto a sobrevivencia por sobrepoblación.

#### **VII.3.1 DIETAS ARTIFICIALES**

##### **TIPO DE ALIMENTO**

Los hábitos alimenticios del caracol manzano (Estebenet, 1984) resultan ventajosos para adaptarse a la ingestión de dietas artificiales ya que estas pueden ser trituradas por la radula y a la vez las partículas pequeñas pueden ser atrapadas mediante la corriente ciliar, evitando de esta



manera la pérdida de estabilidad del pellet en el agua lo cual generalmente representa un inconveniente mayor en otros organismos cultivados con este tipo de alimento.

El suministro de lechuga deshidratada permitió contar con un alimento de referencia que al haber sido utilizado en otros experimentos en condiciones similares permite comparar el rendimiento de diferentes alimentos artificiales. De esta forma fué posible observar que el tipo de alimento es el factor con mayor influencia sobre el crecimiento de los caracoles, lo cual seguramente está relacionado con la cantidad de proteína presente en el alimento peletizado con respecto a la lechuga ya que este nutriente es el que marca la mayor diferencia entre los dos alimentos. Otro aspecto diferencial entre la lechuga deshidratada y el alimento para peces es la cantidad de energía, la cual es producto de las diferencias en proteína y carbohidratos, sin embargo, esta no presenta repercusiones en cuanto al crecimiento entre estos niveles como se demostró en el bioensayo con dietas puras (Gráfica 6.8). Por otra parte el mayor contenido de fibra en la lechuga puede producir tasas elevadas de evacuación incrementando el consumo, en contraparte con la baja cantidad de fibra y alto contenido de energía en el alimento para peces que puede producir una disminución en el consumo.

Los resultados obtenidos con estos alimentos contrastan con los reportados por Estebenet y Cazzaniga (1992) quienes probaron 3 dietas secas incluidas en agar contra una dieta de lechuga fresca, en caracoles de la especie *P. canaliculata*, sin encontrar diferencias significativas entre las cuatro dietas y tomando como mejor opción la alimentación con lechuga fresca. Sin embargo, es muy probable que el crecimiento haya estado enmascarado por diferencias en el consumo, lo cual pudo ser ocasionado por la quimioatracción y palatabilidad de las dietas secas. Al mismo tiempo, en base a que las dietas fueron preparadas con alimento para peces, leche en polvo, alimento comercial para perro y lechuga deshidratada, siendo evidentes las diferencias en proteína y la cual no se menciona, es lógico esperar diferencias en el crecimiento de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo así como los resultados de Benavides (1994) y las observaciones de Ontiveros (1989).

### *NIVEL DE ALIMENTACION*

La cantidad de alimento ingerido es el segundo de los factores que presentó mayor influencia sobre el crecimiento, tal como lo reflejan los resultados obtenidos en esta serie experimental, por este motivo fué de suma importancia controlar este factor utilizando dos raciones fijas, en contraste con la mayoría de las raciones *ad libitum* utilizadas por otros autores que han trabajado con alimentación del caracol manzano (Tabla 3.4), lo cual dificulta su evaluación. En el mismo sentido la cantidad de alimento ingerido, siempre que éste no rebase la capacidad de digestión del organismo y que las cantidades de nutrientes se encuentren por debajo del requerimiento, puede llegar a eliminar las diferencias causadas por el tipo de alimento como se muestra en los resultados similares de crecimiento obtenidos con caracoles alimentados al 6% de lechuga y los alimentados al 2% con alimento artificial, lo cual probablemente se deba a que se compensan de esta forma la cantidad de proteína ingerida y por lo tanto el crecimiento.

Por otra parte los resultados muestran que la ración no influyó en la conversión alimenticia ni en la eficiencia proteica, lo cual puede deberse a que estas variables son afectadas principalmente por la calidad de la dieta y no tanto por la cantidad, por lo cual podemos considerar que el caracol aprovecha de igual forma los nutrientes presentes tanto en la lechuga como en el alimento artificial, reforzando de esta forma la idea de que las diferencias en crecimiento por el tipo de alimento son debidas a la cantidad de proteína suministrada en cada uno.

La mayoría de los trabajos de alimentación y crecimiento de *Pomacea spp.* han utilizado productos vegetales en estado fresco para su evaluación, esto ha dificultado sin duda la interpretación y comparación de los resultados debido a que estos alimentos presentan altos niveles de humedad y baja proteína, además de la dificultad para cuantificar el alimento ingerido, el cual esta condicionado por la capacidad del intestino y el poder de atracción de la planta para ser ingerida, como lo muestra Cazzaniga (1981) quien determinó un consumo máximo por día de 12.5g de *Chara vulgaris* contra 5.6 g de *Myriophyllum eliatinoides* y 4.92g de *Potamogeton pectinalis* en caracoles de 5.5 a 6.5 cm de *P. canaliculata*. Considerando que estas plantas contienen 1.5%, 2% y 2% de proteína respectivamente (Tacon, 1989), el consumo máximo de proteína seria de 0.18, 0.11 y 0.09 gramos por día, la cual es contenida en 1.2, 0.73 y 0.6 gramos

## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

de lechuga deshidratada y 0.51, 0.31 y 0.25 gramos de alimento para peces con 35 % de proteína. Al mismo tiempo sería equivalente a 0.6, 0.36 y 0.3 gramos de alimento con 30% de proteína, lo cual representa una ración del 4% y 2% para caracoles de 3.5 cm (Benavides, 1994). Asiain y Olguín (1995) utilizaron *Ipomea aquatica* para alimentación de *P. patula*, el alimento fue suministrado fresco y *ad libitum*, si consideramos que esta planta contiene 2.1% de proteína (Tacon, 1989) y una capacidad de ingestión máxima similar a la reportada por Cazzaniga (1981) para plantas acuáticas, se obtendrían resultados similares al caso anterior.

### *EDAD DE LOS CARACOLES*

La talla inicial de los caracoles es un factor que debe ser considerado necesariamente en los experimentos de crecimiento ya que esta tiene un efecto directo sobre la tasa de crecimiento como quedo demostrado en este trabajo y como lo confirman los resultados de Benavides (1994), quien establece 3 fases principales de crecimiento de aproximadamente 40 días cada una para dietas con 30 % de proteína.

Por otra parte una variable que ha sido evaluada en otros trabajos es el incremento en la longitud total de la concha la cual, como quedó demostrado en el bioensayo preliminar, no presenta diferencias significativas entre las tallas iniciales, lo que sugiere un crecimiento continuo de la concha en las diferentes fases de crecimiento. Al mismo tiempo es importante considerar que el crecimiento de la concha puede impedir el crecimiento corporal por estar estrechamente relacionado, de esta forma el aprovechamiento de los alimentos puede verse limitada por la presencia de micronutrientes que favorecen la formación de la concha, destacando en este sentido los alimentos artificiales en contraste con dietas a base de un solo ingrediente como la lechuga.

Martínez (1989) determinó un crecimiento máximo de 5.5 mm/mes para *P. patula* alimentados con alfalfa y resultados muy similares con lechuga y berro. Ontiveros (1989) reporta un crecimiento de 5.3 mm/mes para *P. flagelata* alimentado con lechuguilla (*Pistia sp.*). Estos valores de crecimiento son similares a los obtenidos con las dietas a base de lechuga deshidratada al 6% y con alimento artificial al 2% en el presente trabajo, sin embargo, son inferiores al máximo crecimiento obtenido para el alimento artificial al 6% (13.8 mm/mes) (Figura 6.21).

Benavides (1994), obtuvo valores de 7 mm/mes para 3 dietas diferentes con 30% de proteína (formuladas con alimento para peces, soya y levadura), de 5.5 mm/mes para una dieta con *Spirulina*, con igual cantidad de proteína. Por otra parte Lum (1989) obtuvo un crecimiento de 1.7 mm/mes para *P. urceus* en condiciones de laboratorio alimentando caracoles con restos de vegetales, lo cual contrasta con la estimación de crecimiento realizada en campo para esta especie que fue de 13.52 mm/mes, similar a la obtenida por Burkky (1974) para esta misma especie en campo, siendo este último valor más cercano al máximo obtenido en el presente trabajo.

### **VII.3.2 REQUERIMIENTOS DE PROTEINA Y ENERGIA**

#### **REQUERIMIENTO DE ENERGIA**

Los niveles de energía utilizados no muestran ninguna influencia marcada sobre el crecimiento de los caracoles lo cual puede deberse a que los niveles utilizados están por encima del requerimiento de energía dietaria para los caracoles, mostrándose inclusive un ligero descenso en los valores de conversión alimenticia y eficiencia proteica para el nivel mas alto de energía, lo cual sugiere que los requerimientos de energía para el caracol manzano no deben rebasar la cantidad de 250 kcal. por 100 gramos de alimento. Por otra parte, al analizar independientemente las dietas se observan mejores resultados en incremento de peso, talla y conversión alimenticia para los regímenes con 10% y 20 % de proteína y con un nivel de energía de 250 kcal/100g comparados con alimentos equivalentes pero con un nivel de energía de 350 kcal/100g, mientras que en el caso de las dietas con 30% y 40% de proteína la relación se invierte, resultando más adecuado un nivel de 350 kcal/100g.

Otro factor que pudo influir en estos resultados es la posible utilización de la celulosa como fuente de energía ya que esta no fue considerada en los cálculos calorimétricos por lo cual debió haberse considerado la diferencia en cuanto a la cantidad de celulosa que presentan las dietas con 250 Kcal/100g con respecto a las de 350 Kcal/100g. Lo anterior podría ser confirmado utilizando dietas con niveles de energía inferiores a los probados en este trabajo.

En función de los resultados obtenidos podemos considerar que trabajos como el realizado por Benavides (1994) quien utilizó 4 dietas isocalóricas con 330 kcal/100g presentan

## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

un excedente en los niveles de energía. Por otra parte los alimentos utilizados en el presente trabajo también se presentan niveles de mas de 250 kcal/100g, siendo 292 kcal/100g para la lechuga deshidratada y 408 kcal/100g en el alimento para peces.

### *REQUERIMIENTO DE PROTEINA*

En las dietas puras se observa claramente el efecto que producen los niveles de proteína, incrementándose la tasa de crecimiento de manera concomitante con las dietas de 10% hasta las dietas con 30% de proteína, para descender nuevamente en las dietas con 40% de proteína. De forma similar se observa la respuesta en el incremento de longitud de la concha y la conversión alimenticia, sin embargo, las diferencias (significativas) pueden ser atribuidas solo para las dietas con 10 % de proteína. Lo anterior sugiere que el requerimiento de proteína para caracol manzano se encuentra ubicado entre el 20 y el 30 %. Por otra parte los valores de eficiencia proteica descienden con el nivel de proteína, siendo significativas las diferencias entre cada nivel.

De esta forma encontramos que el incremento de longitud y conversión alimenticia no presentan diferencias significativas entre los tratamientos con 20 % de proteína y las dietas de más de 30 % de proteína, mientras que la tasa de crecimiento es ligeramente mayor en las dietas con 30%, pero a su vez estas presentan un PER inferior que las dietas con 20 % de proteína. Lo anterior significa que se obtiene una mejor utilización del alimento y de la proteína sin un marcado descenso en el crecimiento al utilizar dietas con 20 % de proteína, *por lo cual consideramos que el requerimiento proteico para el caracol manzano es cercano al 20 %.*

### *RELACION PROTEINA/ENERGIA*

El diseño experimental realizado nos permitió probar ocho tratamientos con diferente relación proteína/energía, los cuales van de 28.5 a 160 mg de prot./kcal. Al mismo tiempo considerando que los requerimientos de estos nutrientes también deben analizarse mediante esta relación fué importante contemplar esta gama de tratamientos. De esta forma fué posible observar claramente la forma en que la tasa de crecimiento, el incremento de longitud de concha y la conversión alimenticia (Figuras 6.26, 6.27 y 6.28) obtuvieron los mejores valores en las

dietas con 80 y 85 mg prot/kcal. lo cual corresponde a las dietas con 20 % de proteína y con 250 kcal/100g y a la dieta con 30 % de proteína y 350 kcal/100g respectivamente. Por otra parte los valores de eficiencia proteica presentan una tendencia inversa a la observada en las anteriores variables, aunque también con un valor elevado en las dietas con 80 mg/kcal (Figura 6.29).

En base a lo anterior y considerando que *los requerimientos para caracol manzano deben ser aproximados a 250 kcal/100g de energía y 20 % de proteína, las dietas deben mantener una relación de 80 a 85 mg de proteína por kcal*, con lo cual se logra obtener el máximo potencial de crecimiento de la especie y una mejor utilización de los nutrientes del alimento.

Con esto y a manera de comparación podemos mencionar que en el bioensayo preliminar los tratamientos alimentados con lechuga deshidratada presentan un exceso de energía (292 kcal/100g), un bajo contenido de proteína (15.3%) y una baja relación P/E (45.5 mg/kcal) por lo cual se obtuvo un crecimiento inferior al máximo potencial. Mientras que los tratamientos con alimento para peces presentan un exceso de energía (408.9 kcal/100g) y proteína (34.8%) pero una relación P/E adecuada (85.4 mg/kcal), con lo cual se presentan valores de crecimiento elevado, sin embargo los nutrientes no son aprovechados al máximo.

Considerando esta premisa, las dietas utilizadas por Benavides (1994) presentan un excedente en energía (330 kcal/100g) y proteína (30%), al mismo tiempo la relación P/E se encuentra ligeramente por encima (90.9 mg/kcal) del nivel estimado en este trabajo. Lo anterior podría explicar los resultados que obtuvo, poniendo de manifiesto por que no se presentaban diferencias marcadas en la utilización de diferentes fuentes proteicas, ya que para evaluar la calidad y aprovechamiento de este nutriente era necesario no sobrepasar el requerimiento cuantitativo de la especie.

Se considera en general que los requerimientos en proteína y energía están relacionados con los hábitos alimenticios y al mismo tiempo se observa que estos requerimientos son más elevados para organismos acuáticos en comparación con los terrestres, lo anterior debido a adaptaciones fisiológicas al medio. De esta forma a manera de referencia tenemos que los requerimientos de proteína/energía para peces es de 99=22 mg/kcal, en aves de corral 60 a 70 mg/kcal y en mamíferos 40 a 65 mg/kcal. (Hepher, 1993), en comparación a el estimado en este trabajo para el caracol manzano de 80-85 mg/kcal.

#### **VII.4 DISCUSION FINAL**

La mayoría de las especies de moluscos son gasterópodos y esta Clase ha tenido una gran radiación adaptativa lo que ha producido que se encuentren recursos disponibles para cualquier molusco virtualmente en todos los hábitats. Siendo la plasticidad de la forma y función del mecanismo de alimentación uno de los mayores factores que ha contribuido al éxito de este tipo de organismos (Kohon, 1983).

Las observaciones concernientes a la estructura del aparato digestivo de *Pomacea sp.* no muestran un elevado grado de especialización, lo cual en combinación con sus hábitos alimenticios nos permiten considerar que es una especie que puede adaptarse fácilmente al consumo de una dieta artificial. Siendo esto uno de los factores que más ha limitado el cultivo de otros gasterópodos (Barnes, 1977), por lo cual es importante continuar realizando estudios para desarrollar dietas artificiales para el cultivo de caracol manzano. Debido a la dificultad para elaborar dietas destinadas a ciertas especies de gasterópodos, ha sido necesario recurrir a tecnologías más sofisticadas para la elaboración de alimentos (McVeigh, 1994).

La morfología y longitud del tracto digestivo esta estrechamente relacionado con los hábitos alimenticios. En efecto, generalmente las especies herbívoras poseen intestinos más largos y contienen un mayor nivel de carbohidrasas, en comparación con las especies carnívoras, las cuales presentan una mayor capacidad proteolítica. Esta relación entre amilasas/proteasas ha sido propuesta como un indicador de hábitos alimenticios para peces (Munilla y Stark, 1989) y crustáceos (Van Wormouth, 1972), sin embargo, es factible que esta relación se pueda extender de manera general para la mayoría de los grupos zoológicos. Así, tomando en cuenta la actividad amilásica y proteolítica que se determinó en el aparato digestivo del caracol manzano podemos considerar que los hábitos alimenticios no están marcadamente inclinados hacia una dieta particularmente herbívora, como lo señalan la mayoría de los autores. Por otra parte la presencia de colagenasa podría reafirmar la predilección por una dieta zoófaga debido a que el colageno es una de las principales proteínas constitutivas del tejido animal estando ausente en los vegetales. Esta consideración fué tomado como referencia en los hábitos alimenticios de 3 especies de cangrejos con hábitos depredadores y carroñeros (Galgani y Nagayama, 1986).

El conocimiento de la cantidad y especificidad de cada enzima presente en un sistema digestivo particular y las condiciones bajo las cuales tiene lugar la hidrólisis de proteínas podría permitir predecir la digestibilidad de los alimentos (Glass *et al.*, 1989). Varios estudios sobre la presencia de enzimas han sido realizados con la finalidad de contribuir a solventar algunos inconvenientes que suelen presentarse con las dietas artificiales en especies de interés en acuicultura (Lauff y Hofer, 1984). Por otra parte, el conocimiento y la comprensión de la forma de alimentación y de la fisiología digestiva de los organismos permite resaltar la importancia no solo de la composición que debe tener el alimento, sino también de su forma, tamaño y estabilidad en el agua. Esto conlleva naturalmente a considerar otros puntos igualmente importantes en el momento de seleccionar el equipo o la tecnología que se usará para la fabricación de los alimentos (Cruz, 1990).

Considerando el rango de pH en el que se presentó actividad proteolítica así como las enzimas detectadas con sustratos específicos y por lo tanto la variedad de sitios de ruptura que atacan estas enzimas, podemos considerar que el potencial digestivo del caracol manzano es muy elevado, lo cual nos permite probar una mayor variedad de fuentes proteicas en el desarrollo de dietas para la especie con una elevada probabilidad de que estas sean aprovechadas al máximo. Sería por demás interesante resaltar la utilización potencial de proteína proveniente de diversos sub-productos animales y vegetales.

Por otra parte, las ventajas en la utilización de dietas artificiales contra alimentos frescos en sistemas de cultivo ya ha sido discutido (III.3.2), por lo cual, y en base a los resultados obtenidos en el bioensayo preliminar, podemos considerar que en el cultivo de caracol manzano la utilización de un alimento balanceado representa la mejor opción. Sin embargo, como requisito indispensable para que se cumpla lo anterior resulta necesario que las dietas contengan la cantidad de nutrientes adecuados para el máximo crecimiento y utilización del alimento, por lo cual, en base a los resultados obtenidos con las dietas puras, estas no deben exceder los 250 kcal/100g, un 20% de proteína y una relación proteína energía de 80 a 85 mg/kcal. Por supuesto es fundamental igualmente, considerar la calidad de los mismos para lo cual en un estudio que se realiza actualmente de manera colateral se está probando la digestibilidad de varias materias primas como fuente de proteína para el caracol manzano.



## *Determinación del perfil de proteasas y de los requerimientos proteicos del caracol manzano*

El presente estudio confirma algunas de las ventajas para el cultivo del caracol manzano mencionadas en los antecedentes, al mismo tiempo presenta una compilación y revisión de los estudios más importantes realizados con este tipo de organismos, ya que la mayoría de estos trabajos se encontraban dispersos y no presentaban un enlace entre ellos (Tablas 3.1, 3.2 y 3.4).

Por otra parte, los resultados de la investigación básica de la fisiología digestiva, con técnicas histológicas y bioquímicas, dan importantes puntos de referencia para el desarrollo de dietas artificiales, lo cual en conjunto con las aproximaciones en los requerimientos nutricionales de proteína y energía obtenidos con los bioensayos de crecimiento representan un avance para el desarrollo del cultivo del caracol manzano.

De esta forma podemos resumir las características que presenta el caracol manzano para intentar su cultivo intensivo en los siguientes puntos:

- Las características de la respiración anfibia.
- Se reproducen de forma simple y rápidamente.
- La velocidad de crecimiento es elevada.
- La flexibilidad que tienen para adaptarse a dietas artificiales.
- Soportan altas densidades.
- Toleran bajas concentración de O<sub>2</sub> en el agua.
- El cultivo en instalaciones cerradas evita la infección de parásitos.

En base a lo anterior podemos considerar que los estudios próximos a realizarse deben estar enfocados en los siguientes puntos:

- ◆ Ampliar el estudio sobre enzimas digestivas en el caracol manzano
- ◆ Desarrollar sistemas de cultivo adecuados a las características particulares de estos organismos.
- ◆ Determinar las proporciones de las fuentes proteicas (animal/vegetal) más adecuadas para el crecimiento y reproducción.
- ◆ Evaluar las ventajas entre las diferentes tecnologías en la preparación de alimentos artificiales (peletizado vs extruido).
- ◆ Identificar las especies y variedades de caracol manzano con características más favorables para el cultivo.

## **VIII CONCLUSIONES**

1) Los hábitos alimenticios del caracol manzano son omnívoros y estos organismos son susceptibles de adaptarse a diferentes formas de presentación del alimento.

2) El paso del alimento a través del tracto digestivo les permite extraer la mayor parte de los nutrientes presentes (trituration con la rádula y molleja, almacenamiento en el buche, digestión extracelular y absorción en la glándula digestiva).

3) Presentan un espectro de enzimas (en particular proteasas) que les permiten digerir proteínas de diferentes fuentes.

4) El crecimiento se logra con bajos niveles de proteína y energía. Sin embargo, responde rápidamente al incremento en los niveles de proteína.

5) Los requerimientos de energía no son superiores al 250 kcal por 100 g de alimento.

6) El requerimiento de proteína es aproximado al 20 % y debe mantenerse una relación proteína/energía de 80 a 85 mg de proteína por kilocaloría.

7) El caracol manzano presenta características importantes para ser considerado como candidato para cultivos intensivos.

## VIII. LITERATURA CONSULTADA

- ALLIOT, E., A. PASTOUREAUD ET J. TRELLU, 1977, Evolution des activités enzymatiques dans le tube digestive au cours de la vie larvaire du bar (*Dicentrarchus labrax*) variations des proteinogrammes et des zymogrammes. *Actes de Colloques du C.N.E.X.O.*, 4 : 85-91.
- ALMENDROS, A. & D. PORCEL, 1992, Phosphatase activity in the hepatopancreas of *Helix aspersa*. *Copm. Biochem. Physiol.*, Vol. 103A, No. 3, pp. 455-460.
- ANDREWS B. E., 1964. The functional anatomy and histology of the reproductive system of some pilid gasteropod molluscs, *Proc. Malac. Soc. Lond.* 36, 121-140.
- ANDREWS, E.B., 1965 (a), The functional anatomy of the gut of the prosobranch gasteropod *Pomacea canaliculata* and of some other pilids. *Proc. Zool. Soc. London*, 145:19-36.
- ANDREWS, E.B., 1965(b), The functional anatomy of the mantle cavity, kidney and blood system of some pilid gasteropods (Prosobranchia). *J. Zool.*, 146:70-94.
- ANDREWS, J.W., L.V. SICCK & G.J. BAPTIST. 1972. The influence of dietary protein and energy levels on the growth and survival of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 341-347.
- ANZAI H., H. ASADA, A. KOSHIBA, S. YOSHIDA, H. KOBAYASHI, N. UCHIDA & E. NISHIDE, 1991, Distribution of Polysaccharide Digestive Enzymes in a Marine Gasteropod *Dolabella auricularia*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57 (11), 2077-2081.
- ANZAI, H., YOSHIHIRO NANBA, MASAHIRO SAWADA, NAOYUKI UCHIDA & EIICHI NISHIDE, 1992, Mode of Action of Cellulases from the Gastric Teeth of a Gastropod *Dolabella auricularia*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58(1), 159-163.
- ASIAIN, A. & C. OLGUIN, 1995, Evaluation of water spinach (*Ipomea aquatica*) as feed for apple snail (*Pomacea patula*). *World Aquaculture* 95, *Book of Abstracts*, pp.51-52.
- BANARESCU, P. 1990. Zoogeography of freshwater, Vol.1 General distribution and dispersal of fresh water animals. *Aula Verlag Wiessbaden*. pp.1-511.
- BARAGI, V. & R.T. LOVELL, 1986, Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larval development. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115: 478-484.
- BARDACH, J.E., J.H. RYTHER & W.O. MCLARNEY, 1986, Acuicultura Crianza y Cultivo de Organismos Marinos y de Agua Dulce, *AGT Editor S.A.*, pp 644-650.
- BARNES, R.D., 1977, Zoología de los Invertebrados, Ed. *Interamericana*, SAUNDERS, W. (ed.) pp.307-419.
- BASSOMPIERRE, M., H.H. NIELSEN & T. BORRESEN, 1993, Purification and characterization of elastase from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 106B, No. 2, pp. 331-336.
- BENAVIDES-MARTINEZ, M., 1994, Evaluación nutricional de tres fuentes protéicas en dietas para cultivo de dos líneas de caracol manzano (*Pomacea bridgesi*). *Tesis inédita, Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo Leon*, pp.
- BEVER, M.M. & R.B BORGES, 1988, Electrical responses to amputation of the eye in the mystery snail. *The Journal of Experimental Zoology*, 245: 43-52.

- BOMBEO-TUBURAN, I., S. FUKUMOTO & E.M. RODRIGUEZ, 1994**, Use of the apple snail, cassava, and maize as feeds for the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in ponds. *Aquaculture* 131:91-100.
- BOUCAD-CAMOU, E., C. LEBESNERAIS, P. LUBET & I. LIHRMANN. 1983.** Dynamique et enzymologie de la digestion chez l'huitre *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Bases biologiques de l'Aquaculture*. Montpellier, IFREMER, Actes de Colloques n.1, pp. 75-96.
- BRADFORD, M.M., 1976**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BRENDELBERGER H., 1995**, Dietary preference of three freshwater gasteropods for eight natural foods of different energetic content. *Malacologia*, 36(1-2): 147-153.
- BREDELBERGER H., 1995**, Dietary preference of three freshwater gasteropods for eight natural foods of different energetic content. *Malacologia*, 36(1-2): 147-153.
- BUDDINGTON, R.K. & S.I. DOROSHOV, 1985**, Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*), , pp. 233-238
- BURCH, B.J., 1982**, North American freshwater snails. Museum of Zoology, Dep. of Ecology and Evolutionary Biology, University of Michigan Ann Arbor. *Walkerana*, No. 4, pp. 217-365.
- BURKY, A.J., 1974**, Growth and biomass production of an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Müller) from the Venezuelan savannah. *Proc. Malac. Soc. Lond.* 41:127-143.
- BURKY, A.J., J. PACHECO & E. PEREYRA, 1972**, Temperature, water and respiratory regimes of an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Müller), from the Venezuelan savannah. *Biol. Bull.*, 143: 304-316.
- BURKY, A.J., 1972**, Organic content of eggs and juveniles of an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Müller), from the Venezuelan savannah and their ecological significance. *Mollusk Seminar, Ann Arbor*, pp. 59.
- BURKY, K.A. & A.J. BURKY, 1977**, Buoyancy changes as related to respiratory behaviour in an amphibious snail, *Pomacea urceus* (Müller), from Venezuela. *The Nautilus*, Vol. 91(3), pp. 97-104.
- CAREFOOT, T., 1982**, Gasteropod Nutrition in *Proceedings of the Second International Conference. In: Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, World Mariculture Society Special Publication No.2*, pp. 321-337.
- CAZZANIGA, N.J., 1981**, Evaluación preliminar de un gasteropodo para el control de malezas acuáticas sumergidas. *II Reunión sobre Malezas Subacuáticas en canales de desagüe de CORFO, Argentina*, pp. 131- 163.
- CAZZANIGA, N.J., 1983**, Apple-snail eating chara. *Aquaphyte*, Vol. 3, No. 2, pp. 3-4.
- CAZZANIGA, N.J., 1987**, *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1801) en Catamarca (Argentina) y un comentario sobre *Ampullaria catamarcensis* Sowerby, 1874 (Gasteropoda, Ampullaridae). *IHERINGIA. Sér. Zool.*, 66: 43-68.
- CAZZANIGA, N.J., 1990**, Predation of *Pomacea canaliculata* (Ampullaridae) on adult *Biomphalaria peregrina* (Planorbidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Vol. 84, No.1, pp. 97-100
- CAZZANIGA, N.J., 1990**, Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gasteropoda: Ampullaridae). *The Veliger*, 33(4):384-388.
- CAZZANIGA, N.J. & A.L. ESTEBENET, 1984**, Revisión y notas sobre los hábitos alimentarios de los Amullariidae (Gastropoda)(1). *Historia Natural*, Vol. 4 No. 22. pp. 213-224.

- AZZANIGA, N.J. & A.L. ESTEBENET, 1985, Revisión de antecedentes sobre el uso de racionales acuáticos (Ampullariidae) en programas de control biológico. *Malezas (Revista de la Asociación Argentina para el Control de Malezas)*, 13(1): 23-39.
- CAZZANIGA, N.J. & A.L. ESTEBENET, 1988. Effects of crowding on breeding *Pomacea canaliculata* (Gastropoda : Ampullaridae). *Comp. Physiol. Ecol.*, Vol. 13, No. 3, pp. 89-96.
- CAZZANIGA, N.J. & A.L. ESTEBENET, 1990, A siniestral *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullaridae). *Malacological Review*, 23: 99-102.
- CECCALDI H. J., 1989, Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. *AQUACOP IFREMER Actes de colloque 9* pp. 243-259.
- CEDEÑO, A., J. PACHECO & C. ALVAREZ, 1971, Aspectos preliminares de las variaciones de glucogeno y glucosa en el ciclo estacional de *Pomacea urceus*. *Acta Científica Venezolana* 22(Supl. 1), pp. 58
- CEDEÑO-LEON, A., 1984, Carbohydrate reserves during aestivation of *Pomacea urceus* (Müller) (Gastropoda, Prosobranchia). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 78A, No.3, pp. 553-557.
- CHAVIRA, R., T.J. BURNETT & J.H. HAGEMAN, 1984, Assaying proteinases with azocoll, *Analytical Biochemistry*, 136: 446-450.
- CHIOU, T., T. MATSUI & S. KONOSU, 1991, Existence of peptidase activities in mullet *Mugil cephalus* Roe. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(3), pp. 491-494.
- CLARK, J., K.R. MURRAY & J.R. STARK, 1986, Protease development in Dover Sole [*Solea solea* (L.)], *Aquaculture*, 53:253-262.
- COUSIN, J.C.B., 1986. Etude histologique, histochimique et histopathologique du turbot, *Scophthalmus maximus* au cours de son développement, *Tesis doctoral de l'Université de Bretagne Occidentale*. 342 pp.
- CRUZ-SUAREZ, L.A. 1990, Fisiología de la digestión de crustaceos y su relación con la composición de los insumos que se deben usar en la formulación de alimentos balanceados. *Curso-Taller sobre Nutrición y Alimentación Acuicola, Amena y UNAM*, pp.33-41.
- DABROWSKI, K., G. KRUMSCHNABEL, M. PAUKKU & J. LABANOWSKI, 1992, Cyclic growth and activity of pancreatic enzymes in alevins of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Fish Biology*, 40, pp. 511-521.
- DE SILVA, S.S., 1989, Exotic aquatic organisms in Asia. *Published by the Asian Fisheries Society in association with the International Development Research Centre of Canada and the Australian International Development Assistance Bureau*. pp. 37-85.
- DEAN J. I., A. BARBER & F. PONZ, 1987, Imino acid and basic amino acid transport in everted intestine of snail (*Helix aspersa*). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 87A, No. 4, pp' 1055-1058.
- DIUPOTEX, M.A, 1993, Algunas consideraciones cromosomicas del genero *Pomacea* (Gastropoda: Pilidae). *XII Congreso Nacional de Zoología, Resúmenes*, pp.35
- DKRUATRACHUE, M., E. SUCHART UPATHAM, SUKSIRT VICHASRT & VIROON BALDIKUL, 1990, Culture method for the thiarid snails *Brotia costula costula*, *Tarebia granifera* and *Melanoides tuberculata* (Prosobranchia: Mesogastropoda). *J. Med. & Appl. Malacol.*, 2:93-99.
- EDWARD H. M., 1961, On the generic limits in the family Plidae (Prosobranchia: Mollusca), *BREVIORES Museum of Comparative Zoology, Numer 133* pp 1-10.

- EL-SHAIKH K., W. BECKER & D. SIEBERS, 1993, Glucose transport across the intestinal wall of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 106A, No. 4, pp. 603-607.
- ERLANGER, B.F., N. KOKOWSKY & W. COHEN, 1961, The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95: 271-278.
- ESHEL, A., P. LINDNER, P. SMIRNOFF, S. NEWTON & S. HARPAZ, 1993, Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 106A, No. 4, pp. 627-634.
- ESTEBENET, A.L. & N.J. CAZZANIGA, 1990, Effect of short-term exposure to copper on survival of apple-snail in an integrated control program. *J. Aquat. Plant Manage*, 28: 103-105.
- ESTEBENET, A.L. & N.J. CAZZANIGA, 1992, Growth and demography of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullaridae) under laboratory conditions. *Malacological Review*, 25: 1-12.
- ESTEBENET, A.L. & N.J. CAZZANIGA, 1993, Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullaridae). *APEX*, 8(4): 129-138.
- FLARI, V. & M. CHARRIER, 1992, Contribution to the study of carbohydrases in the digestive tract of the edible snail *Helix lucorum* L. (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) in relation to its age and its physiological state. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 102A, No. 2, pp. 363-372.
- FLEMING A.E., 1995, Digestive efficiency of the Australian abalone *Haliotis rubra* in relation to growth and feed preference. *Aquaculture* 134, 279-293.
- FLORES, R., P. FLORES & E. MONTIEL, 1993, Pruebas de alimentación y dietas del caracol de tinte *Purpura pansa* (Gould 1853). *XII Congreso Nacional de Zoología, Resúmenes*, pp. 32.
- FOLK, J.E. & E.W. SCHIRMER, 1963, The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. *Anal. of Biological Chemistry*, Vol. 238, No. 12, pp. 3884-3894.
- GALGANI, F. & F. NAGAYAMA, 1986, Characteristic of digestive proteolysis of the crabs *Portunus trituberculatus*, *Portunus sanguinolentus* and *Charybdis japonica*. *Bulletin of the Japanese Scientific Fisheries*, 52 (12): 2183-2188.
- GIARD W., P. FAVREL, E. BOUCAUD-CAMOU, 1995, *In vitro* investigation of alpha-amylase release from the digestive cells of the bivalve mollusc *Pecten maximus*.
- GILDBERG, ASBJORN, 1987, Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 91B, No. 3, pp. 425-435.
- GLASS, H.J., N.L. MACDONALD, R.M. MORAN & J.R. STARK, 1989, Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 94B, No. 3, pp. 607-611.
- GOBIERNO DEL ESTADO DE TABASCO, SECRETARIA DE DESARROLLO, 1987, Catálogo de especies acuáticas de importancia comercial en el Estado de Tabasco. *Artes y métodos de captura*, pp. 43-58.
- GRIEBEL R., 1993, Fine structure of the three cell types found in the digestive gland of *Elysia viridis* (Opisthobranchia: Sacoglossa), *The Veliger* 36 (2): 107-114 (April 1).
- GRISLEY, M. S., 1993, Separation and partial characterization of salivary enzymes expressed during prey handling in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 105B, No. 1, pp. 183-192.

- GUEDES, L.M., A.M. FIORI & C.O. DIEFENBACH, 1980, Biomass estimation from weight and linear parameters in the apple snail, *Ampullaria canaliculata* (Gasteropoda: Prosobranchia). *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 68A*: 285-288.
- HEPHER, B., 1993, Nutrición de peces comerciales en estanques, *Ed. Limusa, México, Primera Edición*, pp. 193-232.
- HILY, A., 1983, Etude histoenzymologique de la digestion Chez *Ruditapes philipinarum*. *Bases Biologiques de l'Aquaculture, IFREMER, Actes de Colloques No. 1*, pp. 97-108.
- HOYLE, R. J., 1973, Digestive enzyme secretion After dietary variation in the American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can. 30*:1647-1653.
- JERONIMO, S.M., C.P. DIETRICH & H.B. NADER, 1989, Structure of sulfated glycosaminoglycans synthesized during the ontogeny of the mollusc *Pomacea sp.* *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 93B, No. 4*, pp. 899-903.
- JUAREZ PALACIOS, J.R. y G. PALOMO MARTINEZ, 1985, *Acuicultura Bases Biológicas del Cultivo de Organismos Acuáticos*, Editorial CECSA, 95 pp.
- KAMARUDIN, M. S., D. A. JONES, L. I. VAY, A. Z. ABIDIN, 1994, Ontogenic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture 123*:323-333.
- KEAWJAM R.S., 1987, The apple snails of Thailand: aspects of comparative anatomy, *Malacological Review, 1987, 20*:69-89.
- KEAWJAM R.S., 1986, The apple snails of Thailand: Distribution, habitats and shell morphology. *Malacological Review. 19*:61-81.
- KIM, H.R., S.P. MEYERS, J.H. PYEUM & S. GODBER, 1994, Enzymatic properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 107B, No. 2*, pp. 197-203.
- KLAUS-DIETER, J., 1976, Studies on the digestive enzymes of the stomachless bonefish *Carassius auratus gibelio* (blonch): endopeptidases. *Comp. Biochem. Physiol., Vol. 53B*, pp. 31-38.
- KOHN A. J., 1983, Feeding Biology of Gastropods. *The Mollusca, Vol. 5 Physiology, Part 2*, pp. 1-63
- KREEGER D. A. & C. J. LANGDON, 1994 digestion and assimilation of protein by *Mytilus trossulus* (Bivalvia: Mollusca) fed mixed carbohydrate / protein microcapsules. *Marine Biology 121*:479-488.
- KUNITZ, M., 1947, Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *J. Gen. Physiol., No. 30*, pp. 291-310.
- LAUFF, M. & R. HOFER, 1984, Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture, 37*: 335-346.
- LOWENSTEIN, H. & A. INGILD, 1976, Micromethod for determination of proteolytic enzymes in the pH range of 2.8 to 4.8. *Analytical Biochemistry, 71*: 204-208.
- LUM-KONG, 1989, The potential of *Pomacea urceus* as a culture species in Trinidad. *Slugs and Snails in World Agriculture No. 41*, pp. 33-39.
- LUM-KONG, A. & J.S. KENNY, 1989, The reproductive biology of the ampullarid snail *Pomacea urceus* (Müller). *J. Moll. Stud. Vol. 55*, pp. 53-65.
- LUM-KONG, A. & I. RAMNARINE, 1988, Biology of the river conch, *Pomacea urceus* (Muller, 1774). *U.W.I. BioSpectrum, Vol. 1*, pp. 43-44.

- LUNA, L.G., HT (ASCP), 19, Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, Ed. Mc Graw-Hill Book Company, Third Edition.
- MALEEYA, K., E. S. UPATHAM, S. VICHASRI & V. BAIDIKUL. 1990. Culture method for the thiarid snails *Brotia costula costula*, *Tarebia granifera* and *Melanoides tuberculata* (Prosobranchia: Mesogastropoda). *J. Med. and Appl. Malacol.* 2:93-99.
- MARTINEZ, T. & J.A. FARIAS, 1989, Contribución a la ecología y cultivo del caracol de agua dulce *Pomacea patula* (Mesogastropoda: Ampullaridae). *X Congreso Nacional de Zoología*. pp. 25-28.
- MARTINEZ, T., 1989, Contribución a la ecología y cultivo del caracol de agua dulce *Pomacea patula* (Mesogastropoda: Ampullaridae). *Tesis inedita, Instituto Tecnológico del Mar, Boca de Río, Ver.* pp. 40.
- MASSAHUD, N., S.G. FIGUEIREDO & M. AFONSO, 1988, Purification and some properties of  $\beta$ -D-glucosidase from the hepatopancreas of *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 91B, No. 1, pp. 111-115.
- McVEIGH, S., 1994. South Africans develop new diet for abalone. *Fish Farming International An EMA Pbusiness Publications*. Vol. 21,(2) : 15.
- MENDOZA ALFARO, R., 1993, Métodos para evaluar la digestibilidad proteica de los alimentos destinados a los organismos acuáticos. *Mem. Primer Simp. Intern. de Nutrición y Tecnología de Alimentos para Acuicultura*, pp.155-202.
- MENDOZA ALFARO, R., 1993b, Utilización de fuentes de proteína no convencionales y reciclamiento de subproductos para acuicultura. *Curso Teórico práctico sobre extrusión y sus aplicaciones en nutrición animal, F.C.B., U.A.N.L.*, pp. 1-29.
- MICHELSON, EDUARD H. 1961. On the Generics Limits in the family Pilidae (Prosobranchia: Mollusca). *Breviora, Museum of Comparative Zoology*, 133:1-10.
- MORALES, M.A., 1996, Analisis de la hidrolisis digestiva del camaron blanco *Penaeus vanamei* y estudio del tiempo de transito intestinal de diferentes alimentos a base de harina de pescado con diferente score biotoxicologico. *Tesis Inedita, Fac. de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.* pp.57.
- MORRIS, J.E, D'ABRAMO & R.C. MUNCY, 1990, An inexpensive marking technique to assess ingestion of formulated feeds by larval fish. *The Progressive Fish-Culturist*, Vol. 52, pp. 120-121.
- MUNILLA-MORAN, R. & J.R. STARK, 1989, Metabolism in marine flatfish-VI. Effect of nutritional state on digestion in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 95B, No. 3, pp. 625-634.
- MUNILLA-MORAN, R. & J.R. STARK, 1989, Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture*, 81: 315-327.
- NECK, R.W., 1986, A second record of an introduced apple snail, *Pomacea canaliculata*, from the lower rio grande valley of Texas. *Texas Conchologist*, Vol. XXII, No. 3, pp.54-57.
- NOMURA, S. & N. OHARA, 1994, Production and some properties of the extracellular protease of *Cytophaga columnaris*. *Fisheries Science*, 60(1), pp. 97-102.
- ONTIVEROS-LOPEZ, G. 1989, Producción semiintensiva de crías de *Pomacea* sp. (Caracol dulceacuicola) en estanques de concreto, como apoyo a los programas de recuperación de los sistemas palustres del municipio de Veracruz. *Tesis inedita, Instituto Tecnológico del Mar, Boca del Río, Ver.* pp.1-59.



- OSORIO-SANTAMARIA, M., 1987. Aspectos reproductivos del caracol de agua dulce (*Pomacea patula catemacensis*) con observaciones en laboratorio y campo. *Tesis inedita. Fac. de Ciencias Biológicas, Universidad Veracruzana.*
- PACHECO, J., O. TRAVIESO & R.E. MIRANDA, 1971, Contribución al estudio de la biología de *Pomacea urceus* (Molusca: Gasteropoda). *Acta Científica Venezolana* 22(Supl. 1), pp. 58
- PAYNE D. W. & N. A. THORPE, 1993, Carbohydrate digestion in the *Bivalve scrobicularia plana* (Da Costa). *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 104B, No. 3. pp. 499-503.*
- PEREYRA, E. & J. PACHECO, 1971, Características respiratorias de *Pomacea urceus* en su ciclo estacional. *Acta Científica Venezolana* 22(Supl. 1), pp. 58
- RANGEL-RUIZ, L.J. 1988. Estudio morfológico de *Pomacea flagelata* Say, 1827 (Gastropoda : Ampullaridae) y algunas consideraciones sobre su taxonomía y distribución geográfica en México. *Ser. Zool. (1):21-34.*
- REMOLINA-LOPEZ, M.T., A. NAVA-PASTRANA & A. SANTIAGO BAÑOS. 1986. Obtención de un concentrado enzimático a partir del caracol de jardín *Helix aspersa*. *Memorias del 3er. Congreso Nacional de Malacología y Conquiliología.* pp. 351-358.
- RODRIGUEZ, L., J. OGAWA & C.A. MARTINEZ-PALACIOS, 1991, Hatching of the queen conch, *Strombus gigas* L., based on early life studies. *Aquaculture and Fisheries Management* 22, 7-13.
- SANDHOLM, M., R.R. SMITH, J.C.H. SHIH & M.L. SCOT. 1976. Determination of antitrypsin activity on agar plates: relationship between antitrypsin and biological value of soybean for trout. *J. Nutr.* 106:761-766.
- SARATH ET AL, 1989, Protease assay methods. *Proteolytic enzymes a practical approach, Edited by R. J. Beynon & J. S. Bond. pp. 25-55.*
- SCHOLNICK, D.A., G.K. SNYDER & A.R. SPELL, 1994, Acid-base status of a pulmonate land snail (*Helix aspersa*) and a prosobranch amphibious snail (*Pomacea bridgesi*) during dormancy. *The Journal of Experimental Zoology*, 268: 293-298.
- SEGNER, H., R. RÖSCH, H. SCHMIDT & K.J. VON POEPPINGHAUSEN, 1989, Digestive enzymes in larval *Corgenus lavaretus* L.. *J. Fish Biol.*, 35: 249-263.
- SHEAR, M. & A. G. E. PEARSE, 1963, A Strach substrate film method for the histochemical localization of amylase. *Experimental Cell Research* 32 pp. 174-177.
- SHIAU, S. and B. CHOU. 1991. Effects of dietary protein and energy on growth performance of tiger shrimp *Penaeus monodon* reared in seawater. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(2):2271-2276.
- STOKNES, I., T. RUSTAD & V. MOHR, 1993, Comparative studies of the proteolytic activity of tissue extracts from cod (*Gadus morhua*) and herring (*Clupea harengus*). *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 106B, No.3, pp. 613-619.*
- THOMAS, M.A & J.B.R. AGARD, 1992, Metabolic rate depression in the ampullarid snail *Pomacea urceus* (Müller) during aestivation and anaerobiosis. *Comp. Biochem. Physiol. Vol. 102A, No. 4, pp. 675-678.*
- TRIEBSKORN, R., 1989, Ultrastructural changes in the digestive tract of *Deroceras reticulatum* (Muller) Induced by a carbamate molluscicide and by metaldehyde. *Malacologia* 31(1): 141-156.
- TRIEBSKORN, R & C. KUNAST, 1990, Ultrastructural changes in the digestive system of *Deroceras reticulatum* (Molusca; Gastropoda) induced by lethal and sublethal concentrations of the carbamate molluscicide cloethocarb. *Malacologia*, 32(1): 89-106.

- TSUKADA, T. & M. YOSHINO, 1987,** B- Glucoronidase from *Ampularia*. Purification and kinetic properties. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 86B, No. 3, pp. 565-569.
- UEBERSCHÄR, B.F.R., 1985,** Experiments on the development of proteolytic enzyme activity in turbot larvae (*Scophthalmus maximus*). *International Council for the Exploration of the Sea*, pp.1-10.
- VALDEZ , A.& C.J. AGUILERA 1986,** Cultivo del Caracol Manzano (*Pomacea paludosa*), Resúmenes del 3<sup>er</sup> Congreso Nacional de Malacología y Conquiliología, Soc. Mexicana de Malacología pp. 27.
- VAN WORMHOUD, A., A.Y. LeGALL & H.J. CECCALDI, 1972,** Activités des amylases et des protéases digestives chez *Penaeus kerathurus*. Existence d'un rythme circadien. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 274: 1208-1211.
- VONK, H.J. & J.R. WESRERN, 1984,** Comparative biochemistry and physiology of enzymatic digestion. Invertebrate proteinases. *Academic Press, London*, pp. 184-253.
- WETHMAR, C. & W. KLEINOW, 1993,** Characterization of proteolytic activities stimulated by SDS or urea and two-dimensional gel electrophoresis of proteins from *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 106B, No. 2, pp. 349-358.
- YAGINUMA, T. & M. USHIZIMA, 1991,** Proteolytic activity in the fat body during the pupal-adult metamorphosis of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Experimental Zoology*, 259: 145-153.
- ZWULLING, R. & H. NEURATH, 1981,** Invertebrate proteases. *Methods in Enzymology*, Vol. 80, pp. 633-664.

## APENDICE A.

### **BUFFER UTILIZADOS:**

**Buffer Citrato-Fosfato:** Disolver 21.011 g de Acido Cítrico en 1 lt. (0.1M). Disolver 28.39 g de Fosfato Disódico anhidro (0.2M). Mezclar las soluciones en las siguientes proporciones para obtener el pH en un rango de 2.2 a 8.0.

pH	ml. ac. Cítrico	ml. Fosfato
2,2	19,6	0,4
3	15,89	4,11
4	12,29	7,71
5	9,7	10,3
6	7,37	12,63
7	3,53	17
8	0,55	19,45

**Buffer Tris- HCl 10  $\mu$ M (NaCl 0.15M):** Disolver 1.211 g de Tris y 4.2 g de Cloruro de Sodio en 1lt. de agua y ajustar el pH a 7.3 con HCl 0.1 N.

**Buffer de Carbonato:** Disolver 10.6 g/lt. de Carbonato de Sodio anhidro (0.1M). Disolver 8.40 g/lt de bicarbonato de Sodio (0.1M). Mezclar las soluciones en las siguientes proporciones para obtener el pH en un rango de 9.2 a 10.8.

pH	ml de Carbonato	ml. de Bicarbonato
9.2	1.6	18.4
10	11	9
10.7	18	2

**Buffer Acetato de Sodio- HCl:** Disolver 82.04 g/lt de Acetato de Sodio. Disolver 36.47 ml de Acido Clorhidrico aforado a 1 lt (1M). Mezclar 10 ml de solución de acetato con el volumen indicado de HCl y aforar a 50 ml., para obtener el pH en un rango de 1.09 a 5.2

pH	ml. de HCl
1.09	14
1.99	10.5
3.09	9.7
3.95	8
5.2	2

Buffer Tris **0.1M (CaCl<sub>2</sub> 0.01M)**: Disolver 12.1 g de Tris y 1.11 g de Cloruro de Calcio en un litro de agua. Ajustar el pH a 7.8 con HCl 0.1M (8.3 ml de HCl concentrado/lit.).

Buffer Tris **0.025M (NaCl 0.5M)**: Disolver 3.025 g de Tris y 14 g de Cloruro de Sodio en un litro de agua. Ajustar el pH a 7.5 con HCl 0.1M (8.3 ml de HCl concentrado/lit.).

Buffer Acetato de Sodio  $\mu = 0.10$  (pH 5.5): Disolver 8.204 g de Acetato de Sodio por litro. Ajustar el pH a 5.5 con HCl 0.1 M (8.3 ml de HCl concentrado/lit.).

89

