

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCION

1.1 Cultivo de camarón en México

La producción pesquera a nivel nacional durante el año de 1995 fue de 1,404,384 ton de las cuales 157,574 ton correspondieron a técnicas acuaculturales (sistemas controlados y pesquerías acuaculturales). En el caso particular del camarón, a nivel nacional se tuvo una producción de 85,901 ton de peso vivo (67,482 en peso desembarcado), de las cuales 15,867 ton (18.47 %) se produjeron por medio de acuacultura. En los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit la producción de camarón por estas técnicas fue de 10,256; 3,773 y 617 ton respectivamente, siendo los estados anteriormente mencionados los principales productores de camarón mediante técnicas acuaculturales. La producción camarónica se lleva a cabo en granjas construidas para tal fin, de las cuales a nivel nacional existe un total de 231 que ocupan una superficie de 14,302 ha (PROFEPA-SEMARNAP, 1996).

En Febrero de 1994, se encontraban registradas en México 284 granjas en aproximadamente 17.4 mil ha de cultivo, de estas 71.7 % se encontraban operando, 9.2 % detenidas, 11.3 % en proceso de construcción y 7.6 % en proceso de ampliación, (SEPESCA, 1994). La tendencia ha sido hacia la disminución de la superficie productiva respecto al año anterior ya que a finales de 1995 el número de granjas era de 231 con 14,302 ha de superficie, (PROFEPA-SEMARNAP, 1996). Sin embargo nuestro país se ubica como segundo productor en el continente americano con 12,000 ton después que Ecuador con 100,000 ton y seguido muy de cerca por Colombia con 11,000 ton, (Rosenberry, 1995). Se espera un repunte en la actividad camarónica para los próximos años.

En el caso particular del estado de Sonora, existen un total de 22 granjas en una superficie de 1595 ha. La producción acuícola en el estado de Sonora en 1996 fue de 3,463.6 ton de peso vivo, de las cuales el 58.26 % de la producción lo obtuvieron las granjas con sistema de producción semintensivo Maritech, Tecnología Acuícola del Golfo de Cortés y Camarón dorado S.A de C.V con 959.3 ton, 587.36 ton y 471.13 ton respectivamente, (SEMARNAP, 1997).

Las granjas que operan en México lo hacen bajo diferentes tecnologías de cultivo, siendo el sistema semintensivo el que utiliza el 80 % de las granjas camaroneras, 17 % utilizan el sistema extensivo y el 3 % el sistema intensivo. En el sistema semintensivo se cuenta con precriaderos, se aplica alimentación suplementaria y fertilización, se realizan recambios de agua diarios y se obtienen rendimientos de 1-2 ton/ha. En el caso del sistema intensivo, se utilizan estánques pequeños de 2-3 ha, se aplican alimentos balanceados, aireación y recambios de agua que van entre un 30-50 % diario. El sistema extensivo utiliza zonas de engorda denominados encierros o tapos que fluctúan entre unas cuantas hasta cientos de hectáreas.

La especie que más se cultiva en México es el camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei*, debido a sus características de rápida adaptación a las condiciones ambientales de los sistemas de cultivo, por lo tanto los laboratorios que operan actualmente cubren parte de la demanda nacional de postlarvas de esta especie.

El abastecimiento de postlarvas se realiza principalmente por tres fuentes: a) laboratorios y nauplieras nacionales, b) medio silvestre, c) importaciones de países con laboratorios certificados. De acuerdo a datos de SEPESCA en 1994 existían en operación 14 laboratorios, además de 4 en construcción; asimismo 3 laboratorios se encontraban en remodelación. Se esperaba que los laboratorios en operación en 1994, suministrasen un 30 % de la demanda del mercado; el 70 % restante se cubriría con larva del medio natural así como de importaciones de países como Estados Unidos, Panamá, Costa Rica, y de Hawaii. En el último trimestre del año 1994 se suspendieron las importaciones de postlarvas en vista de la sospecha del origen viral del síndrome de Taura. México hasta

ese momento era una zona donde no se había reportado dicha epizootia. A principios del año de 1995 se detectó el virus del síndrome de Taura (STV) en camarones adultos de los litorales de Chiapas y Oaxaca, así como en camarones cultivados en el estado de Sinaloa.

La tendencia hacia la construcción de laboratorios de producción de larvas de camarón en nuestro país se mantendrá en los próximos años, hasta poder cubrir la mayor parte de la demanda de postlarvas por las granjas de engorda de camarón.

Las principales ventajas de la producción de postlarvas en laboratorio es que permite la planeación de los ciclos de cultivo debido a la homogeneidad de tallas al momento de la siembra y la obtención de postlarvas a partir de progenitores seleccionados.

La inversión inicial requerida para la construcción y operación de un laboratorio de producción larvaria es alta, debido a la necesidad de contar con infraestructura y personal capacitado para producción de cultivos auxiliares donde se obtiene alimento vivo como son las microalgas y nauplios de *Artemia salina*. Recientemente se ha implementado el uso de dietas microencapsuladas como complemento de alimento vivo o reemplazo total para incrementar el porcentaje de sobrevivencia en los estadios más críticos (zoea) mejorando el rendimiento al final del cultivo larvario y al mismo tiempo abatir los costos de producción de la larva.

1.2 Antecedentes

Para poder elaborar y suministrar con éxito dietas microencapsuladas a larvas de camarón, es necesario conocer los requerimientos nutricionales de cada uno de los estadios larvarios. No obstante que la composición cuantitativa de AAE se ha determinado en juveniles y adultos en camarones peneidos, (Ver Tabla 1) los estudios sobre la composición de AAE en larvas son muy escasos y solo se han reportado para el estadio de zoea en *P. japonicus* y *P. monodon*. (Deshimaru y Shigeno, 1972; Teshima *et*

al. 1986; Tacon, 1989, 1992; Akiyama, 1992; Liao y Sheen, 1993; Fox *et al.* 1994; Jones *et al.* 1997).

Por tal motivo es necesario el estudio de la composición aminoacídica de los estadios larvarios de *Penaeus vannamei* para estimar los requerimientos de AAs en la fase larvaria del ciclo de vida de esta especie.

Tabla 1
Composición de AAs del camarón *Penaeus japonicus* y *P. monodon*.

Aminoácido	<i>Penaeus japonicus</i>			<i>Penaeus monodon</i>		
	Composición en % del total de AAE + Cys y Tyr			composición g/100 g de Proteína		
	larva ¹	juvenil ¹	adulto ³	larva ²	juvenil ²	adulto ²
Treonina	5.9	8.2	7.73	3.32	3.25	3.23
Cistina	2.4	2.1	2.02	-	-	-
Valina	8.8	8.3	7.91	4.31	4.24	4.21
Metionina	5.7	5.4	5.15	2.09	2.34	2.30
Isoleucina	9.1	8.6	8.28	3.55	3.66	3.89
Leucina	12.1	15.0	14.36	6.23	6.29	6.61
Fenilalanina	8.6	9.0	7.55	3.81	3.45	3.20
Lisina	13.1	15.8	15.10	6.86	6.23	6.80
Histidina	4.5	4.5	4.23	1.84	2.04	1.91
Arginina	14.1	15.2	14.52	5.92	6.57	8.28
Tirosina	-	-	-	3.83	3.24	3.24

¹ Tomado de Tacon (1989)

² Tomado de Liao y Sheen (1993)

³ Calculado a partir de datos de Deshimaru y Shigeno (1972)

1.2.1 Descripción de la biología de la larva del camarón

La primer descripción de larvas de camarones peneidos fue realizada por el Dr. Fujinaga en 1942, quien detalló los cambios morfológicos que ocurrían en el desarrollo

larval de *Penaeus japonicus*, (Kurata, 1985), (Wiban y Sweeney, 1991). La descripción del desarrollo larvario para *Penaeus vannamei* la realizó Kitani (1986).

El camarón *P. vannamei* eclosiona a partir de huevos planctónicos en el Océano Pacífico Subtropical Oriental. Este ambiente relativamente estable, que se caracteriza por aguas de 35 partes por mil de salinidad; temperaturas de 26-28 °C y saturación de oxígeno 5-7 mg/l, presenta las condiciones óptimas para el desarrollo larvario en el ambiente natural así como en cautiverio.

Después de la eclosión, el camarón se desarrolla a través de tres estadios: nauplio, zoea y mysis para llegar al estadio de postlarva. asimismo tales estadios pueden subdividirse en otros subestadios morfológicamente distintos. La transición entre un estadio y otro se determina por el ciclo de muda, donde el tiempo aproximado para cada estadio se representa en la Tabla 2.

Tabla 2
Desarrollo larvario del camarón *Penaeus vannamei* en condiciones óptimas de cultivo (27 °C). Oceanic Institute, Hawaii. (Wiban y Sweeney, 1991).

Día	Estadio ó estadios presentes
1	Nauplio 4/5
2	Zoea 1
3	Zoea 1/2
4	Zoea 2
5	Zoea 2/3
6	Zoea 3
7	Mysis 1
8	Mysis 2
9	Mysis 3
10	Postlarva 1
11	Postlarva 2

Cuando la larva cambia de estadio, sus requerimientos alimenticios cambian así como su morfología. El nauplio recién eclosionado, (Figura 1) satisface todas sus necesidades nutricionales del vitelo. Le Moullac *et al.* (1994a) analizó las actividades de

tripsina, quimotripsina y amilasa en el estadio nauplio las cuales presentan una actividad menor que los siguientes estadios del ciclo larvario (0.2 unidades/mg de proteína).

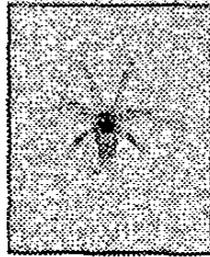


Figura 1. Nauplio V.

Después de cinco mudas, las reservas del saco vitelino se agotan y el nauplio sufre metamorfosis hasta el estadio de zoea (Figuras, 2, 3 y 4), iniciando la alimentación exógena con microalgas. Las actividades de tripsina, quimotripsina y amilasa cuando se alimentan con microalgas se incrementan a medida que el estadio zoea avanza, logrando una actividad máxima en Z-III de aproximadamente 0.47, 0.33 y 0.28 unidades/mg de proteína respectivamente, (Le Moullac *et al.* 1994a).

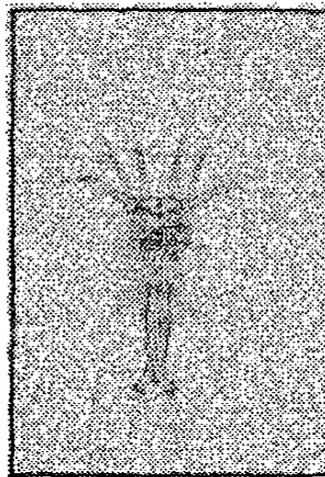


Figura 2. Zoea I.

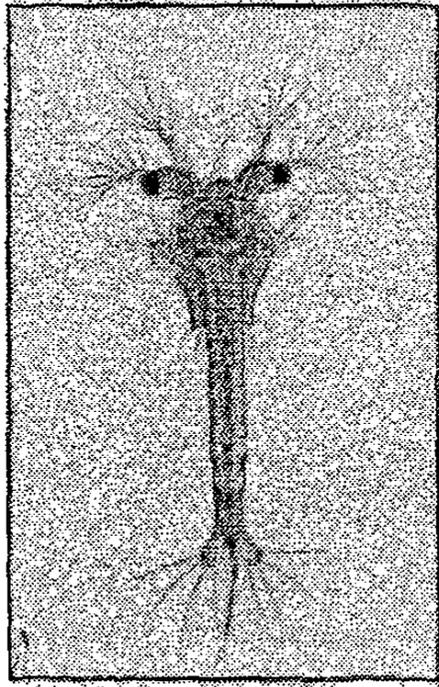


Figura 3. Zoea II.

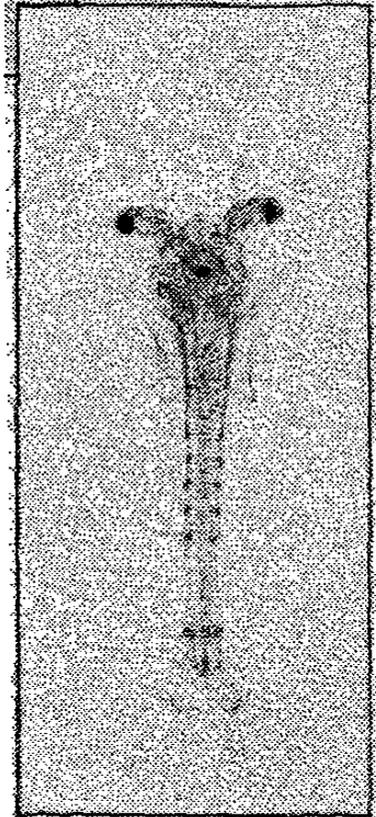


Figura 4. Zoea III.

La zoea sufre la metamorfosis al estadio de misis (Fig. 5, 6 y 7), cambiando sus hábitos alimenticios de herbívoros a carnívoros, alimentándose a base de zooplancton. La actividad de tripsina en las larvas sigue incrementándose pero a una velocidad menor cuando se les alimenta con nauplios de *Artemia salina* hasta alcanzar un máximo de 0.43 unidades/mg de proteína, la quimotripsina logra una actividad máxima de aproximadamente 2.8 unidades/mg de proteína en M-II descendiendo en M-III hasta 0.22 unidades/mg de proteína, (Le Moullac *et al.* 1994a).

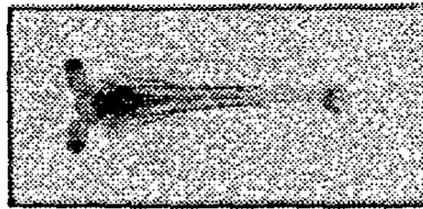


Figura 5. Misis I.

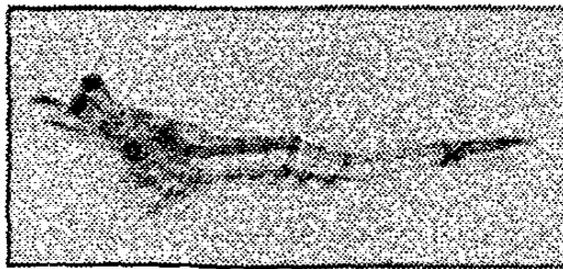


Figura 6. Misis II.

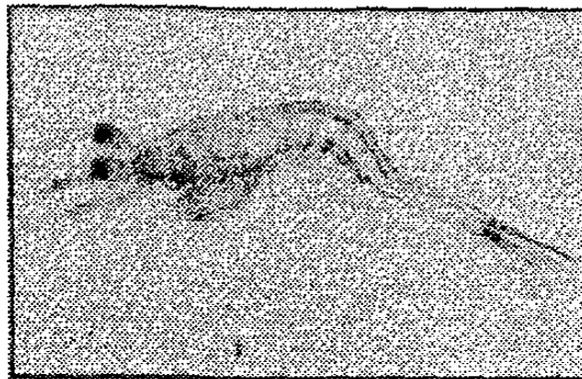


Figura 7. Misis III.

Después de tres mudas, la misis planctónica se convierte en postlarva. La postlarva (Fig. 8) se observa como un camarón adulto en miniatura y comienza a tener hábitos similares a éste. Las actividades de quimotripsina y amilasa descienden a partir del

estadio M-III hasta valores de 0.1 unidades/mg de proteína y 0.2 mg de maltosa liberados en 10 min/mg. La tripsina tiene un incremento en el estadio PL-1 manteniéndose estable en PL-4 cuando se proporcionan a las larvas dietas artificiales pero disminuye cuando las larvas se alimentan con nauplios de *Artemia*. Harris *et al.* (1986) citado por Jones *et al.*(1997) sugiere que la proteína en las dietas artificiales es menos digestible que la proteína en los nauplios de *Artemia* y atribuye el incremento en la secreción de enzimas a una respuesta a la baja disponibilidad de sustrato.

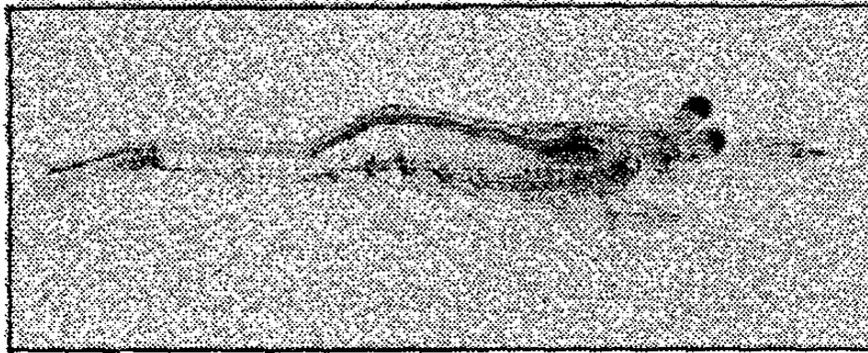


Figura 8. Postlarva.

Aunque los estadios larvarios son planctónicos (nado libre), las postlarvas son bentónicas (permanecen en el fondo). Este cambio permite a las larvas, que fueron arrastradas a los esteros por las corrientes de mareas, situarse en el fondo y permanecer en este sitio hasta alcanzar el estadio de subadulto.

1.2.2 Cultivo larvario de camarones peneidos

La inducción al desove en camarones peneidos se realizó por primera vez en el laboratorio en el año de 1934 por Fujinaga. Los trabajos de Fujinaga proporcionaron las siguientes observaciones: a) El estadio nauplio se mantenía sin dificultad con vida. b) En el estadio zoea las larvas se debilitaban y morían c) En el estadio de misis las larvas eran más fuertes que las zoeas y pudieron mantenerse vivas por un largo tiempo. d) La postlarva adquirió mayor fortaleza y su manejo fue más fácil, (Cruz-Suárez, 1988b). De las observaciones anteriores el estadio de zoea es el más delicado dentro del cultivo

larvario y en el que se debe poner mayor atención para obtener buenos índices de sobrevivencia. Como el estadio zoea de camarón es el período más difícil dentro del cultivo larvario, se piensa que un buen cultivo significa dar alimento adecuado para garantizar una buena sobrevivencia. Por lo tanto es importante conocer los requerimientos nutricionales de los diferentes estadios larvarios del camarón blanco del Pacífico *Penaeus vannamei* para realizar formulaciones microparticuladas que incrementen el rendimiento de la cría larval.

1.2.3 Proteínas

Las proteínas son el mayor componente de los tejidos en los organismos vivos en términos de peso seco. Las proteínas realizan funciones estructurales muy importantes y como enzimas son vitales para el metabolismo. Las proteínas son compuestos orgánicos complejos de alto peso molecular que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre, se forman por polimerización de AAs. No obstante que se han detectado más de 100 AAs de fuentes naturales, solo 20 de ellos se encuentran comúnmente en tejidos animales. Las diferencias físicas y químicas entre los AAs dan origen a las proteínas con diferentes conformaciones estructurales, por lo tanto tales diferencias son un factor muy importante en la definición de las funciones de una proteína específica. Las plantas y microorganismos comparados con los animales pueden sintetizar una variedad más amplia de AAs, sin embargo éstos últimos han mantenido la capacidad para sintetizar ciertos AAs de *novo*, pero también deben obtener otros AAs a través de su dieta. Al primer grupo se les conoce como aminoácidos no esenciales (AANE) y al último grupo se le conoce como aminoácidos esenciales (AAE). Es muy importante aclarar que estos términos se aplican solo a los requerimientos dietéticos, además la interconversión entre algunos AAs puede ser posible, (Tacon y Cowey, 1985; Robinson, 1992).

Las proteínas ingeridas por el organismo a través del alimento son hidrolizadas para liberar AAs que pueden emplearse para síntesis de proteína en los tejidos o si la proteína ingerida se encuentra en exceso se emplea como fuente de energía.

Existe una fuerte interacción entre los tres principales grupos de nutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) como fuentes de energía metabólica ya que estos compuestos pueden actuar en presencia de oxígeno como sustratos para la producción de dióxido de carbono y agua con la consecuente producción de calor, siendo las proteínas muy susceptibles a ser utilizadas como fuente de energía.

1.2.4 Requerimientos nutricionales en proteínas y AAs en crustáceos

Los crustáceos como otros animales necesitan proteína en forma de AAL para el mantenimiento de la vida, crecimiento y reproducción, sin embargo la información específica en nutrición proteica y aminoacídica es aun muy limitada.

Los primeros estudios nutricionales en peces, sobre AAs se realizaron a finales de los 50 y principios de los 60 con salmón chinook, usando dietas formuladas para simular el contenido de AAs del huevo de gallina entero, con caseína y gelatina suplementada con AAs puros, como fuente de proteína, (Wilson, 1996).

En el caso de los crustáceos, y en especial de los camarones, en 1970 Kanazawa *et al.* desarrollaron una dieta basada en el conocimiento adquirido a partir de estudios con salmón chinook, gusano de seda, y *Artemia salina*, para el estudio de los requerimientos nutricionales de *P. japonicus*. A partir de entonces, numerosos estudios y datos sobre requerimientos nutricionales en diversas especies de camarones han sido publicados siendo la proteína el nutriente más estudiado. Algunas revisiones sobre los requerimientos proteicos y de AAs en crustáceos han sido publicadas como la de Deshimaru (1982), la de Kanazawa (1986) citada por Guillaume y la de Guillaume (1997), siendo esta última la más completa. Éste autor hace énfasis en que lo que realmente se esta determinando en nuestros días es el nivel óptimo de proteína para un buen crecimiento y no el requerimiento verdadero que corresponde a la cantidad de nutriente mínima necesaria por animal o por biomasa por día, es decir, que los animales son alimentados con cantidades de nutrientes, no con porcentajes o proporciones.

1.2.4.1 Requerimientos de proteína cruda

Cuando se comparan los requerimientos de proteína de especies diferentes, se observa que existen grandes diferencias entre ellas, aun en el caso de un mismo género (Cruz-Suárez, *op. cit.*). Estos valores varían desde un 55% para *P. japonicus* hasta un 25% para *P. aztecus*. En general estos niveles de proteína son bastante elevados y similares al rango observado en especies de peces (Tacon y Cowey, 1985).

Estos elevados requerimientos proteicos en peces y camarones se atribuyen a sus hábitos alimenticios carnívoros/omnívoros/hervívoros, correlacionados a su alta o baja actividad enzimática (Chuang, 1990) y al uso preferencial de la proteína dietaria sobre los carbohidratos como fuente de energía (Cowey, 1994). En contraste con los animales terrestres, los peces y los camarones pueden obtener más energía metabolizable a partir del catabolismo de proteínas que de los carbohidratos (Wilson 1985; Tacon y Cowey, 1985).

Los requerimientos proteicos globales no son constantes y varían en función de factores endógenos y exógenos dentro de los cuales los que más influyen son: edad o etapa de desarrollo, hábitos alimenticios de la especie, calidad de la fuente proteica (balance de AAs), valor energético de la dieta y factores abióticos como temperatura y salinidad.

1.2.4.2 Requerimientos cualitativos para AAE

La naturaleza de los AAE se ha determinado para diferentes crustáceos (*Uca pugilator* (Claybrook, 1976), *Cancer magister* (Lasser y Allen 1976), *Palaemon serratus* (Cowey y Forster, 1971), *Penaeus aztecus* (Shewbart *et al.*, 1972), *P. monodon* (Coloso y Cruz, 1980), *P. japonicus* (Kanazawa y Teshima, 1981), *Macrobrachium rosenbergii* (Watanabe, 1975) citado por Guillaume (1997), *Macrobrachium ohione* (Miyajima *et al.*, 1978), *Astacus astacus* (Zandee, 1966) y *Homarus americanus* (Gallagher y Brown, 1975), utilizando la técnica de marcado con radioisótopos inyectando un precursor

radioactivo (glucosa, acetato o piruvato) para establecer cuales AAs se incorporaban a las proteínas.

Los resultados concuerdan para todas las especies estudiadas, los AAs que no presentan radioactividad son los esenciales para los organismos y estos son: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. La tirosina es semiesencial lo mismo que la cistina (dímero de la cisteína) ya que pueden sintetizarse por hidrólisis de la fenilalanina y de la metionina respectivamente. Su presencia en la dieta reduce los requerimientos de estos AAE.

1.2.4.3 Balance de aminoácidos

El valor nutricional de una proteína depende de su balance de AAs, así como de la cantidad presente de manera disponible en la dieta. Phillips y Brockway (1956) citado por Deshimaru (1982) sugieren que la proteína dietaria que más se aproxima a la proteína corporal del animal, tiene el valor nutricional potencial más elevado.

El número de proteínas de referencia usadas en estudios nutricionales de crustáceos ya sea como ingredientes en una dieta control o como referencia en cálculos de formulación, es bastante amplio.

Partiendo de la suposición de una alta correlación entre el perfil de AAE de la composición corporal del tejido y el de la dieta, Peñaflores (1989) uso el perfil de AAE del camarón entero, para calcular un índice de AAE. Sin embargo, la harina de camarón no mostro ser una buena proteína "ideal" para crustáceos tal como lo ha sido la harina de pescado para los peces (Kanazawa 1986, 1990) citados por Guillaume (1997), esto al parecer debido a la interferencia introducida por la quitina en la determinación de proteína cruda de este ingrediente.

Por su parte, Deshimaru (1982) propone la composición proporcional de AAE del cuerpo entero de la almeja (*Venerupis philippinarum*) como una referencia debido al excelente crecimiento que presentan los camarones al consumirla; Boghen *et al.* (1982) y

Castell (1990) proponen la proteína de cangrejo (*Cancer irroratus*) como proteína de referencia para ser utilizada en los estudios de nutrición de crustáceos.

El perfil de AAs de estas proteínas de referencia así como recomendaciones y requerimientos de AAs disponibles actualmente, han sido resumidas por Guillaume (1997) en su revisión sobre requerimientos de proteínas y AAs (Tabla 3).

Tabla 3

Perfil de AAs de proteínas de referencia (% de Proteína) para formulación de alimentos empleadas en estudios nutricionales en camarón, (Guillaume, 1997).

Aminoácido	Proteínas de referencia			Tejidos			Recomen- da-ciones 3	Requerimiento
	Almeja de cuello corto 3	Caseína libre de vitaminas ¹	Huevo de galina 4	Largosta juvenil 1	Camarón 1	Músculo de cola de camarón 2		
Arginina	5.8	3.3	6.8	6.8	6.5	7.5	5.8	5.5 ⁶
Histidina	1.3	2.2	2.6	2.1	1.1	1.9	2.1	
Isoleucina	3.2	4.7	5.8	3.8	4.9	3.6	3.4	
Leucina	5.0	8.5	9.2	6.4	9.9	6.5	5.4	
Lisina	5.2	6.7	7.6	4.0	8.5	6.4	5.3	4.5-5.2
Metionina	2.0	3.0	3.5	2.8	2.7	2.6	2.4	
Metionina+Cistina	2.3	3.4	6.1	3.7	3.6	3.3	3.6	
Fenilalanina	2.7	4.2	5.3	3.9	4.9	3.6	4.0	
Fenilalanina+Tirosina	5.2	9.4	10.0	7.3	8.8	-	7.1	
Treonina	3.4	4.0	5.2	3.8	4.4	3.4	3.6	
Triptófano	-	1.6	1.8	2.3	1.1	1.1	0.8	
Valina	3.3	5.3	6.8	4.6	3.4	3.8	4.0	

¹ Boghen y Castell (1981), ² Lim (1993), ³ Deshimaru (1982), ⁴ Sauveur (1988),

⁵ Akiyama et al. (1991), ⁶ Chen et al. (1992), ⁷ Fox et al. (1995a).

Shigueno (1974) también hace alusión a este tipo de correlación con las proteínas de referencia, remarcando especialmente la similitud entre el perfil de AAs del músculo de camarón, con el de la almeja *Venerupis philippinarum*, el calamar y la harina de pescado todos ellos considerados como excelentes fuentes de proteína en dietas para camarón, (Fig 9).

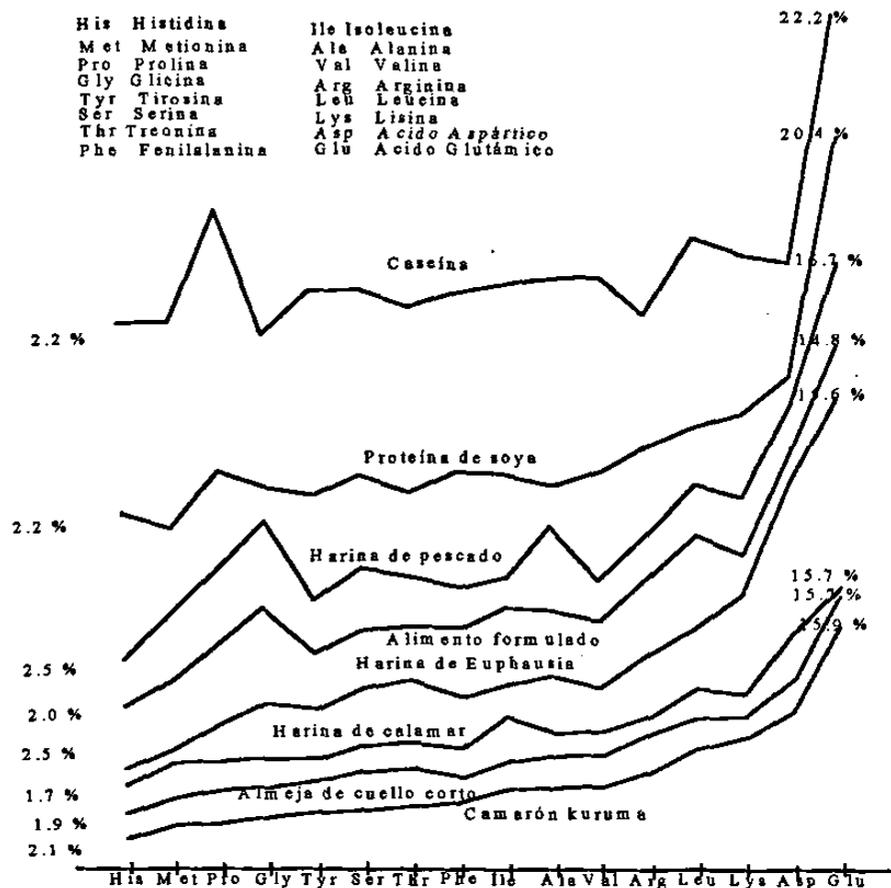


Figura 9. Composición de aminoácidos en 8 clases de ingredientes en relación a 16 aminoácidos. Tomado de Shigeno (1974).

En el eje de las ordenadas se describen los AAs analizados. Los valores descritos a la izquierda de la gráfica es el valor más bajo del perfil de AAs, mientras que los números de la derecha describen el valor más alto.

La proteína del músculo de camarón también ha sido usada como referencia por Lim (1993) citado por Guillaume (1997) y recientemente por Fox *et al.* (1996).

Para comparar los perfiles de AAs de diferentes proteínas, en lugar de determinar el grado de correlación entre los perfiles de las mismas, Deshimaru (1982) propone calcular diferencias a partir de las proporciones de los AAs con respecto a la metionina, de la proteína de referencia. De esta manera se pueden obtener valores numéricos que determinan la magnitud o la importancia de esas diferencias para cada AA. Este es el

mismo tipo de cálculo que se utiliza en el concepto de proteína ideal que se mencionará más adelante.

1.2.4.4 Requerimiento cuantitativo de aminoácidos

El estudio de los requerimientos cuantitativos de AAs se puede realizar por varios métodos, Cowey (1994) hace una revisión sobre los métodos utilizados principalmente en peces, estos métodos incluyen estudios de crecimiento, contenido de AAs en suero y tejido, oxidación de AAs y deposición diaria en el cuerpo del pez (Método de Ogino).

El método más usado en crustáceos es el de crecimiento a través del suministro de niveles graduales de cada AA en forma pura, dentro de una dieta definida para obtener una curva dosis-respuesta, en la cual la respuesta evaluada es la ganancia en peso o el crecimiento.

Deshimaru (1974, 1982) prueba AAs en dietas puras a base de caseína, para *P. japonicus*, pero no logra obtener una dieta efectiva basada en una mezcla de AAs puros, encuentra que la arginina libre es 900 veces menos eficiente que la arginina ligada a proteína, en satisfacer el requerimiento de este AA.

Muchos investigadores consideran que los AAL no son eficientemente asimilados por los camarones juveniles por problemas de lixiviación, de velocidad de absorción y hasta de pH en el tubo digestivo, sin embargo hay una serie de estudios que demuestran una mejora en el crecimiento al agregar AAs puros, (Guillaume, 1997).

Teshima *et al.* (1992) mejora el balance de proteínas uniendo AAs limitantes a proteínas, haciendo plasteínas. Recientemente Chen *et al.* (1992a) demuestran que el crecimiento de *P. monodon* se mejora cuando se suplementa una dieta a base de caseína, con arginina pura microencapsulada con acetato de celulosa, phtalato y glicolmonoestearato. La adición de la arginina cristalina sin encapsular no fue efectiva.

Actualmente solo se han determinado los requerimientos de dos AAE en camarones por el método de dosis-respuesta, estos son: arginina (encapsulada) para juveniles de *P. monodon* (Chen *et al.*, 1992b) y lisina (unida covalentemente a gluten de trigo) para juveniles de *P. vannamei*, (Fox *et al.*, 1995, 1996a).

1.2.4.5 Concepto de proteína ideal y recomendaciones de contenido de AAE individuales en dietas comerciales para uso en formulación

La primera proteína ideal real, en la que se encontraban presentes todos los AAE en las cantidades mínimas requeridas tanto para mantenimiento como para formación de proteína, fue presentada por Dean y Scott en 1965 para pollos jóvenes (Baker, 1995). En 1981 el Consejo de investigación Agrícola (ARC) de Gran Bretaña introdujo la Proteína ideal ARC para cerdos. El perfil ARC se apoyaba en gran parte en el perfil de AAs de todo el cuerpo del cerdo y debido a la diferencia en la tasa de metabolismo de los diferentes AAs, se llegaron a sobreestimar los niveles ideales de lisina y a subestimar los niveles ideales de AAs que se metabolizan más rápido como son los AAs azufrados, treonina y triptófano. Actualmente este concepto esta bien desarrollado en cerdos y pollos y se está iniciando su aplicación en nutrición acuícola. En este caso el uso de este concepto sera sumamente ventajoso ya que conociendo solo el requerimiento de un AA y usando una buena proteína de referencia se pueden estimar los requerimientos de todos los demás AAs. Obviamente si el requerimiento del AA de base no es bien determinado todo el resto de la información también será erróneo. Es importante señalar que en cerdos y pollos el requerimiento del AA que se usa de referencia es el AA más limitante y el que intervenga de manera casi exclusiva en la síntesis de proteínas, lo cual es el caso de la lisina para pollos y cerdos.

Fox *et al.*(1996b) fue el primero en aplicar este principio para estimar los requerimientos de AAE en camarones juveniles *P. vannamei* de diferentes tallas y medios de cultivo, usando como proteína de referencia el músculo de la cola del camarón o el camarón entero y el requerimiento de lisina obtenido a través de estudios de dosis-respuesta.

La estimación de requerimientos propuesta por Fox (1996b) no presenta diferencias significativas con los valores recomendados por Akiyama para dieta comercial, excepto para la arginina, que además de intervenir en la síntesis de proteínas interviene como componente del fosfágeno para la contracción muscular en crustáceos (Guillaume, 1997). Los resultados de este estudio así como las recomendaciones de contenido de AAs para dietas comerciales propuestos por Tacon (1989), Fox *et al.*, (1996b) y Akiyama (1992) se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4
Requerimiento de AAE reportados para el camarones g/100 g de proteína.

AMINOACIDO	g / 100 g de proteína		
	Nivel comercial ¹	Juveniles de 105 mg. ²	Nivel comercial ³
Histidina	2.1	-	1.53
Arginina	5.8	7.99	5.43
Treonina	3.6	2.97	3.35
Metionina	2.4	2.20	1.89
Cistina	1.2	-	0.94
Triptófano	0.8	-	0.94
Valina	4.0	3.87	2.97
Fenilalanina	4.0	3.62	2.69
Tirosina	3.1	-	2.72
Isoleucina	3.5	3.53	2.38
Leucina	5.4	5.79	4.89
Lisina	5.3	4.67	5.13

¹ Akiyama, (1991).

² Fox, (1996). Para *P. vannamei*.

³ Tomado de Tacon (1989) Calculado a partir del perfil de la almeja de cuello corto.

1.2.5 Nutrición larvaria de crustáceos

El desarrollo exitoso de los cultivos larvarios de peces y crustáceos es determinante para el desarrollo de la acuicultura. En el caso de camarones peneidos la tecnología de la crianza larvaria esta relativamente bien establecida, ya que en

condiciones de laboratorio se obtienen buenos resultados cuando se suministra alimento vivo.

En la crianza larval de crustáceos se emplean dietas artificiales en forma de micropartículas ó microcápsulas, como complemento a un régimen alimenticio a base de microalgas (Jones *et al.*, 1979).asimismo, existen laboratorios de producción de larvas con tendencia hacia la sustitución total de microalgas mediante el suministro de dietas microencapsuladas, (Jones *et al.*, 1987, 1997; Ottogalli, 1993).

Recientemente se ha tratado de sustituir el alimento vivo por micropartículas inertes y actualmente son escasos los experimentos donde no se presenta una consecuencia debido a esta sustitución, como disminución en la tasa de sobrevivencia, composición bioquímica o el retardo en el desarrollo del cultivo larvario. Esto se explica debido a que no se ha logrado proveer con alimento artificial cada una de los macro y micronutrientes que son aportados por el alimento vivo o sus metabolitos. Sin embargo a pesar de que la sustitución total con dietas artificiales en forma de microcápsulas pueda ser una práctica común a mediano plazo, el conocimiento total de los requerimientos nutricionales en larvas de camarones peneidos no se ha logrado, (Jones *et al.*, 1997) por lo que actualmente no se formula la dieta más adecuada para los estadios larvarios de alimentación exógena.

El estudio de los requerimientos nutricionales en larvas de crustáceos se inició desde hace más de dos décadas por el Dr. Kanazawa trabajando con *P. japonicus* y D.A. Jones con *P. monodon* y *P. japonicus*. Estos investigadores tuvieron que desarrollar técnicas de microencapsulación de dietas para larvas planctónicas de camarones peneidos mediante el método de polimerización interfacial desarrollado por Chang *et al.*, 1966.

A pesar de que la microencapsulación está disponible como herramienta para el estudio de requerimientos nutricionales en larvas de crustáceos, (Amjad y Jones, 1992) aun existen limitaciones.

Jones *et al.*, (1993) menciona las causas por las que se ha dificultado el estudio de los requerimientos en larvas de camarones peneidos entre los que considera el cambio de nivel trófico durante la alimentación planctónica, escaso conocimiento de la biología de la alimentación y fisiología digestiva de las larvas de peneidos durante el cultivo larvario (comportamiento alimenticio, ingestión, digestión y energética). En el comportamiento alimenticio se debe considerar la densidad de alimento en el agua, el tamaño de partícula, la estabilidad si se están probando alimentos artificiales, así como el programa de alimentación. En la ingestión es de gran interés observar la selección química y mecánica de la dieta así como el comportamiento de adaptación a éstas. En el proceso de la digestión se deben conocer la morfología y funcionalidad del tracto digestivo, así como los cambios ocurridos durante la ontogénesis; las actividades enzimáticas y su cambio durante el desarrollo larval; así como la influencia de la dieta sobre la actividad de las enzimas.

El principal obstáculo en la formulación de dietas artificiales es el escaso conocimiento que actualmente se tiene sobre los requerimientos nutricionales de larvas de crustáceos. Por lo que la efectividad de una dieta artificial se restringe a la ausencia de factores traza los cuales están sutilmente involucrados en la composición de la dieta natural perfecta de las especies en cuestión ó en el medio de cultivo, (Jones, 1997).

A pesar de que esta limitante no ha sido superada parcialmente, en la actualidad existen en el mercado una amplia diversidad de alimentos para crianza larval. Sin embargo los estudios clásicos de requerimientos a partir de bioensayos dosis-respuesta no pueden aplicarse de manera adecuada para obtener resultados suficientemente precisos, debido a limitaciones en los métodos de elaboración de dietas microligadas o microencapsuladas que puedan suministrar nutrientes al organismo de manera eficiente.

Debido a lo anterior los requerimientos nutricionales para larvas de crustáceos son muy escasos. Jones *et al.*, (1997) hace una revisión de ellos refiriéndose principalmente a macronutrientes para larvas de *P. japonicus* y *P. monodon*.

Existen pocos estudios sobre los cambios ontogénicos respecto al contenido energético, enzimas digestivas (Descritos en 1.2.1) , perfiles de aminoácidos y lipídicos de las larvas de camarón.

El contenido energético a través del desarrollo larvario de *P. japonicus* en milicalorías por individuo, (Cahu, 1979) indica una disminución a partir de embriones tempranos con 18.36 mcal/ind, 17.34 mcal/ind en embriones tardíos, en el estadio N-II de 15.98 y en N-V de 12.65 mcal/ind. Durante la fase zoea alcanza un valor máximo en Z-III con 75.71, al final de la fase mysis logra un valor de 207.36 mcal/ind y an el estadio Pl-IV registra un valor de 635.36 mcal/ind.

Los requerimientos de proteína para *P. monodon* están en el rango de 30-56 %, mientras que para *P. japonicus* están entre 44-55 %. El requerimiento de AAs de crustáceos se ha estudiado desde hace varios años pero solo en su forma adulta (Akiyama et al., 1992), por lo que los datos de requerimientos de AAE de referencia (ver tabla 3) para la formulación de dietas para crustáceos invariablemente son los propuestos por Akiyama op. cit.asímismo Jones (1997) sugiere que actualmente no existe razón para creer que las larvas tengan requerimientos diferentes; sin embargo acepta que mucha investigación falta por realizarse.

El estudio de los requerimientos nutricionales de larvas de peneidos también se ha realizado a través de estimaciones indirectas definidas por medio de dos aproximaciones. 1) El estudio de la composición bioquímica de los alimentos vivos y 2) El estudio de la variación de la composición bioquímica durante la ontogénesis. En el primer caso, generalmente se ha determinado el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos. Recientemente se han comenzado a estudiar nutrientes más específicos como ácidos grasos y aminoácidos, sin embargo se ha encontrado que existe mucha variación en la composición bioquímica de los alimentos vivos en función de los parámetros fisicoquímicos como son temperatura, fotoperíodo etc. y que además existe poca correlación entre estos y los escasos estudios de la composición corporal de las larvas.

En el segundo caso, el número de trabajos son muy escasos, teniendo como antecedentes los trabajos de Cahu (1979) que estudió los cambios en el contenido energético, talla y materia seca en el desarrollo larval de *P. japonicus*. Mourente *et al.* (1995). y Araujo (1989) quienes estudiaron los cambios del contenido de lípidos durante la ontogénesis en larvas de *P. keraturus* y *P. stylirostris*. Laubier-Bonichon *et al.* (1977) Lovett y Felder (1990), Le Moullac (1992, 1994a,b) quienes analizaron las proteínas solubles y enzimas digestivas en *P. japonicus*, *P. setiferus* y *P. vannamei*, así como los cambios en la composición de aminoácidos en larvas de carpa, (Dabrowski, 1981); bagre (Wilson y Poe, 1984) y salmón (Arai, 1985).

En el presente trabajo se propone como estrategia la técnica de análisis del cuerpo de los diferentes estadios larvarios mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en la modalidad de fase reversa (CLAR-FR), el cual tiene una alta correlación con el requerimiento de AAs en la dieta, Tacon y Cowey (1985), Reed y D'Abramo (1989). Para contribuir en el establecimiento de una referencia de los requerimientos de AAE en larvas de peneidos criadas en laboratorio a nivel comercial.

Se propone el análisis de AAs del cuerpo entero debido al pequeño tamaño de cada estadio larvario, como se ilustra en la Tabla 5.

Tabla 5.

Relación de tallas de los estadios larvarios de *Penaeus vannamei* (Kitani,1986).

Estadio	Longitud modal (mm)
Huevo	0.28
Nauplio ₂	0.34
Nauplio ₃	0.35
Nauplio ₄	0.36
Nauplio ₅	0.38
Nauplio ₆	0.43
Zoea ₁	0.86
Zoea ₂	1.25
Zoea ₃	1.97
Misis ₁	2.79
Misis ₂	3.28
Misis ₃	3.74
Postlarva	4.12

1.2.6 Determinación cuantitativa de AAs mediante CLAR-FR

La separación y determinación cuantitativa de una matriz proteica compleja constituye un problema de gran importancia en muchas áreas de investigación ya sea en trabajos de investigación básica o en control de calidad. Generalmente las muestras son hidrolizados de proteínas o fluidos biológicos (plasma, orina). En todos los casos anteriores, la complejidad de la muestra demanda una gran capacidad de resolución del sistema cromatográfico, (Joseph y Marsden, 1986; Jones y Gilligan, 1983).

La química analítica actual se apoya fundamentalmente en las técnicas instrumentales, de las cuales, la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es la que ha experimentado mayor auge.

Este auge es debido al numeroso tipo de problemas que se pueden resolver con esta técnica, gracias al reciente desarrollo de nuevas y mejores fases estacionarias, detectores de gran sensibilidad y selectividad, así como la automatización y manejo del equipo cromatográfico a través de la conexión a una microcomputadora, (Guerrero y Viader, 1994).

En el método tradicional de intercambio iónico de Moore y Stein desarrollado en 1963, (Lehninger, 1975), los AAs libres eran separados sobre columnas de resinas sulfonadas de intercambio catiónico y la detección y cuantificación se realizaba espectrofotométricamente en el rango visible por una reacción post-columna con ninhidrina. La versión automatizada de este sistema está representada desde hace varias décadas por el sistema de CLAR, empleando presiones por encima de unos cientos de psi, utilizándose columnas relativamente grandes. Aparatos automatizados de este tipo han alcanzado un alto nivel de sofisticación y las técnicas se han refinado por varios grupos de investigadores.

El reciente interés que surge en CLAR, se basa en el desarrollo de columnas empacadas con micropartículas muy uniformes de (3-10 μm) químicamente modificadas para dar una cubierta superficial con diferentes grupos funcionales. Esta característica confiere alta resolución empleándose columnas cortas (15-30 cm) y altas presiones (1000-6000 psi) para tener razonables velocidades de flujo, (Joseph y Marsden, 1986).

Los empaques en fase reversa (FR) tienen la superficie cubierta con cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas, se usan con fases móviles polares (principalmente acuosos) y han demostrado que son extremadamente versátiles en el análisis de tejidos y fluidos fisiológicos comunes así como drogas. La principal característica de dichos compuestos es su naturaleza hidrofóbica e hidrofílica. Se ha estimado que el 80 % de los trabajos en CLAR son realizados mediante empaques FR, (Quattrocchi *et al.*, 1992; Guerrero y Viader, 1994).

1.3 Objetivo General

Estimar los requerimientos cuantitativos de aminoácidos esenciales a partir de la cuantificación de aminoácidos proteicos corporales de los diferentes subestadios larvarios de *Penaeus vannamei* criados en laboratorio.

1.3.1 Objetivos Particulares

- 1.- Estandarizar la técnica de análisis de aminoácidos proteicos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en la modalidad de fase reversa.
- 2.- Cuantificar la proteína corporal soluble y la composición de aminoácidos proteicos de los estadios y subestadios larvarios de *Penaeus vannamei*.
- 3.- Determinar si existen cambios ontogénicos significativos en la composición de aminoácidos proteicos.
- 4.- Estimar el requerimiento de aminoácidos esenciales de *P. vannamei* en los estadios larvarios de alimentación exógena y comparar con recomendaciones actualmente disponibles en bibliografía.

1.3.2 Hipótesis

Considerando que existen diferencias en los hábitos alimenticios de los estadios larvarios, en este trabajo se plantea que también existen diferencias ontogénicas significativas en la composición y por consecuencia en el requerimiento de aminoácidos esenciales.

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general

Para estimar los requerimientos de AAE en los estadios larvarios de *Penaeus vannamei* se planteó la estrategia general descrita en la Fig. 11. Se estandarizó la metodología para la cuantificación de AAs mediante CLAR-FR, donde se analizó una proteína de referencia (ASB) y se realizó la comparación de los resultados obtenidos con la composición teórica según su secuencia aminoacídica. Enseguida se realizó la colecta de los estadios larvarios de *P. vannamei* en un laboratorio comercial de producción larvaria. Se realizó la cuantificación de AAP de cada estadio del ciclo larvario de *P. vannamei*. Posteriormente se aplicaron análisis estadísticos, transformando las concentraciones de AAs a arcoseno para realizar un análisis de varianza bifactorial ANOVA con separación de medias mediante la prueba de Tukey y poder observar diferencias significativas en la concentración de AAs en cada estadio y a través de todo el ciclo larvario del camarón *P. vannamei*. Finalmente se compararon los requerimientos estimados de AAE en los estadios de alimentación exógena (zoea, misis y postlarva). Los requerimientos estimados de AAE en los estadios larvarios de *P. vannamei* se correlacionaron y se compararon con los requerimientos de AAE de juveniles de 105 mg de *P. vannamei* y los requerimientos de AAE recomendados para formulación de dietas para *P. vannamei* a nivel comercial.

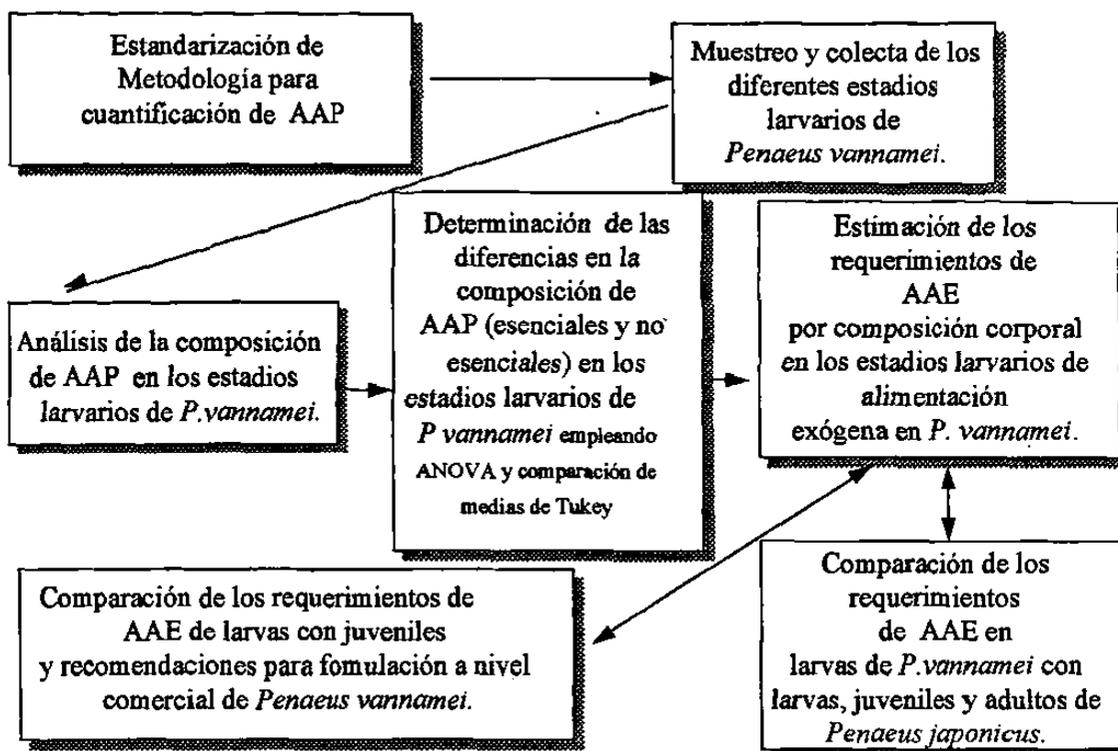


Figura 11. Diagrama que muestra la estrategia seguida para estimar los requerimientos de AAE, así como la cuantificación de AANE en diferentes estadios larvarios de *P. vannamei*.

2.2 Estandarización de la metodología para cuantificación de AAP mediante CLAR

Para la estandarización del método analítico y cuantificar AAP mediante CLAR-FR se procedió como se describe en el diagrama de la Fig. 12. Para estandarizar la metodología se consideró el tipo de detector así como la columna que pudieran separar, mediante el diseño de un programa de elución de los analitos de interés. Se realizó el análisis cualitativo de una mezcla de estándares de AAs en el cual se identificaron cada uno de los AAs de la mezcla mediante tiempos de retención. Se realizaron las rectas de calibración de cada AA para obtener los factores de respuesta y de esta forma facilitar los cálculos de concentración. Se determinaron los factores de corrección por pérdidas durante la hidrólisis. Para comprobar la estandarización de la metodología se analizó la ASB, *Sigma Chemical Co.* la cual se tomó como referencia debido a que se conoce la secuencia de AAs que componen dicha proteína.

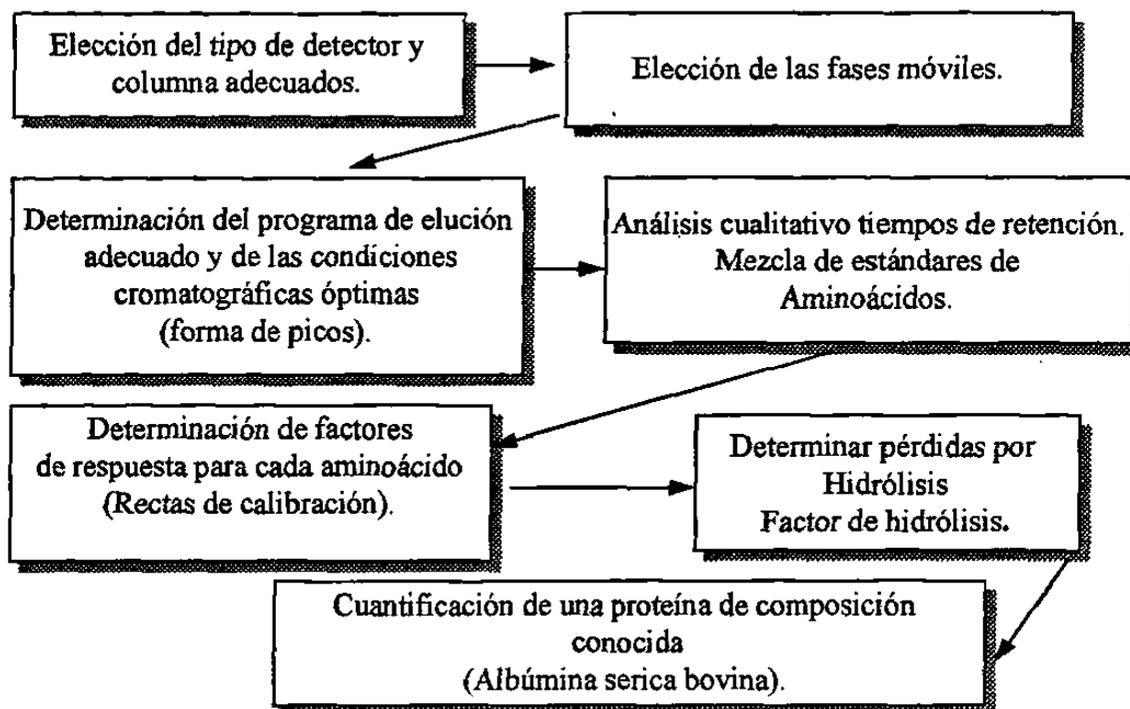


Figura 12. Diagrama que muestra el procedimiento de estandarización del método analítico para cuantificar AAP mediante CLAR-FR.

2.2.1 Elección del tipo de detector y columna adecuados

La elección del tipo de detector empleado en el análisis de AAs está en función del agente derivatizante utilizado. Después de que se revisaron y compararon los reactivos de derivatización empleados en trabajos de análisis de AAs previos, se encontró que el más adecuado como reactivo de derivatización fue el OPA, el cual al reaccionar con un AA en particular forma un isoindol sustituido fluorescente. Se trabajó con un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución System Gold (*Beckman Instruments Inc.*), empleándose un detector de fluorescencia modelo 157 (*Beckman*), equipado con un filtro de excitación de longitud de onda de 305-395 nm y un filtro de emisión de 430-470 nm, unido a una interfase analógica-digital modelo 406 (*Beckman*), el nivel de atenuación del detector y la constante de tiempo se fijó a 0.005 R.F.U y 0.5 seg, respectivamente, con una velocidad de digitalización de la señal analógica de 2 puntos por segundo (Hz) para la colección de datos y una escala máxima de salida de la señal del detector de 1 voltio. El sistema de análisis de datos fue el software para cromatografía *System Gold* (*Beckman*).

El sistema cromatográfico contaba con un inyector con un loop de 20 μ l. Respecto al tipo de columna se decidió utilizar la columna para fase reversa ULTRASPHERE-ODS, con un tamaño de partícula de 5 μ m, longitud de 150 mm y un diámetro interno de 4.6 mm (*Beckman*).

2.2.2 Elección de fases móviles y programa de elución

Antes de preparar las fases móviles se calculó el número de inyecciones que se realizarían durante la sesión de trabajo, para que en función de éstas se pudiera calcular el volumen de fases móviles a preparar. Se trabajó con un programa de elución descrito por Garza-Ulloa (1986), modificado por Cavazos (1994) al cual se le añadieron 2 minutos en la primera elución isocrática, asimismo, se le cambió la primera elución de gradiente reduciendo la pendiente hasta llegar a la meseta de la segunda elución isocrática con 100 % de la Fase móvil B. También se duplicó el tiempo de duración de la segunda elución isocrática. Las condiciones de trabajo en el sistema cromatográfico empleado se resumen en la Tabla 6.

Las fases móviles se prepararon mezclando metanol, buffer de fosfatos 1.8 mM de pH 7.2 y un tercer componente el tetrahidrofurano (THF). El buffer de fosfatos se preparó disolviendo 1.549 g de K_2HPO_4 + 1.23 g KH_2PO_4 en un vaso de precipitados de 50 ml que contenía 20 ml de agua MilliQ, posteriormente se aforó a un litro con agua MilliQ. Para la preparación de las fases móviles se usaron metanol, buffer de fosfatos 1.8 mM y tetrahidrofurano respectivamente en la proporción (12:85:3) para la fase móvil polar A y para la fase móvil apolar B (55:42:3). Finalmente se ajustó el pH a 7.2 con HCl 3 N o NaOH 3 N. Las fases móviles se filtraron a través de un filtro Durapore (*Millipore*) de 0.45 μ m para lo cual se empleó un dispositivo de filtración conectado a una bomba de vacío, posteriormente se desgasificaron proporcionando vacío y agitación magnética a velocidad de 5 durante 10 minutos.

Las mezclas se dejaron reposar por 10 minutos. Debido a la volatilidad del THF que se empleó en las fases móviles, no se pudieron utilizar en sesiones de trabajo posteriores.

Durante la preparación de las fases móviles se tuvo la precaución de medir lo más exacto posible los volúmenes que constituían la mezcla para evitar variación en la separación de los picos cromatográficos, adicionalmente la filtración, así como el tiempo de desgasificación de las fases móviles fueron muy importantes debido a la volatilidad del THF y una variación en los tiempos de filtración y desgasificación pueden cambiar la composición de las fases móviles a emplear en el sistema cromatográfico.

Tabla 6.
Programa de elución usado en la separación de AAs mediante CLAR-FR, empleando OPA como reactivo derivatizante.

Tiempo min	Fase Móvil B %	Duración min
0	0	-
9	70	22
31	80	2
33	90	10
43	100	5
48	100	20
68	0	5

Velocidad de flujo: 1 ml/min

Fase móvil A: Metanol: Buffer de fosfatos 1.8 mM: THF (12:85:3)

Fase móvil B: Metanol: Buffer de fosfatos 1.8 mM: THF (55:42:3)

Columna: Fase reversa ULTRASPHERE-ODS, con un tamaño de partícula de 5 μ m, longitud de 150 mm y un diámetro interno de 4.6 mm (*Beckman*).

Detección: Fluorescencia

λ ex: 360 nm y λ em: 455 nm

2.2.3 Preparación de una solución stock de estándares de AAs

En una balanza analítica modelo AE163 (*Mettler*) con precisión de 0.01 mg, se pesaron aproximadamente 10 mg de cada AA, empleando viales Eppendorf de 2 ml de capacidad. Se rotuló cada vial con el nombre del AA así como el peso, posteriormente se registró el peso exacto de cada AA en el diario de laboratorio. Fue importante no pesar más de 20 mg para lograr una rápida disolución. Se adicionó 1 ml de HCl 0.1 N a cada vial que contenía un AA en particular, excepto al vial que contenía tirosina y ácido glutámico al que se le adicionó 1 ml NaOH 0.1 N. Se agitó en vortex hasta disolver completamente. Se obtuvo la concentración de cada AA en $\mu\text{mol/ml}$ dividiendo los miligramos pesados de cada AA entre el volumen añadido para disolver los AAs obteniéndose una concentración en mg/ml empleando los siguientes cálculos.

$$\text{Concentración de AA } (\mu\text{mol} / \text{ml}) = \frac{\frac{\text{mg de cada AA}}{1 \text{ ml de HCl } 0.1\text{N}} \times 1000}{\text{PM}}$$

En donde PM es el peso molecular de cada AA en particular en $\mu\text{mol/ml}$ y por relación volumétrica se obtuvieron los microlitros necesarios para obtener una solución de 10 ml de estándares de 1.25 $\mu\text{mol/ml}$:

$$\text{Volumen de cada AA } (\mu\text{l}) = 1000 \times \left(\frac{10. \text{ml} * 1.25 \mu\text{mol} / \text{ml}}{\text{Concentración de cada AA en } \mu\text{mol} / \text{ml}} \right)$$

Se adicionó con una pipeta automática la cantidad en microlitros calculada del paso anterior en un matraz de 10 ml y se aforó con HCl 0.1 N hasta enrase. El procedimiento realizado se describe en la Tabla 7.

Al pesar los AAs se tuvo la precaución de anotar el peso exacto después de que la balanza se estabilizaba debido a que los cristales de AAs son higroscópicos y la pesada se altera rápidamente por la poca cantidad pesada y aún más cuando existe humedad ambiental. asimismo se tuvo precaución al momento de realizar las diluciones, siguiendo el procedimiento adecuado al emplear las pipetas automáticas, debido a los pequeños

volumenes manejados fue importante no introducir una fuente de error muy grande. La solución de estándares de AAs se preparó cada semana debido a que si se conservaba un tiempo mayor no se tenían resultados reproducibles en la señal de cada AA generada por el detector de fluorescencia. Con la renovación semanal de la mezcla de estándares de AAs se pudo evitar la variación en la señal de cada AA.

Tabla 7.

Preparación de una mezcla de estándares de AAs de 1.25 $\mu\text{mol/ml}$ los AAs empleados son cristales de L-AAs, (*SigmaChemical Co.*). Excepto Hys y Arg los cuales están a 0.922 y 1.032 $\mu\text{mol/ml}$

	Peso Mol.	mg/ml	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$	Volumen a pipetear para tener 1.25 $\mu\text{mol/ml}$ en un volumen de 10 ml (μl)
Asp	133.1	10	10010	75.20	166.2
Glu	147.1	6.49	6480	44.05	283.8
Ser	105	15.6	15620	148.76	84.0
Hys	209.6	7.75	7750	36.98	250.0
Gly	75	17.3	17250	230.00	54.3
Arg	210.7	6.14	6140	29.14	354.2
Thr	119	8.7	8700	73.10	170.9
Ala	89	18.2	18220	204.71	61.1
Tyr	181	3.81	3810	21.05	593.8
Met	149	8.79	8790	58.99	211.9
Trp	204	4.91	4910	24.07	519.3
Val	117	14.2	14200	121.37	103.0
Phe	165	8.18	8180	49.57	252.1
Ile	131	9.3	9300	70.99	176.1
Leu	131	10.6	10590	80.83	154.6

2.2.4 Determinación de las condiciones cromatográficas óptimas

Se utilizó la mezcla de estándares de AAs de 37.5 nmol/ml para obtener las condiciones de trabajo, que se preparó tomando 150 μl de la solución de 1.25 $\mu\text{mol/ml}$ y

aforando a 5 ml con buffer de dilución (buffer acetato de sodio 0.1 N, pH 7.0, *Sigma*). El buffer de dilución se preparó diluyendo 0.8203 g de acetato de sodio en 100 ml de agua MilliQ y ajustando a un pH de 7.0 con NaOH 3 N, empleando un potenciómetro (*Orion*) modelo 601A.

2.2.4.1 Derivatización

El procedimiento de derivatización se realizó tomando 10 μ l de la solución de estándares de 37.5 nmol/ml, se adicionaron inmediatamente 10 μ l de Fluoraldaído (*Pierce*) donde el OPA reaccionó con cada AA para formar un isoindol sustituido. Se agitó en Vortex por 60 segundos, al contabilizar los 60 segundos se adicionaron 100 μ l de buffer de dilución y se dejó agitar en Vortex por 30 segundos, se tomaron aproximadamente 80 μ l de muestra en una jeringa de 100 μ l de los cuales, al completar 120 segundos, se inyectaron a la columna a través de un loop de 20 μ l, obteniendo una concentración al momento de la inyección de 3.13 nmol/ml. Debido a la estabilidad limitada de los OPA-AAs, se tuvo extrema precaución en el tiempo entre el mezclado y la inyección.

2.2.4.2 Condiciones cromatográficas

Para determinar las condiciones óptimas de separación, se obtuvieron los primeros cromatogramas donde se observó la separación y forma de los picos cromatográficos realizando modificaciones al programa de elución cuando los picos no estuvieron resueltos.

Asimismo se determinó el nivel de atenuación en el detector de fluorescencia más adecuado para nuestro trabajo (R.F.U), para lo cual se procedió a inyectar cinco diluciones de la mezcla de AAs de 37.5 μ mol/ml las cuales fueron 2×10^{-4} , 2×10^{-3} , 3×10^{-2} , 4×10^{-2} y 6×10^{-2} que se prepararon tomando 1, 10, 150, 200 y 300 μ l aforados cada uno a 5 ml con el buffer de dilución.

De la misma forma se determinaron las concentraciones para realizar las rectas de calibración que presentaran buena linealidad en el sistema cromatográfico, realizando observación de los picos para cada AA y que no se salieran del intervalo de detección ya fuera por ser demasiado grandes en la escala de fluorescencia o por ser demasiado pequeños y confundirse con la línea de base del cromatograma.

2.2.5 Análisis cualitativo

Con los cromatogramas que se obtuvieron de la inyección de una mezcla de estándares después de obtener las condiciones cromatográficas óptimas, se identificaron los AAs individualmente mediante el orden de elución, así como por tiempos de retención, se compararon con valores reportados para la misma técnica en trabajos de investigación previos. Los AAs en los que no se tenía la certeza de identificación por los procedimientos anteriormente mencionados, se inyectaron individualmente para comprobar el tiempo de retención y poder después identificarlos en una mezcla de estándares, asimismo se realizaron coinyecciones que consistió en adicionar a una mezcla de estándares una cantidad extra, generalmente 50 % de la concentración del AA que se quería identificar y que además estaba presente en la mezcla de estándares de AAs.

2.2.6 Determinación de los factores de respuesta para cada AA

Los factores de respuesta se determinaron empleando el método del estándar externo. Se realizaron cuatro rectas de calibración a lo largo de todo el período de investigación. Se inyectaron mezclas de estándares de AAs de composición conocida, con las siguientes concentraciones 0.21, 3.13 y 4.17 nmol/ml después de derivatizar. Se ajustó el intercepto al origen de las ordenadas en cada recta, donde el valor del intercepto es igual a cero. Se empleó la función LINEST del programa *Microsoft Excel* el cual emplea el método de mínimos cuadrados para calcular una recta que ajusta mejor los datos analizados. Se calculó el promedio de las pendientes de las cuatro rectas de calibración para cada AA.

2.2.7 Factores de hidrólisis

Se emplearon dos métodos de hidrólisis con HCl 6 N y AMS 4 N con 0.2 % de aminoetilindol (*Pierce*), dos tiempos de hidrólisis 110 °C por 24 horas y 135 °C por 5 horas así como dos dispositivos para la hidrólisis, los cuales fueron tubos de hidrólisis de tapa roscada y tubos de hidrólisis de *Pierce* a los cuales se les adicionaron 0.50 ml de AMS 4 N (*Pierce*) ó 0.5 ml de HCl 6 N además 150 µl de una mezcla de estándares de 1.25 µmol/ml. La hidrólisis se realizó por triplicado en un block de calentamiento (*Thermoline*) con regulador de temperatura, bajo atmósfera de nitrógeno a 110 °C por 24 horas y a 135 °C por 5 horas, al finalizar los hidrolizados se neutralizaron parcialmente con 1 ml de NaOH 3 N a pH 6-7.5 y se analizaron por CLAR. Para la obtención de los factores de hidrólisis se inyectaron por triplicado 3.13 nmol/ml de la mezcla de estándares de AAs con una concentración de 37.5 nmol/ml. Por lo que posteriormente se obtuvo un factor de corrección por hidrólisis, que se aplicó a hidrolizados de proteínas. Para el cálculo, se empleó la relación del promedio de la pérdida por hidrólisis para cada AA de las muestras hidrolizadas respecto al promedio para cada AA de las muestras de estándares de 3.13 nmol/ml sin hidrolizar.

Para obtener buena recuperación en este paso fue necesario lavar exhaustivamente el tubo de hidrólisis. Después de que se cumplió el tiempo de hidrólisis, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se recuperó el hidrolizado de estándares con una pipeta Pasteur y se transfirió a un vaso de precipitados de 10 ml. Se adicionó 1 ml de agua MilliQ al tubo de hidrólisis, se le puso un tapón de caucho y se agitó manualmente, este paso se realizó tres veces. El agua de los lavados se vertió en un vaso de precipitados de 10 ml, donde se completó a 3.5 ml aproximadamente. Se neutralizó a un intervalo de pH de 6.0-7.5 con 2 ml de NaOH 3 N y se aforó a 10 ml con agua MilliQ, Dall y Smith (1987).

2.2.8 Cuantificación de una proteína de composición conocida

Para validar la metodología de análisis de AAs se procedió a hidrolizar entre 0.2 a 1 mg de una proteína de composición aminoacídica conocida, ASB (*Sigma Chemical*

Co.). La cuantificación se realizó empleando el método del estándar externo descrito en 2.2.6 y aplicando los factores de hidrólisis obtenidos en 2.2.7.

Las muestras de ASB se hidrolizaron con AMS 4 N (*Pierce*) conteniendo 0.02% de aminoetil-indol, empleándose el protocolo de hidrólisis con AMS en tubos de hidrólisis con tapa roscada.

En tubos de hidrólisis con tapa roscada de 10 x 100 mm marca Pyrex, se introdujeron 0.56, 0.27, 0.26 mg de ASB. Se adicionaron 0.5 ml de AMS 4 N, que contenía 0.02 % de aminoetil indol (Fig. 13). Se evitó que los volúmenes de muestra no excedieran la tercera parte del volumen del tubo. Se trabajó en una campana de extracción manteniendo en una posición de 20-30 grados respecto a la horizontal, al tubo con la muestra se le adicionó gas nitrógeno por espacio de 2 minutos para eliminar la mayor cantidad de oxígeno. Se insertó un tapón de caucho a la vez que se retiraba la manguera con el nitrógeno fluyendo y se presionó éste hacia abajo, se introdujeron dos agujas hipodérmicas (tipo insulina) al tapón de caucho hasta que alcanzaran la parte interna, se conectó nuevamente la manguera con el suministro de nitrógeno a la base de una de las agujas, a un flujo moderado para evitar que la muestra se levantara del fondo y se adhiriera a las paredes por exceso de presión hacia el interior.

La segunda aguja se dejó libre funcionando como una válvula reguladora de presión y por ese conducto saliera el oxígeno residual de la muestra a la que previamente se le adicionó nitrógeno. Después de 3 minutos, se cerró el suministro de gas nitrógeno y al mismo tiempo se retiraron las dos agujas dejando el interior del tubo con gas nitrógeno que previamente desplazó el aire del interior.

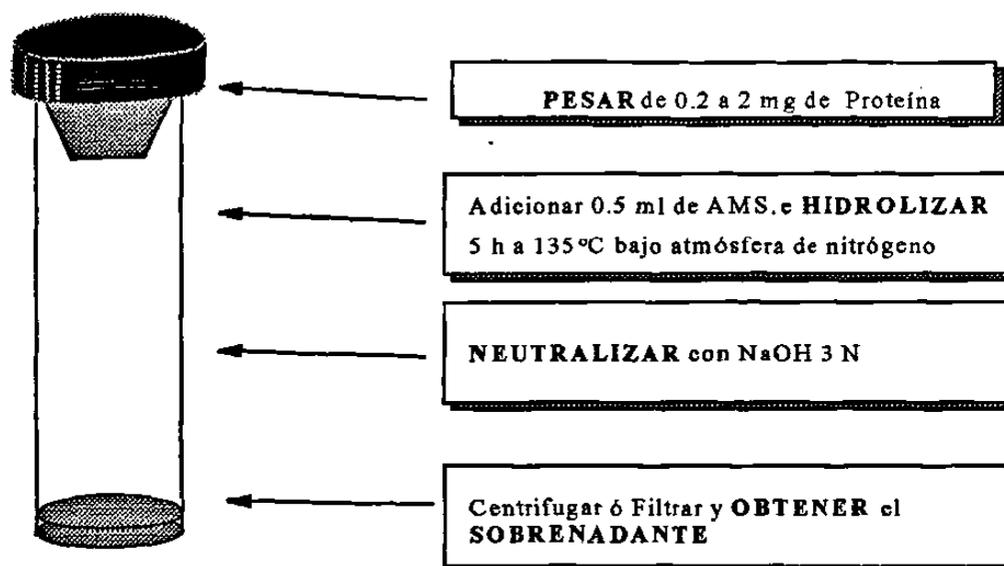


Figura 13. Procedimiento de hidrólisis de proteínas.

Se cerró el tubo con la tapa de teflón original para reforzar al tapón de caucho y evitar una implosión (introducción de aire al interior del tubo). Se insertaron los tubos en los orificios del block de calentamiento (*Thermoline*) previamente calibrado a 135 °C y se realizó la hidrólisis por un tiempo de 5 horas. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente después de completar el tiempo de hidrólisis.

Se desenroscó cuidadosamente la tapa de teflón y se insertó una jeringa hipodérmica (tipo insulina) al tapón de caucho para crear un flujo suave de aire hacia el interior del tubo. Se removi6 la muestra del tubo, empleando una pipeta Pasteur de diámetro pequeño.

Al final de la hidrólisis se neutralizó parcialmente el hidrolizado (pH 6-7.5) con 1 ml de NaOH (*Merck*) 3.0 N. La neutralización parcial se realiza para que la reacción de derivatización ocurra a un intervalo de pH óptimo para el *Fluoraldehido* (*Pierce*). La muestra neutralizada se introdujo a un matraz de aforación y se enrasó a 10 ml con agua MilliQ. Se tomó 1 ml para filtración en filtro *Durapore* (*Millipore*) de 0.45 µm, el cual se depositó en un vial Eppendorf de 3 ml de capacidad, fue de gran importancia conservar

en congelación éste vial como una solución stock para posteriores análisis de AAs, derivatizando como se describe en 2.2.4.1.

2.3 Análisis de la composición de AAP en los estadios larvarios de *P. vannamei*

Después de validar la metodología de análisis de aminoácidos se procedió a coleccionar los estadios larvarios del camarón *P. vannamei* en un laboratorio de producción comercial.

2.3.1 Muestreo y colecta de los diferentes estadios larvarios de *Penaeus vannamei*

La colecta de muestras se realizó durante el período comprendido del 12 al 18 de Mayo de 1995, en el laboratorio "El Camarón Dorado S.A de C.V", ubicado en la Bahía de Santa Bárbara, Huatabampo; Sonora, México.

Se coleccionaron cada uno de los subestadios larvarios desde huevo, nauplio, zoea, misis y postlarva del camarón blanco del pacífico *Penaeus vannamei*, de diferentes cultivos larvarios que se estaban corriendo los días del muestreo, los embriones se coleccionaron por duplicado de dos tinas de desove de 100 litros de capacidad, los subestadios Z-1, Z-II, Z-III, M-I, M-II y M-III se coleccionaron por duplicado de dos tinas de 14 m³, mientras que los subestadios Pl-I, Pl-II y Pl-VII, se coleccionaron por duplicado de dos tinas de 20 m³. Las tinas de cría larval fueron sembradas a una densidad de 100 nauplios/l, realizándose un muestreo aleatorio de toda el área de cría larval. Es importante mencionar que la colecta de un estadio en particular se realizó hasta que se observó al microscopio estereoscópico que más del 80 % de la población muestreada alcanzara el subestadio requerido considerando las claves de identificación de los estadios larvarios descritos por Treece (1989) y Kitani (1985), contando además con la asesoría de los jefes del área de maduración y cría larval dentro del laboratorio de producción de larvas.

Los parámetros fisicoquímicos de las tinas de cría larval al momento de la colecta fueron: temperatura 28.0 °C, Salinidad 35 partes por mil. Los muestreos se realizaron de las 14.00 a las 15.45 horas después de haber realizado la observación de las larvas en

todas las tinas y asignar el estadio predominante en cada tina. Los organismos provenían de progenitores del medio natural capturados en el estado de Nayarit y cultivados en los estanques de engorda de la misma empresa. Los organismos en el estadio zoea fueron alimentados con *Skeletonema costatum* y *Chaetoceros gracilis* a una densidad de 100 cel/ μ l y como suplemento alimento microcapsulado (FRIPPAK). En el estadio misis se adicionaron nauplios de *Artemia* (San Francisco Bay Brand) recién eclosionados. La duración promedio de los cultivos larvarios desde nauplio V hasta postlarva VII con el régimen alimenticio descrito anteriormente fue de 16 días y la sobrevivencia de 60 %, por lo que las muestras representan un cultivo larvario exitoso.

Se empleó un sedazo con 100 μ m de luz de malla, el cual se introdujo en sitios diferentes dentro de la tina de cría larval (Fig. 14). Esta malla fue la única utilizada durante la colecta en todos los estadios larvarios. Posteriormente se introdujeron en viales de 3 ml de capacidad, registrándose el número de cada muestra y guardándose en un contenedor de nitrógeno líquido de 5 Kg de capacidad, marca Taylor-Warton. Para cada estadio se tomaron aproximadamente 5,000 embriones, 2,000 nauplios, 800 zoeas, 600 misis y 200 postlarvas.

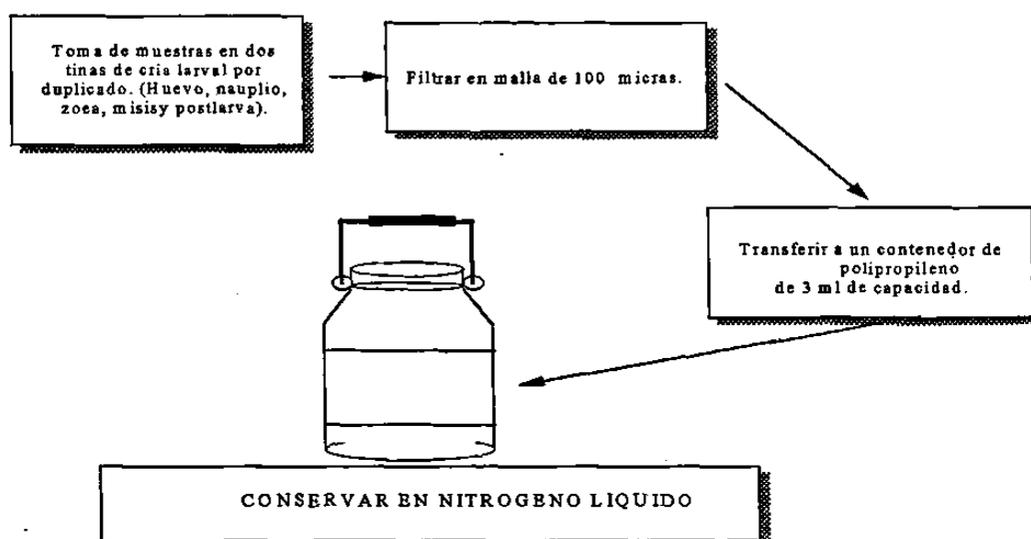


Figura 14. Diagrama que muestra la secuencia de pasos para la colecta de larvas de camarón *P. vannamei*

Respecto al tipo de malla empleado lo más recomendable es utilizar malla de 100 μm para huevo, mala de 10-150 μm para zoea, malla de 300 μm para el estadio de misis y malla de 500 μm para el estadio de postlarva. (Treece, 1989).

Las 26 muestras colectadas se conservaron en nitrógeno líquido para ser trasladadas al laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., donde se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis por CLAR-FR.

2.3.2 Tratamiento de muestras.

Cada vez que se iniciaba una sesión de trabajo, cada muestra se transfirió del congelador de tejidos donde permanecía a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a un congelador con temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora, se transfirió a una temperatura de $4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos en un refrigerador convencional para descongelar totalmente las muestras.

Cada una de las muestras descongeladas se transfirieron a cajas petri con agua marina sintética (*Fritz*) a 35 partes por mil de salinidad, la medición se realizó con un refractómetro (*Argent*), donde se confirmó el estadio previamente asignado en la colecta de campo observando las características descritas para cada estadio Kitani (1986), Treece (1989), Wiban y Sweeney (1991) posteriormente se eliminaron partículas tales como alimento en forma de microcápsulas, algas cianofitas, quistes y nauplios de artemia.

La forma más conveniente que aseguró la obtención de muestras limpias, libres de otros componentes fue tomar a cada uno de los organismos con pipetas automáticas con capacidad de 1000 μl para misis y postlarva así como 20 μl para zoea y nauplio y puntillas recortadas 1 cm de la parte inferior. Las muestras limpias se transfirieron a un tubo de ensaye de 10 x 100 mm (*Pirex*), donde se les redujo la salinidad con agua desionizada hasta 0 partes por mil cada 5 partes por mil en un lapso de 20 minutos, para eliminar posibles interferencias de los iones del agua marina al inyectar la muestra al loop del cromatógrafo.

Las muestras limpias se enrasaron a 4 ml con agua MilliQ, se tomó una alícuota de 0.1 ml para conteo volumétrico (Fig 15). Para el conteo volumétrico, los 100 μ l de muestra tomados para el análisis de huevo, nauplio y zoea se pusieron en una caja Petri y se contaron bajo el microscopio estereoscópico. Posteriormente se realizó el cálculo respecto al volumen inicial.

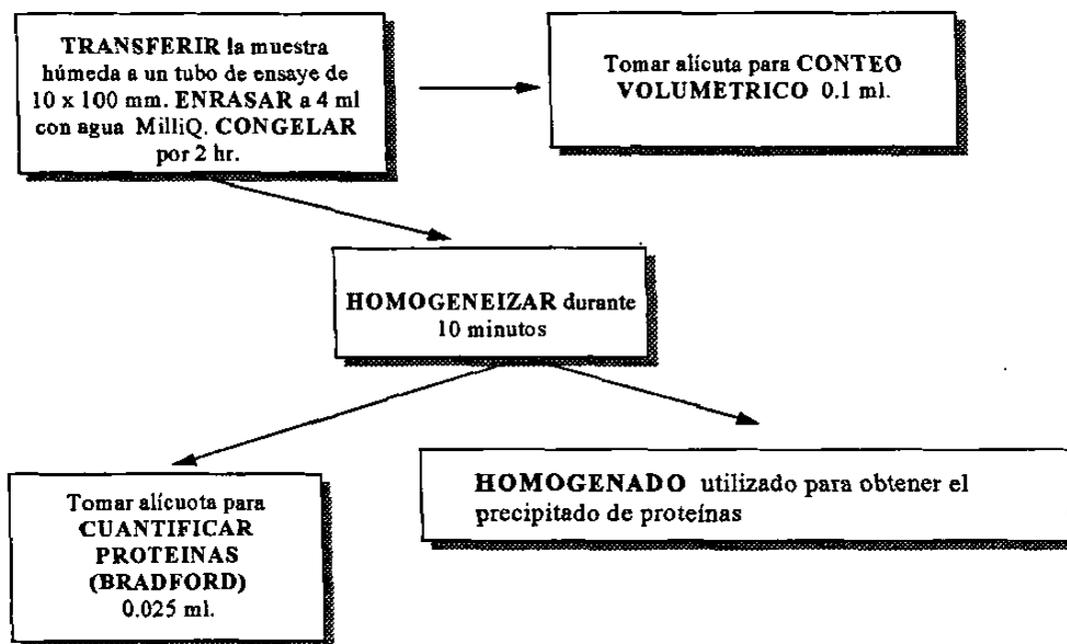


Figura 15. Tratamiento de muestras realizado para homogeneizar y cuantificar proteínas en larvas de *P. vannamei*.

2.3.3 Homogeneización.

Las muestras libres de sales se introdujeron a un congelador a -4°C por 120 minutos para solidificar la muestra, posteriormente se introdujo la sonda de un homogeneizador de tejidos (*Venturis*) al tubo de ensaye de 10 x 100 mm (*Pirex*) que contenía la muestra congelada, donde se mantuvo cada muestra por espacio de 10 minutos hasta obtener una suspensión lo más homogénea posible. Se tomó una muestra de 50 μ l para análisis de proteínas mediante el método colorimétrico de Bradford, (Smith, 1987). La sonda del homogeneizador se lavó alternadamente tres veces con agua desionizada y metanol como agente precipitante de proteínas, cada vez que se introdujo

una muestra nueva. Un buen indicador de una sonda limpia fue cuando el agua residual después de los lavados ya no mostró turbidez. El homogenado de cada muestra se distribuyó en cuatro tubos de centrifuga de 3 ml de capacidad y se realizó la precipitación y purificación de proteínas.

2.3.3.1 Análisis de proteínas

Después de haber obtenido el homogenado de larvas se tomó una alícuota de 25 μ l para realizar análisis de proteínas solubles mediante el método colorimétrico de Bradford. Se realizó una recta de calibración con una solución estándar de albúmina sérica bovina (*Sigma Chemical Co.*) de 0.5 mg/ml en NaCl (*Sigma Chemical Co.*) 150 mM. Se empleó para realizar la recta de calibración un intervalo de concentraciones de 1 a 15 μ g/ml. Tanto las muestras como los estándares se prepararon al menos por duplicado a excepción del estadio Z-I. En un vial eppendorf de 2 ml de capacidad se tomaron 25 μ l de muestra homogenada colectada en el paso anterior, se adicionaron 75 μ l de NaCl 150 mM y 900 μ l del reactivo de Comassie (*Pierce*) para hacer un volumen final de 1 ml. La detección se realizó a 595 nm en un espectrofotómetro (*Beckman*), empleándose el método de mínimos cuadrados en una computadora personal (*Macintosh*) con programa *Microsoft Excel*. Los resultados se reportan en μ g de proteína por organismo.

2.3.3.2 Comparación de la variación del contenido de proteína y el crecimiento relativo de cada subestadio analizado.

Se comparó en forma gráfica la variación del contenido de proteína soluble en los estadios huevo, nauplio y zoea así como el crecimiento relativo teórico* durante el ciclo larvario de *P. vannamei*.

$$\text{Crecimiento relativo (\%)} = 100 \times \left[\frac{\text{Long (mm) subestadio}_n - \text{Long (mm) subestadio}_{n-1}}{\text{Long (mm) subestadio}_n} \right]$$

donde:

n= N-1, N-2, N-3, N-4, N-5, Z-1, Z-2, Z-3, M-1, M-2, M-3 y Pl-1

* Los datos se obtuvieron de Kitani (1986).

2.3.4 Precipitación y purificación de proteínas

Se realizó el procedimiento de precipitación y purificación (Fig. 16) de proteínas descrito por Teshima, (1986) modificado, donde 650 µl del homogenado de larvas se introdujeron a un vial eppendorf de 3 ml se trataron tres veces con ácido tricloroacético (TCA, *Sigma Chemical Co.*) al 10 % para precipitar las proteínas. Los precipitados de proteínas se lavaron tres veces con 1.35 ml TCA al 7 % (*Sigma Chemical Co.*), tres veces con 1.35 ml de etanol (*Merck*) como un agente deshidratador de tejidos, tres veces con 1.35 ml de una mezcla cloroformo (*Merck*)-metanol (*Merck*) en una proporción 3:1 para eliminar lípidos del tejido y finalmente tres veces con 1.35 ml de éter etílico (*Merck*) para lavar los residuos de la mezcla cloroformo/metanol. Se realizó en cada lavado la siguiente rutina: agitación en vortex por 5 min, centrifugación 8 min a 15,000 rpm en microcentrífuga Modelo 5402 (*Eppendorf*) y recuperación del precipitado. El precipitado proteico obtenido se introdujo a una cámara de vacío a 45 °C por 30 minutos para eliminar los residuos de éter y desecar la muestra al mismo tiempo, finalmente se selló con parafilm para evitar la entrada de humedad a la muestra seca.

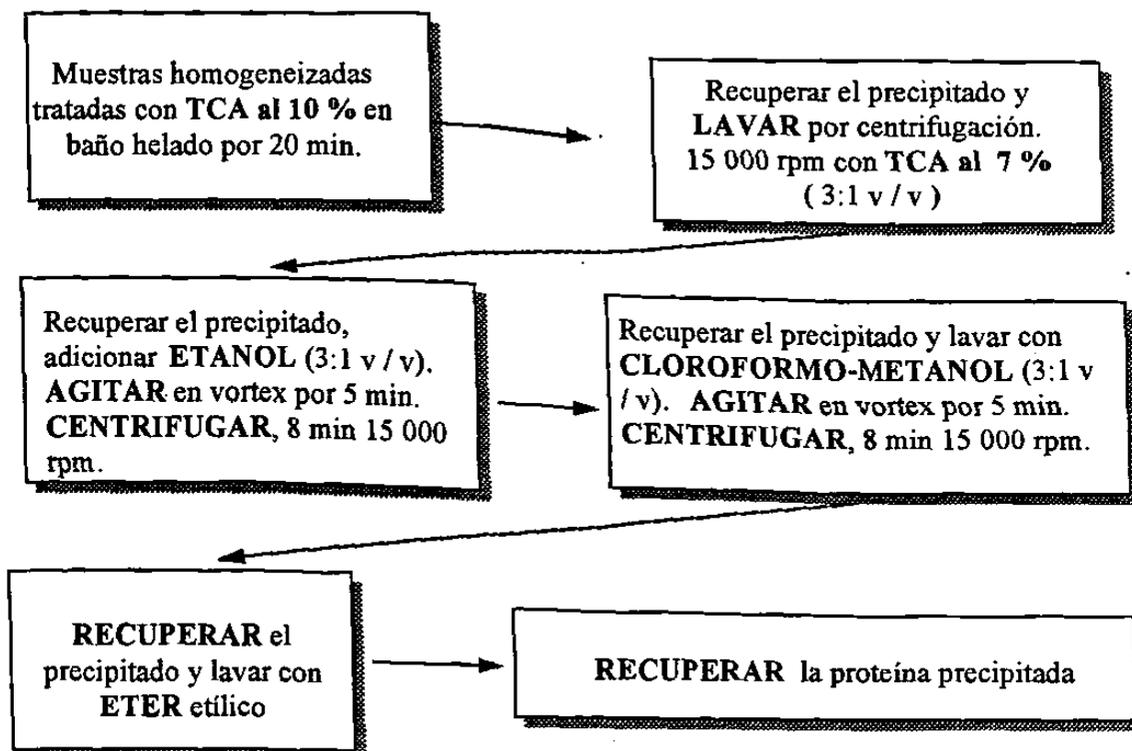


Figura 16. Procedimiento realizado para la precipitación y purificación de proteínas obtenidas de un homogenado de larvas de *P. vannamei*

2.3.5 Hidrólisis del concentrado proteico de larvas de camarones peneidos

Se pesaron de 0.2 a 2.0 mg del purificado de proteínas de las larvas, se hidrolizaron con AMS 4 N (*Pierce*) conteniendo 0.02 % de aminoetil-indol, empleando el protocolo de hidrólisis en tubos de tapa roscada descrito previamente.

2.3.6 Derivatización del hidrolizado proteico de larvas de camarones peneidos

Después de la hidrólisis y neutralización se realizó la derivatización pre-columna con Fluoraldehído (*Pierce*), como se describe en 2.2.4.1

2.3.7 Cuantificación de AAs en embriones y larvas de *Penaeus vannamei*

La composición de AAP se analizó por CLAR-FR usando OPA (*Pierce*) como reactivo de derivatización y empleándose las condiciones establecidas durante la

estandarización de la metodología (descritos en 2.2.4, 2.2.6 y 2.2.7). Los resultados se reportan en g/100 g de AA recuperados.

2.4 Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas en la composición de aminoácidos en los diferentes subestadios y estadios, se realizó la transformación de los datos a arcoseno empleando el programa *Microsoft Excel* y se realizaron ANOVA bifactorial y comparaciones múltiples de Tukey, (Zar, 1984) mediante el paquete estadístico *Statgraphics. Versión 4.0*, tomando tanto AAE como de los AANE a nivel estadio y a nivel subestadio.

2.5 Comparación del perfil de AAE de los diferentes estadios larvarios con datos bibliográficos

Para comparar los perfiles de AAE de larvas de *P. vannamei* con datos bibliográficos de los perfiles de larvas, juveniles y adultos de *P. japonicus* y *P. monodon* la almeja de cuello corto *V. philippinarum* y perfiles del cuerpo entero, músculo y huevos del esturión *Acipenser transmontanus*, todos los datos se convirtieron a % AAE.

$$\% \text{ AAE} = (\text{AAE individual} / \text{AAE totales incluyendo Tyr}) * 100$$

2.6 Determinación de requerimientos de AAE en función de los aminogramas obtenidos del cuerpo entero de los estadios larvarios de alimentación exógena de *P. vannamei*

Los resultados de los aminogramas expresados en porcentaje de AAE se multiplicaron por 0.35 para determinar el requerimiento aproximado de AAE, en % de proteína, considerando que la suma de los AAE más cisteína y tirosina constituyen el 35 % del requerimiento proteico del pez (Tacon, 1989).

$$\text{Requerimiento estimado de AAE (\% de proteína)} = (0.35)(\% \text{ de AAE})$$

Para dar una aproximación de los requerimientos en % de la materia seca, los resultados anteriores se multiplicaron por el % de proteína cruda de cada estadio reportada por Mourente *et al* (1995) para *P. keratulus*.

Requerimiento estimado de AAE (% de materia seca) = (Requerimiento estimado de AAE en % de proteína) (% proteína cruda de cada estadio)

Finalmente se hizo una estimación del requerimiento en % de proteína considerando el concepto de proteína ideal, tomando como referencia el requerimiento de lisina determinado por Fox (1996b) para camarones juveniles de la misma especie.

Requerimiento estimado de AA (% de proteína) = (Requerimiento aparente de Lys)(concentración de AA en el cuerpo ó músculo)/(concentración de lisina en el cuerpo entero ó músculo).

2.7 Comparación del requerimiento estimado de AAE de los estadios, zoea, misis y postlarva de *P. vannamei* y comparación con antecedentes bibliográficos para la misma especie

Para realizar las comparaciones se utilizaron los índices de Deshimaru (1981): Definido como: la relación de cada AAE respecto a metionina, (AAE/Met) y el índice de AAs esenciales (IAAE) de Arai (1981) definidos como:

$$\text{AAE/Met} = (\text{AAE individual} / \text{Metionina})$$

$$\text{IAAE} = (\text{AAE individual} / \text{total de AAE} + \text{Tyr} \times 1000)$$

En este trabajo no se sumo el valor de cisteína, por no haberse analizado.

Asimismo se realizó la comparación de los perfiles de AAE empleando coeficientes de correlación, empleando el programa estadístico *Statgraphics vers 4.0*.

CAPITULO 3.

RESULTADOS

3.1 Estandarización de la metodología para cuantificación de AAP mediante CLAR

Se obtuvo buena resolución en todos los picos cromatográficos a excepción de arginina-treonina y metionina-valina, a pesar de haber modificado el gradiente y la composición de las fases móviles. Asimismo cuando se usó una columna nueva se obtuvo buena separación del par arginina treonina, pero al paso del tiempo la columna fue perdiendo eficiencia en la separación de estos dos picos solamente. La decisión que se tomó fue la de considerar el par arginina-treonina como un solo pico, al que en adelante se llamó arginina+treonina.

Respecto a lisina se consiguió una buena separación del pico correspondiente a dicho AA cuando se inyectó una mezcla de estándares de AAs, sin embargo la señal generada por el detector fue menor comparada con el resto de los AAs. A pesar de que se pudo separar el pico correspondiente a lisina, no se tuvo reproducibilidad en la cuantificación de muestras de ASB, así como en muestras de larvas de *P. vannamei* por lo que se decidió no incluirla en el cálculo de concentraciones.

Se detectaron algunos picos adicionales a los AAs, lo cuales se pudieron identificar realizando blancos del método cromatográfico empleado, así como de reactivos. Como se observa en la Fig. 17, a los 14.21 min eluyó un pico el cual provenía del producto de degradación de la mezcla del agente derivatizante (la cual contiene OPA, mercaptoetanol y detergentes) dicho pico sólo aparecía cuando la mezcla del agente derivatizante empleado comenzaba a oxidarse. Se evitó que este pico interfiriera en la

elución de un pico correspondiente a la glicina, empleando en cada sesión un vial de 100 μ l conteniendo el Fluoraldehido (*Pierce*). A los 15 min apareció un pico al que se le identificó como buffer de acetato sodio que se empleó como diluyente de las muestras, el cual se detectó cuando se usaba el buffer de acetatos que no se preparó el mismo día en que se trabajó en el cromatógrafo. A los 56 min se encontró un pico identificado como buffer de fosfatos, este se comenzaba a observar después de haber realizado 5 inyecciones consecutivas al cromatógrafo. La aparición de los picos extraños se evitó al máximo empleando soluciones recién preparadas.

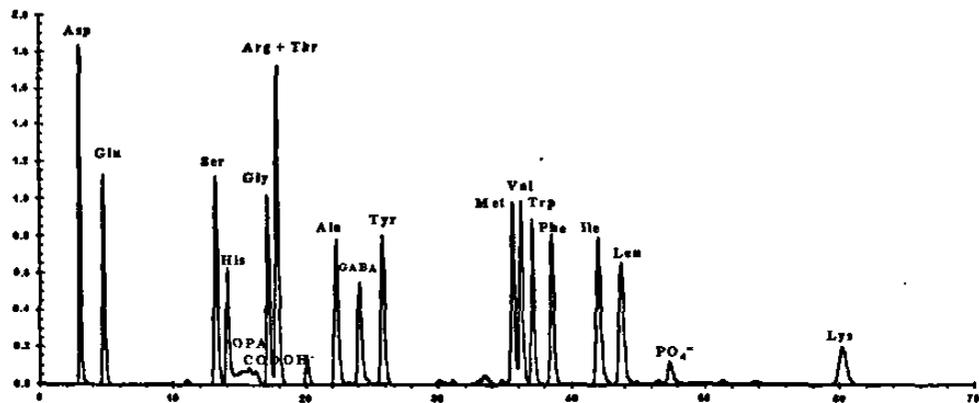


Figura 17. Cromatograma obtenido de una mezcla de estándares de AAs de 4.17 nmol/ml empleada para determinar las condiciones de trabajo óptimas en el CLAR.

Una solución práctica al problema de la separación de arginina-treonina, metionina-valina es incrementar el número de platos teóricos de la columna. Lo anterior se lograría adquiriendo una columna de mayor longitud, por lo que Beckman® recomienda una columna con un tamaño de partícula 5 μ m, longitud de 250 mm y un diámetro interno de 4.6 mm.

Las concentraciones empleadas para realizar las rectas de calibración fueron 0.21, 3.13 y 4.17 nmol/ml, dichas concentraciones corresponden al volumen antes de inyectar al loop del cromatógrafo, las cuales se obtuvieron después de haber realizado cinco inyecciones hasta encontrar un intervalo de concentraciones en la cual el detector de

fluorescencia con 0.005 R.F.U no se saturara, es decir: que los picos correspondientes a todos lo AAs estuvieran a un nivel de fluorescencia donde la señal generada por el detector estuviera en un rango lineal para que se pudieran cuantificar adecuadamente.

3.1.1 Análisis cualitativo de AAs a partir de una muestra de estándares

Los resultados de análisis por tiempos de retención (t_R) se muestran en la Tabla 8. En la Tabla se proporciona el t_R promedio en minutos durante cuatro sesiones de trabajo realizando tres inyecciones en cada sesión para cada AA, los coeficientes de variación son menores a 1.27 % indicando una buena repetibilidad en cada sesión de trabajo así como reproducibilidad a lo largo del período de investigación.

Cuando se realizó la identificación de los picos cromatográficos correspondientes a cada AA en los cromatogramas obtenidos con datos reportados en bibliografía, los picos cromatográficos que no correspondían se inyectaron individualmente; además de realizar coinyecciones del AA a cuantificar dentro de una mezcla de estándares y así tener la certeza de haber identificado adecuadamente el pico correspondiente a un AA en particular. Los picos cromatográficos de arginina, alanina, metionina, triptófano, fenilalanina y leucina se identificaron mediante este procedimiento. La identificación posterior dentro de una mezcla de estándares de estos mismos AAs ya no fue un problema debido a que se conocía el tiempo de retención individual.

Tabla 8.

Análisis cualitativo de una mezcla de estándares de AAs, la identificación de AAs individuales se realizó por tiempos de retención.

Aminoácido	t_R (min)	S_x^*	C.V.** %
Ac. Aspártico	2.9	0.03	1.21
Ac. Glutámico	4.4	0.09	1.96
Serina	12.4	0.16	1.27
Histidina	13.2	0.16	1.22
Glicina	16.5	0.16	0.96
Arg. +Treo.	17.3	0.13	0.76
Alanina	21.7	0.25	1.14
Tirosina	25.2	0.18	0.72
Metionina	34.7	0.22	0.62
Valina	35.4	0.21	0.58
Triptófano	36.3	0.21	0.57
Fenilalanina	37.7	0.21	0.57
Isoleucina	40.9	0.27	0.66
Leucina	42.5	0.30	0.70

$n = 12$, Se inyectaron al CLAR una mezcla de estándares a 0.21, 3.13, 4.17 nmol/ml, a cuatro tiempos diferentes durante el período de investigación.

$$* S_x^* = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad S_x^* = \text{Error estándar de la media.}, S = \text{Desviación estándar}$$

** C. V = Coeficiente de variación.

3.1.2 Determinación de los factores de respuesta para cada AA

Los FR respecto a la altura excepto para el par arginina+treonina que se realizó respecto a áreas, se resumen en la Tabla 9. Se observa que se obtuvieron coeficientes de variación menores de 9.5 % en los valores de factor de respuesta.

Tabla 9.

Factores de respuesta de AAs individuales calculados a partir de una mezcla de estándares.

Aminoácidos	$\frac{FR}{\bar{x}^1}$	S_x^{-2}	C.V %	R^2	S_x^-	C.V %
Ac. Aspártico	0.49	0.021	4.2	0.970	0.017	1.8
Ac. Glutámico	0.32	0.028	8.7	0.993	0.004	0.4
Serina	0.31	0.019	6.2	0.900	0.031	3.4
Histidina	0.20	0.012	7.5	0.993	0.003	0.3
Glicina	0.27	0.018	6.7	0.904	0.039	4.3
Arg. +Treo.	133	11.92	9.0	0.993	0.004	0.4
Alanina	0.21	0.009	4.6	0.961	0.019	2.0
Tirosina	0.23	0.022	9.5	0.996	0.002	0.2
Metionina	0.26	0.015	5.9	0.939	0.033	3.6
Valina	0.24	0.016	6.5	0.986	0.012	1.2
Triptófano	0.27	0.019	6.9	0.963	0.026	2.7
Fenilalanina	0.23	0.018	8.0	0.995	0.003	0.3
Isoleucina	0.22	0.015	6.6	0.994	0.003	0.3
Leucina	0.18	0.015	8.2	0.993	0.003	0.3

¹ n = 4, excepto para serina, glicina, alanina n=3. Determinado por el análisis cromatográfico de una mezcla de estándares de AAs de 0.21, 3.13 y 4.17 mmol/ml, Los datos expuestos se calcularon con las alturas de pico de cada AA, excepto para el par arginina + treonina calculado por área de pico.

$$^2 S_x^- = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad S_x^- = \text{Error estándar de la media, } S = \text{Desviación estándar}$$

C. V = Coeficiente de variación.

La linealidad de las rectas de calibración fueron buenas obteniendo coeficientes de determinación (R^2), superiores a 0.96 excepto glicina con R^2 de 0.90 y metionina con R^2 de 0.93. Adicionalmente la variabilidad de los coeficientes de determinación para cada una de las rectas fueron menores a 4.3 %.

3.1.3 Determinación de factores de hidrólisis

3.1.3.1 Método de hidrólisis

Durante la hidrólisis de una mezcla de estándares con HCl 6 N tanto a 110 °C por 24 horas como a 135 °C por 5 horas, se observó la pérdida total de triptófano en los cromatogramas, esta pérdida se ha reportado en trabajos de investigación previos Merck (1989), Gehrke *et al.*, (1985); donde se empleó el HCl para realizar la hidrólisis. Lo anterior no ocurrió cuando se empleó el AMS 4 N, el cual es un ácido relativamente menos fuerte que el HCl 6 N, consecuentemente se obtuvieron buenas recuperaciones de triptófano; además de evitar la realización de una hidrólisis alcalina para poder cuantificarlo.

En los tiempos de hidrólisis probados, 110 °C por 24 horas y 135 °C por 5 horas; se obtuvieron recuperaciones de AAs muy próximas al 100 % por lo que se decidió emplear la hidrólisis a 135 °C or 5 horas, reduciendo considerablemente el tiempo de hidrólisis.

De los dos dispositivos empleados para realizar la hidrólisis se trabajó con el tubo de vidrio con tapa roscada (*Pyrex*) de 18 x 100 mm en sustitución del tubo de hidrólisis de Pierce (*Pierce*) debido a que se lograron obtener recuperaciones de AAs de 98 %.

3.1.3.2 Factores de hidrólisis

La obtención de los factores de hidrólisis se realizó con la finalidad de compensar pérdidas ocurridas durante el proceso, (Dall y Smith, 1987).

Tabla 10.

Factores de Hidrólisis utilizados para compensar las pérdidas ocurridas durante el proceso de hidrólisis de proteínas

AA	Factor de Hidrólisis ¹	$S_{\bar{x}}^2$	C.V
Ac. Aspártico	1.12	0.013	1.2
Ac. Glutámico	1.23	0.010	0.8
Serina	1.28	0.063	4.9
Histidina	1.21	0.037	2.7
Glicina	1.21	0.062	5.1
Arg. +Treo.	1.01	0.002	0.2
Alanina	1.17	0.031	2.7
Tirosin	1.34	0.000	0.03
Metionina	1.36	0.006	0.4
Valina	1.22	0.009	0.7
Triptófano	1.28	0.003	0.2
Fenilalanina	1.23	0.001	0.1
Isoleucina	1.24	0.000	0.08
Leucina	1.24	0.012	1.0

¹ n = 2 . Determinado como la relación (nmol/ml de solución de estándares AA sometidos a hidrólisis entre nmol/ml de AA determinados por CLAR después de la hidrólisis de dos muestras sometidas a las mismas condiciones. (5 h a 135 °C).

$$^2 S_{\bar{x}} = R / \sqrt{n} \text{ Error estándar de la media., } R = \text{Rango} = |X_2 - X_1|$$

C.V = Coeficiente de variación

Los factores de hidrólisis de proteínas aumentan la exactitud en el cálculo de la concentración de los AAs. Como podemos observar en la Tabla 10, las pérdidas por hidrólisis para cada AA que se obtuvieron están en un intervalo desde 36 % para histidina y metionina, hasta 1 % para arginina-treonina. Respecto a la variabilidad en el cálculo de los factores de hidrólisis, se obtuvieron coeficientes de variación menores a 5.1 % indicando buena reproducibilidad en la determinación de dichos valores.

3.1.4 Cuantificación de una proteína de composición conocida

Para validar el método de análisis de AAP, se analizó por CLAR-FR una proteína de referencia; la albúmina sérica bovina (ASB), donde se comparó el porcentaje de cada AA, con la proporción de cada AA correspondiente a su secuencia aminoacídica. El cromatograma correspondiente a la ASB se muestra en la Figura 18.

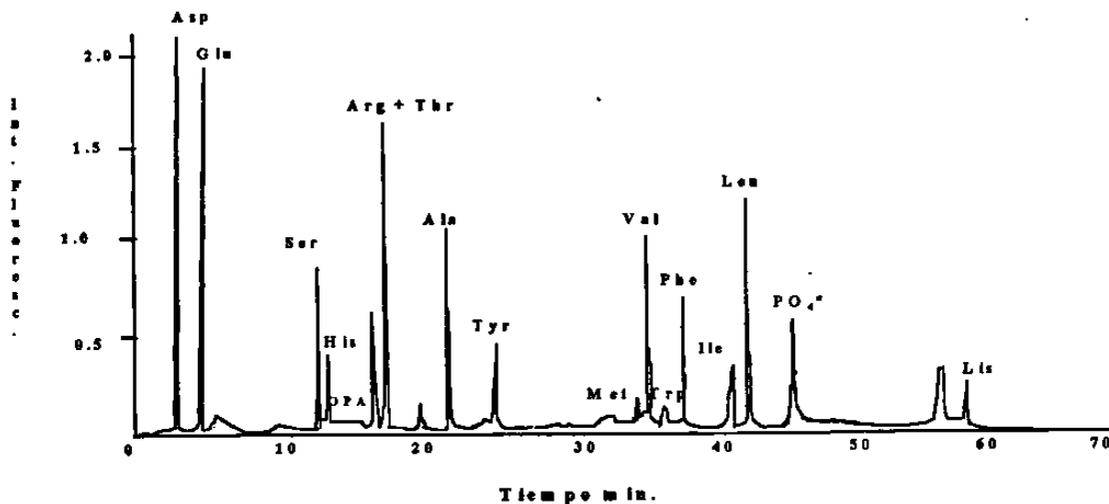


Figura 18. Aminograma de albúmina sérica bovina en la cual se indican los AAs cuantificados mediante CLAR-FR.

Se obtuvo buena reproducibilidad en los resultados obtenidos por análisis mediante CLAR-FR, como se muestra en la Tabla 11, en los cuales se obtuvieron coeficientes de variación menores a 9.9 % para todos los AAs excepto para el triptófano. En el triptófano el coeficiente de variación fue de 21.0 %.

Tabla 11.

Comparación del contenido de AAs de ASB analizada por CLAR-FR y su secuencia aminoacídica.

AA	CLAR-FR			Secuencia
	% ¹	S_x^{-2}	C.V %	%
Ac. Aspártico	8.32	0.59	7.1	9.12
Ac. Glutámico	14.38	0.59	4.1	10.37
Serina	5.42	0.54	9.9	4.20
Histidina	4.77	0.25	8.45	3.10
Glicina	3.03	0.24	8.0	1.59
Arg. +Treo.	9.86	0.43	4.4	10.70
Alanina	6.13	0.19	3.0	5.45
Tirosina	5.43	0.18	3.2	4.75
Metionina	0.65	0.02	2.7	0.93
Valina	6.18	0.22	3.6	6.20
Triptófano	0.73	0.15	21.0	0.80
Fenilalanina	6.79	0.27	3.9	6.18
Isoleucina	2.51	0.13	5.0	2.13
Leucina	11.49	0.57	5.0	10.63

¹ n = 3 , excepto para metionina y triptófano donde n = 2. El análisis de ASB (Sigma Chemical Co.) se realizó por triplicado (0.56, 0.27, 0.26 mg peso seco).

$$^2 S_x^{-} = S / \sqrt{n} \quad S_x^{-} = \text{Error estándar de la media, } S = \text{Desviación estándar}$$

C. V = Coeficiente de variación.

Se realizó una prueba de t de Student para comparar la recuperación de los AAs analizados por CLAR-FR comparando con la secuencia aminoacídica. En la Tabla 12 se proporcionan los valores obtenidos de la prueba de t, donde se observó que no existen diferencias significativas para la mayoría de los aminoácidos analizados excepto para ácido glutámico, histidina, glicina y metionina, por lo tanto la exactitud del análisis es apropiada para 10 aminoácidos. Se hace la observación que por ser el número de muestras pequeño (n= 3), se corre el riesgo de subestimar ó sobrestimar los resultados.

Tabla 12.

Prueba de t de Student del contenido de AAs de ASB analizada por CLAR-FR y su secuencia aminoacídica.

	CLAR-FR ¹	Secuencia	t_c	$t_{0.05, gl}$
AA	g/100 de AA recuperados	%	Si $t_{obs.} < t_{0.05(2), gl}$ entonces no existen diferencias significativas.	
Ac. Aspártico	8.32	9.12	1.35	4.30
Ac. Glutámico	14.38	10.37	6.79 *	4.30
Serina	5.42	4.20	2.25	4.30
Histidina	4.77	3.10	6.68	4.30
Glicina	3.03	1.59	8.47 *	4.30
Arg. +Treo.	9.86	10.70	1.95	4.30
Alanina	6.13	5.45	3.57	4.30
Tirosina	5.43	4.75	3.77	4.30
Metionina	0.65	0.93	14.0 *	12.7
Valina	6.18	6.20	0.09	4.30
Triptófano	0.73	0.80	0.46	12.7
Fenilalanina	6.79	6.18	2.25	4.30
Isoleucina	2.51	2.13	2.92	4.30
Leucina	11.49	10.63	1.50	4.30

¹ n = 3 , excepto para metionina y triptófano donde n = 2. El análisis de ASB (Sigma Chemical Co.) se realizó por triplicado (0.56, 0.27, 0.26 mg peso seco).

Si $t_{obs.} < t_{0.05(2), gl}$ entonces no existen diferencias significativas, por lo tanto la exactitud es apropiada.

Sin embargo como se muestra en la Figura 19, la comparación de las proporciones de AAs obtenidas de un hidrolizado proteico analizadas por CLAR-FR y las proporciones de AAs establecidos por secuencia indican una alta correlación con un valor de $r = 0.946$. El valor de la pendiente en la ecuación de la recta fue muy próxima a la unidad ($y = 1.03x + 0.57$), por lo que el protocolo de hidrólisis y cuantificación por CLAR-FR son satisfactorios permitiendo emplearlo en la cuantificación del precipitado proteico de larvas del camarón *Penaeus vannamei*.

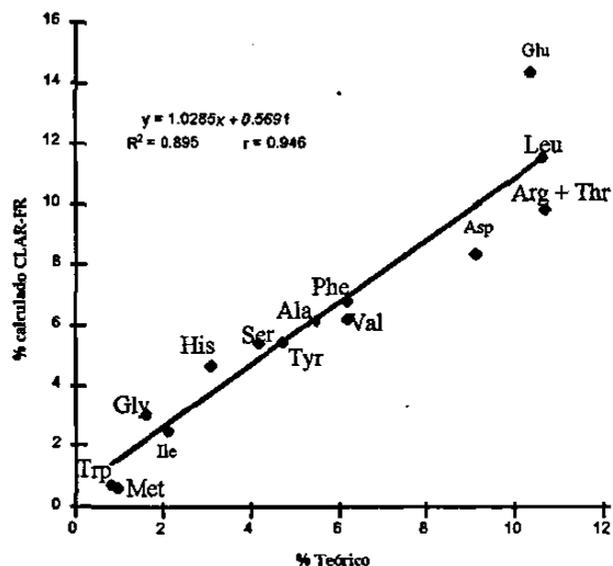


Figura 19. Correlación del contenido de AAs de ASB analizados por CLAR-FR y su secuencia aminoacídica.

3.2 Análisis de proteínas

Los resultados del análisis del contenido de proteína en $\mu\text{g}/\text{org}$ de los subestadios huevo, nauplio y zoea se presentan en la Tabla 13. El embrión presentó el valor más bajo con $0.16 \mu\text{g}/\text{org}$, mientras que los subestadios N-I y N-III presentaron ambos valores de $0.5 \mu\text{g}/\text{org}$ y la mezcla de los subestadios NIV/V registró una disminución registrando un valor de $0.42 \mu\text{g}/\text{org}$. El estadio Z-I con $0.24 \mu\text{g}/\text{org}$, registró una drástica disminución respecto al estadio NIV/V. A partir de Z-II ($0.54 \mu\text{g}/\text{org}$) se registró un incremento constante del contenido de proteína hasta el estadio Z-III $0.68 \mu\text{g}/\text{org}$. Asimismo se realizó el cálculo para estimar el contenido de proteína expresado como estadio.

Tabla 13

Contenido de proteína en las primeras etapas larvarias del camarón *Penaeus vannamei*. cuantificadas mediante método colorimétrico de Bradford.

	Subestadio ¹ (µg/org)				Estadio ² (µg/org)			
	Media	$S_{\bar{x}}$	C.V	n	Media	$S_{\bar{x}}$	C.V	n
Embrión	0.16	0.04	25.5	2	0.16	-	-	-
Nauplio-I	0.50	0.09	17.9	2	0.47	0.027	10	3
Nauplio-III	0.50	0.02	3.7	3				
NauplioIV-V	0.42	0.01	2.0	3				
Zoea I	0.24	-	-	1	0.49	0.13	46.19	3
Zoea-II	0.54	0.07	12.4	2				
Zoea-III	0.68	0.06	8.3	4				

¹ Los valores de proteína en cada subestadio es el promedio de n muestras

² Los valores de proteína en cada estadio es el promedio de valores reportados para cada subestadio

$$S_{\bar{x}} = S / \sqrt{n}, \quad n = \text{número de muestras analizadas}$$

Al graficar los valores del contenido de proteína (Figura 20) de cada subestadio respecto al tiempo durante el desarrollo larvario, se observa que existe un incremento en la cantidad de proteína soluble desde huevo hasta nauplio I manteniéndose sin cambio en N-III, para después iniciar una disminución brusca desde NIV/V hasta el estadio zoea I. A partir de zoea II el contenido de proteínas se incrementó hasta zoea III. En la Figura 20 se incluye también una descripción del contenido de proteína por estadio, el cual se obtuvo al calcular el promedio del contenido de proteínas de cada subestadio, resultando una gráfica con una tendencia creciente a lo largo del ciclo larvario, enmascarándose la disminución del contenido de proteína en el último subestadio de nauplio y primero de zoea.

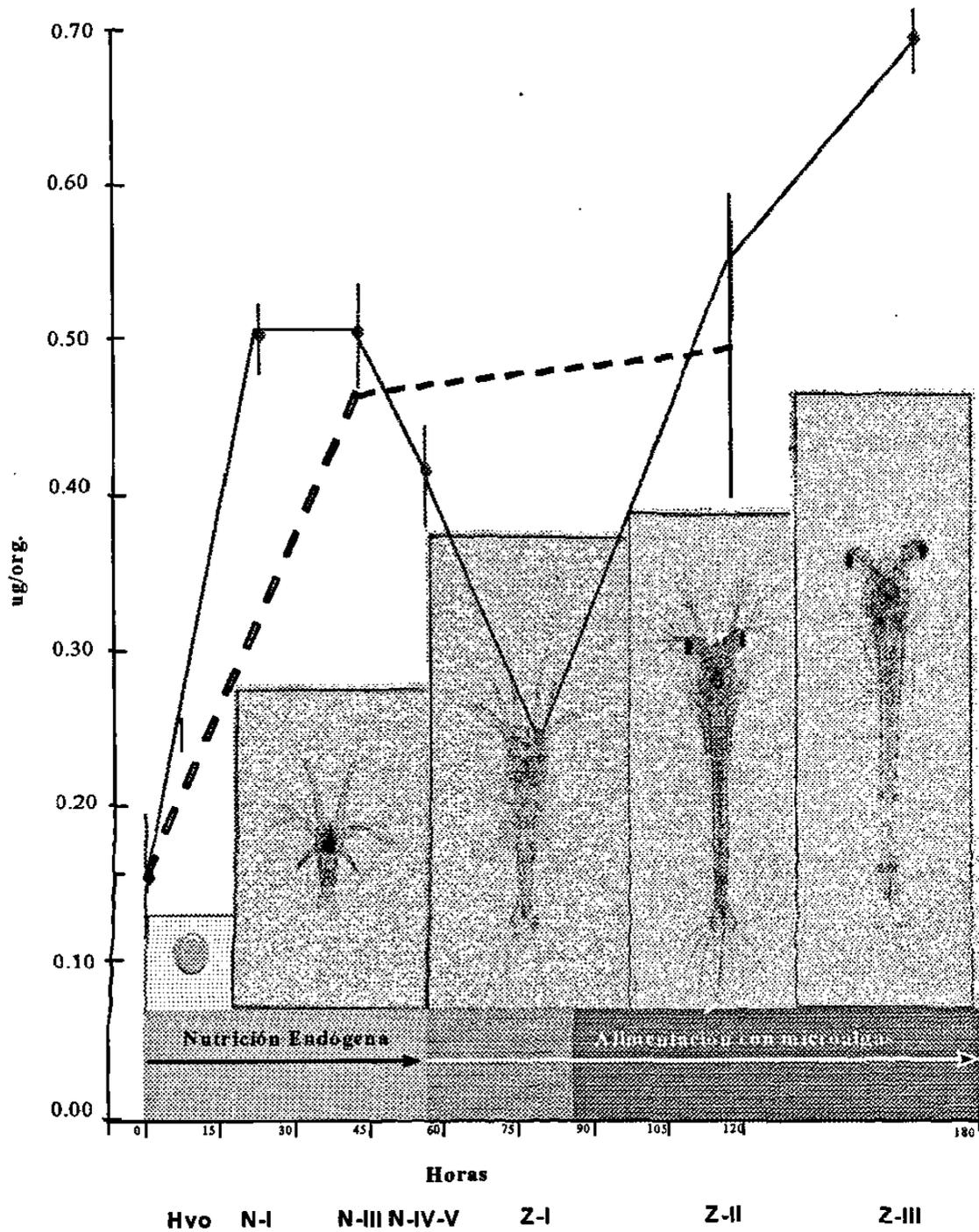


Figura 20. Variación en el contenido de proteínas durante la fase embrionaria y los estadios larvarios nauplio y zoea del camarón *Penaeus vannamei*.

La línea continua (—) representa los valores de proteína para cada subestadio. La línea discontinua (- - - -) une los valores de proteína del estadio, expresados como promedio de los subestadios.

3.3 Variación del contenido de proteína durante la fase embrionaria y los dos primeros estadios larvarios de *Penaeus vannamei* así como del crecimiento relativo durante el ciclo larvario

En la Figura 21, se observa que el crecimiento longitudinal teórico (Kitani, 1986) de las larvas es mínimo en los subestadios de nauplio de *P. vannamei*, volviéndose exponencial a partir de zoea. Mientras que en términos de crecimiento relativo se presentan tres periodos de crecimiento máximo, uno de huevo a N-I; otro, el más importante de N-IV/V a Z- I; coincidiendo éste último, con la caída brusca del contenido de proteína soluble corporal y finalmente de Z-II a Z-III. A partir del subestadio Z-III el crecimiento relativo disminuye en comparación con el estadio zoea I y paralelamente el contenido de proteína de la larva se incrementa.

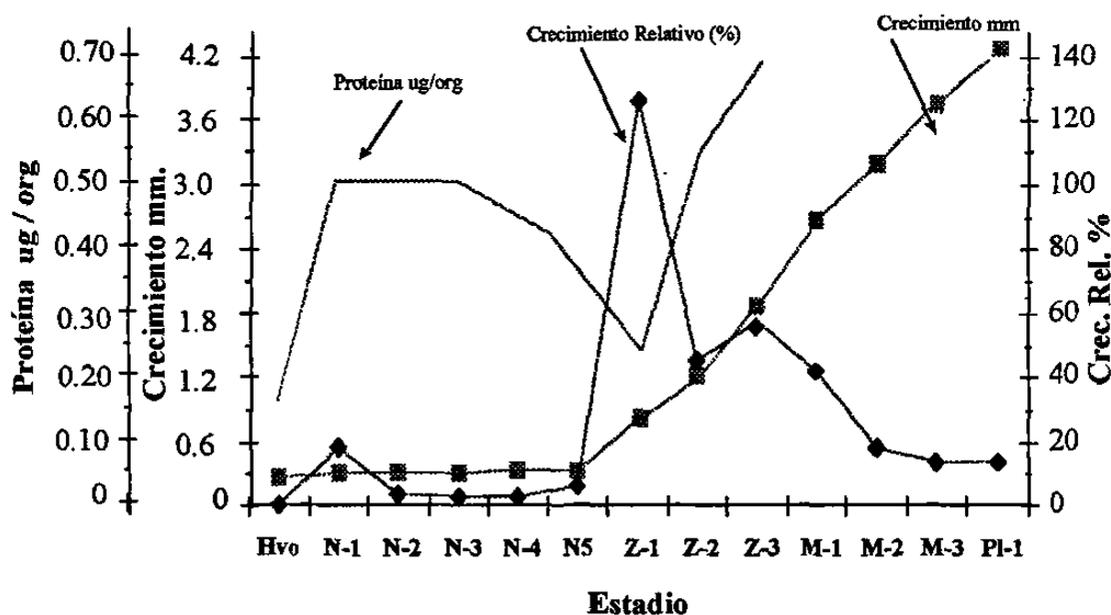


Figura 21. Variación del contenido de proteína total durante la fase embrionaria y los dos primeros estadios larvarios de *Penaeus vannamei* y el crecimiento relativo* durante todo el ciclo larvario.

* Crecimiento relativo (%) = $100 * [(Subestadio\ n-1 - subestadio\ n) / subestadio\ n]$
 donde n = N1, N2, N3, N5, Z1, Z2, Z3, M1, M2, M3, P11.
 Tomado de Kitani (1986).

3.4 Cuantificación de AAs en embriones y larvas del camarón *Penaeus vannamei*

Los datos se expresan en g/100g de AA, el cual representa el porcentaje de la relación de la cantidad determinada (mg) de cada AA respecto a la cantidad (mg) total de AA recuperados del hidrolizado de un concentrado proteico. Se emplearon dichas unidades debido a que no se cuantificó la proteína total (Kjeldalh) en base seca. Además no se cuantificaron los 20 AA presentes en las proteínas, entre los AAs no cuantificados estuvieron prolina e hidroxiprolina al no reaccionar con el agente derivatizante empleado (OPA), cistina y cisteína por requerir un tratamiento de hidrólisis diferente al método utilizado y lisina por no obtener reproducibilidad en la cuantificación donde se obtuvieron coeficientes de variación en algunos casos superiores a 20 %, sin embargo al expresar los requerimientos se realizó una extrapolación para poder reportar el valor de lisina en las muestras. Se transforman a su respectivo ácido durante el proceso de hidrólisis la asparagina y glutamina por lo que en las concentraciones de ácido aspártico y ácido glutámico van incluidas la asparagina y glutamina, respectivamente.

En la Tabla 14 se presentan las concentraciones de AA de los estadios nauplio, zoea, misis y postlarva que forman parte del ciclo larvario del camarón *P. vannamei*.

Tabla 14

Perfil de AAs proteicos durante la ontogénesis de *Penaeus vannamei*.
(g/100 g AA)¹. Los valores en nauplio zoea, misis y postlarva son el promedio de las concentraciones de AAs cuantificados en cada subestadio analizado

AMINOACIDO	ESTADIO LARVARIO				
	Embrión*	Nauplio	Zoea	Misis	Postlarva
Asp + Asn	9.08	8.38 ± 1.06	8.89 ± 0.60	9.94 ± 0.77	9.35 ± 0.90
Glu + Gln	14.19	11.70 ± 2.13	13.41 ± 0.94	13.89 ± 1.51	14.66 ± 1.76
Ser	10.64	9.40 ± 1.71	8.12 ± 0.47	7.46 ± 1.24	6.81 ± 2.49
His	6.57	5.88 ± 0.46	4.50 ± 0.27	5.12 ± 2.23	4.43 ± 0.97
Gly	5.96	5.67 ± 0.96	5.85 ± 0.53	6.41 ± 1.81	5.73 ± 1.22
Arg + Thr	12.86	13.26 ± 1.29	14.15 ± 0.57	15.66 ± 2.50	13.55 ± 2.82
Ala	7.94	8.03 ± 0.61	7.39 ± 0.30	6.20 ± 0.44	6.17 ± 0.50
Tyr	4.83	5.40 ± 0.47	6.22 ± 0.35	5.06 ± 0.55	5.27 ± 0.65
Met	3.67	3.82 ± 0.16	3.96 ± 0.22	5.53 ± 2.33	5.80 ± 1.77
Trp	2.09	2.62 ± 1.19	1.50 ± 0.29	2.30 ± 0.75	2.40 ± 2.23
Val	6.35	6.61 ± 0.52	6.22 ± 0.24	5.17 ± 0.77	5.89 ± 1.38
Phe	4.7	5.36 ± 0.28	5.98 ± 0.24	5.33 ± 0.32	5.82 ± 0.48
Ile	4.87	4.89 ± 0.40	4.47 ± 0.22	3.90 ± 0.31	5.05 ± 1.03
Leu	7.28	9.04 ± 1.37	9.45 ± 0.68	8.04 ± 0.65	9.08 ± 0.83

* n = 2 para el embrión.

$\bar{X} \pm S$ n = 8,8,9,12 para los estadios nauplio, zoea, misis y postlarva respectivamente.
S = Desviación estándar.

¹ g/100 g. de AA. calculado como el porcentaje de la relación de la cantidad (mg) de cada AA individual (mg) respecto a la cantidad total de AAs recuperados (mg) del hidrolizado de un concentrado protéico.

El patrón de AAE expresados como porcentaje respecto al total de AAE se describe en la Tabla 15, se observa que en el embrión de *P. vannamei* la histidina, metionina y los aminoácidos ramificados valina e isoleucina están en mayor proporción que en los estadios larvarios. La histidina y valina presentan la mayor concentración en el estadio nauplio cuando se comparan entre los estadios zoea, misis y postlarva, mientras que en zoea la fenilalanina, leucina, lisina y tirosina presentan valores más elevados. El estadio misis presenta altas concentraciones en arginina y treonina, mientras que la postlarva presenta altas valores en metionina e isoleucina.

Tabla 15.

Patrón de AAE durante la ontogénesis de *P. vannamei* expresados como % de AAE*

AMINOACIDO	Estadio larvario				
	Embrión	Nauplio	Zoea	Misis	Postlarva
Histidina	10.87	8.94	6.85	8.03	6.69
Arginina	14.33	13.57	14.49	16.53	13.78
Treonina	6.96	6.59	7.04	8.03	6.69
Metionina	6.07	5.81	6.03	8.31	8.76
Triptófano	3.46	3.98	2.28	3.61	3.63
Valina	10.51	10.05	9.46	8.11	8.90
Fenilalanina	7.86	8.15	9.10	8.36	8.79
Isoleucina	8.06	7.44	6.80	6.12	7.63
Leucina	12.05	13.75	14.38	12.61	13.72
Lisina	11.83	13.49	14.11	12.37	13.46
Tirosina	7.99	8.21	9.46	7.93	7.96

* % de AAE = (AA individual / total de AAE + Tyr) * 100

3.4.1 Embriones

El perfil cromatográfico de los embriones de *Penaeus vannamei* se proporciona en la Fig. 22. Las concentraciones de AAs analizados mediante CLAR-FR durante la fase embrionaria de *Penaeus vannamei* se proporcionan en la Tabla 14. Se observó que los AA que presentan la más alta concentración (g/100g de AA) fueron ácido glutámico, el par Arginina+Treonina y serina. La metionina y triptófano tuvieron los valores más bajos.

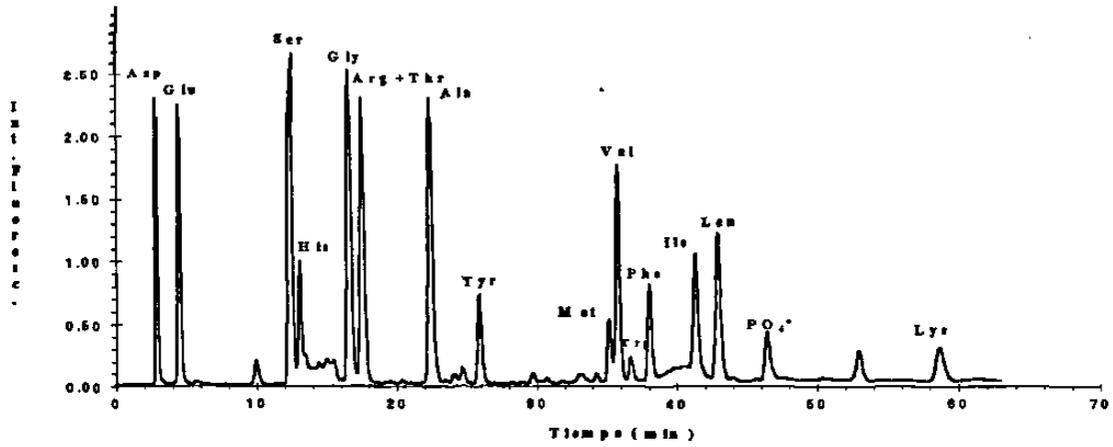


Figura 22. Perfil de AAs en embriones obtenidos de un grupo *Penaeus vannamei* colectados en un laboratorio de producción larvaria a escala comercial.

3.4.2 Nauplio

Los AAs que tuvieron la más alta concentración (g/100g de AA) durante el estadio de nauplio fueron: el par Arginina+Treonina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico. La metionina fue el penúltimo en concentración y finalmente el triptófano, asimismo en la Figura 23 se presenta un aminograma del estadio nauplio.

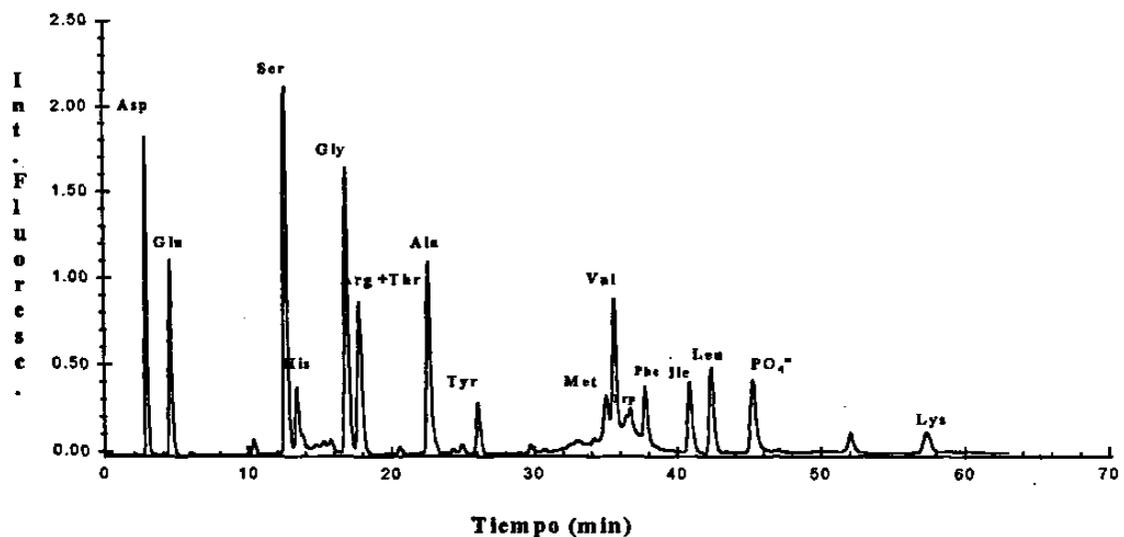


Figura 23. Perfil de AAs en el subestadio nauplio III de *Penaeus vannamei* colectados en un laboratorio de producción larvaria a escala comercial.

3.4.3 Zoea

El par arginina + treonina, ácido glutámico, leucina y ácido aspártico presentaron las concentraciones (g/100g de AA) más elevadas durante el estadio de zoea, mientras que metionina y triptófano fueron los de menor concentración. En la Figura 24 se presenta un cromatograma del subestadio Z-III.

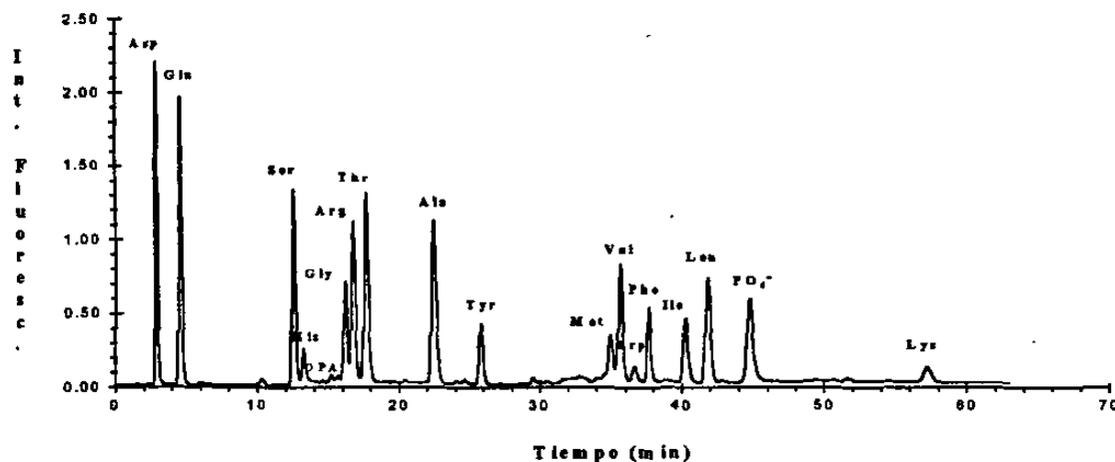


Figura 24. Perfil de AAs en el subestadio Z III de *Penaeus vannamei* colectados en un laboratorio de producción larvaria a escala comercial.

3.4.4 Misis

Los AAs que tuvieron la más alta concentración (g/100g de AA) durante el estadio de misis (Fig. 25) fueron: el par arginina + treonina, ácido glutámico, ácido aspártico y leucina. Los que tuvieron menor concentración que los anteriormente mencionados fueron isoleucina y el triptófano.

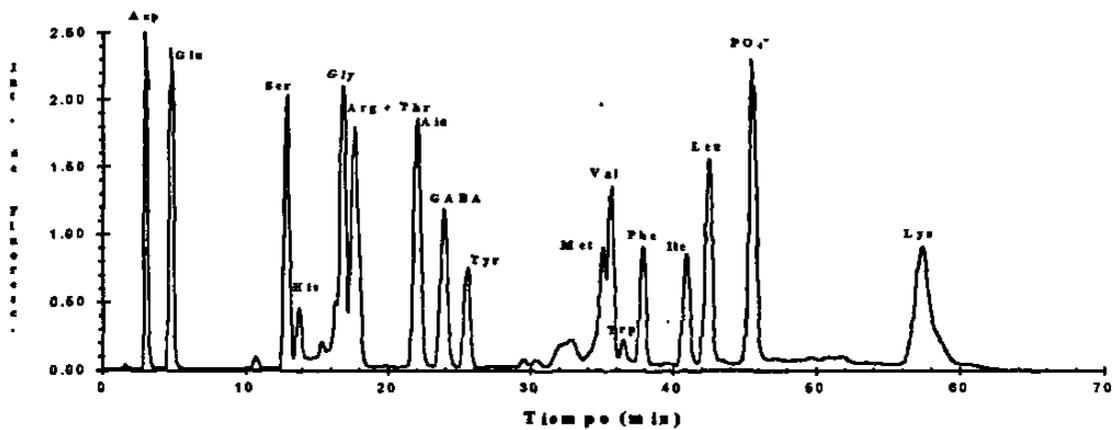


Figura 25. Perfil de AAs en el subestadio mysis I de *Penaeus vannamei* colectados en un laboratorio de producción larvaria a escala comercial.

3.4.5 Postlarva

Los AAs que tuvieron la más alta concentración (g/100g de AA.) durante el estadio de postlarva del camarón *Penaeus vannamei* fueron: el ácido glutámico, el par arginina + treonina, el ácido aspártico y leucina. Los AAs que tuvieron una concentración menor mencionados fueron histidina y triptófano (Fig 26).

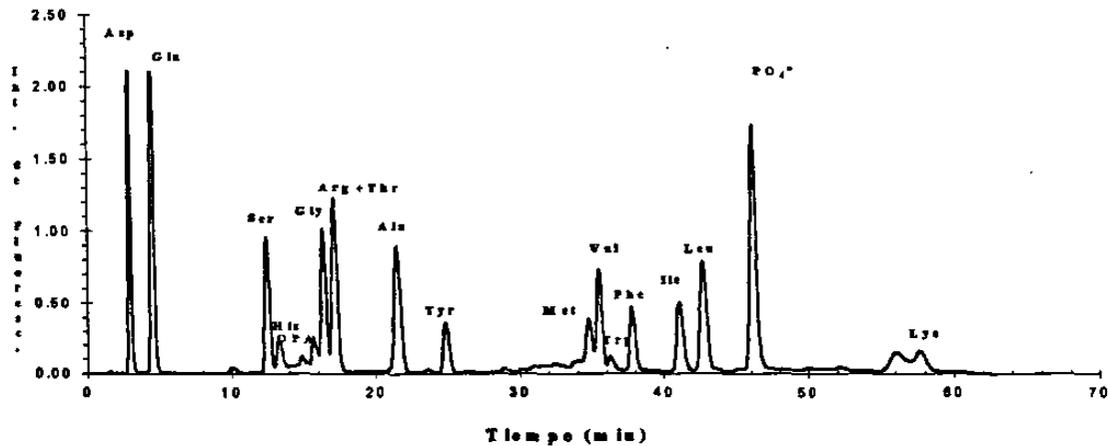


Figura 26. Perfil de AAs en el estadio postlarva de *Penaeus vannamei* colectados en un laboratorio de producción larvaria a escala comercial.

3.5 Análisis estadísticos de la composición de AAP en los estadios larvarios de *Penaeus vannamei*

Al comparar los perfiles de AAP obtenidos por CLAR-FR en los estadios nauplio, zoea, misis y postlarva, se observó que el perfil de AA en los estadios que componen el ciclo larvario de *P. vannamei*, tuvieron mucha similitud, manteniendo la proporción de la mayoría de los aminoácidos cuando se comparan entre estadios. Sin embargo, se presentan variaciones en algunos AAs como ácido glutámico, serina, metionina, triptófano, fenilalanina, isoleucina y leucina principalmente.

Tales diferencias se pudieron observar mejor cuando se graficaron los perfiles de AAP de cada estadio larvario en la Figura 27, donde en el eje de las ordenadas se describe cada AA cuantificado en el perfil cromatográfico y en el eje de las abscisas la concentración (g/100 g de AA) correspondiente a cada AA.

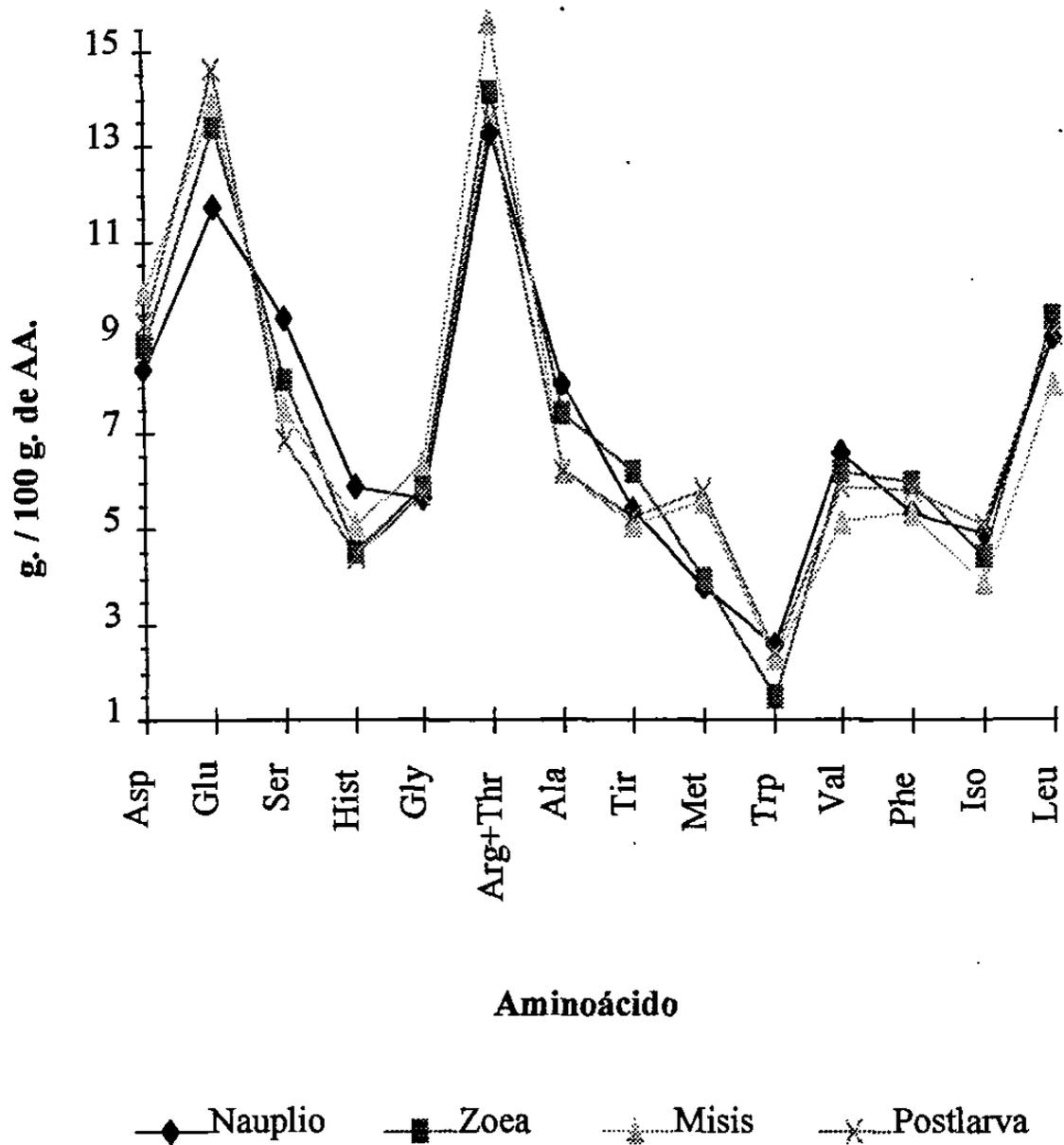


Figura 27. Comparación del perfil de AAP en los cuatro estadios del ciclo larvario de *Penaeus vannamei* colectados en un laboratorio de producción larvaria a escala comercial. la comparación se realiza situando en una misma escala los cuatro estadios larvarios.

3.6 Variación de AAE y AANE durante la ontogénesis de *Penaeus vannamei*

Las concentraciones de cinco AAE (metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina) y de cinco AANE (ácido aspártico, ácido glutámico, serina, alanina y tirosina) del cuerpo entero de las larvas de camarón *P. vannamei*, presentaron diferencias significativas entre los cuatro estadios larvarios; ($P < 0.05$). Sin embargo, estas diferencias fueron numericamente pequeñas y en la mayoría de los casos se debieron al contenido de AAs de solo un estado larvario, (Tabla 16).

El contenido de metionina tiene una tendencia a incrementarse progresivamente entre estadios, presentando una concentración significativamente mayor (65 %) en postlarva con respecto a nauplio.

A diferencia de la metionina, los aminoácidos ramificados valina, isoleucina y leucina, así como la fenilalanina presentan un comportamiento muy similar entre ellos, en el cual los tres tienen una concentración significativamente mínima en el estadio misis con respecto a los otros tres estadios que presentan una concentración relativamente constante.

De manera general, el contenido de serina, alanina y tirosina disminuyen a lo largo del ciclo larvario mientras que el ácido aspártico y ácido glutámico se incrementan.

La serina y alanina disminuyen progresivamente, encontrando una diferencia de 38 % y 30 % en la postlarva con respecto al nauplio. Mientras que la tirosina se incrementa de nauplio a zoea para disminuir desde zoea hasta postlarva en un 18 %. Los ácidos aspártico y glutámico se incrementan en un 6 % y 25 % respectivamente desde nauplio hasta postlarva.

Tabla 16

Variación del contenido de AAE y AANE (g /100 g de AA) durante la ontogénesis de *Penaeus vannamei*

AMINOACIDO	NAUPLIO	ZOEA	MISIS	POSTLARVA	F
Histidina	5.88 ± 0.5	4.50 ± 0.3	5.12 ± 2.2	4.43 ± 1.0	2.786
Arg + Thr	13.26 ± 1.3	14.15 ± 0.6	15.66 ± 2.5	13.55 ± 2.8	1.954
Metionina	3.82 ± 0.2 ^b	3.96 ± 0.2 ^b	5.30 ± 2.8 ^{ab}	5.80 ± 1.8 ^a	4.160*
Triptófano	2.62 ± 1.2	1.50 ± 0.3	2.30 ± 0.8	2.40 ± 0.6	1.200
Valina	6.61 ± 0.5 ^a	6.22 ± 0.2 ^{ab}	5.17 ± 0.8 ^b	5.89 ± 1.4 ^{ab}	3.452*
Fenilalanina	5.36 ± 0.3 ^{bc}	5.98 ± 0.2 ^a	5.33 ± 0.3 ^c	5.82 ± 0.5 ^{ab}	6.316**
Isoleucina	4.89 ± 0.4 ^a	4.47 ± 0.2 ^{ab}	3.90 ± 0.3 ^b	5.05 ± 1.0 ^a	6.494**
Leucina	9.04 ± 1.4 ^{ab}	9.45 ± 0.7 ^a	8.04 ± 0.6 ^b	9.08 ± 0.8 ^{ab}	3.690*
TOTAL	49.78 ± 3.9	50.16 ± 1.1	49.46 ± 3.94	50.19 ± 4.41	0.08
Acido Aspártico	8.38 ± 1.1 ^d	8.89 ± 0.6 ^c	9.94 ± 0.8 ^a	9.35 ± 0.9 ^b	4.825**
Acido Glutámico	11.70 ± 2.1 ^c	13.41 ± 0.9 ^{ab}	13.89 ± 1.5 ^{ab}	14.66 ± 1.8 ^a	4.635**
Serina	9.40 ± 1.7 ^a	8.12 ± 0.5 ^b	7.46 ± 1.2 ^c	6.81 ± 2.5 ^c	4.153 *
Glicina	5.67 ± 1.0	5.85 ± 0.5	6.41 ± 1.8	5.73 ± 1.2	0.362
Alanina	8.03 ± 0.6 ^a	7.39 ± 0.3 ^b	6.20 ± 0.4 ^c	6.17 ± 0.5 ^c	28.82**
Tirosina	5.40 ± 0.5 ^{ab}	6.22 ± 0.2 ^a	5.06 ± 0.6 ^c	5.27 ± 0.7 ^{ab}	6.219**
TOTAL	50.22 ± 3.13	49.83 ± 2.00	49.62 ± 5.52	49.80 ± 5.02	0.177

Literales diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05), P < 0.01

$\bar{X} \pm S$ n = 8, 8, 9, 12 para los estadios nauplio, zoea, misis y postlarva respectivamente

3.6.1 Variación de AAE y AANE en el estadio nauplio y zoea

Debido a que el número de replicados para los tres subestadios de nauplio y zoea analizados fueron en algunos casos menores de tres, no se reportan análisis estadísticos. Describiéndose en las tablas 17 y 18 los valores promedio para cada AA con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 17.

Contenido de AAE Y AANE (g/100g de AA) durante el estadio Nauplio de *P.vannamei*

AMINOACIDO	NAUPLIO I $\bar{X} \pm S^1$	NAUPLIO III $\bar{X} \pm D.S^2$	NAUPLIO IV-V $\bar{X} \pm D.S^2$
Histidina	5.98 ± 0.16	6.12 ± 0.62	5.57 ± 0.04
Arg + Thr	12.92 ± 0.66	12.70 ± 1.69	14.01 ± 0.57
Metionina	3.63 ± 0.04	3.99 ± 0.08	3.77 ± 0.09
Triptófano	1.79 ± 0.02	4.16 ± 0.09	1.65 ± 0.12
Valina	6.64 ± 0.09	7.16 ± 0.27	6.03 ± 0.02
Fenilalanina	5.22 ± 0.03	5.39 ± 0.44	5.42 ± 0.08
Isoleucina	5.04 ± 0.13	5.09 ± 0.52	4.59 ± 0.06
Leucina	8.16 ± 0.03	8.87 ± 1.88	9.79 ± 0.60
TOTAL	49.37 ± 1.15	55.25 ± 7.05	50.83 ± 1.18
Ac. Aspártico	8.40 ± 0.23	7.31 ± 0.76	9.40 ± 0.44
Ac. Glutámico	12.68 ± 0.34	9.41 ± 1.77	13.30 ± 0.62
Serina	10.08 ± 0.27	10.09 ± 2.31	8.23 ± 0.39
Glicina	5.68 ± 0.16	6.19 ± 1.36	5.13 ± 0.03
Alanina	8.44 ± 0.37	8.30 ± 0.60	7.46 ± 0.17
Tirosina	5.34 ± 0.00	5.23 ± 0.71	5.62 ± 0.10
TOTAL	52.69 ± 1.40	48.08 ± 7.50	56.13 ± 1.89

n = 2, 3, 3 para los subestadios nauplio I, nauplio II, nauplio IV-V, respectivamente.

$$^1 S = \frac{D}{\sqrt{n}}, n = 2. \quad ^2 D.S., n = 3$$

Tabla 18

Contenido AAE (g/100g de AA) durante el estadio zoea de *Penaeus vannamei*

AMINOACIDO	ZOEA I $\bar{X} \pm S^1$	ZOEA II $\bar{X} \pm S^1$	ZOEA III $\bar{X} \pm D.S^2$
Histidina	4.91 ± 0.01	4.26 ± 0.08	4.40 ± 0.15
Arg + Thr	13.90 ± 0.50	14.14 ± 0.26	14.21 ± 0.62
Metionina	4.19 ± 0.03	3.80 ± 0.26	3.91 ± 0.13
Triptófano	1.14 ± 0.01	1.28 ± 0.09	1.77 ± 0.04
Valina	6.07 ± 0.07	6.34 ± 0.21	6.21 ± 0.28
Fenilalanin	5.78 ± 0.10	5.84 ± 0.15	6.12 ± 0.21
Isoleucina	4.20 ± 0.01	4.64 ± 0.09	4.51 ± 0.21
Leucina	9.34 ± 0.45	10.24 ± 0.67	9.09 ± 0.38
TOTAL	49.54 ± 1.05	50.57 ± 0.64	50.27 ± 1.27
Ac. Aspártico	8.17 ± 0.40	9.37 ± 0.33	8.98 ± 0.43
Ac. Glutámico	12.72 ± 0.62	13.23 ± 0.47	13.78 ± 1.03
Serina	8.59 ± 0.42	8.05 ± 0.28	7.95 ± 0.35
Glicina	6.68 ± 0.09	5.66 ± 0.06	5.52 ± 0.30
Alanina	7.68 ± 0.29	7.23 ± 0.20	7.31 ± 0.24
Tirosina	6.62 ± 0.19	5.90 ± 0.18	6.18 ± 0.29
TOTAL	50.46 ± 1.05	49.43 ± 0.64	51.68 ± 2.60

$$^1 S = \frac{D}{\sqrt{n}}, n = 2. \quad ^2 D.S., n = 3$$

3.6.2 Variación de AAE y AANE en el estadio misis

Los resultados de ANOVA presentados en la Tabla 19 nos indican que no hubieron diferencias significativas en la concentración de AAE y AANE durante el estadio misis de *P. vannamei*, así como tampoco en la suma total de AAs cuantificados.

Tabla 19

Variación del contenido de AAE (g./100g. de AA) durante el estadio Misis de *Penaeus vannamei*.

AMINOACIDO	MISIS I $\bar{X} \pm D.S$	MISIS II $\bar{X} \pm D.S$	MISIS III $\bar{X} \pm D.S$	F
Histidina	3.96 ± 0.42	6.30 ± 4.05	5.11 ± 1.03	0.604
Arg + Thr	17.64 ± 1.91	14.83 ± 2.31	14.52 ± 2.38	1.369
Metionina	5.70 ± 0.83	4.88 ± 2.52	6.00 ± 3.28	0.358
Triptófano	2.59 ± 0.55	2.29 ± 1.10	2.01 ± 0.65	0.137
Valina	5.37 ± 0.23	5.00 ± 0.25	5.16 ± 1.27	0.884
Fenilalanina	5.14 ± 0.19	5.33 ± 0.50	5.51 ± 0.18	1.080
Isoleucina	3.69 ± 0.19	3.96 ± 0.43	4.07 ± 0.25	1.125
Leucina	7.56 ± 0.34	8.32 ± 1.08	8.23 ± 0.18	0.865
TOTAL	51.63 ± 2.2	50.91 ± 1.84	50.60 ± 3.70	0.114
Ac. Aspártico	10.11 ± 0.85	9.87 ± 1.00	9.85 ± 0.59	0.064
Ac. Glutámico.	14.31 ± 1.92	13.88 ± 1.51	13.47 ± 1.11	0.145
Serina	7.22 ± 1.58	7.07 ± 1.10	8.08 ± 0.86	0.465
Glicina	5.02 ± 2.18	7.66 ± 1.48	6.54 ± 0.33	1.500
Alanina	6.44 ± 0.14	6.03 ± 0.60	6.12 ± 0.46	0.604
Tirosina	5.27 ± 0.30	4.58 ± 0.58	5.34 ± 0.51	2.030
TOTAL	48.37 ± 1.27	49.09 ± 1.84	49.40 ± 3.70	0.079

Literales diferentes indican diferencias significativas (P< 0.05)

$\bar{X} \pm D.S$ n = 3, 3, 3 para los subestadios misis I, misis II, misis III, respectivamente.

3.6.3 Variación de AAE y AANE en el estadio postlarva

Durante el estadio postlarva se analizaron los estadios postlarva I, postlarva II y postlarva VII, (Tabla 20) en el análisis estadístico se observa que arginina + treonina, metionina y triptófano, ácido aspártico, glicina y tirosina tuvieron diferencias significativas (P<0.05). Respecto a la suma total de AAE y AANE no se encontraron diferencias en el estadio analizado.

Arginina + treonina se incrementa de Postlarva-I hasta Postlarva-II y disminuye en Postlarva-VII. Mientras que las concentraciones de metionina y triptófano disminuyen desde postlarva I hasta postlarva II y postlarva VII respectivamente. Se observa que

metionina va disminuyendo en su concentración en la última etapa del ciclo larvario del camarón *Penaeus vannamei*. El ácido aspártico tiene un incremento en su concentración a partir de postlarva I hasta postlarva II, manteniendo su valor sin cambios significativos en postlarva VII, mientras que las concentraciones de glicina y tirosina tienen un comportamiento muy parecido disminuyendo desde postlarva I hasta postlarva II manteniendo su concentración sin cambios significativos hasta postlarva VII.

La Postlarva-I fue la que presentó mayor diferencia con valores máximos para metionina, triptófano y glicina y mínimos para arginina, treonina y tirosina. Los perfiles de Postlarva-II y Postlarva-III unicamente difirieron en el ácido aspártico siendo el resto del perfil muy similar.

Tabla 20.

Contenido de AAE y AANE (g./100g. de AA)¹ durante el estadio postlarva de *Penaeus vannamei*.

AMINOACIDO	POSTLARVA I $\bar{X} \pm D.S$	POSTLARVA II $\bar{X} \pm D.S$	POSTLARVA VII $\bar{X} \pm D.S$	F
Histidina	4.16 ± 0.42	4.34 ± 0.38	5.07 ± 1.25	1.948
Arg + Thr	12.92 ± 1.33 ^b	15.14 ± 2.01 ^a	14.67 ± 0.81 ^a	14.063**
Metionina	7.89 ± 2.61 ^a	4.99 ± 1.12 ^b	5.15 ± 0.58 ^{ab}	4.467*
Triptófano	2.81 ± 0.44 ^a	1.44 ± 0.12 ^b	1.45 ± 0.17 ^b	8.77**
Valina	6.48 ± 1.25	5.41 ± 0.35	6.02 ± 0.47 ^a	0.320
Fenilalanina	5.03 ± 0.49	5.54 ± 0.34	6.22 ± 0.13	2.602
Isoleucina	4.40 ± 0.64	4.61 ± 0.31	4.85 ± 0.36	1.945
Leucina	7.71 ± 1.05	9.46 ± 0.61	9.26 ± 0.24	2.690
TOTAL	52.85 ± 3.49	50.84 ± 1.52	47.29 ± 1.29	0.122
Acido Aspártico	8.30 ± 0.60 ^b	9.79 ± 0.72 ^a	9.69 ± 0.42 ^b	7.186*
Acido Glutámico	11.36 ± 1.69	15.58 ± 1.54	14.92 ± 0.63	3.128
Serina	10.70 ± 2.89	6.44 ± 0.67	5.86 ± 0.40	1.021
Glicina	7.81 ± 1.01 ^a	5.33 ± 0.39 ^{ab}	4.97 ± 0.38 ^b	9.026**
Alanina	6.09 ± 0.49	6.48 ± 0.49	6.20 ± 0.14	3.677
Tirosina	4.34 ± 0.38 ^b	5.44 ± 0.52 ^a	5.66 ± 0.09 ^a	4.818*
TOTAL	48.61 ± 3.17	49.06 ± 1.52	47.29 ± 1.29	4.116

Literales diferentes indican diferencias significativas (P < 0.05), P < 0.01

$\bar{X} \pm D.S$ n = 3, 5, 4 para los subestadios postlarva I, postlarva II, postlarva III, respectivamente.

3.7 Comparación del perfil de AAE de los diferentes estadios larvarios con datos bibliográficos

Como se puede apreciar en la Tabla 21, en el embrión se observan altos valores de histidina, valina e isoleucina respecto a los estadios nauplio, zoea, misis y postlarva de *P. vannamei*, mientras que en nauplio el triptófano registra el valor más elevado respecto a los demás estadios. En zoea se obtuvieron los valores más elevados de fenilalanina, leucina, lisina y tirosina, en contraste en misis la arginina y la treonina tuvieron una alta concentración. La postlarva registró un valor elevado de metionina.

Las larvas de *P. japonicus* presentaron el valor más elevado de isoleucina cuando se compararon con los estadios larvarios de *P. vannamei*, mientras que los juveniles presentaron altos valores de treonina y lisina. El valor de lisina de los adultos de *P. japonicus* es ligeramente menor al valor de lisina de juveniles de la misma especie, sin embargo fue más elevado que los estadios larvarios de *P. vannamei*.

La valina y la fenilalanina tuvieron altas concentraciones en larvas de *P. monodon* cuando se compararon con *P. japonicus* y los estadios larvarios analizados en este trabajo, mientras que los juveniles de la misma especie presentaron valores elevados en valina y leucina y la arginina presentó el valor más elevado cuando se comparó con los estadios larvarios de *P. vannamei* y *P. japonicus*.

La treonina presentó el valor más alto respecto a todos los perfiles de crustáceos y respecto a los perfiles de AAE de *A. transmontanus* a excepción del perfil de huevo. El triptófano registró el valor más bajo en los tres estadios de *A. transmontanus* respecto a los perfiles de los estadios larvarios de *P. vannamei*.

Los valores de histidina, metionina y triptófano de todos los estadios larvarios analizados son particularmente elevados con respecto a los datos bibliográficos. Lo cual puede reflejar una sobrestimación por alguna interferencia o problema en el análisis. Cabe señalar que al validar los resultados con una proteína de composición conocida ASB se

detectó una sobrestimación para histidina, ácido glutámico y glicina y una subestimación para metionina por lo que el caso de la histina se puede considerar como sobre estimado y los otros AAs pueden presentar esos niveles por causas biológicas y no analíticas. Independientemente de los errores analíticos, la composición entre todos los subestadios analizados es válido porque todas las muestras se trataron y analizaron de la misma forma.

Tabla 21

Comparación del patrón de AAE (%) * de los estadios larvarios de *P. vannamei*, con *P. japonicus*, *P. monodon*, almeja *Tapes* y el esturión *Acipenser transmontanus*.

Aminoácido	<i>P. vannamei</i>			<i>P. japonicus</i>		<i>P. monodon</i>		Almeja ¹		Esturión <i>A. transmontanus</i> ⁴					
	Embrión	Nauplio	Zoea	Misis	Postlarva	Larva ¹	Juvenil ¹	Adulto ³	Larva ²	Juvenil ²	Adulto ²	V. philippinarum	Cuerpo entero	Músculo	Huevo
Histidina	10.9	8.9	6.8	8.0	6.7	4.5	4.5	4.2	4.4	4.9	4.4	4.4	3.8	6.6	4.0
Arginina	14.3	13.6	14.5	16.5	13.8	14.1	15.2	14.5	14.2	15.9	19.0	15.5	15.4	12.3	13.7
Treonina	7.0	6.6	7.0	8.0	6.7	5.9	8.2	7.7	8.0	7.9	7.4	9.6	9.5	9.1	10.4
Metionina	6.1	5.8	6.0	8.3	8.8	5.7	5.4	5.2	5.0	5.7	5.3	5.4	6.3	6.6	5.6
Triptófano	3.5	4.0	2.3	3.6	3.6	-	-	-	-	-	-	-	1.3	1.4	1.4
Valina	10.5	10.1	9.5	8.1	8.9	8.8	8.3	7.9	10.3	10.3	9.6	8.5	9.7	10.1	10.5
Fenilalanina	7.9	8.2	9.1	8.4	8.8	8.6	9.0	7.6	9.1	8.4	7.3	7.7	9.6	9.2	8.5
Isoleucina	8.1	7.4	6.8	6.1	7.6	9.1	8.6	8.3	8.5	8.9	8.9	6.8	8.8	9.4	10.1
Leucina	12.1	13.7	14.4	12.6	13.7	12.1	15.0	14.4	14.9	15.2	15.1	14.0	13.0	13.9	14.5
Lisina	11.8	13.5	14.1	12.4	13.5	13.1	15.8	15.1	16.4	15.1	15.6	14.7	15.9	14.5	14.2
Tirosina	8.0	8.2	9.5	7.9	8.0	-	-	-	9.2	7.8	7.4	7.8	6.6	6.9	7.3

* % AAE = (AAE individual / AAE totales incluyendo Tyr) * 100

¹ Tomado de Tacon (1989)

² Tomado de Liao and Sheen (1993)

³ Calculado a partir de datos de Deshimaru and Shigeno (1972)

⁴ Calculado a partir de datos de Wing-Keong and Silas (1994)

3.8 Estimación de Requerimientos aproximados de AAE en función de los aminogramas obtenidos del cuerpo entero, en los estadios larvarios de alimentación exógena en *Penaeus vannamei*

El conocimiento cuantitativo de los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento de un organismo es de principal importancia en nutrición. Dentro de la formulación de dietas para crustáceos de interés comercial, el nivel de inclusión de proteína así como el perfil de AAE se consideran de alta prioridad debido a que el crecimiento del organismo depende del suministro adecuado de AAs para satisfacer los requerimientos de mantenimiento y síntesis proteica. El creciente interés por sustituir los alimentos vivos por dietas inertes en forma de microcápsulas durante el cultivo larvario obliga a conocer a detalle el requerimiento de AAs en cada fase de desarrollo. En la Tabla 22, 23, 24, 25, 26 y 27 se proporcionan valores de los requerimientos estimados de AAE para los estadios de alimentación exógena (zoea, misis y postlarva) de *P. vannamei*. asimismo se proporcionan los requerimientos para los subestadios zoea y postlarva donde se observó que ocurrieron cambios en la composición de aminoácidos.

De los resultados expresados como g/100 g de AA recuperados a partir del concentrado proteico se realizaron los cálculos para expresar los requerimientos de AAE empleando en criterio de Tacon (1989), Fox *et al.*, (1996) y como % de materia seca descritos en 2.6.

Tabla 22.

Requerimientos estimados de AAE de larvas en los estadios Zoea, Misis y Postlarva de *Penaeus vannamei* basado en el % de materia seca del cuerpo entero.

AMINOACIDO	Requerimiento estimado		
	% materia seca ¹		
	Zoea	Misis	Postlarva
Histidina	1.54	1.66	1.14
Arginina ¹	3.26	3.42	0.96
Treonina ²	1.59	1.66	1.97
Metionina	1.36	1.79	0.96
Triptófano	0.51	0.75	1.26
Valina	2.13	1.68	0.52
Fenilalanina	2.05	1.73	1.27
Isoleucina	1.53	1.27	1.26
Leucina	3.24	2.61	1.09
Lisina	3.18	2.57	1.96

¹ g/100 de AA*Proteína total (% de materia seca) de la larva de *P. keratulus*, zoea 0.583, misis 0.547, postlarva 0.409 (Mourente *et al*, 1995).

¹ Calculado como (0.6730 * (Thr + Arg))

² Calculado como (0.3269 * (Thr + Arg))

Los factores 0.3269 para treonina y 0.6730 para arginina son el porcentaje del promedio de los valores reportados por Akiyama (1991) y Fox (1986).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) * Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

Tabla 23.

Requerimientos estimados de AAE de larvas en los estadios Zoea, Misis y Postlarva de *Penaeus vannamei* basado en el % de AAE del cuerpo entero

AMINOACIDO	Requerimiento estimado					
	Zoea		Misis		Postlarva	
	% de Proteína.					
	I	II	I	II	I	II
Histidina	2.65	2.28	3.04	3.05	2.79	2.34
Arginina ¹	5.60	4.83	6.26	6.28	2.34	4.81
Treonina ²	2.72	2.34	3.03	3.04	4.82	2.34
Metionina	2.33	2.01	3.28	3.29	2.34	3.06
Triptófano	0.88	0.76	1.37	1.37	3.07	1.27
Valina	3.66	3.15	3.07	3.08	1.27	3.11
Fenilalanina	3.52	3.03	3.17	3.18	3.11	3.07
Isoleucina	2.63	2.27	2.32	2.32	3.08	2.66
Leucina	5.56	4.79	4.78	4.79	2.67	4.79
Lisina	5.45	4.70	4.69	4.70	4.80	4.70

I % de AAE + Tyr (calculados de los datos en g/100 de AA) * 0.35.

II (4.7*AA específico en g/100 de AA) / Lisina en g/100 de AA

1 Calculado como (0.6730 * (Thr + Arg))

2 Calculado como (0.3269 * (Thr + Arg))

Los factores 0.3269 para treonina y 0.6730 para arginina son el porcentaje del promedio de los valores reportados por Akiyama (1991) y Fox (1986).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) * Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

Tabla 24.

Requerimientos estimados de AAE de larvas en los subestadios de Zoea de *Penaeus vannamei* basado en el % de AAE del cuerpo entero.

AMINOACIDO	Requerimiento estimado		
	% materia seca ¹		
	Zoea I	Zoea II	Zoea III
Histidina	1.57	1.34	1.41
Arginina ¹	2.99	2.99	3.06
Treonina ²	0.98	0.98	1.00
Metionina	1.34	1.20	1.25
Triptófano	0.37	0.40	0.57
Valina	1.94	1.99	1.99
Fenilalanina	1.85	1.84	1.96
Isoleucina	1.34	1.46	1.44
Leucina	2.98	3.22	2.91
Lisina	2.93	3.15	2.85

¹ g/100 de AA*Proteína total de la larva, zoea de *P. keratulus* 0.583, (Mourente *et al.*, 1995).

1 Calculado como (0.6730 * (Thr + Arg))

2 Calculado como (0.3269 * (Thr + Arg))

Los factores 0.3269 para treonina y 0.6730 para arginina son el porciento del promedio de los valores reportados por Akiyama (1991) y Fox (1986).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) * Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

Tabla 25.

Requerimientos estimados de AAE de larvas en los subestadios de Zoea de *Penaeus vannamei* basado en el % de AAE del cuerpo entero

AMINOACIDO	Requerimiento estimado					
	Zoea I		Zoea II		Zoea III	
	% de Proteína.					
	I	II	I	II	I	II
Histidina	2.69	2.52	2.29	1.99	2.41	2.32
Arginina ¹	5.13	4.80	5.13	4.45	5.25	5.04
Treonina ²	1.68	1.57	1.68	1.45	1.71	1.65
Metionina	2.30	2.15	2.05	1.78	2.14	2.06
Triptófano	0.63	0.58	0.69	0.60	0.97	0.93
Valina	3.33	3.11	3.42	2.96	3.41	3.27
Fenilalanina	3.17	2.96	3.15	2.73	3.36	3.22
Isoleucina	2.30	2.15	2.50	2.17	2.47	2.38
Leucina	5.12	4.79	5.52	4.79	4.99	4.79
Lisina	5.03	4.70	5.41	4.70	4.89	4.70

I % de AAE + Tyr (calculados de los datos en g/100 de AA) * 0.35.

II (4.7*AA específico en g/100 de AA) / Lisina en g/100 de AA)

1 Calculado como (0.6730 * (Thr + Arg))

2 Calculado como (0.3269 * (Thr + Arg))

Los factores 0.3269 para treonina y 0.6730 para arginina son el porciento del promedio de los valores reportados por Akiyama (1991) y Fox (1986).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) * Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

Tabla 26.

Requerimientos estimados de AAE de larvas en los estadios de Postlarva de *Penaeus vannamei* basado en el % de AAE del cuerpo entero

AMINOACIDO	Requerimiento estimado		
	% materia seca ¹		
	Postlarva I	Postlarva II	Postlarva III
Histidina	0.96	0.97	1.10
Arginina ¹	2.01	2.28	2.15
Treonina ²	0.66	0.74	0.70
Metionina	1.82	1.12	1.12
Triptófano	0.65	0.32	0.31
Valina	1.50	1.21	1.31
Fenilalanina	1.16	1.24	1.35
Isoleucina	1.02	1.03	1.06
Leucina	1.78	2.11	2.01
Lisina	1.75	2.07	1.98

¹ g/100 de AA*Proteína total de la larva de *P. keraturus*, 40.9 % de materia seca (Mourente *et al.*, 1995).

¹ Calculado como (0.6730 * (Thr + Arg))

² Calculado como (0.3269 * (Thr + Arg))

Los factores 0.3269 para treonina y 0.6730 para arginina son el porcentaje del promedio de los valores reportados por Akiyama (1991) y Fox (1986).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) + Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

Tabla 27.
Requerimientos estimados de AAE de larvas en los estadios de Postlarva de *Penaeus vannamei* basado en el % de AAE del cuerpo entero

AMINOACIDO	Requerimiento estimado					
	% de Proteína.					
	Postlarva I		Postlarva II		Postlarva III	
	I	II	I	II	I	II
Histidina	2.35	2.58	2.37	2.20	2.69	2.62
Arginina ¹	4.91	5.40	5.57	5.16	5.25	5.11
Treonina ²	1.61	1.77	1.82	1.69	1.71	1.67
Metionina	4.46	4.90	2.73	2.53	2.74	2.66
Triptófano	1.59	1.75	0.79	0.73	0.77	0.75
Valina	3.66	4.02	2.96	2.74	3.20	3.11
Fenilalanina	2.84	3.12	3.03	2.80	3.31	3.22
Isoleucina	2.49	2.73	2.52	2.33	2.58	2.51
Leucina	4.36	4.79	5.17	4.79	4.92	4.79
Lisina	4.28	4.70	5.07	4.70	4.83	4.70

I % de AAE (calculados de los datos en g/100 de AA) * 0.35

II (4.7*AA específico en g/100 de AA/ Lisina en g/100 de AA)

1 Calculado como (0.6730* (Thr + Arg))

2 Calculado como (0.3269 * (Thr + Arg))

Los factores 0.3269 para treonina y 0.6730 para arginina son el porciento del promedio de los valores reportados por Akiyama (1991) y Fox (1986).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) * Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

3.8.1 Comparación de requerimientos estimados de AAE de los estadios larvarios de alimentación exógena de *P. vannamei* (zoea, misis y postlarva) respecto a juveniles y recomendaciones de AAE en formulaciones a nivel comercial de la misma especie

En la Tabla 28 se proporcionan los requerimientos estimados de AAE de zoea, misis y postlarva, así como la recomendación de AAE para formulación de alimento balanceado para camarones de Akiyama (1991) y la de Fox *et al.*(1996). Para establecer una mejor comparación únicamente del balance de AAs sin considerar los valores cuantitativos entre los estadios de alimentación exógena (zoea, misis y postlarva) se utilizó la relación de cada AAE respecto al valor de metionina (AAE/Met) descrito por Deshimaru, (1982) y el índice de aminoácidos esenciales (IAAE) propuesto por Arai, (1981).

Tabla 28.

Comparación de requerimientos estimados de AAE de larvas en los estadios zoea, misis y postlarva de *Penaeus vannamei* basado en el contenido total de AAE del cuerpo entero, respecto a las recomendaciones a nivel comercial y juveniles de 105 mg

AMINOACIDO	Requerimiento estimado				
	g/100 g de Proteína		g/100 g de proteína		
	Nivel comercial	Juveniles de 105 mg ²	Zoea	Misis	Postlarva
Histidina	2.1	-	2.65	3.04	2.54
Arginina	5.8	7.99	5.60	6.26	5.24
Treonina	3.6	2.97	2.72	3.03	2.54
Metionina	2.4	2.20	2.33	3.28	3.33
Triptófano	0.8	-	0.88	1.37	1.38
Valina	4.0	3.87	3.66	3.07	3.38
Fenilalanina	4.0	3.62	3.52	3.17	3.34
Isoleucina	3.5	3.53	2.63	2.32	2.90
Leucina	5.4	5.79	5.56	4.78	5.22
Lisina	5.3	4.67	5.45	4.69	5.12

¹Akiyama, (1991).

²Fox *et al.*, (1996).

Los valores de lisina de los estadios zoea, misis y postlarva se extrapolaron del valor reportado por Akiyama, (1981).

Lisina en larvas = [Lisina Akiyama,(1991) * Leucina (zoea, misis ó postlarva) / Leucina Akiyama,(1991)].

Los valores de AAE/Met se presentan en la Tabla 29, donde se puede observar que si se utilizara como referencia para formular las recomendaciones de Akiyama (1991) se presentarían deficiencias solo para el estadio zoea, ya que. la histidina, triptófano, leucina y lisina tuvieron una proporción mayor en este estadio. Para el estadio misis y postlarva el perfil recomendado a nivel comercial aparentemente cubriría en exceso el requerimiento de las larvas. Por otro lado cuando se comparan los perfiles de AAE de juveniles de la misma especie con zoea, la lisina presentaría una deficiencia, mientras que para misis y postlarva el perfil de AAE de juveniles aparentemente cubriría los requerimientos de AAs.

En la Tabla 30 se presentan las comparaciones del IAAE de las recomendaciones de Akiyama (1992) y los requerimientos propuestos por Fox *et al.* (1996a) respecto al perfil de larvas de *P. vannamei*. Se observa que histidina, arginina, metionina, triptófano, leucina y lisina estarían en deficiencia si se empleara el perfil de AAE recomendado por Akiyama (1992) para formular dietas para los estadios zoea y postlarva. De la misma manera la histidina, arginina, metionina y triptófano estarían en deficiencia en el estadio misis. En contraparte si se empleara el perfil de AAE propuesto por Fox *et al.* (1996a) para juveniles de *P. vannamei* para formular dietas para larvas zoea de *P. vannamei*, la lisina sería la única que estaría en deficiencia. Por otro lado la metionina sería el único aminoácido deficiente si se empleara el perfil de AAE recomendado por (Fox *et al.*, 1996a) para formular dietas para misis y postlarva de la misma especie.

En la Tabla 31 se realiza una comparación de las relaciones AAE/Met de los subestadios zoea de *P. vannamei*. Se observa que en Z-I que la histidina está en una proporción mayor a la recomendación a nivel comercial (Akiyama, 1992) por lo que se formularía, con una posible deficiencia. En Z-II la arginina, histidina, leucina y lisina se encuentran en mayor proporción que las relaciones AAE/Met para el perfil recomendado a nivel comercial, asimismo en Z-III la histidina, triptófano y lisina están en proporción mayor que las recomendaciones a nivel comercial. Mientras que, cuando se toma como referencia el perfil de juveniles, la lisina es el único AA que estaría también en deficiencia para Z-II.

Cuando se comparan los IAAE en el subestadio Z-I (Tabla 32), la histidina, arginina, metionina, leucina y lisina estarían en deficiencia si se empleara para formular dietas el perfil de AAE recomendado por Akiyama (1992). Mientras que para el estadio Z-II la histidina, arginina, isoleucina leucina y lisina presentarían deficiencia, en el estadio Z-III además de los cinco AAs descritos anteriormente; la metionina también estaría en deficiencia. Cuando se comparan los IAAE de las recomendaciones reportadas por Fox *et al.* (1996a) respecto a los subestadios de zoea, se observa que la metionina y lisina en Z-I, treonina y lisina en Z-II y Z-III estarían en deficiencia, si se emplearan dichos valores para formular dietas en estos subestadios.

En la Tabla 33 se comparan las relaciones AAE/Met para los subestadios de postlarva de *P. vannamei*, tomando como referencia las recomendaciones para formulación a nivel comercial, observándose que para PI-I el triptófano estaría deficiente. En PI-II el perfil de recomendaciones a nivel comercial cubriría todos los requerimientos de AAE, mientras que en PL-III, la histidina y el triptófano serían deficientes.

Se compararon los IAAE de los estadios de postlarva (Tabla 34) respecto a las recomendaciones a nivel comercial proporcionadas por Akiyama (1992), donde se observó que la histidina, metionina, triptófano y valina, estuvieron en deficiencia en PI-I mientras que en PII y PI-VII la histidina, arginina, metionina, triptófano leucina y lisina presentaron también una menor proporción que las recomendaciones a escala comercial. Cuando se compararon los IAAE de los requerimientos propuestos por Fox *et al.* (1996a) respecto a los tres estadios de postlarva analizados, se observó que la metionina sería la única deficiente en PI-I y PI-II, mientras que en PI-VII además de la metionina, la lisina presentó también deficiencias.

Tabla 29.
Comparación de la relación AAE/Met para los estadios larvarios de alimentación exógena de *P. vannamei*.

AMINOACIDO	Relación respecto a Metionina				Deficiencia ó exceso															
	Referencia				N.C			N.C			N.C			Juv.			Juv.			
	N.C	Z	M	PI	N.C vs Z	N.C vs M	N.C vs PI	N.C vs Z	N.C vs M	N.C vs PI	Juv. vs Z	Juv. vs M	Juv. vs PI	Juv. vs Z	Juv. vs M	Juv. vs PI	Juv. vs Z	Juv. vs M	Juv. vs PI	
His	0.9	1.1	0.9	0.8	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	2.4	2.4	1.9	1.6	0	+	0.5	+	0.8	+	0.8	+	0.8	+	1.2	+	1.7	+	2.0	+
Thr	1.5	1.4	0.9	0.8	+	0.3	+	0.6	+	0.7	+	0.7	+	0.2	+	0.5	+	0.6	+	0.6
Met	1.0	1.0	1.0	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trp	0.3	0.4	0.4	0.4	-	0.1	+	0.1	+	0.1	+	0.1	+	0.1	+	0.1	+	0.1	+	0.1
Val	1.7	1.6	0.9	1.0	+	0.1	+	0.8	+	0.7	+	0.7	+	0.2	+	0.9	+	0.8	+	0.8
Phe	1.7	1.6	1.5	1.0	+	0.2	+	0.7	+	0.7	+	0.7	+	0.1	+	0.6	+	0.6	+	0.6
Ile	1.5	1.6	1.1	0.9	+	0.4	+	0.8	+	0.6	+	0.6	+	0.5	+	0.9	+	0.7	+	0.7
Leu	2.3	2.6	2.4	1.5	-	0.1	+	0.8	+	0.7	+	0.7	+	0.2	+	1.1	+	1.0	+	1.0
Lys	2.2	2.1	2.3	1.4	-	0.1	+	0.8	+	0.7	+	0.7	+	0.2	+	0.7	+	0.6	+	0.6

N.C. Akiyama (1992).

Juv Fox(1995).

AAE/MET = Suma de aminoácidos esenciales/Metionina

s.v = (sin valor), valor no reportado

+ Exceso

- Deficiencia

0 Similar

N.C = recomendación Nivel comercial.

Z = Zoa, M= Misis, PI = Postlarva

Tabla 30
Comparación del índice de aminoácidos esenciales (IAAE) para los estadios de alimentación exógena de *P. vannamei*

AMINOACIDO	IAAE				Deficiencia ó exceso													
	Referencia																	
	N.C	Juv.	Z	M	PI	N.C vs Z	N.C vs M	N.C vs PI	Juv. vs Z	Juv. vs M	Juv. vs PI	s.v	s.v	s.v	s.v	s.v		
His	53	-	70	80	71	-	17	-	27	-	18	s.v	+	83	+	66	+	81
Arg	145	231	148	165	150	-	3	-	20	-	5	s.v	+	38	+	6	+	37
Thr	90	86	48	80	49	+	42	+	10	+	41	s.v	+	2	-	22	-	31
Met	60	64	62	86	95	-	2	-	26	-	35	s.v	+	15	+	31	+	18
Trp	20	-	22	36	30	-	2	-	16	-	10	s.v	+	13	+	22	+	18
Val	100	112	97	81	94	+	3	+	19	+	6	s.v	+	33	+	41	+	30
Phe	100	105	92	83	87	+	8	+	17	+	13	s.v	+	18	+	41	+	29
Ile	88	102	69	61	72	+	19	+	27	+	16	s.v	+	11	+	12	+	0
Leu	135	167	149	126	138	-	14	+	9	-	3	s.v	+	11	+	12	+	0
Lys	133	135	146	123	135	-	13	+	10	-	2	s.v	+	11	+	12	+	0

N.C. Akiyama (1992).

Juv. Fox(1995).

IAAE = (AAE individual / Suma de aminoácidos esenciales + Tyr) * 1000

s.v = (sin valor), valor no reportado

+ Exceso

- Deficiencia

0 Similar

N.C = recomendación Nivel comercial.

Z = Zoea, M= Misis, PI = Postlarva

Tabla 32.
Comparación del índice de aminoácidos esenciales (IAAE) para los subestadios zoea de *P. vannamei*.

	IAAE				Deficiencia ó exceso										
	Referencia				N.C vs Z-I	N.C vs Z-II	N.C vs Z-III	Juv. vs Z-I	Juv. vs Z-II	Juv. vs Z-III	Juv. vs Z-III				
	N.C	Juv.	Z-I	Z-II								Z-III			
AMINOACIDO															
His	53	-	77	66	69	-	24	-	13	-	16	s.v	s.v	s.v	s.v
Arg	145	231	147	146	150	-	2	-	1	-	5	+ 84	+ 84	+ 81	+ 81
Thr	90	86	48	48	49	+	42	+ 42	+ 41	+ 41	+ 41	+ 38	- 48	- 48	- 7
Met	60	64	66	58	61	-	6	+ 2	- 1	- 1	- 1	- 2	+ 5	+ 5	+ 2
Trp	20	-	18	20	28	+	2	0	0	- 8	s.v	s.v	s.v	s.v	s.v
Val	100	112	95	98	97	+	5	+ 2	+ 3	+ 3	+ 3	+ 17	+ 14	+ 14	+ 14
Phe	100	105	91	90	96	+	9	+ 10	+ 4	+ 4	+ 4	+ 14	+ 15	+ 15	+ 9
Ile	88	102	66	71	71	+	22	- 16	+ 17	+ 17	+ 17	+ 36	+ 30	+ 30	+ 31
Leu	135	167	146	158	142	-	11	- 23	- 7	- 7	- 7	+ 21	+ 10	+ 10	+ 25
Lys	133	135	144	155	140	-	11	- 22	- 7	- 7	- 7	- 9	- 20	- 20	- 5

N.C. Akiyama (1992).

Juv Fox(1995).

IAAE = (AAE individual / Suma de aminoácidos esenciales + Tyr) * 1000

- = (sin valor), valor no reportado

+ Exceso

- Deficiencia

0 Similar

N.C = recomendación Nivel comercial.

Z-I= primer estadio Zoea, Z-II= segundo estadio Zoea,, Z-III= tercer estadio Zoea,,

Tabla 33
Comparación de la relación AAE/Met para los estadios postlarva de *P. vannamei*.

AMINOACIDO	Relación respecto a Metionina			Deficiencia ó exceso								
	Referencia						N.C vs PI-I		N.C vs PI-II		N.C vs PI-III	
	N.C	Juv.	PI-I	PI-II	PI-III							
His	0.9	s.v	0.5	0.9	1.0	+ 0.4	0	0	- 0.1	s.v s.v	s.v s.v	s.v s.v
Arg	2.4	3.6	1.1	2.0	1.9	+ 1.3	+ 0.4	+ 0.5	+ 2.5	+ 1.6	+ 1.7	+ 1.7
Thr	1.5	1.4	0.4	0.7	0.6	+ 1.1	+ 0.8	+ 0.9	+ 1.0	+ 0.7	+ 0.8	+ 0.8
Met	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0	0	0	0	0	0	0
Trp	0.3	s.v	0.4	0.3	0.4	- 0.1	0	- 0.1	s.v s.v	s.v s.v	s.v s.v	s.v s.v
Val	1.7	1.8	0.8	1.0	1.2	+ 0.9	+ 0.7	+ 0.5	+ 1.0	+ 0.8	+ 0.6	+ 0.6
Phe	1.7	1.6	0.6	1.1	1.2	+ 1.1	+ 0.6	+ 0.5	+ 1.0	+ 0.5	+ 0.4	+ 0.4
Ile	1.5	1.6	0.6	0.9	0.9	+ 0.9	+ 0.6	+ 0.6	+ 1.0	+ 0.7	+ 0.7	+ 0.7
Leu	2.3	2.6	1.0	1.9	1.8	+ 1.3	+ 0.4	+ 0.5	+ 1.6	+ 0.7	+ 0.8	+ 0.8
Lys	2.2	2.1	1.0	1.9	1.8	+ 1.2	+ 0.3	+ 0.4	+ 1.1	+ 0.2	+ 0.3	+ 0.3

N.C. Akiyama (1992).

Juv Fox(1995).

AAE/MET = Suma de aminoácidos esenciales/Metionina

s.v = (sin valor), valor no reportado

+ Exceso

- Deficiencia

0 Similar

N.C = recomendación Nivel comercial.

Z = Zoea, M= Misis, Pl = Postlarva

Tabla 34
 Comparación del índice de aminoácidos esenciales (IAAE)* para los estadios postlarva de
P. vannamei.

AMINOACIDO	IAAE			Deficiencia ó exceso											
	Referencia			N.C vs PI-I		N.C vs PI-II		N.C vs PI-VII		Juv. vs PI-I		Juv. vs PI-II		Juv. vs PI-VII	
	N.C	Juv.	PI-I PI-II PI-III	N.C vs PI-I	N.C vs PI-II	N.C vs PI-VII	Juv. vs PI-I	Juv. vs PI-II	Juv. vs PI-VII	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v			
His	53	0	67 68 77	- 14	- 15	- 24	- 14	- 15	- 24	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v			
Arg	145	231	140 159 150	+ 5	- 14	- 5	+ 91	+ 72	+ 81	+ 91	+ 72	+ 81			
Thr	90	86	46 52 49	+ 44	+ 38	+ 41	+ 40	+ 34	+ 37	+ 40	+ 34	+ 37			
Met	60	64	127 78 78	- 67	- 18	- 18	- 63	- 14	- 14	- 63	- 14	- 14			
Trp	20	0	45 22 22	- 25	- 2	- 2	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v	s.v s.v s.v			
Val	100	112	105 84 91	- 5	+ 16	+ 9	+ 7	+ 28	+ 21	+ 7	+ 28	+ 21			
Phe	100	105	81 87 94	+ 19	+ 13	+ 6	+ 24	+ 18	+ 11	+ 24	+ 18	+ 11			
Ile	88	102	71 72 74	+ 17	+ 16	+ 14	+ 31	+ 30	+ 28	+ 31	+ 30	+ 28			
Leu	135	167	125 148 141	+ 10	- 13	- 6	+ 42	+ 19	+ 26	+ 42	+ 19	+ 26			
Lys	133	135	122 145 138	+ 11	- 12	- 5	+ 13	+ 10	- 3	+ 13	+ 10	- 3			

N.C. Akiyama (1992).

Juv Fox(1995).

*IAAE = (AAE individual / Suma de aminoácidos esenciales + Tyr) * 1000

s.v = (sin valor), valor no reportado

+ Exceso

- Deficiencia

0 Similar

N.C = recomendación Nivel comercial.

Z = Zoea, M= Misis, PI = Postlarva

3.8.2 Correlación de los perfiles de AAE ($P < 0.05$) en los estadios larvarios de alimentación exógena (zoea, misis y postlarva) respecto a juveniles de 105 mg de *Penaeus vannamei* y recomendaciones de AAE a nivel comercial

Las correlaciones se presentan en la Tabla 35. El perfil de AAE recomendado para formulación de dietas a nivel comercial presentó coeficientes de correlación superiores 0.86 para misis hasta 0.96 para el estadio zoea. El perfil de AAE de juveniles de 105 mg tuvieron coeficientes de correlación mayores a 0.82 para postlarva, 0.87 para zoea y 0.89 para misis. La correlación entre los perfiles de AAE de zoea respecto a misis y postlarva fue de 0.92 y 0.97 respectivamente.

Tabla 35

Correlación de los perfiles de AAE ($P < 0.05$) en los estadios larvarios de alimentación exógena (zoea, misis y postlarva) de *Penaeus vannamei* respecto a juveniles de 105 mg y recomendaciones de AAE a nivel comercial de *Penaeus vannamei*

	Juveniles 105 mg.	Zoea	Misis	Postlarva
Recomendación				
Nivel comercial	91 1 9 2 0.0018 ³	0.96 10 0.0001	0.86 10 0.0096	0.92 10 0.0055
Juveniles 105 mg.		0.87 9 0.006	0.89 9 0.003	0.82 9 0.0137
Zoea			0.92 10 0.0042	0.97 10 0.0002
Misis				0.93 10 0.0021

¹ Coeficiente de correlación

² Tamaño de muestra

³ Nivel de significancia

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1 Precisión en el análisis cualitativo

Los tiempos de retención individuales presentaron poca variación durante un mismo día de trabajo, es decir tuvieron repetibilidad, así como a lo largo del período de investigación (C.V. < 1.96 %), por lo que también fueron reproducibles. El ácido glutámico presentó los C.V. más elevados que el resto de los aminoácidos analizados (1.96 %), mientras que valina y triptófano tuvieron los C.V más bajos con 0.58 y 0.57 % respectivamente, estos AAs fueron los que presentaron mayor variabilidad en el trabajo de Cavazos (1994), sin embargo los C.V. fueron menores con 0.8, 0.2, y 0.1 % para ácido aspártico, triptófano y valina respectivamente, se hace la observación de que en dicho trabajo solo se reportó la repetibilidad en un día de trabajo. Cabe señalar que los tiempos de retención pueden variar en función de la temperatura ambiental y en cambios en el pH y la composición de las fases móviles. En nuestro caso se detectó claramente que el factor temperatura ambiental fue el que actuó de manera más notable ya que en verano se registraron tiempos de retención más cortos para un mismo componente con respecto al invierno.

4.2 Exactitud y Precisión del análisis cuantitativo

En el presente trabajo se requirió cuantificar aminoácidos proteicos por lo que fue necesario emplear un método de hidrólisis para obtener AAs individuales. Al aplicar los factores de hidrólisis para cada AA, se corrigen las pérdidas que pudieran ocurrir durante la hidrólisis de proteínas por lo tanto, se compensa el error por pérdidas de AAs durante dicho proceso y aumenta la exactitud del análisis cuantitativo. Dall y Smith (1987) emplearon la corrección por pérdidas durante la hidrólisis de una mezcla de AAs que fueron aplicados a los hidrolizados de proteína en músculo del camarón *P. esculentus* y observaron la variación de AAs durante períodos de ayuno. En la presente investigación

los factores de hidrólisis con AMS tuvieron un valor máximo de 1.36 para histidina y metionina, mientras que el valor más bajo lo presentó alanina con 1.17. Es difícil establecer una comparación entre los factores de hidrólisis obtenidos en nuestro trabajo con los valores reportados por Dall y Smith (*op. cit.*) debido a que emplearon HCl para realizar la hidrólisis en tal caso, isoleucina, treonina y serina presentaron los factores de hidrólisis más elevados 2.5, 2.0 y 1.66 respectivamente mientras que Triptófano tuvo el valor de 1.0.

Para la evaluación de la exactitud y precisión del análisis cuantitativo se analizó por CLAR-FR la ASB de la cual previamente se conocía su composición aminoacídica. Las concentraciones de ASB (g/100g de AA recuperados) obtenidas por el análisis mediante CLAR-FR se compararon con las proporciones teóricas según secuencia y mostraron una buena exactitud en el análisis. Esto se pudo constatar cuando se realizó una prueba de t de Student donde no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), a excepción del ácido glutámico, histidina, glicina y metionina entre el promedio de los valores de ASB cuantificados por CLAR-FR y los valores teóricos obtenidos por secuencia aminoacídica. Adicionalmente se obtuvo un coeficiente de correlación entre los dos valores de $r = 0.94$, así como un valor de la pendiente de la recta muy cercano a la unidad ($y = 1.03x + 0.57$), aproximándose a una correlación perfecta.

Los C.V. de los AAs cuantificados en los análisis de ASB fueron menores a 9.94 %, siendo serina quien presentó mayor variación, a excepción de triptófano que presentó un C.V de 20.98 %, sin embargo en este caso solo se obtuvieron dos valores por lo que el cálculo puede estar sobrestimado aunado al hecho de que la concentración es menor que la unidad lo que hace que el C.V. sea mayor.

La variación de los AAs entre muestras de larvas de camarón medida como desviación estándar, generalmente fueron menores a la unidad en los estadios nauplio, zoea, y postlarva, sin embargo en el estadio misis se presentó la mayor variabilidad de todos los estadios analizados, registrándose desviaciones estándar de hasta 2.23 y 2.5

unidades respecto al valor promedio en histidina y metionina por lo que no se pudieron detectar diferencias significativas entre los subestadios de *misis*.

4.3 Muestreo y colecta de los diferentes estadios larvarios de *P. vannamei*

Inicialmente se identificaron las variables que podían afectar o influir sobre la composición bioquímica de los diferentes estadios larvarios, con el fin de que la única variable involucrada fuera el cambio del estadio ó subestadio larvario.

Para ello, se había previsto muestrear por triplicado cada subestadio de tres cultivos larvarios diferentes, provenientes de un mismo tipo de reproductores que hubieran seguido el mismo programa de alimentación y manejo durante la fase de maduración.

El tamaño de muestra necesaria para la determinación de AAP era desconocido por lo que se tomó una cantidad aleatoria de organismos por muestra, que fue menor a medida que avanzaba el estadio larvario. Después de realizar un conteo volumétrico se estimó que se habían colectado en promedio por cada muestra en cada subestadio 3 000 huevos, 2 000 nauplios, 800 zoeas, 600 *misis* y 200 postlarvas. Lo que representaría en su totalidad 15 800 individuos por cultivo larvario, que a su vez multiplicado por el número de replicados que en este caso fueron 2 se alcanza una cantidad de 32 600 organismos/cultivo. Es decir del 4-6.5 % del total de organismos que se obtendrían de una tina de cultivo larvario de 14 - 20 m³, considerando una tasa de sobrevivencia del 50 %.

Considerando un costo de 7 dólares el millar el muestreo por ciclo larvario ascendería a 221.2 dólares. En la práctica debido a diversas circunstancias el muestreo se realizó en condiciones menos estrictas y más prácticas, tomando los diferentes subestadios a partir de diferentes cultivos larvarios provenientes de camarones cultivados y camarones del medio natural que constituían el lote de reproductores del laboratorio muestreado.

Sin embargo, se considera que el efecto de estas variables no fue determinante, por el hecho de que todas las tinas de cultivo larvario fueron tratadas exactamente con el mismo protocolo de cultivo y por otro lado a pesar de que algunos reproductores eran silvestres, estos maduraron dentro del laboratorio, bajo las mismas condiciones de alimentación y cultivo, por lo que solo un efecto genético podría haber influido.

Por los resultados obtenidos con C.V. especialmente bajos entre replicados en el análisis de aminoácidos, consideramos que los resultados obtenidos son principalmente debidos a los cambios ontogénicos del camarón, a excepción del estadio misis donde se encontró alta variabilidad.

Para poder considerar los AAs analizados como una referencia de requerimientos, es necesario partir de un ciclo larvario exitoso y este se consideró así porque los ciclos larvarios en el laboratorio muestreado presentan porcentajes de sobrevivencia en superiores al 50 %, desde N-V hasta Pl-7.

4.4 Forma de expresión de resultados

Para conservar adecuadamente las muestras, se congelaron sin registrar el peso y hasta el momento de iniciar el análisis de las larvas se realizó la limpieza y el conteo de las muestras por unidad de volumen. Lo que permitió expresar los resultados de contenido proteico por individuo como es reportado por Le Moullac *et al.* (1994a,b) y Cahu (1979).

En el caso de los resultados de AAs debido a que la muestra para el análisis fue sometida previamente a un proceso de purificación, (Eliminando los lípidos, carbohidratos, AAs libres y humedad) el peso final del hidrolizado no correspondió al peso de la muestra antes de la hidrólisis (1-2 mg), por lo que no se consideró como proteína pura (para expresar los resultados en % de proteína) debido a la presencia de quitina en la muestra antes de la hidrólisis. Para eliminar esta interferencia se optó por expresar los resultados en valor relativo a la cantidad total de AAP y de AAE para poder

comparar con datos bibliográficos y hacer estimaciones de los requerimientos para los estadios larvarios de *P. vannamei*.

Consideramos que sería necesario triplicar la cantidad de muestra para contar con suficiente material y tener la posibilidad de expresar los resultados de AAs en % de la proteína determinada por Kjeldahl ó en % de la materia seca (pesando los animales), forma de expresión comunmente usada en literatura.

Asimismo se considera que en la medida de lo posible las muestras de subestadios deben realizarse a partir de un mismo cultivo larvario para cada subestadio (considerando el cultivo larvario como replicado).asímismo se debe realizar el seguimiento del cultivo desde su inicio hasta la transferencia a estanques de precría, para poder utilizar estos parámetros bioquímicos (contenido de AAs) como posibles indicadores de la calidad de las larvas.

4.5 Análisis de proteínas en los estadios embrión, nauplio y zoea de *P. vannamei*

Este análisis se realizó sobre un número muy reducido de replicados y solo sobre los primeros subestadios debido principalmente a la falta de previsión en la cantidad de muestra necesaria para estas determinaciones. Desde este punto de vista los resultados podrian considerarse como preliminares, sin embargo al comparar con datos bibliográficos se encontró que ciertos valores concuerdan con algunos de los resultados reportados en este trabajo.

Al comparar el contenido de proteínas del huevo encontrado en este trabajo $0.16 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{org}$ con los valores reportados para la misma especie por Quakembush (1989) de $0.56 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{org}$, observamos que el valor cuantitativo es muy bajo, sin embargo Quakembush *Op. cit.*, hace referencia a la gran variabilidad encontrada en muestras de huevos de un mismo desove así como diferentes desoves debido al estado de desarrollo embrionario en que se encuentre cada huevo en el momento del muestreo. inclusive considerando las desviaciones estándar que dicho autor reporta, se pudo constatar que en

su análisis obtuvo valores de proteína más bajos que los que se reportan como promedio en este trabajo.

Claybrook (1983) reporta que las proteínas conforman una fracción importante de los constituyentes orgánicos en los huevos de crustáceos alcanzando cerca del 50 % de peso seco en camarones (Richard y Ceccaldi, 1977). La alimentación inicial del embrión, se deriva de la yema del huevo, la cual está constituida de una lipoglicoproteína denominada lipovitelina. La composición de aminoácidos de las proteínas del huevo varía a lo largo del desarrollo embrionario registrando un porcentaje menor de metionina y cisteína en los estadios previos a la eclosión, (Richard y Ceccaldi, *Op. cit.*).

Durante el desarrollo embrionario los aminoácidos liberados de la lipovitelina por la acción de proteasas entran al reservorio de aminoácidos libres, solo una porción es reincorporada a las proteínas embrionarias (cuantificables por Bradford). El contenido de proteína total decrece cerca de un 25 % durante el desarrollo del embrión de *P. serratus* por lo que relativamente parece que poca proteína es oxidada durante la embriogénesis (Richard y Ceccaldi, *Op. cit.*), siendo principalmente los carbohidratos y en segundo término los triglicéridos los que se consumen durante esta fase.

Los huevos fertilizados eclosionan después de 14-16 hrs del desove, resultando el primer estadio de nado libre N-I. En nauplio los requerimientos de energía se incrementan y dependen del suministro de energía proporcionada por las reservas presentes en el vitelo.

A medida que el desarrollo del nauplio avanza el contenido energético del mismo se va agotando (Cahu, 1979) lo cual es visible de manera práctica como un cambio de coloración en el nauplio que va desde amarillo oscuro en N-I hasta semitransparente en N-V (Wyban y Sweeney, 1992). Sin embargo el contenido de proteínas no cambia considerablemente si no hasta el inicio del N-V, debido a un consumo preferencial de carbohidratos en forma de glicógeno y lípidos en forma de ácidos grasos. Cuando se analizó una mezcla del cuarto y quinto subestadios (N-IV/N-V) se observó una

disminución del 16 % respecto al N-III como resultado del catabolismo de proteínas al haberse agotado los sustratos glicolíticos y lipídicos, para suministrar el requerimiento energético necesario durante esta fase. Cuando el N-V sufre metamorfosis para convertirse al primer estadio de zoea (Z-I) ocurren cambios morfológicos notables; en este trabajo se obtuvo el nivel más bajo de proteína 0.21 $\mu\text{g}/\text{org}$ en este estadio, lo cual indicaría el grado máximo de catabolismo de la proteína tisular, que en otros trabajos se ha reportado para el subestadio nauplio. Esto a su vez se relaciona con la caída del valor energético y peso seco de N-VI de *P. japonicus* reportado por Cahu (1979) y la caída de proteína soluble en el mismo subestadio reportado para *P. japonicus* por Laubier-Bonichon (1983), así como con la baja actividad de enzimas digestivas reportado para los nauplios de *P. vannamei* por Le Moullac (1994a).

En el estadio Z-I se inicia la alimentación exógena principalmente con microalgas a una densidad de 100 cel/ μl , por lo que el contenido de proteínas se incrementó notoriamente a medida que transcurría el estadio. Para Z-II (0.54 $\mu\text{g}/\text{org}$), se observó un incremento notorio (157 %) respecto a Z-I. En Z-III el contenido de proteína siguió aumentando (0.68 $\mu\text{g}/\text{org}$) como reflejo de la acelerada tasa de crecimiento que se presenta durante estos subestadios coincidiendo con el paulatino incremento de la tasa de crecimiento y contenido energético para el estadio zoea reportado por Cahu (1979), Laubier-Bonichon (1983) para *P. japonicus* y para *P. vannamei* por Le Moullac (1994a,b).

En este trabajo la concentración de proteínas se redujo cuando ocurrió el cambio de estadio nauplio a estadio zoea, en camarones peneidos se ha observado que cuando ocurre el proceso de muda, las células del tejido corporal absorben agua con esto el organismo aumenta de talla, por lo que puede disminuir la cantidad de proteínas en el organismo, compensando posteriormente esta disminución al reiniciar su alimentación.

Durante el estadio zoea, la larva se alimenta continuamente de microalgas y/o dietas inertes por lo que el suministro de nutrientes es constante, el cual se ve reflejado en el incremento proporcional de proteínas, coincidiendo con el patrón de comportamiento

del contenido de proteínas reportado por Le Moullac (1994a) para la misma especie, a pesar de que los valores obtenidos en este trabajo fueron inferiores, asimismo el contenido de proteína durante el desarrollo de los tres subestadios de zoea depende del alimento suministrado. Se ha demostrado que el contenido de proteína disminuye notablemente alimentando a las larvas con micropartículas que cuando se les proporcionan microalgas, Le Moullac (1994b).

Los resultados reportados en este trabajo coinciden en algunos valores con los reportados en bibliografía, sin embargo en el trabajo de Quakembush (1989) se realizó un tratamiento de muestra diferente (precipitación de la proteína total soluble con NH_4SO_4) previo a la cuantificación de proteína por lo que se atribuye a un tratamiento de muestra diferente la poca coincidencia en los resultados.

4.6 Variación del contenido de AAs durante la ontogénesis de *Penaeus vannamei*

El proceso de desarrollo larvario ocurre a través de una secuencia de mudas donde el régimen alimenticio es de gran importancia para un crecimiento y metamorfosis adecuado Mourente *et al.* (1995). Durante el desarrollo larvario, inicialmente la larva depende de las reservas (lípidos, proteínas, carbohidratos y carotenoides) provenientes de los reproductores para la obtención de energía y síntesis de nuevos componentes orgánicos y es solo a partir del estadio zoea cuando el régimen alimenticio exógeno empieza a afectar la composición global de la larva. En el presente estudio el perfil de AAs de la proteína corporal soluble, precipitada e hidrolizada deben corresponder principalmente a las lipovitelininas que constituyen arriba del 90 % de la proteínas solubles del huevo fertilizado (Lee *et al.* 1994) y a la proteína corporal (tejidos, enzimas, hormonas, etc) en el caso de las larvas, que a su vez es afectada por la proteína proveniente del alimento (micropartículas, microalgas, artemia).

En el presente trabajo al comparar el contenido de AAs de los cuatro estadios larvarios, nauplio, zoea, misis y postlarva de *P. vannamei* se encontraron diferencias significativas en metionina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido

glutámico, serina, alanina y tirosina ($P < 0.05$) coincidiendo con Dabroski, (1984) citado por Fox *et al.*, (1996) y con Wing-Keong y Silas (1994) quienes proponen que las proporciones de los tejidos corporales (con sus tasas de “turn over” características) cambian durante la ontogénesis, por lo que los requerimientos de AAs pueden cambiar dependiendo del estadio de desarrollo. En contraste con lo que ocurre cuando se trata de la composición en AAs corporales de diferentes especies de peces en crecimiento o de la misma especie con diferente talla ya que la proporción de tejido muscular es predominante, por lo que en este caso el requerimiento de AAE no debe diferir en gran medida, (Cowey, 1994).

Durante la ontogénesis de *P. vannamei* la concentración de metionina tiende a incrementarse a partir de nauplio hasta postlarva un 65.8 %, ocurriendo lo inverso a lo reportado en el desarrollo embrionario de *P. serratus* por Richard y Ceccaldi (1977) y en *Dentex dentex* por Tulli (1996). Este incremento en la concentración de metionina puede reflejar una síntesis proteica continua, ya que la metionina interviene entre otras funciones como aminoácido iniciador de la síntesis proteica, precursor de cisteína/cistina y como donador de grupos metilo en reacciones de transmetilación para formar diversos compuestos, como colina, creatina, adrenalina y peptidos como glutatión (Bonn *et al.*, 1991).

Los valores de AAE que presentaron diferencias significativas en este trabajo (metionina y los AAs ramificados valina, isoleucina y leucina, así como también fenilalanina) son similares a los que presentaron diferencias significativas en el trabajo de Wing-Keong y Silas, (1994) en el cual analizaron la composición de AAs del cuerpo entero, hígado, branquias), músculo, huevo, lipovitelina y vitelogenina, encontrando diferencias significativas entre ellos en los siguientes AAs. El músculo contenía cantidades mayores de ácido glutámico, histidina y lisina. El hígado contenía cantidades mayores de los AAs ramificados (valina, isoleucina y lisina) y de cistina. Las branquias tuvieron los valores más altos de glicina y prolina con valores bajos de AAs ramificados. En el huevo alanina, arginina, cistina, metionina, fenilalanina, prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina y serina presentaron diferencias significativas.

A pesar de que no se analizaron órganos individualmente, debido a la limitante que representa el trabajar con organismos de tallas pequeñas; podríamos suponer que hubieron cambios importante en los tejidos durante el desarrollo de los diferentes órganos principalmente aquellos que constituyen el tubo digestivo, así como en la puesta en marcha de las actividades enzimáticas digestivas, lo que de una manera global podría explicar las variaciones encontradas en los AAE y AANE mencionados anteriormente. Cabe hacer mención que existe una variación importante en la actividad de las enzimas digestivas reportada por Le Moullac (1994a,b) para los estadios larvarios de esta especie, en donde se menciona la existencia de adaptaciones de las actividades enzimáticas en relación al régimen alimenticio. Esta adaptación de las enzimas es inversamente proporcional al porcentaje de proteína alimentaria ó a la concentración de sustrato y se presenta como una caída de actividad en el subestadio misis-I para la tripsina, en M-III para la quimotripsina y en M-I para la amilasa (Le Moullac, 1994a,b). Esta adaptación ocurre debido al aporte de sustrato especialmente rico en proteína y lípidos representado por el suministro de nauplios de *Artemia* como alimento en este estadio. Las adaptaciones fisiológicas de la actividad enzimática considerando el tiempo de retención en el tracto digestivo, también han sido consideradas por Jones *et al.* (1997), para explicar las variaciones enzimáticas en los estadios larvarios.

En el ciclo larvario del camarón *Penaeus vannamei*, el ácido glutámico se incrementó debido posiblemente a los altos requerimientos de energía necesarios durante el metabolismo de la larva, el cual; lo mismo que el ácido aspártico pueden derivarse de otros AAs mediante el mecanismo de desaminación a partir de glutamato y aspartato respectivamente.

4.6.1 Variación del contenido de AAs durante el estadio misis

En el estadio misis no se presentaron diferencias significativas en el contenido de AAs entre subestadios lo que indicaría que el requerimiento de todos los aminoácidos esenciales para este estadio sería único. En el estadio misis la larva de *P. vannamei* se

vuelve carnívora y presenta un sistema digestivo más equipado debido al completo desarrollo de los dientes del molino gástrico. A pesar de que disminuye la actividad de las enzimas digestivas como la tripsina, quimotripsina y amilasa. El comportamiento reitoral se ha mejorado, por lo que además de nutrirse de fitoplacton (*Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Isocrysis*, etc.) y dietas microparticuladas, puede capturar presas de un tamaño adecuado como nauplios de *Artemia salina*, Jones *et al.*, (1992). Aunado a esto los nauplios de *Artemia* al ser proteína de origen animal, proporcionan una dieta con mejor balance de aminoácidos. Durante el estadio misis existe una mayor selectividad hacia las microcápsulas que hacia las microalgas, (Marín-Magán *et al.*, 1995) se atribuye dicho comportamiento a las características de los apéndices bucales al poder atrapar mejor a las micropartículas que a las microalgas. El nivel de tripsina, quimotripsina y amilasa disminuye drásticamente durante el desarrollo de misis, justo cuando se inicia la alimentación con nauplios de *Artemia*, (Le Moullac 1994a). Lovett y Felder (1990), proponen que la disminución de la actividad enzimática después de misis I en *Penaeus setiferus* puede deberse al reemplazo de enzimas exógenas presentes en los nauplios de *Artemia* contribuyendo a la hidrólisis de la presa. Sin embargo las actividades enzimáticas de origen exógeno son muy pequeñas, (Jones *et al.*, 1993).

Los resultados del estadio misis que se describen en este trabajo, presentan valores de desviaciones estandar elevados comparados con el resto de los estadios larvarios de *P. vannamei*, una posible causa de la alta variabilidad es que las muestras se analizaron en período invernal (primera quincena de enero de 1996) y la temperatura ambiental del laboratorio descendió hasta 18 °C. Durante el período de estandarización de la metodología también se observó una mayor variabilidad en los resultados cuando se trabajo en invierno.

4.6.2 Variación del contenido de AAs durante el estadio postlarva

El par arginina + treonina aumentó al incrementarse el desarrollo postlarvario. Este incremento se ha reportado en arginina cuantificado individualmente

(Fox *et al.*, 1995) por lo que consideramos el cambio del par arginina + treonina a la variación de arginina.

La postlarva ya ha soportado la transformación larvaria, sin embargo parece haber un desajuste en el requerimiento de AAs, debido principalmente a la necesidad de síntesis proteica y a un cambio morfológico en el divertículo medio anterior (DMA). El DMA donde se efectúa la secreción enzimática y la absorción de nutrientes, reduce su tamaño cuando la postlarva va creciendo, coincidiendo con una fase crítica en la sobrevivencia durante la misma, (Jones *et al.*, 1993). Después de que se ha reducido notablemente la actividad enzimática durante el estadio misis. La quimotripsina y la amilasa continúan descendiendo durante el desarrollo de la postlarva, solo la tripsina se incrementa nuevamente, Le Moullac (1994b).

Se ha empleado la suplementación con arginina en dietas para alevines de *Dicentrax labrax*, sin embargo no se encontraron diferencias significativas a pesar de que los promedios de peso final fueron más altos en los alevines suplementados con L-arginina que en la dieta control, (Tibaldi, 1993). asimismo en juveniles de *Penaeus monodon* se han determinado los requerimientos de arginina por análisis de rompimiento de la recta, suministrando dietas microcapsuladas donde la variable evaluada es la ganancia en peso, (Chen, 1992). La arginina es precursor de un fosfágeno importante en el músculo de crustáceos, la fosfoarginina Hird *et al.*, (1986) citado por Dall y Smith, (1987). Con la suplementación de L-arginina en dietas para larvas de *P. japonicus* a base de caseína se logran resultados similares a los reportados alimentando con presas vivas, (Teshima *et al.*, 1986).

Los ácidos aspártico y glutámico son fuente rápida de energía, Dall y Smith (1987). El ácido aspártico que se deriva de ciclo del ácido cítrico, se incrementa durante el ayuno en camarones adultos y puede ser sintetizado a partir de otros aminoácidos. Glicina puede tener una función como combustible metabólico. Tirosina es precursor de hormonas como la triyodotironina y triyotiroxina las cuales se sintetizan a partir de

tirosina y una molécula de yodo las cuales son estimuladoras del crecimiento, (Inui, 1985).

En el estadio postlarva se observa que el contenido de los AAs con diferencias significativas entre subestadios, el intervalo de tiempo que más se ve afectado es el que comprende el paso de postlarva I a postlarva II. Durante la cría larvaria de *Penaeus vannamei*, las postlarvas de 2 a 3 días, adquieren el comportamiento bentónico por lo que la estabilización de sus requerimientos puede deberse a la adquisición de dicha característica. Mientras que la alta variación de las concentraciones en los estadios Postlarva I a postlarva II, podría deberse a que el requerimiento para ciertos AAs ya no se cubre con lo capturado en la columna de agua; por lo que estarían forzadas a adquirir el comportamiento bentónico para poder reunir sus requerimientos nutricionales. Cuando las larvas logran pasar al estadio postlarva II, parece haber una estabilización en la concentración de los AAs estadísticamente diferentes.

4.7 Comparación del patrón AAE (%) de los diferentes estadios larvarios, con datos bibliográficos

El embrión presentó los valores más elevados de histidina y los aminoácidos ramificados valina e isoleucina, mientras que durante el estadio nauplio registró el valor más alto de triptófano. En zoea la fenilalanina y tirosina así como de leucina y lisina presentan un requerimiento dietético mayor, en contraparte misis tiene un requerimiento mayor de arginina y treonina, mientras que en postlarva solo la metionina fue la única que tuvo mayor demanda.

La histidina presentó un requerimiento más elevado, casi el doble respecto a *P. japonicus* y *P. monodon* y *A. transmontanus* posiblemente por un error en la cuantificación. La arginina tuvo un requerimiento más elevado en misis de *P. vannamei*, respecto a *P. japonicus*, sin embargo *P. monodon* registró el valor más elevado de todos los tejidos analizados.

4.8 Determinación de Requerimientos de AAE en función de los aminogramas obtenidos del cuerpo entero, en los estadios larvarios de alimentación exógena en *Penaeus vannamei*

La estimación de los requerimientos de AAE se realizó de forma indirecta, transformando los resultados obtenidos (g/100 g de AA) en este trabajo a % de AAE para posteriormente obtener los resultados en porcentaje de proteína, tomando como modelo (Tacon, 1989) y poder comparar con valores previamente reportados en literatura. Cabe mencionar que las dos formas de expresión de resultados es válida, sin embargo en nutrición animal todos los ingredientes empleados para formulación se reportan en porcentaje de proteína presente en el ingrediente.

Como requisito principal para formular alimento de larvas de camarón se debe conocer la composición de aminoácidos de la proteína corporal y poder simular dicha composición en el alimento suministrado. La proteína es el nutriente más importante y costoso en una dieta para camarones debido a que se encuentra en mayor proporción respecto a los demás componentes de la misma. Por lo que se debe trabajar con la premisa de formular dietas que proporcionen los requerimientos de AAs a un costo mínimo para que se vea reflejado en buenas tasas de crecimiento y sobrevivencia.

La formulación de alimento para larvas no es tan fácil debido a que no se dispone de datos suficientes sobre los requerimientos nutricionales específicos de las larvas, así como de los niveles de nutrientes y su disponibilidad (digestibilidad) en los ingredientes. Adicionalmente en dietas para larvas de peneidos, se requiere el desarrollo de una técnica de encapsulación que asegure a la larva la ingestión y digestión más adecuada de los nutrientes introducidos en la dieta, sin pérdidas por lixiviación.

En este trabajo se analizó el ciclo larvario completo de *P. vannamei* respecto al contenido de AAs para proponer el requerimiento estimado de AAE y poder formular dietas específicas para cada estadio y a nivel subestadio asumiendo que cada estadio larvario tiene requerimientos nutricionales específicos.

4.8.1 Zoea

El conocimiento de los requerimientos estimados de AAE en el primer estadio de alimentación exógena permitirá planear estrategias de alimentación durante la crianza larvaria a nivel comercial del camarón *Penaeus vannamei*, debido a que los valores de requerimiento para un estadio larvario en particular no se habían reportado hasta antes de realizar esta investigación.

Durante el desarrollo larvario se ha observado que la población en las tinas de crianza larvaria disminuye significativamente, esto se ha atribuido a epizootias de origen bacteriano, micótico ó viral, asumiendo que las larvas reciben una nutrición adecuada.

Sin embargo, los valores de requerimientos de proteínas, AAs, lípidos y vitaminas se conocen muy poco por lo que actualmente no podría decirse que las larvas se nutren adecuadamente. Una evaluación en las estrategias de alimentación puede realizarse al conocer el requerimiento estimado de AAE ayudando tal vez a proporcionar una mejor nutrición y consecuentemente incrementar rendimientos en la producción larvaria.

Asimismo se puede emplear el requerimiento estimado de AAE en futuras investigaciones para establecer el requerimiento real de AAE durante el ciclo larvario, por lo que debe seguir evaluandose este perfil poniendo especial interés en los AAs que tuvieron significancia estadística y tal vez en contenido de AAL presentes en el cuerpo de las larvas. El requerimiento de AAE se correlacionaría con parámetros biológicos como sobrevivencia, talla y peso así como el tiempo en que ocurre cada estadio y contenido de proteína con lo que se obtendría un perfil de AAs mejorado basado en las mejores condiciones de sobrevivencia, condición de los animales y tiempo de metamorfosis.

4.8.2 Misis

Durante el estadio misis no ocurrieron diferencias estadísticamente significativas en el análisis de varianza realizado a los AAE. Por lo anterior se podría inferir que en el

estadio misis los requerimientos de AAE se han reunido debido principalmente a que las larvas pueden nutrirse mejor al capturar presas vivas, además de ingerir microalgas o dietas microcapsuladas.

En la crianza de larvas a nivel comercial del camarón *Penaeus vannamei*, una vez que las larvas llegan al estadio misis la probabilidad de sobrevivir de la larva es mayor, asimismo el paso desde misis hasta postlarva ocurre con menor riesgo. Podría pensarse que el requerimiento estimado de AAE presentado en este trabajo no puede estar muy alejado del requerimiento de AAs real, el cual se puede emplear para formular alimentos artificiales microparticulados sustitutos del alimento vivo en esta fase de vida larval. Al lograr la sustitución de los nauplios de *Artemia salina* se reducirían significativamente los costos de alimentación durante la crianza larvaria.

Sin embargo la interpretación descrita anteriormente debe tomarse con cautela debido a que durante el análisis estadístico se observó que en este estadio se observó la mayor variabilidad en los datos y al realizar el ANOVA las posibles interacciones entre subestadios pudieron ser encubiertas.

4.8.3 Postlarva

Al alcanzar el estadio postlarva, termina la fase de vida larvaria del camarón *Penaeus vannamei* adquiriendo un comportamiento bentónico. Por las diferencias significativas obtenidas en el análisis estadístico de arginina+treonina, metionina y triptófano parece haber un requerimiento de arginina+treonina que tiende a incrementarse, mientras que triptófano y metionina se reducen. Podría pensarse que en el último estadio larvario la arginina tendría una función importante. El perfil de AAE estimado del estadio postlarva podría servir como base para la formulación de alimentos para la siguiente fase de crianza ya sea en maternidades o en estanques de precría dentro de granjas de engorda.

4.9 Comparación de requerimientos de AAE de los estadios larvarios de alimentación exógena de *P. vannamei* (zoea, misis y postlarva) respecto a juveniles y recomendaciones de AAE en formulaciones a nivel comercial de la misma especie

La histidina, triptófano leucina y lisina tuvieron deficiencias cuando se compararon las relaciones (AAE/Met) de zoea contra las recomendaciones para formulación a nivel comercial (Akiyama, 1992), asimismo cuando se compararon los IAAE, además de los AAs descritos anteriormente, la arginina y metionina presentaron deficiencias por lo que podemos suponer que las larvas en el estadio zoea podrían tener un requerimiento más exigente en el requerimiento de AAE que para los estadios de misis, debido a que el requerimiento de AAE aparentemente se cubre con el perfil de AAE recomendados para formular a nivel comercial. Sin embargo cuando se compararon los IAAE de las recomendaciones a escala comercial se observó que la histidina, arginina, metionina, triptófano, leucina y lisina presentaron también deficiencia en postlarva.

Cuando se tomó como referencia el perfil propuesto por Fox *et al.* (1996b) para juveniles de *P. vannamei* en el estadio zoea, solo la lisina estuvo en menor proporción cubriéndose con dicho perfil los requerimientos de AAE para los estadios de misis y postlarva. Por lo que se puede interpretar que requerimiento de AAE de las larvas se podría cubrir con el perfil de AAE que más se aproxima al de la larva en el caso de Fox *et al.*, (1996b), el cual trabajó con juveniles de 105 mg.

Existen altas correlaciones mayores a 0.81 ($P < 0.05$) entre los perfiles de larvas con el perfil de juveniles (Fox *et al.*, 1996) así como recomendaciones a nivel comercial (Akiyama, 1991) en el camarón *Penaeus vannamei*.

CAPITULO 5.

CONCLUSIONES

Se estandarizó la metodología para análisis de aminoácidos proteicos por cromatografía de líquidos de alta resolución en la modalidad de fase reversa (CLAR-FR) y derivatización precolumna en larvas de camarón *Penaeus vannamei*.

Se obtuvo buena reproducibilidad en los resultados al identificar los aminoácidos por tiempos de retención (C.V. < 2 %), en los factores de respuesta para cada aminoácido (C.V. < 9 % en promedio), factores de hidrólisis (C.V.< 5 %), se obtuvo buena linealidad en las rectas de calibración ($R^2 > 0.96$), asimismo en la cuantificación de una proteína de referencia (C.V.< 10 %, excepto para triptófano 20 %).

El contenido de proteínas del huevo encontrado en este trabajo fue de 0.16 ± 0.4 $\mu\text{g}/\text{org}$, sin embargo se encontró gran variabilidad en muestras de huevos de un mismo desove así como diferentes desoves. La alimentación inicial del embrión, se deriva de la yema del huevo, la cual está constituida de una lipoglicoproteína denominada lipovitelina. Durante el desarrollo embrionario, los aminoácidos liberados de la lipovitelina por la acción de proteasas entran al reservorio de aminoácidos libres, solo una porción es reincorpora a las proteínas embrionarias.

A medida que el desarrollo del nauplio avanza el contenido energético del mismo se va agotando, sin embargo el contenido de proteínas no cambia considerablemente si no hasta el inicio del N-V, donde se observó una disminución del 16 % respecto al N-III como resultado del catabolismo de proteínas al haberse agotado los sustratos glicolíticos y lipídicos necesarios durante esta fase. Cuando el N-V sufre metamorfosis para convertirse al primer estadio de zoea (Z-I) ocurren cambios morfológicos notables; en este trabajo se obtuvo el nivel más bajo de proteína $0.21 \mu\text{g}/\text{org}$ en este estadio, lo cual

indicaría el grado máximo de catabolismo de la proteína tisular, relacionándose con la caída del valor energético y peso seco de N-VI de *P. japonicus* reportado por Cahu (1979) y la disminución de proteína soluble en el mismo subestadio reportado para *P. japonicus* por Laubier-Bonichon (1983), así como con la baja actividad de enzimas digestivas reportado para los nauplios de *P. vannamei* por Le Moullac (1994a).

Durante el estadio zoea el suministro de nutrientes es constante, el cual se ve reflejado en el incremento proporcional de proteínas, coincidiendo con el patrón de comportamiento del contenido de proteínas reportado por Le Moullac (1994a).

En los estadios nauplio y zoea no se reportaron resultados estadísticos. En contraste en el estadio misis, las concentraciones tanto de los AAE y AANE no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$). En postlarva, las concentraciones de Treonina + arginina, metionina, triptófano, ácido aspártico, glicina y tirosina también mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$).

Al realizar ANOVA y separación de medias de Tukey de todo el ciclo larvario tomando como replicados a los subestadios de cada estadio, las concentraciones de metionina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, alanina y tirosina tuvieron diferencias significativas; ($P < 0.05$). Por lo tanto, se concluye que ocurren cambios en la composición de aminoácidos proteicos durante el ciclo larvario de *P. vannamei*.

Se proponen los requerimientos estimados de AAE para los estadios larvarios de alimentación exógena de *P. vannamei*, zoea, misis y postlarva como % de proteína: zoea (histidina 2.65, arginina 5.60, treonina 2.72, metionina 2.33, triptófano 0.88, valina 3.66, fenilalanina 3.52, isoleucina 2.63, leucina 5.56, lisina 5.45) misis (histidina 3.04, arginina 6.26, treonina 3.03, metionina 3.28, triptófano 1.37, valina 3.07, fenilalanina 3.17, isoleucina 2.32, leucina 4.78, lisina 4.69) y postlarva (histidina 2.79, arginina 2.34, treonina 4.82, metionina 2.34, triptófano 3.07, valina 1.27, fenilalanina 3.11, isoleucina 3.08, leucina 2.67, lisina 4.80). No existiendo en el estadio misis diferencias significativas.

En postlarva arginina + treonina, metionina y triptófano fueron los únicos que presentaron diferencias significativas cuando se compararon entre subestadios.

Cuando se compararon las relaciones AAE/Met y el IAAE de los estadios zoea, misis y postlarva respecto al perfil recomendado para formulación a nivel comercial, se observó que las larvas en el estadio zoea y postlarva tuvieron un requerimiento más exigente de AAE que para el estadio misis, debido a que la histidina, triptófano, leucina, lisina, arginina y metionina presentaron deficiencias.

Asimismo el requerimiento de AAE de las larvas de *P. vannamei* se podría cubrir con el perfil de AAE de juveniles debido a que cuando se compararon los perfiles de los estadios zoea, misis y postlarva con juveniles de 105 mg de la misma especie reportados por Fox *et al.* (1996b), todos los requerimientos de AAE reportados en este trabajo no presentaron deficiencias a excepción de la lisina.

Existen altas correlaciones mayores a 0.81 ($P < 0.05$) entre los perfiles de larvas con el perfil de juveniles (Fox *et al.*, 1996) así como recomendaciones a nivel comercial (Akiyama, 1991) en el camarón *Penaeus vannamei*.