

Revisión Sobre Calidad de Harinas y Aceites de Pescado para la Nutrición de Camarón

Lucía Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Martha Nieto López y Mireya Tapía Salazar

Programa Maricultura. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Cd. Universitaria A.P. F-56 San Nicolás de los Garza, Nuevo León CP. 66450 Tel.y fax: +52 (8) 352 6380 E-mail: lucruz@ccr.dsi.uanl.mx y dricque@ccr.dsi.uanl.mx

A nivel mundial, los alimentos para camarón incluyen harina y aceite de pescado en niveles de 25 y 3% respectivamente (Chamberlain, 1993) con un posible incremento a 5% para el aceite en los próximos años. En consecuencia, los alimentos para camarón consumen aproximadamente 25% de las 1.7 millones de toneladas de harina de pescado utilizadas en acuicultura, que a su vez corresponde al 25% de la producción mundial anual. La harina de pescado aporta proteína de alta calidad con un balance de aminoácidos y de ácidos grasos adecuado para el rápido crecimiento de organismos marinos (especialmente carnívoros) y el uso de sustitutos ha sido menos exitoso en camarones y salmónidos que en animales terrestres. De ahí que, la disponibilidad y calidad de la harina de pescado sean determinantes para la obtención de alimentos acuáticos de buena calidad. En México, este problema ha sido identificado tanto por las compañías de alimentos balanceados como por los productores de camarón.

Los resultados que se presentan en esta revisión corresponden a los objetivos de un proyecto internacional financiado por la Comunidad Europea, que inicio en 1994, en el que participaron, la IFOMA (Asociación internacional de productores de harina de pescado), con el Dr. Ian Pike, el IFREMER, con el Dr. Gerard Cuzon y el Programa Maricultura de la UANL.

El objetivo de este proyecto fue definir parámetros de calidad de harinas y aceites de pescado adecuados para nutrición de camarón, que servirán de guía a los productores y usuarios de estos insumos, con la finalidad de mejorar los rendimientos obtenidos por los productores de camarón, así como, disminuir la contaminación del medio ambiente.

La selección de los parámetros de calidad a evaluar, se realizó de acuerdo al estado actual de conocimientos, tomando como referencia los parámetros utilizados en animales terrestres y en salmónidos:

- 1.- Efecto de la frescura de la materia prima utilizada en la elaboración de las harinas de pescado usadas en alimentos para camarón
- 2.- Efecto de la mollerossina y de las harinas de pescado de diferente score biotóxico en camarón
- 3.- Digestibilidad *in vitro* e *in vivo* en camarón, de harinas de pescado y su correlación con la digestibilidad en salmón.
- 4.- Efecto de la rancidez en harinas y aceites de pescado al incluirse en alimentos para camarón

Cruz-Suárez, L.E., D. Ricque-Marie, M. Nieto-López y M. Tapía-Salazar. 2000. Revisión sobre calidad de harinas y aceites de pescado para la nutrición del camarón. pp 298-326 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuicola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

5.- Establecimiento de normas de control de calidad para harinas de pescado usadas en nutrición de camarón

Cada uno de estos puntos se tratará brevemente en esta revisión a través de una introducción y un resumen de los resultados obtenidos.

1.-Efecto de la Frescura de la Materia Prima

La calidad de la proteína y la composición nutricional de las harinas de pescado varía dependiendo de la frescura y del tipo de materia prima, así como de la temperatura de secado. El incremento en la producción de especies acuícolas cultivadas, que son sensibles a estos parámetros ha creado un incremento en la demanda de estas harinas de pescado de alta calidad (Mc Callum y Higgs, 1989; Barlow y Pike, 1990; Pike et al.1990; Hardy y Castro, 1994). Actualmente se comercializan “productos especiales” elaborados con pescado muy fresco, secado a baja temperatura, principalmente para alimento de salmónidos (Pedersen y Opsvedt, 1992, Romero *et al.* 1994). Es importante investigar si otras especies cultivadas, como los camarones peneidos, son susceptibles a los mismos factores de calidad.

La frescura del pescado es afectada por las condiciones y el tiempo de almacenamiento antes del procesamiento. A partir del momento de captura, el pez sufre cambios, por la acción de sus propias enzimas (autólisis) y por la acción de las bacterias presentes en la superficie del pescado así como, en el tubo digestivo.

La evaluación de diferentes harinas de pescado con parámetros químicos como nitrógeno volátil total (TVN) en la materia prima, o el contenido de aminas biogénicas en harinas de pescado, se ha realizado de manera paralela a bioensayos nutricionales, por diversos autores en diferentes especies. En pollos (Huisman *et al.*, 1992) así como en trucha arcoiris (Cowey y Cho, 1992) o en salmón (Jensen, 1986, Anderson *et al.*, 1997), el consumo de alimento y el crecimiento pueden ser afectados por el nivel de inclusión de harinas de pescado conteniendo altos niveles de aminas biogénicas, i.e. harinas de pescado elaboradas con materia prima deteriorada.

Los siguientes experimentos fueron desarrollados para medir los efectos de la frescura de la materia prima en el rendimiento de diferentes especies de camarones peneidos en términos de crecimiento, consumo de alimento, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia. Los aspectos relacionados a las condiciones de procesamiento, particularmente efectos del calor, serán considerados en la parte 3 de ésta revisión.

Dos lotes de harinas de pescado, elaboradas de materia prima con niveles graduales de frescura proporcionados por IFOMA, fueron evaluados en varios bioensayos de crecimiento. La frescura de la materia prima utilizada en esas harinas de pescado experimentales puede ser cuantificada por su contenido de aminas biogénicas (Tablas 1, 2 y 3)

Tabla 1. Contenido total de aminas biogénicas de las harinas de pescado experimentales

Frescura de la materia prima	Fresca	Moderadamente fresca	Deteriorada
Primer grupo anchoveta	114	3384	7873
Segundo grupo arenque	182		8819

Contenido total de aminas (ppm=histamina+cadaverina+putrecina+tiramina) en las harinas de pescado experimentales para los bioensayos de frescura.

Tabla 2. Composición de las harinas experimentales de arenque (en base húmeda)

	Arenque fresco (H.P.2)	Arenque descompuesto (H.P. 2)
Composición proximal (%)		
Humedad	7.6	6.1
Proteína (N x 6.25)	73.4	73.4
Lípidos (Soxhlet)	8.8	11.3
Ceniza	11.1	9.7
Indicadores de frescura de la materia prima		
TVN (mg N/100 g harina de pescado)	160	200
Proteína soluble (% de prot. total)	24.5	24.7
Aminas biogénicas (mg/kg)		
Histamina	9	2763
Cadaverina	79	3254
Putrescina	73	1465
Tiramina	21	1337
Total de aminas biogénicas	182	8819
Indicadores de la calidad de la proteína		
Digestibilidad en Mink (%)	92.7	92.2

Tabla 3.- Composición de las harinas experimentales de anchoveta (en base húmeda).

	F Fresca	FM Frescura mediana	D Descompuesta
Composición química (%)			
Humedad	9.39	10.99	11.01
Proteína	65.98	64.20	62.39
Lípidos	7.96	7.58	8.75
Ceniza	14.26	14.52	14.77
Fibra	0.90	0.27	0.51
Indicadores de la frescura de la materia prima			
TVN (mg N/100g materia prima) ¹	14	30	50
Histamina (mg/kg)	0.028	1.850	4.701
Cadaverina (mg/kg)	0.051	0.803	1.599
Putrescina (mg/kg)	0.035	0.446	0.916
Tiramina (mg/kg)	--	0.285	0.657
Total (mg/kg)	0.114	3.384	7.873
Indicadores de la calidad de la proteína			
Digestibilidad en Mink (%)	91.4	89.7	89.8
Proteína soluble (Bradford) ²	5.51a	6.37b	6.81b
Proteína soluble (Kjeldhal) ³	20.97a	25.21b	27.64c

1= nitrógeno volátil total,

Una primera serie de bioensayos de crecimiento en camarón (F1 y F2 en la UANL y 3 en el IFREMER) fueron llevados a cabo utilizando dietas compuestas, isoenergéticas, conteniendo 30% de harinas de pescado experimentales en la UANL y 40% en el IFREMER. Las harinas de pescado fueron evaluadas en *P. stylirostris* (peso inicial 8.4g), *P. monodon* (2.5g) y *P. vannamei* (0.9, 1.5 y 7.6g). Al comparar con el control (harina de anchoveta fresca) se observó una reducción en la tasa de crecimiento (15% menos) en *P. stylirostris*, *P. monodon* y *P. vannamei* de 0.9g con el tratamiento de la harina de pescado descompuesta. Esta diferencia en el crecimiento no fue observada en los camarones *P. vannamei* de 1.5 y 7.6 g. Los camarones *P. stylirostris* de 8.4g alimentados con las harinas de anchoveta moderadamente frescas también presentaron una tasa de crecimiento significativamente reducida, demostrando tener una mayor sensibilidad que las otras dos especies.

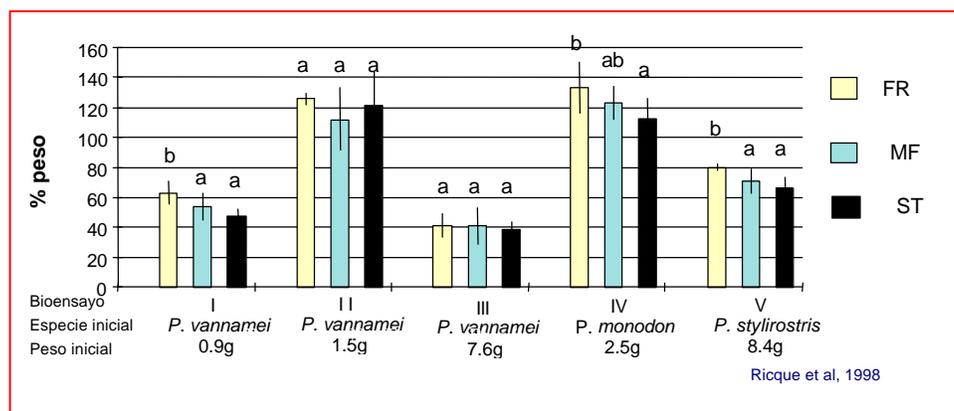


Figura 1. Tasa de crecimiento de diferentes especies alimentadas con harinas de pescado hechas de materia prima fresca (FR), moderadamente fresca (MF) o descompuesta (ST).

Se demostró que la frescura de la materia prima, indicada en términos de TVN en la materia prima (menos de 30mg N/100g) o por la suma del contenido de las aminos en el producto final (menos de 2000mg/kg), es un parámetro de calidad que debe ser considerado cuando se seleccionan harinas de pescado para alimentos de camarón, particularmente para los primeros estadios de juveniles y especies carnívoras (Ricque *et al.*, 1998). La limitación del crecimiento observada en presencia de harinas hechas con materia prima deteriorada (TVN > 30 mg N/100g) se interpretó primero como un efecto de la degradación de la proteína. Sin embargo, se realizaron otros experimentos para investigar la susceptibilidad de camarones juveniles pequeños, ya que algunas mortalidades fueron observadas en los experimentos en donde se evaluó una harina de pescado con altos contenidos de aminos biogénicas, con camarones muy pequeños.

Efecto de harina de arenque descompuesta y de la adición de aminos biogénicas cristalinas en juveniles de *P. stylirostris* (77mg).

Se realizó otro experimento utilizando aminos biogénicas cristalinas agregadas a harinas de pescado elaboradas con arenque fresco (Tabla 4), comparando con una harina de pescado hecha con el mismo arenque, pero descompuesto (Tapia Salazar *et al.*, 1998). En este experimento se confirmó que el arenque descompuesto afecta el consumo del alimento, el crecimiento y la sobrevivencia en *P. stylirostris* de estadios juveniles tempranos, mientras las aminos agregadas no afectaban esos parámetros (Fig.2) Se concluyó que las aminos deben ser

consideradas solo como indicadores, y no como factores de toxicidad, lo cual puede deberse a otras sustancias como endotoxinas bacterianas.

Tabla 4. *Diseño para el bioensayo de aminas biogénicas cristalinas agregadas a harinas de arenque.*

Dietas	
Dieta 1	FM1 (de arenque fresco)
Dieta 2	FM2 (de arenque descompuesto)
Dieta 3	FM1 + C H P T
Dieta 4	FM1 + C P T
Dieta 5	FM1 + H P T
Dieta 6	FM1 + C H

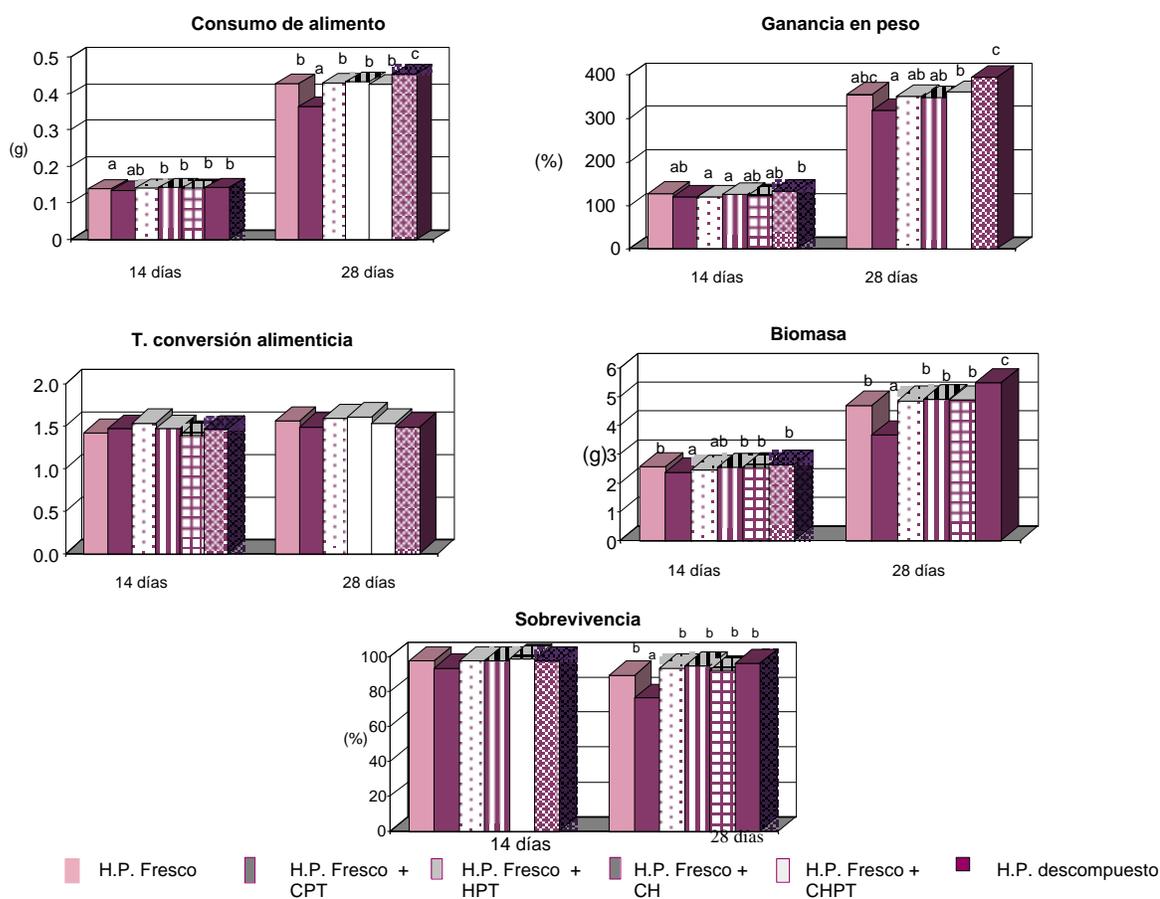
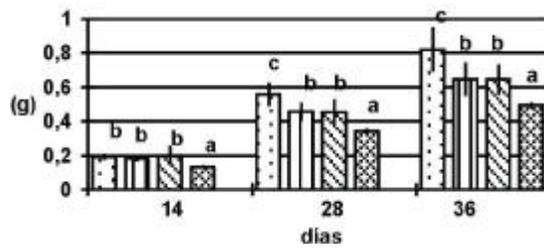


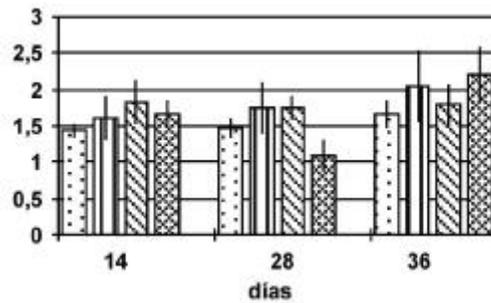
Figura 2. *Resultados del efecto de aminas biogénicas cristalinas agregadas a harinas de pescado elaboradas con arenque fresco.*

Efecto de harina de anchoveta de diferente frescura en las primeras etapas de *P. stylirostris* (70mg).

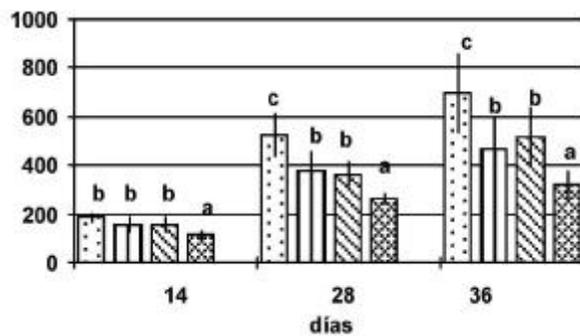
Se realizó un último bioensayo con el objetivo de evaluar la toxicidad de harinas de pescado elaboradas con anchoveta descompuesta (primer lote) en las primeras etapas juveniles de *P. stylirostris* (peso individual < 0.1g) debido a que cierta toxicidad fue observada con animales de esa talla en el bioensayo previo, cuando se utilizó arenque deteriorado. Los camarones alimentados con harina de anchoveta fresca mostraron un mayor consumo de alimento y crecimiento como se describió en experimentos anteriores, y una tendencia a mejorar (disminuir) la tasa de conversión alimenticia, pero la harina de anchoveta deteriorada no afectó la sobrevivencia de los juveniles de *P. stylirostris* (Figura 3), aunque los niveles de aminas biogénicas totales fueron similares en las harinas de anchoveta y arenque deterioradas.



Consumo de alimento



Tasa de conversión alimenticia



Tasa de crecimiento

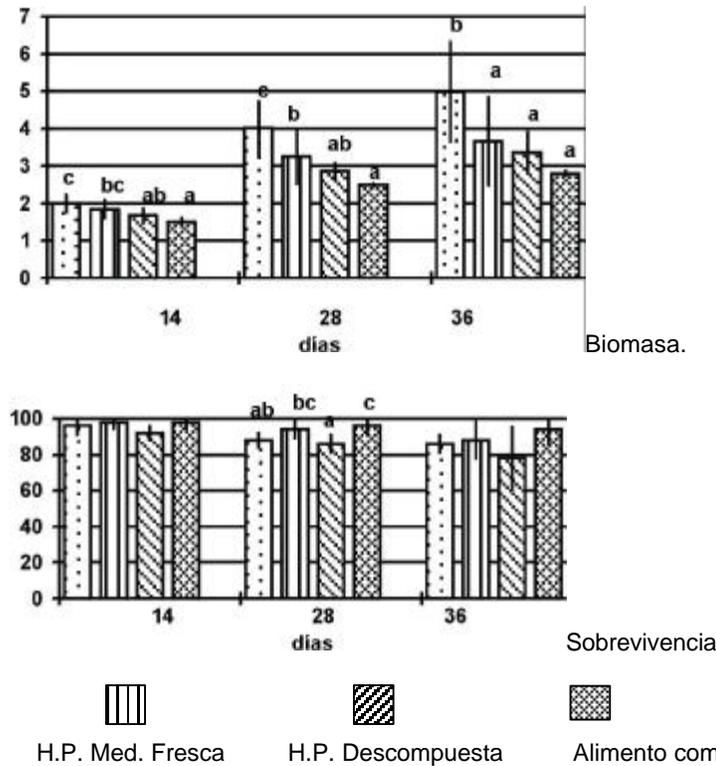


Figura 3. Resultados del efecto de harinas de anchoveta de diferente frescura sobre Juveniles tempranos de *P. stylirostris* (<1g)

Esta diferencia en toxicidad puede ser explicada considerando que fue necesario un tiempo de almacenamiento mayor en Noruega (probablemente al menos 10 días) para alcanzar el mismo nivel de aminas biogénicas que el obtenido en harina de anchoveta en Chile después de solo 36 horas, involucrando diferente desarrollo bacteriano. Se confirmó entonces que el efecto negativo de la descomposición de la materia prima sobre el crecimiento de los camarones no parece estar directamente relacionado a los niveles de aminas, sino más bien a unos compuestos tóxicos de origen microbiano.

El primer efecto de estos compuestos podría ser una disminución en el consumo de alimento, induciendo una disminución en el crecimiento, como la principal consecuencia. Las mortalidades obtenidas solamente a altas dosis o con organismos muy sensitivos (como los primeros estadios juveniles de camarón) y la falta de consistencia en el efecto sobre la tasa de conversión debilita la primera explicación basada en alteraciones proteínicas afectando selectivamente las especies carnívoras.

Sin embargo, la determinación de aminas biogénicas aún se mantiene como uno de los mejores indicadores para estimar a posteriori la frescura de la materia prima usada para una determinada harina de pescado, aún cuando sus niveles no están necesariamente correlacionados con el nivel de los aún hipotéticos compuestos tóxicos.

2.-EFECTO DE LA INCLUSIÓN DE MOLLEROSINA Y DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE SCORE BIOTOXICOLÓGICO EN ALIMENTOS PARA CAMARONES.

El estudio de las toxinas que se forman cuando las harinas de pescado son sobrecalentadas, se inició como consecuencia de pérdidas económicas importantes experimentadas en la producción avícola de Japón debido a un brote epizootico de erosión de molleja y vómito negro. Uno de los agentes responsables de estos efectos adversos en las aves es la mollerossina, la cual se forma durante el procesamiento inadecuado de harina de pescado y que está relacionado a la calidad de la materia prima usada y al proceso de calentamiento.

Parece que este problema es confinado solo a las harinas de anchoveta y ocasionalmente a las harinas de macarela (peces con un gran contenido de músculo rojo, llamados peces histidínicos), cuando son procesados en secadores donde una pequeña proporción de material es atrapado y consecuentemente sobrecalentado (100°C) permitiendo la formación del tóxico mollerossina (Pike, 1994). La mollerossina está formada por precursores que se desarrollan durante la descarboxilación de la histidina cuando el pescado se descompone y consiste de un compuesto entre histamina y el radical epsilon del aminoácido lisina ligado a la proteína. Esta reacción es catalizada por altas temperaturas de secado, pero también depende del tiempo que el producto pasa en el secador.

El contenido de mollerossina de la harina de pescado puede ser cuantificado por cromatografía líquida, aunque es difícil de estandarizar porque el compuesto está presente solo en pequeñas cantidades. Por esta razón, no existe un análisis químico estándar confiable en el presente, para la clasificación de rutina y certificación de varias características toxicológicas encontradas en las harinas de pescado.

Un nuevo método para determinar la calidad de las harinas de pescado, llamado análisis biotoxológico, fue desarrollado en Chile. El método consiste en bioensayos de crecimiento para evaluar los efectos tóxicos que pueden ser causados por harinas de pescado. Este análisis fue inicialmente desarrollado para evaluar el grado de toxicidad asociado con la presencia de mollerossina, pero también detecta evidencias de úlceras asociadas con altos niveles de histamina y otras sustancias que causan erosión de molleja en pollos. Este concepto ha hecho posible certificar ingredientes, usados no solamente por la industria avícola, sino también por la industria animal. La Fundación Chile usa este método altamente estandarizado para certificar un gran porcentaje de las harinas chilenas para mercados locales y foráneos (Tabla 5). Los análisis consisten en alimentar pollos de un día de edad con dietas conteniendo 50% de la harina de pescado a evaluar, determinando la erosión de molleja después de 7 días, obteniendo un valor, que después es utilizado para clasificar las harinas de pescado en cuatro diferentes categorías:

Tabla 5. Clasificación de harinas de pescado de acuerdo a su score biotoxológico

Clasificación	Score
Normal	0.1 a 0.5
Bajo	0.5 a 1.0
Medio	1.0 a 1.5
Grave	1.5 a 3.0

Los valores de score son utilizados en el mercado para comercializar las harinas de pescado para diferentes especies animales de acuerdo con la sensibilidad de cada especie. Las harinas de score normal (0.1-0.5) son usadas en Chile y otras naciones para los mercados avícola y acuícola; harinas de score 0.1 a 0.8 son exportadas a los mercados avícolas Sudafricanos; las harinas de score medio y bajo (0.8 a 1.5) son comercializadas para alimentos animales en general, pero con algunas restricciones, ya que las harinas de score alto solo pueden ser mezcladas con harinas de bajo score para obtener harinas de score comercializable.

Efecto de la inclusión de mollerossina en dietas para camarón

Para investigar el efecto de la mollerossina en *P. vannamei* se llevó a cabo un bioensayo de crecimiento en camarones de 66mg con dietas conteniendo niveles crecientes de DL-mollerossina (1, 3, 6 y 9 ppm). La inclusión de mollerossina incrementó significativamente la mortalidad aún a niveles de inclusión bajos, probando la toxicidad de esta sustancia en camarón. A la luz de estos resultados, así como de las mortalidades observadas con las harinas de score medio evaluadas en el mismo experimento, se decidió investigar de manera más extensiva la toxicidad de las harinas causantes de erosión de molleja en pollos.

INCLUSION DE MOLLEROSINA SINTETICA

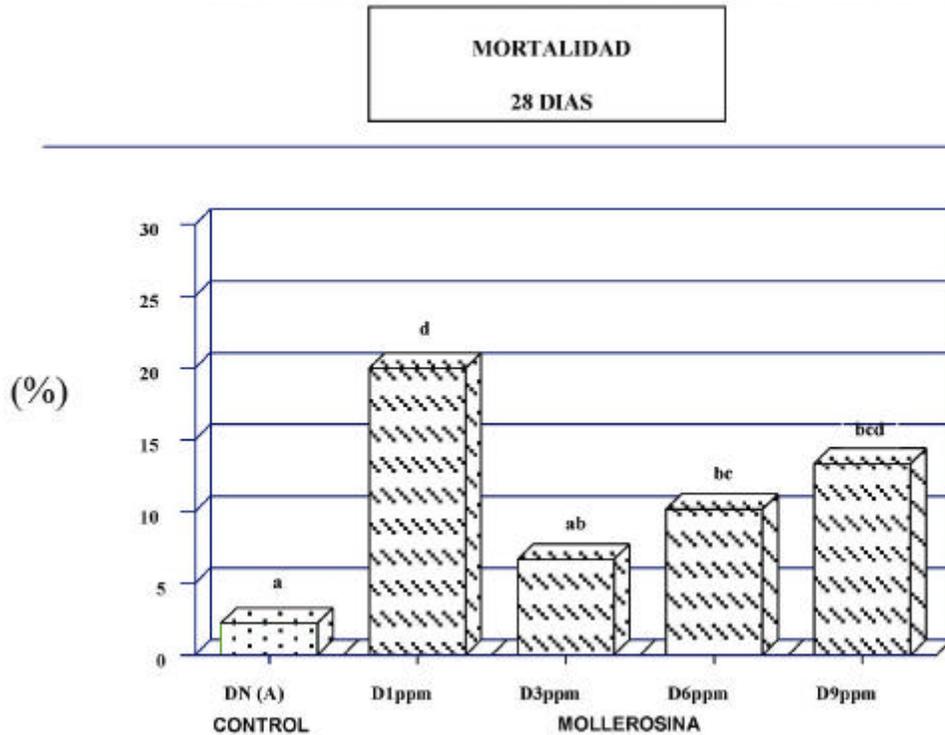


Figura 4. Efecto de la adición de DL-mollerossina en camarón blanco *Penaeus vannamei*.

Experimentos de harinas con diferente score

Tres diferentes lotes de harinas de pescado chilenas clasificadas por su score biotóxico en pollos, fueron probadas en bioensayos de crecimiento de camarón, digestibilidad *in vivo* y tiempos de tránsito digestivo.

Tabla 6. Lotes de harinas Chilenas de pescado de diferente score biotóxico determinado en pollos.

Nivel de toxicidad	Normal	Bajo	Medio	Alto
1er. Set	Na 0.1 & Nb 0.1	---	Ma 1.1 & Mb 1.4	---
2do. Set	0.1	0.9	1.3	2 (harina 1.3 sobrecalentada)
3er. Set	0.1	0.8	1.3	2.3

Al comparar la composición de estas harinas de pescado se mostró que las harinas con el mismo score presentaban grandes variaciones en algunos de los parámetros de calidad química (Tabla 7), especialmente en aquellos indicadores del grado de frescura de la materia prima (histamina y contenido de ácidos grasos libres).

Estos tres lotes de harinas de pescado fueron evaluados incluyéndolos en dietas compuestas isoenergéticas a diferentes niveles de inclusión (30 o 50%) y alimentando camarones *P. vannamei* de diferentes clases de tallas. Cada lote fue evaluado en bioensayos de crecimiento separados, durante 28 días, usando diferentes tamaños de camarón para cada bioensayo. Solo el lote 3 fue evaluado en camarones pequeños (0.1g) y grandes (1 g ó más grandes).

Tabla 7.- Análisis químico de las harinas de pescado experimentales del lote 3 (Base húmeda).

Composición(%)	Score 0.1	Score 0.8	Score 1.3	Score 2.3
Humedad	8.4	7.9	8.6	6.5
Proteína	67.7	63.2	64.2	66.6
Grasa	8.4	8.5	9.2	10.8
Ceniza	15.3	20.1	17.1	15.5
Calcio	3.5	4.8	3.7	4.6
Fósforo	2.5	3.1	2.5	2.8
Cloruros	3.1	4.5	4.7	1.7
Histamina (ppm)	253	954	1542	208
TNV mg N/100g	103	102	110	74
Acidos grasos libres (%)	7.8	8.9	9.3	9.6
Digestibilidad de la proteína	96.6	95.4	96.2	95.1
Lisina disponible (g/100 proteína)	7.1	7.4	6.6	7.0
HPLC (ppm)				
Histamina	283	1214	1897	245
Cadaverina	250	577	731	166
Putrescina	90	300	570	63
Tiramina	81	186	183	46
Feniletilamina	42	100	128	36
Total de aminas	731	2247	3332	538
Presencia de vómito negro (VN)	-	-	VN	VN

Efecto en Crecimiento y Tasa de Conversión Alimenticia

De las dos harinas de pescado con score alto, solo una (score 2.0 del lote 2) produjo una reducción significativa en el crecimiento. Esta harina de pescado fue producida por sobrecalentamiento de la harina de pescado de score 1.3 del mismo lote a 100°C por 3 horas en el laboratorio. Este tratamiento resultó en una reducción significativa de la digestibilidad y también en un incremento significativo y drástico de la tasa de conversión alimenticia (de 1.5 a 3.3). De esta manera, la degradación de la proteína y por lo tanto la reducción de su digestibilidad, producida por el sobrecalentamiento, fue probablemente más responsable del efecto adverso en crecimiento, que el score biotóxico.

De las 4 harinas de pescado de score mediano (1.0 - 1.5), solo con una (score 1.3 del lote 2), se obtuvo una reducción significativa en el crecimiento. Esta harina de pescado contenía altos niveles de histamina (1425 mg / kg) y de ácidos grasos libres (10.5%), como indicación de una baja fresca de la materia prima en el procesamiento de la harina de pescado, lo cual es suficiente para explicar la reducción en el crecimiento, como de acuerdo a las conclusiones obtenidas para el efecto de fresca de la presente revisión. Las otras harinas de pescado de score medio, evaluadas en los otros bioensayos, no tuvieron efecto en crecimiento.

En camarones alimentados con harinas de pescado de score leve (0.8, 0.9 y 1.1), un pequeño incremento en el crecimiento (no significativo) se observó con respecto al control (score 0.1). Más aún, una reducción significativa en la tasa de conversión alimenticia fue encontrada para harinas de pescado de toxicidad baja.

EFFECTO DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE SCORE EN *Penaeus vannamei*
Tasa de Crecimiento (%)

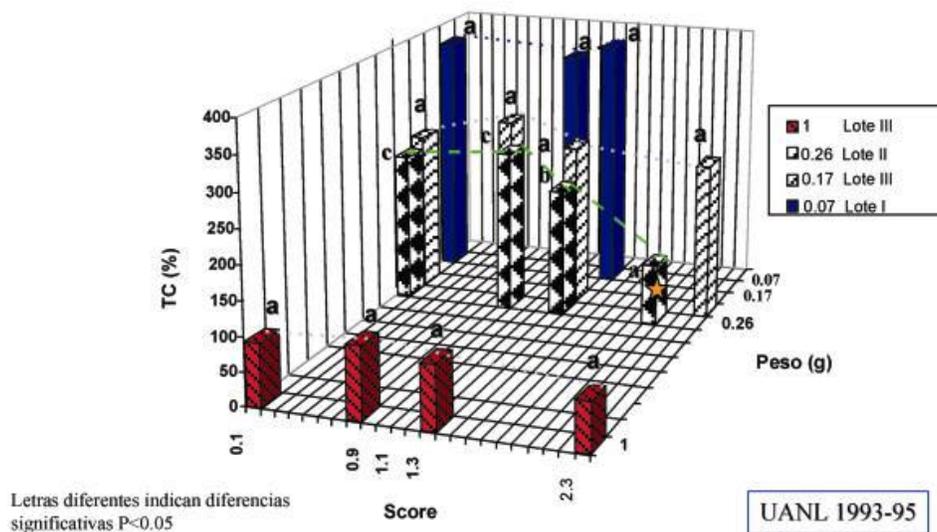


Figura 5. Efecto de harinas de pescado con diferente score en *Penaeus vannamei* -Tasa de Crecimiento

**EFFECTO DE HARINAS DE PESCADO CON DIFERENTE
SCORE EN *Penaeus vannamei*
Tasa de Conversion Alimenticia**

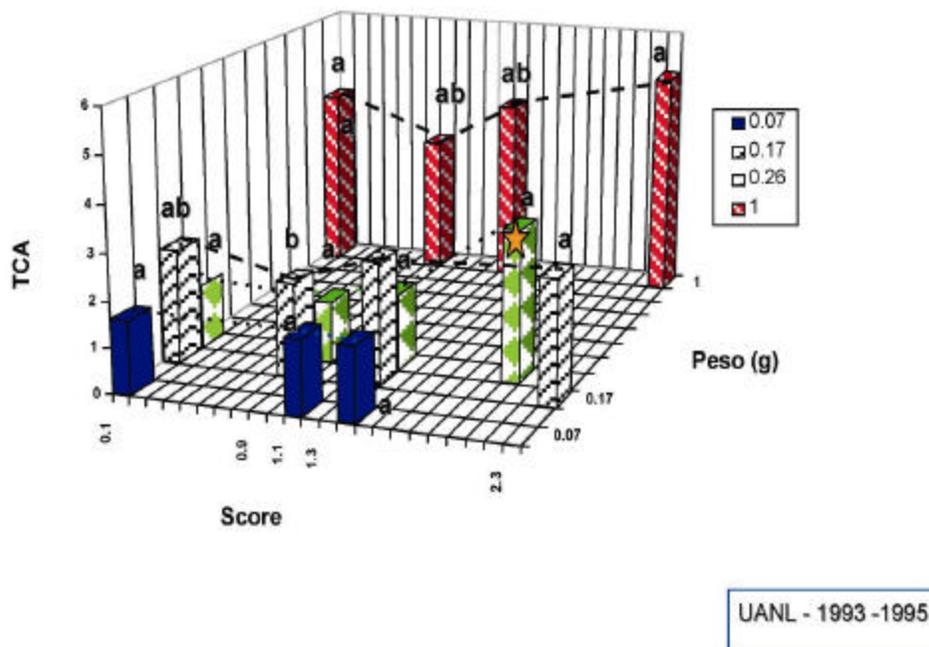


Figura 6. Efecto de harinas de pescado con diferente score en *Penaeus vannamei*- Tasa de Conversión alimenticia

Efecto en sobrevivencia de camarón

Con respecto a la sobrevivencia de los camarones, se observo que de los 5 experimentos llevados a cabo, solo en los 2 bioensayos donde se usaron camarones pequeños, se presentaron mortalidades significativas después de los 28 días. Estas mortalidades fueron observadas con 3 harinas de pescado de score medio (de scores 1.1 y 1.4, incluidas al 30% en la dieta, y de score 1.3 incluida a un nivel del 50% en la dieta), pero no para las harinas de pescado de alto score. Dos de las harinas de pescado causantes de mortalidad (score 1.1 del lote 1 y 1.3 del lote 3), se caracterizaron por tener altos niveles de histamina (4840 y 1897 mg / kg respectivamente) y ácidos grasos libres (9.7 y 9.3 % respectivamente). Nuevamente, estos valores indicaron la reducida frescura de la materia prima usada en el proceso, lo cual podría ser la causa de la mortalidad encontrada en los camarones muy pequeños usados en los bioensayos, como se observo en la parte 1 de esta revisión.

3.- DIGESTIBILIDAD *in vivo* E *in vitro* EN CAMARON, DE HARINAS DE PESCADO Y SU CORRELACION CON LA DIGESTIBILIDAD EN SALMON

La digestibilidad es el método empírico óptimo para medir la disponibilidad de nutrientes de un alimento. Un alimento formulado puede estar bien balanceado y contener todos los nutrientes esenciales en la dieta, pero no producir un buen crecimiento porque los nutrientes no se encuentran disponibles. El valor nutritivo verdadero de un alimento formulado depende en última instancia de la biodisponibilidad de sus nutrientes y no simplemente de su composición.

La digestibilidad del alimento recientemente ha tomado gran interés para los acuicultores debido a la necesidad de disminuir los alimentos contaminantes (Cho *et al.*, 1993; 1994; Lee y Lawrence, 1997). Las regulaciones medioambientales estrictas sobre los efluentes y el alto costo de tratamiento está induciendo el desarrollo de alimentos altamente asimilables que resulten en un reducido aporte de desechos de nitrógeno y fosfato. El uso de datos de digestibilidad de los ingredientes permitirá la formulación de alimentos más adecuados y menos contaminantes.

En contraste con otras especies, la digestibilidad en camarones ha sido muy poco estudiada y prácticamente no existen tablas de digestibilidad de los principales ingredientes utilizados en la formulación especialmente por la falta de estandarización en la metodología del manejo de los animales y las técnicas de recolección de heces.

La digestibilidad es afectada por dos de los principales factores de calidad que deben ser considerados en las harinas de pescado utilizadas en alimentos para acuicultura: el tipo de materia prima, en particular pescado entero o subproductos; y la temperatura y el tiempo de exposición al calor durante el procesamiento de secado (Pike, 1998).

La digestibilidad de la proteína tiende a disminuir cuando el contenido de ceniza se incrementa en las harinas de pescado (Romero *et al.*, 1994). El contenido de ceniza a su vez va a variar dependiendo de la especie de pescado y si se está usando pescado entero o subproductos. Las harinas de pescado hechas de pescado entero, generalmente tienen un contenido de ceniza en el rango de 10 a 20%. Las harinas hechas con harinas de subproductos de pescado que contienen huesos, generalmente van a tener un contenido por arriba del 17%. Si el contenido de ceniza es superior del 23%, la calidad de aminoácidos de la proteína es probablemente disminuida.

Sin embargo, el principal problema con la calidad de la proteína se presenta con la aplicación de calor de manera excesiva durante el secado, dado que la calidad de la proteína puede disminuir por efectos combinados de temperatura y del tiempo de exposición (Pike y Hardy, 1997).

Las harinas de calidad estándar (FAQ) (secadas a temperaturas por arriba de 95 C) son digeridas por cerdos y aves, pero no necesariamente por salmónidos. Se ha desarrollado un nuevo proceso involucrando un secado con calor indirecto para producir las llamadas harinas de pescado de baja temperatura (LT), donde la digestibilidad de la proteína verdadera determinada en Mink o en rata es mayor de 90%, y la digestibilidad de la proteína aparente en salmónidos es arriba del 86%. Una harina de pescado estándar (FAQ) va a tener una digestibilidad verdadera de aproximadamente 5 unidades menos, y harinas de pescado de menor calidad que han sido sobrecalentadas pueden tener 10 unidades menos (80% de digestibilidad proteica en Mink).

Las harinas de pescado LT van a promover un mejor crecimiento; por ejemplo, al comparar una harina de pescado de baja temperatura y una harina estándar con una diferencia de 5 puntos de digestibilidad, el crecimiento en salmón del Atlántico fue 15% mayor (Opstvedt, 1989 en Pike y Hardy, 1997). En camarones la influencia de la digestibilidad de las harinas de pescado sobre los rendimientos de producción aun no es bien conocida.

Por otro lado, los productores de alimentos tienen que tomar decisiones rápidas cuando compran, combinan o procesan ingredientes y solo tomarán los resultados de digestibilidad en cuenta, si pueden disponer de métodos rápidos de evaluación de digestibilidad. Esto indica la necesidad de desarrollar métodos *in vitro* que den resultados que se correlacionen bien con los resultados en camarones vivos, lo que justifica el desarrollo de este tema.

El trabajo en esta parte se presenta en 3 secciones: a) digestibilidad aparente *in vivo*, usando óxido de cromo, b) digestibilidad con métodos *in vitro*: pH Stat y método de Torry modificado con pepsina, c) correlación entre los resultados obtenidos en camarón, *in vitro* y aquellos determinados *in vivo* en salmónidos.

a) Digestibilidad aparente *in vivo* usando óxido de cromo.

Un lote de doce harinas de pescado elaboradas con diferentes especies y procesos cuya digestibilidad en salmónidos y en Mink fue determinada en diferentes laboratorios del mundo (Tabla 8 y 9) (incluyendo harinas de arenque de digestibilidad extrema, denominadas como la 539 y 163) y un concentrado proteico de pescado (CPSP), fueron proporcionados por la IFOMA para evaluar su digestibilidad *in vivo* e *in vitro* en camarones. A estas muestras se adicionaron nuevas muestras del primer lote de harinas de pescado usadas en los experimentos de frescura de la materia prima.

Para la determinación de la digestibilidad *in vivo* de las harinas de pescado se utilizó una dieta de base con una fórmula inspirada en el método propuesto por Cho *et al.* (1979), con un porcentaje de 30% de la harina a evaluar.

El método de digestibilidad *in vivo* fue adaptado para camarones pequeños (1g) a través de una modificación del micrométodo Kjeldahl usando el equipo Tecator que permite utilizar una misma muestra de heces para determinar contenido de proteína y de cromo (Nieto *et al.* 1997), con la cual sólo una muestra de 30 mg. de materia seca de heces es suficiente para medir la proteína y el óxido de cromo. De esta manera, se pueden obtener resultados a pocos días de haber colectado heces, aún con camarones relativamente pequeños, comparados con el tamaño comúnmente usado por otros investigadores para estudios de digestibilidad (15 a 25 g.)

Tabla 8. Características de las harinas de pescado experimentales

Harina	Tipo de pescado	Frescura	Harina entera/torta de prensa	Temp.	Tiempo de secado	Etq	Secado
539/93	Herring	<50	Harina entera	----	----	300	LT
163/94	Herring	<90	H. Entera/T.de prensa	----	----	300	Steam
CPSP	Flat fish	<50	----	100	----	250	Spray Drying
A 3481	Menhaden	----	Harina entera	----	20	625	----
Taf-1	Sand Eel	50	Harina entera	70	165	500	vacuum Disk Dryer
1431	Mackerel	40	Harina entera	70	180	300	PCD Indd Steam
2204	Tobis	40	Harina entera	95	180	150	PCD Indd Steam
F 813	Capelin	<50	----	----	----	200	Indirect air- Hetland
F 815	Herring	<50	----	----	----	200	Indirect air- Hetland
3664	White fish offal	22	Harina entera	100	90	50	Indirect steam dryer
11858	Herring offal	28.5	Harina entera	430	20	400	hot air Rota Disc Dryer
1986		----		----	----	----	
2002		----		----	----	----	
Bad	Anchoveta	50		----	----	----	LT
Good	Anchoveta	14		----	----	----	LT
Medium	Anchoveta	30		----	----	----	LT
Tepual*	Jurel	----		----	----	----	

- La harina Tepual fue proporcionada por Inual-Tepual, Santiago Chile y se usó en la dieta de referencia.

Tabla 9. Resultados de digestibilidad aparente de la proteína en Mink (proteína verdadera), salmón y trucha (digestibilidad aparente) de las harinas de pescado experimentales.

Harina	Mink	A	B	C	D	E
539/93	92.5	95.6	95.2	88.3	89	90.7
163/94	83.9	94.7	89.7	77.4	76.3	79.5
CPSP	----	97.9	97.3	88.3	89	89.8
A 3481	83.1	88	87.9	76.2	80.6	83.1
Taf-1	91.6	95.3	93.9	85.9	87.5	88.8
1431	87	92.4	92.2	83.7	83.7	86.5
2204	89	89.6	92.2	79.1	82.9	84.5
F 813	83.4	87.1	93.3	83.9	86.2	84.4
F 815	94.7	95.8	96.3	88.6	89.5	90.5
3664	85.1	95.7	94.4	84.3	87	89.9
11858	92.4	90.7	92	83.9	85.5	85.5
1986	88.2	95.9	94.6	85.5	85.7	85.4
2002	86.2	96.3	93.7	85.2	86.1	89.4
Bad	89.8	----	----	----	----	----
Good	91.4	----	----	----	----	----
Medium	89.7	----	----	----	----	----

A.- trucha FC, Washington, B.- trucha Strip, Fundación Chile, C.- salmón Strip, Fundación Sunndalsora, D.- salmón Strip, ARC- Nutreco, E.- salmón Strip, ARC- Nutreco, (FC= Fecal collection- recolecta de heces; S=strip=masaje abdominal)

Los resultados de digestibilidad de proteína y de materia seca de estas harinas mostraron que los camarones son muy sensibles en términos de digestibilidad a la calidad de la harina de pescado (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de digestibilidad *in vivo* de las dietas y harinas de pescado (las harinas de pescado se incluyeron al 30% en la dieta de referencia).

Dieta Id.#	Dietas						Ingredientes								
	Digestibilidad de materia seca (DMSD)			Digestibilidad de proteína (DPD)			Proteína%	Id.#	Digestibilidad de materia seca (DMSHP)			Digestibilidad de proteína (DPHP)			
	Media		sd	Media		sd			Media		sd	Media		sd	
6	83.43	ef	0.27	91.42	efg	0.36	74.2	539/93	81.28	de	0.90	88.22	ef	0.68	
1	75.68	a	1.16	84.13	a	0.84	74	163/94	56.03	a	3.78	75.84	a	1.63	
2	84.53	f	1.07	94.00	h	0.44	73.5	CPSP	84.93	e	3.47	98.74	h	0.88	
9	82.92	ef	0.32	89.97	def	0.84	63.6	A3481	79.51	de	1.08	85.27	cde	1.73	
11	83.50	ef	0.39	90.70	def	0.74	72.1	TAF	81.47	de	1.31	87.47	def	1.43	
7	80.01	c	0.71	86.99	b	0.99	72.1	2204	69.80	b	2.37	79.82	b	1.93	
13	82.65	def	1.32	90.96	def	1.20	69.2	1431	78.64	cde	4.40	92.20	g	2.43	
10	84.33	f	1.71	92.94	gh	1.05	73	F813	84.27	e	5.64	95.98	h	2.07	
12	83.61	ef	0.88	91.81	fg	0.63	74.8	F815	81.83	de	2.95	91.02	fg	1.20	
3	77.86	b	1.08	89.49	de	0.97	64.2	3664	62.30	a	3.67	83.71	bcd	1.99	
5	80.73	cd	1.22	90.32	def	0.38	70.4	11858	72.07	bc	4.13	86.46	cde	0.75	
8	80.34	c	0.57	87.24	bc	0.81	70.1	1986	71.05	b	1.88	81.21	b	1.60	
4	80.30	c	1.94	87.56	bc	1.79	68.4	2002	70.92	b	6.42	82.61	bc	3.60	
14	81.72	cde	0.89	90.52	def	1.29	65.8	Bad	75.37	bcd	3.01	88.96	efg	2.65	
15	82.03	cde	1.24	89.02	cd	1.69	69.6	Good	76.53	bcd	4.17	85.55	cde	3.37	
16	80.77	cd	2.06	88.95	cd	1.77	67.7	Medium	72.16	bc	7.02	86.49	cde	3.60	
17	84.36	f	0.31	91.61	fg	0.29									
Prob. ANOVA	P<0.0001			P<0.0001						P<0.0001			P<0.0001		

Los diferentes superíndices indican diferencias estadísticas significativas a una probabilidad < 0.05. s.d. = Desviación estándar. n=3

La digestibilidad de la proteína varió entre 84.1 y 94.0% para las dietas y entre 75.8 y 98.7% para las harinas de pescado. Las digestibilidades más altas se obtuvieron con el hidrolizado CPSP (98.7 %) y la harina de pescado 539 (95.98%) y las digestibilidades más bajas con la harina 163 (75.84%). Es interesante remarcar que la harina de pescado con baja frescura de la materia prima (BAD) tuvo una mejor digestibilidad que la harina de buena frescura, probablemente debido a la hidrólisis ocurrida durante la descomposición de la materia prima.

En lo que respecta a los coeficientes de correlación obtenidos entre las digestibilidades *in vivo* en camarón y las digestibilidades *in vivo* en otras especies, se ha observado que las digestibilidades de salmónidos (C y D) poseen buenas correlaciones ($r = 0.5-0.7$) con las cuatro determinaciones de digestibilidad en camarón, no así para el Mink (Tabla 11).

Tabla 11.- Coeficientes de determinación obtenidos entre la digestibilidad en camarón y las digestibilidades de diferentes especies (*P≤0.05)

	Mink	Trucha A	Trucha B	Salmón C	Salmón D	Salmón E
DMSD	0.3572	-0.1292	0.3913	0.5028*	0.6204*	0.4588
DPD	0.3005	-0.0401	0.5114*	0.6002*	0.7161*	0.5721*
DMSHP	0.3524	-0.1267	0.3872	0.4990*	0.6106*	0.4484
DPHP	0.2075	-0.0248	0.5080	0.5741*	0.6212*	0.4666

DMSD= digestibilidad de la materia seca de la dieta, DPD= digestibilidad proteica de la dieta, DMSHP= digestibilidad de la materia seca de la harina de pescado. A,B,C,D,E,= digestibilidad *in vivo* en salmónidos y DPHP= digestibilidad proteica de la harina de pescado.

b) Digestibilidad *in vitro*. Método de pH Stat.

Se usaron extractos de enzimas de hepatopáncreas de camarón con el método pH Stat, el cual ya había sido probado como un método con buena correlación con la digestibilidad *in vivo* en camarón (Ezquerria *et al.*, 1997) o en salmón (Dimes y Haard, 1994).

Durante los estudios de digestibilidad *in vitro* se observó que las harinas de pescado contenían rangos muy amplios de proteína soluble. El grado de hidrólisis obtenido con el pH Stat (corregido con el blanco sin enzima) presentó un rango de 10.2 a 29.04% para las dietas y de 13.6 a 35.4% para las harinas de pescado (ver Tabla 12). Otra vez el valor más alto se obtuvo para el CPSP, pero la clasificación para las harinas de pescado con las digestibilidades *in vivo* no se conservó de manera perfecta.

Tabla 12. Grado de hidrólisis (GH) de las dietas y harinas de pescado.

Dieta Id #	GHCor Dieta %		sd	GH Dieta %		sd	Harina Id#	GHCor harina %		sd	GH harina %		sd
6	17.48	bcd	5.75	18.95	b	5.75	539/93	22.91	ef	0.96	26.05	cd	0.96
1	19.53	cde	0.99	23.36	cde	0.99	163/94	13.58	a	0.82	21.61	a	0.82
2	29.35	g	0.48	29.51	g	0.48	Cpsp	29.26	g	0.56	30.79	f	0.56
9	19.53	cde	1.15	23.79	cde	1.15	A3481	19.93	cde	1.38	25.81	bcd	1.38
11	17.35	bc	1.40	20.58	bc	1.40	TAF	17.62	bc	1.37	24.09	bc	1.37
13	10.19	a	0.15	13.20	a	0.15	1431	23.69	f	0.40	30.53	f	0.40
7	20.62	cdef	0.94	22.02	bcde	0.94	2204	17.34	bc	1.70	24.10	bc	1.70
10	15.80	b	2.35	18.79	b	2.35	F813	22.69	def	0.00	30.09	ef	0.00
12	23.72	f	0.06	25.16	def	0.06	F815	19.04	bc	2.84	23.22	b	2.84
3	23.68	f	2.14	27.38	fg	2.14	3664	35.42	h	0.27	39.60	g	0.27
5	20.68	def	1.48	25.23	ef	1.48	11858	22.64	def	0.67	26.59	cd	0.66
8	20.83	ef	2.25	23.17	cde	2.25	1986	20.22	cde	2.43	25.92	bcd	2.43
4	21.11	df	0.52	22.56	cde	0.52	2002	18.94	bc	0.28	25.15	bcd	0.28
14	17.62	bcd	1.01	20.60	bc	1.01	Bad	19.58	cde	0.45	26.54	cd	0.45
15	17.26	bc	0.44	21.39	bcd	0.44	Good	16.36	bc	2.72	23.24	b	2.71
16	20.39	cdef	0.68	24.46	def	0.68	Medium	19.74	cde	1.30	28.02	de	1.30
17	11.54	a	0.47	15.18	a	0.47	Tepual	17.62	bc	0.65	24.55	bc	0.65

n=3, s.d.= desviación estándar. G.H, cor= grado de hidrólisis corregido = grado de hidrólisis fina - grado de autohidrólisis de la harina de pescado durante la incubación en agua destilada sin la adición de extracto enzimático.

Determinación de digestibilidad con pepsina (Torry modificado)

La Tabla 13, muestra los valores de digestibilidad con pepsina, obtenidos para cada harina y dieta con la técnica del A.O.A.C. modificada por Torry.

La determinación de la digestibilidad *in vitro* usando pepsina (AOAC, Torry modificado) presentó un rango de 62.67 a 91.14% para las dietas y de 42.69 a 98.91% para las harinas de pescado cuando los valores fueron corregidos con el blanco (incubación sin enzima) y de 40.86 a 84.67% para las dietas y de 25.55 a 91.73 para las harinas cuando el valor no fue corregido por el blanco.

Los resultados obtenidos, relativamente bajos al compararlos con la literatura, podrían deberse a la concentración de las enzimas usadas y que en otros estudios ésta fuera mayor, o a que la actividad de la enzima utilizada no fuera la actividad marcada en la etiqueta de reactivo. La modificación del laboratorio Torry, de usar la enzima diluida (0.0002%), reduce ligeramente los resultados, pero al mismo tiempo el método se hace más sensible. Es posible que el método usado por otros autores no sea el Torry modificado o que no se haya corregido el valor con el blanco, estos análisis se están corriendo nuevamente en nuestro laboratorio con enzimas de actividad conocida.

Tabla 13.- Resultados de digestibilidad con pepsina de las dietas y harinas de pescado sin corregir (Torry mod.).

Dietas	Dig. con pepsina de la dieta		SD	Harina	Dig. con pepsina de la harina		SD
6	74.66	cdef	5.82	539	84.67	f	1.83
1	62.67	a	4.15	163	42.69	a	0.73
2	80.76	efgh	0.73	Cpsp	98.91	g	0.02
9	79.22	defgh	0.68	3481	76.49	def	14.10
11	84.91	ghi	0.06	TAF	81.87	ef	2.08
13	85.72	hi	1.63	1431	82.99	ef	1.17
7	71.32	bcd	2.57	2204	59.95	b	0.00
10	77.27	defg	0.72	813	74.09	cde	0.92
12	82.70	fgh	2.03	815	86.31	f	1.96
3	80.19	efgh	0.99	3664	67.30	bcd	2.70
5	64.08	ab	1.61	11858	68.68	bcd	0.34
8	91.14	i	2.37	1986	73.02	cde	5.82
4	74.18	cde	4.63	2002	68.58	bcd	1.18
14	83.85	ghi	3.80	Bad	77.41	def	5.45
15	73.14	cde	3.00	Good	63.00	b	2.68
16	68.93	abc	9.19	Medium	66.30	bc	0.74
17	78.48	defgh	0.15	Tepual	81.19	ef	5.35

Los diferentes superíndices indican diferencias a una probabilidad de $P < 0.05$.

Correlación entre los resultados obtenidos con éstas metodologías y aquellos determinados en salmónidos.

Los resultados obtenidos para las 15 harinas de pescado con el método pH Stat fueron comparados con aquellos obtenidos con el método de pepsina y con los métodos *in vivo* en camarón y en salmónidos (datos aportados por IFOMA).

Cuando se hace una regresión entre el grado de hidrólisis de la harina de pescado y la digestibilidad de la proteína de la dieta en *Penaeus vannamei*, se obtiene un coeficiente de correlación mejor para los valores de grado de hidrólisis corregidos(%GH cor) que para los no corregidos ($r= 0.51$ vs. $R= 0.38$ respectivamente, $n= 16$). Pero esta correlación se mejora cuando 2 harinas con alto contenido de ceniza y bajo contenido de proteína (3664 y A3481) fueron omitidas, obteniendo una alta significancia ($r=0.80$, $p=0.0006$, $n=14$) (Figura 7). Usando estos datos la siguiente ecuación de regresión fue determinada: $Y=60.919 + 1.2965*(\% GH cor de la harina de pescado)$.

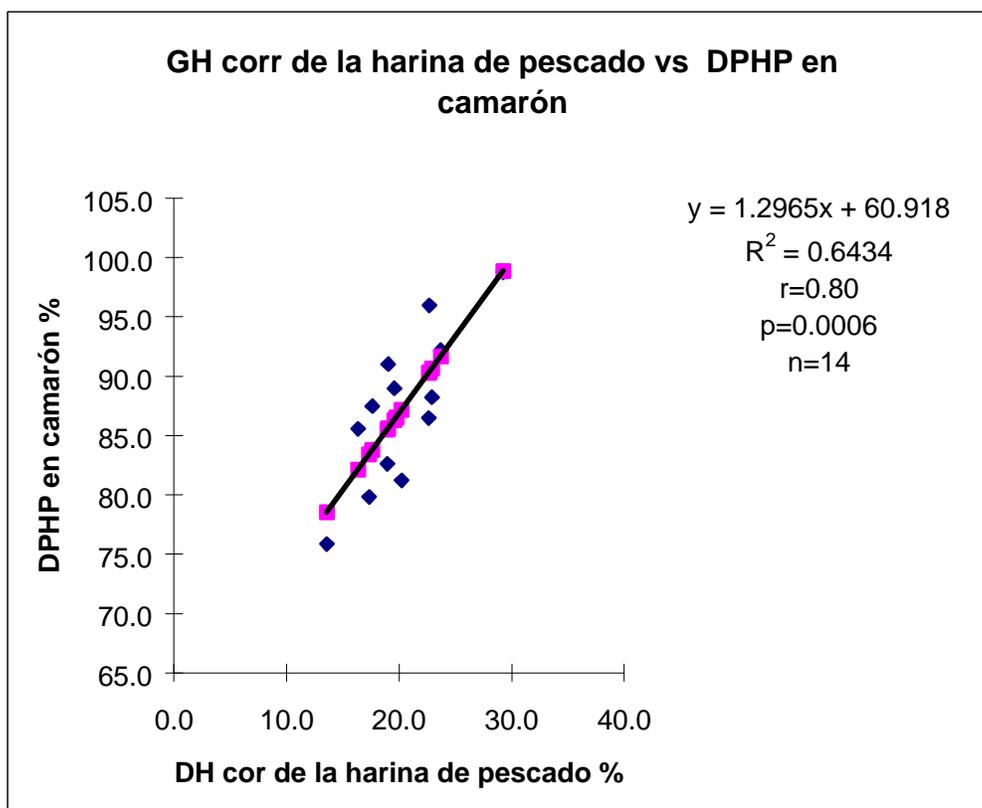


Figura 7.- Regresión lineal obtenida entre el grado de hidrólisis corregido (GH cor) de la harina de pescado y digestibilidad proteica de las harinas eliminando 2 harinas con alto contenido de ceniza y baja proteína.

Una vez establecida la ecuación de regresión se determinó la digestibilidad proteica *in vitro* a partir del grado de hidrólisis de la harina (Tabla 14), como podemos observar la diferencia máxima del valor de predicción con respecto a la digestibilidad *in vivo* es de alrededor de 6 %.

Tabla 14. Resultados de digestibilidad/proteica de las harinas de pescado calculada a partir de la ecuación $DPHP \text{ calculada} = 60.919 + 1.2965 * (\% \text{ GH cor de la harina de pescado})$.

Harina Id #	DPHP	DH cor de la Harina	DPHP calculada	Residuales
F815	91.02	19.04	85.60	5.42
539/93	88.22	22.91	90.62	-2.40
163/94	75.84	13.58	78.53	-2.69
CPSP	98.74	29.26	98.86	-0.12
F813	95.98	22.69	90.34	5.64
2204	79.82	17.34	83.40	-3.59
TAF-1	87.47	17.62	83.76	3.71
11858	86.46	22.64	90.27	-3.80
1986	81.21	20.22	87.13	-5.93
GOOD	85.55	16.36	82.13	3.43
1431	92.20	23.69	91.64	0.56
2002	82.61	18.94	85.47	-2.87
MEDIUM	86.49	19.74	86.51	-0.02
BAD	88.96	19.58	86.30	2.66
3664	83.71	35.42		
A3481	85.27	19.93		

Al comparar los resultados de digestibilidad con pepsina, corregidos y no corregidos, se encontró que los valores no corregidos presentaron una mejor correlación con la digestibilidad *in vivo* (Figura 8). La digestión en ácido sin enzima (blanco) fue tan elevada como 57% en el caso del CPSP y tan baja como 12.8% para la harina de pescado 163, con un promedio entre 15 y 20%. La hidrólisis ácida entonces juega un papel importante en la digestión de la proteína usando este método.

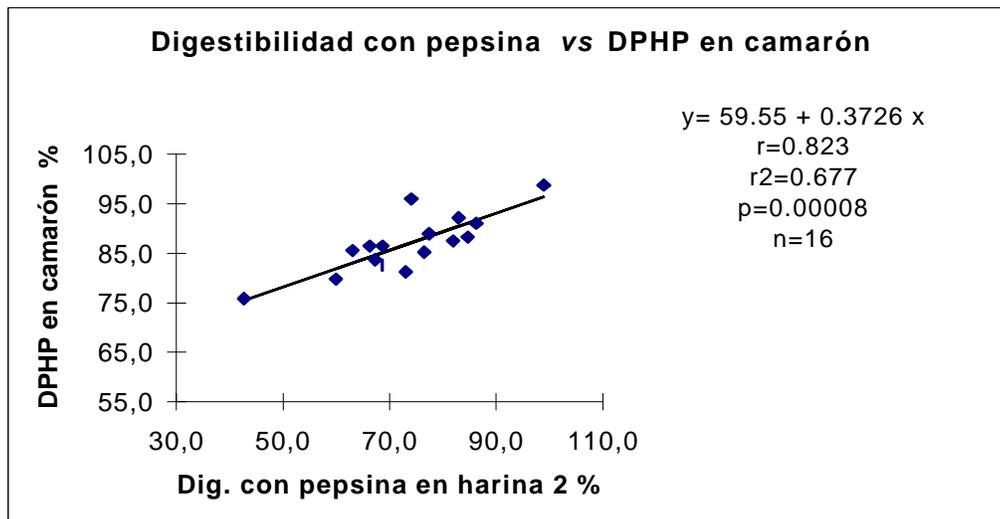


Figura 8. Regresión lineal obtenida con la digestibilidad con pepsina y con la digestibilidad *in vivo* en camarón.

La digestibilidad *in vitro* de la proteína de la harina de pescado usando pepsina no corregida con el blanco, dio una correlación significativa para uno de los cuatro valores de digestibilidad *in vivo* en salmones, para todos los parámetros de digestibilidad *in vivo* para camarón y también para la digestibilidad *in vitro* usando el método de pH Stat. La digestibilidad de camarón entonces se correlacionó bien con la digestibilidad de salmónidos.

No se esperaba que la pepsina pudiera tener una correlación tan buena con la digestibilidad *in vivo* en camarones, sin embargo se encontró que trabajaba aún mejor que el método pH Stat usando las propias enzimas del camarón.

Una posible explicación de éstos resultados es que la parte de la proteína soluble dietaria sea probablemente perdida por lixiviación en el agua antes de ser ingerida y parcialmente absorbida por el camarón apareciendo como digerida en los resultados de digestibilidad aparente *in vivo*.

Efecto de la talla de los camarones en la digestibilidad

Se compararon los resultados de digestibilidad obtenidos por el método *in vivo* en camarones pequeños (1,0.4 o 1.2 g) con los obtenidos en camarones grandes (17g, procedimiento experimental presentado por Cuzon y Aquacop), se observó que la digestibilidad es mayor mientras mayor es la talla de los camarones y que la sensibilidad de los camarones pequeños es mayor que la de los camarones grandes, porque el rango entre los valores de digestibilidad bajos y altos es mayor para camarones pequeños que para camarones grandes.

Esta observación se realizó sobre dos harinas de arenque (163/94 y 539/93) las cuales fueron producidas a partir de la misma materia prima pero procesadas a alta y baja temperatura respectivamente, y con diferencias en su digestibilidad proteica en Mink por cerca de 10 unidades (Tabla 15).

Tabla 15. Digestibilidad aparente *in vivo* (%) de la proteína de dos harinas de pescado en diferentes especies y tamaños de camarón.

	Harina de pescado # 163	Harina de pescado # 539
Mink (IFOMA)	84	95
17g <i>P. stylirostris</i> (IFREMER)	81	94
1g <i>P. vannamei</i> (UANL)	41	83
0.4g <i>P. vannamei</i> (UANL)	66	106
1.2g <i>P. stylirostris</i> (UANL)	59	95

Los resultados con los camarones grandes (17g) fueron similares a los obtenidos en Mink, mientras que los resultados con los camarones pequeños presentaron una diferencia mayor entre las digestibilidades de las dos harinas.

Estos datos sugieren que los camarones pequeños son más sensitivos que el Mink.

Conclusiones

El camarón es una especie sensible a la calidad de la harina de pescado en términos de digestibilidad.

La digestibilidad *in vitro* con enzimas de camarón usando el método pH Stat predice con cierta precisión la digestibilidad de una fuente proteica. El método y la correlación con la digestibilidad *in vivo* pueden optimizarse.

Se recomienda el uso de harinas de pescado de más de 85% de digestibilidad, lo que corresponde a harinas comerciales de contenido de ceniza inferior a 15% y secadas a baja temperatura.

Contrariamente a lo esperado, la digestibilidad *in vitro* con pepsina usando el método Torry modificado, da una excelente correlación con la digestibilidad *in vivo* en camarón.

Los camarones más pequeños son más sensibles probablemente porque presentan una actividad enzimática menor que los camarones adultos y un tiempo de tránsito más corto.

Los resultados de digestibilidad pueden predecir indirectamente la capacidad de un alimento o ingrediente para producir buenos rendimientos en camarón, siempre y cuando, los niveles de proteína cruda no sobrepasen el requerimiento de proteína, la formulación no sea deficiente y tenga algún nutriente esencial limitante, y no contenga un porcentaje elevado de ingredientes hidrolizados o predigeridos. Se recomienda complementar este parámetro de calidad con otros como excreción amoniacal, perfil de aminoácidos, proteína soluble y sobre todo, pruebas de crecimiento en medio controlado.

4.- EFECTO DE LA RANCIDEZ OXIDATIVA EN ACEITES Y HARINAS DE PESCADO

Para el camarón y otras especies acuáticas marinas, la calidad nutricional de lípidos proporcionados por harinas y aceites de pescado está en función directa con su contenido de ácidos grasos poli-insaturados (AGPI), especialmente aquellos insaturados en posición $\omega 3$, los cuales son parte de los requerimientos esenciales. La cantidad de estos AGPI $\omega 3$ depende de varios factores:

1) Tipo de materia prima: algunas especies como la anchoveta y el menhaden tienen un contenido más alto que AGPI $\omega 3$ que otras especies, como el arenque y la capelina. La estación también es importante debido a que el pescado en invierno puede tener un contenido menor de AGPI $\omega 3$.

2) Ocurren dos tipos de degradación durante los diferentes pasos de elaboración de la harina y el aceite de pescado:

Rancidez hidrolítica. Durante el almacenamiento de la materia prima, las enzimas presentes en bacterias principalmente hidrolizan las grasas en ácidos grasos libres. Este proceso prácticamente se detiene después del cocimiento del pescado. Por lo tanto, el porcentaje de ácidos grasos libres es un indicador de la frescura de la materia prima antes del proceso.

Rancidez oxidativa. Durante el proceso de secado, las acciones combinadas del oxígeno y del calor producen radicales de ácidos grasos y luego radicales peróxidos, moléculas muy activas que van a propagar la reacción creando nuevos radicales de ácidos grasos, productos intermediarios como peróxidos, o productos finales como cetonas y aldehídos, conocidos por su mal sabor y olor. La cuantificación de peróxidos es útil para monitorear la rancidez oxidativa en progreso, mientras que el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el valor de anisidina permiten medir la acumulación de los productos finales.

Hay pocos experimentos sobre los efectos de la rancidez oxidativa en alimentos para camarón. Liao (1992) ha descrito en Taiwan una enfermedad conocida como la enfermedad del camarón rojo descolorido en la cual los camarones alimentados con desechos de pescado rancio presentan una atrofia en el hepatopáncreas antes de morir. En Filipinas, De la Cruz *et al.* (1989), estudiaron en *P. monodon* las consecuencias de la oxidación del alimento durante el almacenamiento en condiciones tropicales. Ellos almacenaron un alimento (particularmente rico en grasa: 17%) durante 10 semanas a 0, 10, 28 y 40 C, y encontraron que los alimentos rancios disminuían el crecimiento y eventualmente provocaban mortalidades asociadas con lesiones necróticas en el hepatopáncreas. Koshio *et al.* (1994a) mostró que el aceite de hígado de pescado medianamente oxidado (valor peróxido = 50 meq/kg) tuvo un pequeño efecto en *P. japonicus*, pero un efecto detrimental en el crecimiento de peces, especialmente si la dieta era deficiente en vitamina E (Koshio *et al.*, 1994b; en Pike 1998).

Los experimentos que se describen a continuación fueron diseñados para determinar cuál podía ser el nivel de oxidación máximo aceptable en el aceite de pescado para camarón, en presencia de vitamina E y etoxiquin, los cuales son antioxidantes naturales y sintéticos, para evitar cualquier efecto en el crecimiento y en la tasa de conversión. El segundo objetivo fue determinar los valores de los indicadores químicos (peróxidos, TBA, y anisidina) causantes de algún efecto tóxico en el camarón.

Experimentos en rancidez oxidativa

Resultados

En el primer bioensayo, 3 niveles de oxidación fueron evaluados con aceite de menhaden suplementado en dietas experimentales: bajo, medio y alto con valores de peróxidos de 6, 50 y 100 meq/kg de aceite respectivamente. Las muestras de aceite fresco, mediana y altamente oxidados fueron incluidas en dietas suplementadas o no, con vitamina E (DL- α -tocoferol acetato 199 mg/kg dieta) en un diseño bifactorial 3x2. Un diseño factorial adicional 2x2 fue utilizado con dietas conteniendo el aceite altamente oxidado, quitando el suplemento de etoxiquina en la dieta. Los resultados sugieren que : 1) solo un alto nivel de oxidación en el aceite de pescado disminuye el consumo de alimento, y como consecuencia, el incremento en peso, probablemente debido a la baja palatabilidad de los productos de oxidación. Sin embargo cabe mencionar que los altos niveles de oxidación en los aceites de pescado comerciales son escasos; 2) la falta de suplemento de vitamina E es responsable de fuertes mortalidades (mayores al 40%) cualquiera que sea el nivel de oxidación; más aún, el uso de un aceite muy fresco, conteniendo altos niveles de AGPIs tiende a incrementar el requerimiento de vitamina E; 3) un suplemento dietario de etoxiquin es útil para evitar mortalidades (como protector de la vitamina E del alimento) y para mantener el consumo del alimento y la ganancia en peso o el crecimiento (como un protector de AGPI en el alimento); 4) la suplementación de vitamina E en la dieta se correlaciona con los altos niveles de vitamina E en el cuerpo del camarón y en el hepatopáncreas y viceversa (San Martin *et al.*, 1995).

Una atrofia hepatopancreática (significativa) fue observada en los camarones sobrevivientes a los tratamientos sin suplemento de vitamina E, mientras que los camarones alimentados con aceite oxidado en presencia de vitamina E tuvieron índices hepatosomáticos incrementados. Esto sugiere que la mortalidad y las enfermedades asociadas con atrofia o lesiones hepatopancreáticas reportadas en el caso de alimentos rancios, es probablemente causada principalmente por deficiencias en vitamina E, y no por la toxicidad (aún no comprobada) de los productos de oxidación.

Un segundo bioensayo se llevó a cabo para establecer los valores de digestibilidad in vivo de los alimentos usados en el primer bioensayo pero la digestibilidad no fue afectada por ninguno de los factores mencionados anteriormente.

Las muestras de hepatopáncreas, músculo y ojo fueron analizadas en su actividad de glutatióna peroxidasa. Esta enzima es un elemento clave del sistema de detoxificación celular contra la rancidez. La técnica fue adquirida en el laboratorio del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.) de Hermosillo, Sonora con la Dra. Jean Wyatt, donde ensayos preliminares demostraron por primera vez la presencia de la enzima glutatióna peroxidasa en camarones silvestres. La presencia de glutatióna peroxidasa fue confirmada en camarones y su actividad fue estudiada (rango óptimo de temperatura, efecto de congelación de la muestra o del extracto) (Ponce Ambriz, 1999 tesis de M.C. en progreso).

La rancidez oxidativa en las harinas de pescado fue evaluada en muestras de harina de subproductos de enlatado de atún las cuales son disponibles en México, y son particularmente propensas a la oxidación, debido al alto contenido de hierro (agente pro-oxidativo) en el músculo rojo. Los bioensayos se llevaron a cabo con muestras de harina de atún (HA) estabilizadas con un antioxidante (etoxiquin) inmediatamente después de la producción (HA fresca, con valor peróxido PV= 9.8 meq/kg) o después de 180 días de almacenamiento en refrigeración a 4°C (HA medianamente oxidada, PV= 47.6 meq/kg) o después de un periodo de almacenamiento adicional de 21 días a temperatura ambiental de verano (HA altamente oxidada PV=97.5 meq/kg). Una segunda fuente de variación fue introducida fortuitamente debido a las proporciones variables de hueso en las muestras adyacentes tomadas en la planta procesadora para la harina de atún fresca (28% de ceniza) y la harina de atún mediana y altamente oxidada (21%). Las harinas de atún y una harina de pescado Chilena usada como referencia, fueron incluidas para aportar el mismo porcentaje de proteína, aproximadamente 20% en las dietas experimentales (Tabla 16).

Las muestras de harina de atún sometidas a oxidación gradual no produjeron diferencias significativas en términos de consumo, crecimiento, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia, aunque el consumo y el crecimiento fueron ligeramente menores para la harina altamente oxidada, como se esperaba. El rendimiento del camarón fue significativamente mejor con la harina de pescado Chilena (HPCH), y significativamente más bajo con la dieta de base carente de un suplemento con harina de pescado (Tabla 17).

Tabla 16. Composición de las dietas experimentales

Ingredientes	Dieta Base	Dieta HPCH	Dieta HAF	Dieta HAMO	Dieta HAAO
HP Tepual, (composito 5)		18.220			
Harina de Atún Fresca			21.400		
Harina de Atún Median. Oxidada				19.820	
Harina de Atún Altamente Oxidada					20.300
Harina de camarón (Tepual Chile)	5.018	4.000	4.000	4.000	4.000
Pasta de soya	29.190	23.270	23.270	23.270	23.270
Gluten de trigo	10.037	8.000	8.000	8.000	8.000
Harina de trigo	47.907	38.422	35.655	36.446	35.888
Lecitina (F100 Central Soya)	6.381	6.802	6.381	7.151	7.232
Colesterol Solvay (Inve I)	0.233	0.250	0.242	0.250	0.250
Metionina	0.208		0.026	0.027	0.025
Mezcla vitamínica y mineral (INVE)	1.000	1.010	1.000	1.010	1.010
Antioxidante (ETQ)	0.025	0.026	0.025	0.025	0.025
Total	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

Mezcla de Vitaminas y Minerales: Vit. A 1'000,000 IU/kg; Vit. B₁ 6,000 ppm; Vit. B₂ 2,500, ppm; Ca Pant. 7,500 ppm; Vit. B₆ 7,500 ppm; Vit. B₁₂ 20 ppm; Vit. C 10,000 ppm; C PY P 10,000 ppm; Vit. K₃ 4,000 ppm; Vit. D₃ 800,000 IU/kg; Vit. E 15,000 ppm; Vit. K 100 ppm; Niacina 2,500 ppm; Ac. Fólico 1,000 ppm; Co 500 ppm; Mg 0.001 %; Mn 4,000 ppm; Zn 10,000 ppm; Cu 5,000 ppm; Fe 0.250 ppm; Fe 0.250 ppm; Se 25 ppm; I 500 ppm.

Tabla 17. Resultados del bioensayo a los 28 días

Dieta	Base	HPCH	HAF	HAMO	HAAO	P
Peso Inicial (g)	0.507 ± 0.01	0.524 ± 0.01	0.524 ± 0.01	0.514 ± 0.01	0.517 ± 0.01	0.8684
Peso Final (g)	0.87 ± 0.05 ^c	1.30 ± 0.07 ^a	1.09 ± 0.08 ^b	1.08 ± 0.17 ^b	1.02 ± 0.04 ^b	0.0001
Consumo28 (g)	1.04 ± 0.10 ^c	1.61 ± 0.02 ^a	1.46 ± 0.04 ^{ab}	1.37 ± 0.19 ^b	1.02 ± 0.04 ^b	0.0001
TC 28 (g)	70.90 ± 9.9 ^c	147.71 ± 18 ^a	108.58 ± 12 ^b	109.54 ± 30.9 ^b	98.07 ± 11.6 ^{bc}	0.0001
TCA 28	2.93 ± 0.4 ^b	2.10 ± 0.20 ^a	2.59 ± 0.30 ^{ab}	2.63 ± 0.95 ^{ab}	2.60 ± 0.36 ^{ab}	0.0179
Sobrev 28 (%)	90.0 ± 8.2	90.0 ± 8.16	95.00 ± 5.77	90.00 ± 0.01	92.50 ± 5.0	0.7213

Los valores representan la media de cada parámetro; n = 4 para cada dieta

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

TC= tas de crecimiento, TCA= tasa de conversión alimenticia.

Inesperadamente la digestibilidad de la proteína, fue significativamente menor para la harina fresca que para las harinas alta y medianamente oxidadas, sugiriendo que le afectó más el contenido de ceniza que el grado de oxidación de la grasa residual (Tabla 18).

Tabla 18. Digestibilidad aparente de las dietas experimentales.

DIETA (%)	Base	HPCH	HAF	HAMO	HAAO
DMSD	84.53 ± 1.06 ^{ab}	86.35 ± 0.06 ^a	80.47 ± 0.57 ^b	82.84 ± 3.80 ^{ab}	83.67 ± 0.06 ^{ab}
DPD	88.96 ± 0.39 ^{bc}	91.38 ± 0.28 ^a	87.23 ± 0.75 ^c	90.74 ± 1.76 ^{ab}	91.39 ± 0.15 ^a
DMSHP		94.50 ± 0.37 ^a	65.56 ± 2.67 ^b	75.97 ± 19.2 ^{ab}	80.26 ± 6.65 ^{ab}
DPHP		90.89 ± 0.82 ^a	75.11 ± 2.14 ^b	84.79 ± 5.04 ^a	83.84 ± 0.42 ^a

Los valores representan la media de cada parámetro; n = 3 para cada dieta

El factor de conversión de proteína empleado fue de 6.25

Letras diferentes denotan diferencias significativas, en (p<0.05)

Conclusión

Estos resultados confirmaron que el uso de aceites o de harinas altamente oxidados (pero estabilizados) en dietas para camarón reduce el consumo de alimento como principal efecto.

Debe tenerse cuidado, entonces en no olvidar la importancia del uso de antioxidantes sintéticos en la fórmula del alimento, ya que esto evita la destrucción de antioxidantes naturales como: vitamina E, vitamina C y pigmentos carotenoides, cuya deficiencia produce alta mortalidad, especialmente cuando los alimentos son suplementados con grandes cantidades de aceites o harinas de pescado de alta calidad, ricos en PUFAs altamente oxidables.

5.-NORMAS DE CALIDAD DE HARINAS DE PESCADO PARA CAMARON

Frescura de la materia prima

Se ha demostrado que los camarones son generalmente sensibles a pequeñas variaciones en la frescura de la materia prima, por ejemplo de materia prima fresca a moderadamente fresca (TVN entre 0 y 30 mg de N/100g de materia prima, histamina entre 50 y 1850 mg/kg para harinas de anchoveta Sudamericana) (Tabla 19). La descomposición de la materia prima produce una disminución en el consumo del alimento y en el crecimiento, mientras que la tasa de conversión alimenticia no presenta una tendencia definitiva. En contraste, la digestibilidad aparente *in vivo* se incrementa ligeramente en harinas de pescado elaboradas de anchoveta moderadamente fresca o descompuesta.

Tabla 19. Sensibilidad de diferentes especies de camarón a la frescura de la materia prima .

Especies	Peso (g)	Significancia* Harina de arenque	Efecto en crecimiento	Límite TVN (mgN/100g en materia prima)	Límite Histamina ppm	Límite Cadaverina ppm
			↓10%			
<i>P. stylirostris</i>	0.077	F>S	+20% Mortalidad	?	2700	3200
		Harina de anchoveta				
<i>P. stylirostris</i>	0.072	F>MF&D	↓ 33%	30	1850	830
<i>P. stylirostris</i>	8.4	F>MF&D	↓ 8-13%	30	1850	830
<i>P. monodon</i>	2.5	F>MF>D	↓ 20%	50	4700	1600
<i>P. vannamei</i>	0.9	F>MF&D		30		
<i>P. vannamei</i>	1.5	No significativa	↓ 8%	?	1850	830
<i>P. vannamei</i>	7.6	No significativa		?		

F= fresco, MF= moderadamente fresco, D= descompuesto

Cuando comparamos harinas de pescado "especiales": prime, LT etc. y harinas de pescado standard (FAQ), el uso de harinas especiales de pescado parece recomendable con niveles de TVN menores de 50mgN/100g particularmente para especies carnívoras como *P. stylirostris*, y en una menor extensión para *P. monodon*. En el caso de *P. vannamei* el uso de harinas de pescado especiales parece justificarse solo en los estadios de desarrollo tempranos (peso <1g).

Score biotóxico

Aunque *P. vannamei* es sensible a la mollerósina sintética no es afectado negativamente por harinas de pescado que producen erosión de molleja.

Las harinas de score biotóxico medio o alto no afectan el crecimiento de los camarones y la tasa de conversión a priori, sin embargo, las harinas de pescado comerciales clasificadas por su score biotóxico presentan considerables variaciones en algunos parámetros de calidad químicos, especialmente aquellos que indican el grado de frescura de la harina (aminas biogénicas y ácidos grasos libres). Cuando estos parámetros presentaron valores altos, las harinas de pescado con score medio causaron mortalidades significativas en juveniles de *P. vannamei* (20-40% en 28 días). Las harinas de pescado de score leve (entre 0.8 y 1.1) produjeron una tasa de crecimiento y una tasa de conversión alimenticia ligeramente mejores que las harinas de pescado con score normal (0.1) de la misma forma, que una mezcla de 2:1 de harina de score normal y alto.

El uso de harinas de pescado de score biotóxico leve, o de mezclas equivalentes, es por lo tanto recomendado, siempre y cuando los indicadores de la frescura de la materia prima sean adecuados.

Digestibilidad

El coeficiente de digestibilidad *in vivo* en camarones puede ser usado para seleccionar diferentes lotes de harina de pescado comercial.

La digestibilidad de las harinas de pescado en camarón puede variar ampliamente según el tipo de materia prima utilizado y el tipo de secado usado.

Se recomienda el uso de harinas de pescado de más de 85% de digestibilidad, lo que corresponde a harinas comerciales de contenido de ceniza inferior a 15% y secadas a baja temperatura

Los camarones más pequeños son más sensibles probablemente por que presentan una actividad enzimática menor que los camarones adultos y tiempos de tránsito digestivo más cortos, por lo tanto es necesario estandarizar metodologías entre laboratorios.

Rancidez de la harina y aceite de pescado

Siempre y cuando el nivel de oxidación en aceites de pescado o en los lípidos extraídos de la harina de pescado no exceda un valor medio (VP<50 meq/kg, un TBA<8mg Malonaldehído/kg, un valor de Anisidina <52 Odx100) ningún efecto adverso debe ser esperado.

Con lípidos altamente oxidados (VP=1090meq/kg, TBA 15 mg de Mal/kg, AV=183, Odx100) el consumo de alimento disminuye, y como consecuencia el crecimiento, pero la tasa de conversión alimenticia no es afectada.

Se debe poner énfasis en el uso de antioxidantes sintéticos y naturales en las fórmulas de alimentos para camarón para controlar la oxidación durante el procesado y el almacenamiento del alimento y evitar la subsecuente destrucción de los antioxidantes naturales dietarios, lo cual puede provocar mortalidades importantes, de al menos 40% en pocas semanas.

Referencias:

- Anderson, J.S., Higgs, D.A., Beames, R.M., Rowshandeli, M.**, 1997. Fish meal quality assessment for Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*) reared in sea water. *Aquaculture Nutrition*, 3(1), 25-38.
- A.O.A.C.**, 1990. Official methods of analysis. 12th Ed., Association of Official Analytical Chemist, Elliam Horritz Ed., Washington, D.C., 684pp.
- Barlow, S.M. , Pike, I.H.**, 1990. Fish meal and oil markets 1990: future developments. IFOMA, 2 College Yard, Lower Dagnall Street, St. Albans, Hertfordshire. AL3 4PA, UK, 10 pp.
- Cowey, C.B., Cho, C.Y.**, 1992. Failure of dietary putrescine to enhance the growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 2469-2473.
- Cruz-Suárez, L. E. y Ricque-Marie D.**, 1995a. Indices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón. Oral paper presented at III Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. 27 Octubre-01 Noviembre. Ed. CENAIM, Guayaquil Ecuador. Paper published in "Acuicultura del Ecuador", Guayaquil, Ecuador. Enero, 1996. Vol. 12 pp. 12-30, in spanish with english traduction of the whole paper.
- Chamberlain, G.W.** 1993. Aquaculture trends and feed projections. *World Aquaculture*, 24 (1): 19-29.
- Cho, C.Y., and S.J. Slinger.** 1979. Apparent digestibility measurement in feedstuffs for rainbow trout. Pages 239-247. In: J.E. Halver and K. Tiews, editors. Proceedings of the world symposium on finfish nutrition and fishfeed technology, Vol. II., Henemann Verlagsgesellschaft, Berlin, Germany.
- Cho, C.Y., S.J. Kaushik and P. Luquet.** 1993. Digestibility of feedstuffs as a major factor in aquaculture waste management. Pages 365-374 in *Fish nutrition in practice. Colloquium Number 61.* Institut National de la Recherche Agronomique, París, France.
- Cho, C.Y., J.D. Hynes, K.R. Wood and H.K. Yoshida.** 1994. Development of high nutrient-dense, low-pollution diets and prediction of aquaculture wasters using biological approaches. *Aquaculture* 124:293-305.
- De la Cruz, M.C., Erazo G. and Bautista M.N.**, 1989. Effect of storage temperature on the quality of diets for the prawn *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 80:87-95.
- Dimes, L.E. and N.F. Haard.** 1994. Estimation of protein digestibility I. Development of an *in vitro* method for estimating protein digestibility in salmonids (*Salmo gairdneri*). *Comparative biochemistry and physiology* 108:349 -362.
- Ezquerria, J.M., García Carreño, F., Civera, R. y Haard, N.** 1997. pH Stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture* 157:249-260.
- Hardy, R.W., Castro, E.**, 1994. Characteristics of the chilean salmonid feed industry. *Aquaculture* 124, 307-320
- Huisman, J., van Kempen, G.J.M., Bos, K.D., Verstraten, A.J.M.A., Fentener van Vlissingen, J.M.**, 1992. Effect of fish meal quality and biogenic amines on performance of piglets and chicken. *Nutrition & Food Research Annual Report*, TNO Biotechnology and Chemistry Institute, Zeist, the Netherlands, pp.12-13.
- Jensen, N.C.**, 1986. Evaluation of the influence of drying methods on the feed conversion value of fish meal for rainbow trout. *Rec. of Ann. Conf.* 1986, IFOMA, 2 College Yard, Lower Dagnall Street, St. Albans, Herts. AL3 4PA, UK, pp. 74-86.
- Koshio, S., Teshima S. and Kanasawa, A.**, 1994. Effects of dietary oxidized oil for *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science*, 60 (3): 283-298.
- Lee, P. and Lawrence, A.**, 1997. Digestibility. In: D'Abraham, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M., (Eds), *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*, vol.6, The World Aquaculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, USA, 194-260.
- Liao ,** 1992. Diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan: a review from 1977 to 1991. p113-137 in *Fulks and Main (Eds) Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States.* Proceedings of a workshop in Honolulu, Hawaii, April 27-30, 1992, published by the Oceanic Institute, Makapuu Point, PO Box 25280, Honolulu, Hawaii 96825.
- McCallum, I.M., Higgs, D.A.**, 1989. Aspects of protein utilisation in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Nutritive value of marine protein sources considering the effects of processing conditions. *Aquaculture* 77, 181-200.
- Nieto-Lopez, M.G., Cruz-Suarez, L.E. y D. Ricque.** 1997. Implementacion de un metodo para la determinacion de oxido de cromo y proteina en micromuestras de alimento y heces de camaron. Oral paper presented at the International Conference: "VI Reunion de Nutricion Animal", UANL, Fac. de Agronomia, Monterrey, N.L., México, Octubre 22-24, 5 pages paper in the proceedings. p. 211-214.

- Pedersen, T.M., Opstvedt, J.**, 1992. Principal of quality control Norsildmel. Paper presented at the "Seminario Internacional sobre la Calidad de Harinas de Pescado en Nutrición Animal Acuicola y Pecuaria", 16-17 Nov. 1992, Monterrey, N.L., Mexico, 12 pp.
- Pike, I.H. and Hardy, R.W.**, 1997. Standards for asseying quality of feed ingredients. In: D'Abraham, L.R., Conklin, D.E., Akiyama, D.M, (Eds), Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture, vol.6, The World Aquaculture Society, Louisiana State University, Baton Rouge, USA, 473-492.
- Pike, I.H.**, Andorsdóttir, G., Mundheim, H., 1990. The role of fish meal in diets for salmonids. IAFMM Technical Bulletin No. 24, 2 College Yard, Lower Dagnall Street, St. Albans, Herts. AL3 4PA, UK, pp. 1-35.
- Pike, I. H.**,1994. Productos marinos para acuicultura: el futuro. In: R. Mendoza, L. E: Cruz-Suárez y D. Ricque Memorias del segundo simposium internacional de nutrición acuícola. Edits.,7-9 de Noviembre de 1994, Monterrey, FCB/UANL, pp191-204.
- Pike, I.H.** 1998. Fishmeal outlook. Aquafeed, January/February 1998, 5-8.
- Denis Ricque-Marie, Ma. Isabel Abdo-de la Parra, L. Elizabeth Cruz-Suárez , Gerard Cuzon, Marc Cousin Aquacop and Ian H. Pike.** 1998. Raw material freshness, a quality criterion for fish meal fed to shrimp. Aquaculture 165 1-2, p. 95-109
- Romero, J.J., Castro, E., Díaz, A.M., Revoco, M., Zaldivar, J.**, 1994. Evaluation of methods to certify the "premium" quality of chilean fish meals. Aquaculture, 124, 351-358.
- Rosenberry, B.** 1997. Wolrd shrimp farming 1997. Shrimp News International, San Diego, CA. 286 pp.
- San Martin-Del Angel, P., Ricque-Marie D. y Cruz-Suárez, L.E.**,1995. Efecto del grado de oxidación de aceite de pescado y de la suplementación con vitamina "E" y un antioxidante sintético en la nutrición del camarón blanco *Penaeus vananmei*. Oral paper, abstract in Memorias del Séptimo Congreso de la AMENA (Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal). November 02-04, 1995.
- Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Cruz Suárez, L.E., and Pike I.H.**, 1998. Compared effects of raw material deterioration and added crystalline amines biogenic amines in fish meals fed to shrimp. Draft paper to be submitted to Aquaculture Nutrition or Aquaculture (Elsevier).
- Torry Modificado.** 1969. Método digestibilidad de pepsina, modificado por el laboratorio de Torry.