

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO



EFECTO DE LAS AMINAS BIOGENICAS PRESENTES EN
HARINAS DE PESCADO O SUPLEMENTADAS EN LA
DIETA DEL CAMARON AZUL *LITOPENAEUS STYLIROSTRIS*

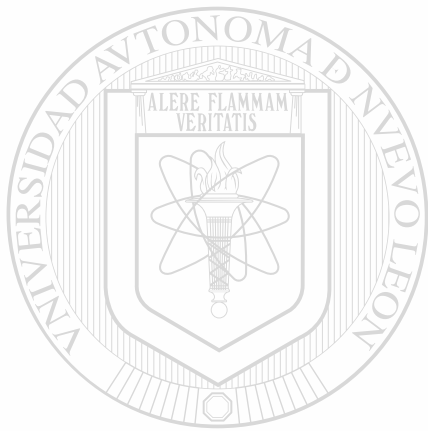
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA

PRESENTA
M.C. MIREYA TAPIA SALAZAR

CIUDAD UNIVERSITARIA

SEPTIEMBRE DE 2000



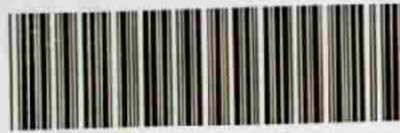
U
ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

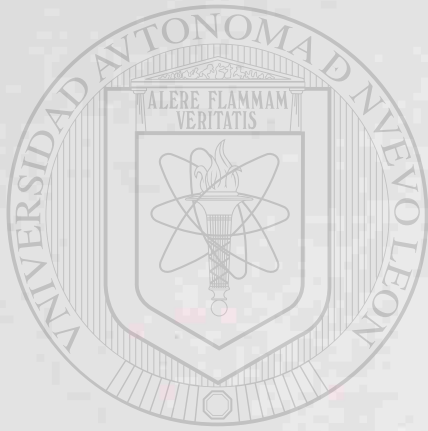
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QP603
.A4
T3
2000
c.1



1080124481



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFEECTO DE LAS AMINAS BIÓGENAS PRESENTES EN
HARINAS DE PESCADO G SUPLEMENTADAS EN LA
DIETA DEL CAMARÓN AZUL, *LITOPENAEUS STYLIROSTRIS*

UANL
TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA

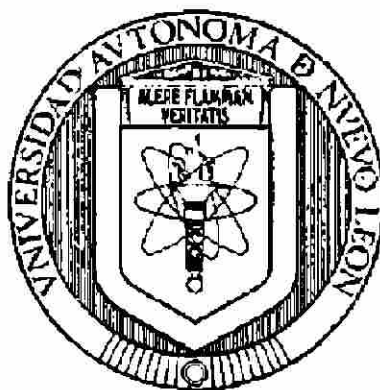
®

PRESENTA
M.C. MIREYA TAPIA SALAZAR

CIUDAD UNIVERSITARIA

SEPTIEMBRE DE 2000

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LAS AMINAS BIOGENICAS PRESENTES EN
HARINAS DE PESCADO O SUPLEMENTADAS EN LA DIETA DEL
CAMARON AZUL *Litopenaeus stylirostris*.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON
ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA**

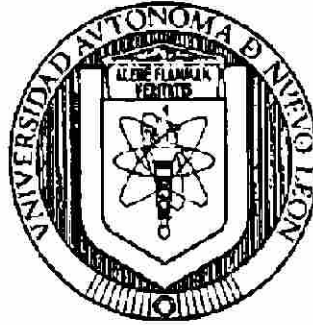
POR:

M.C. MIREYA TAPIA SALAZAR

SAN NICOLAS DE LOS GARZA NUEVO LEON

SEPTIEMBRE DEL 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE POSTGRADO




EFFECTO DE LAS AMINAS BIOGENICAS PRESENTES EN HARINAS DE PESCADO O
SUPLEMENTADAS EN LA DIETA DEL CAMARON AZUL *Litopenaeus stylirostris*.

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA

POR:

M.C. MIREYA TAPIA SALAZAR


COMITE DE TESIS


DRA. LUCIA ELIZABETH CRUZ SUAREZ
PRESIDENTE


DR. DENIS RICQUE MARIE
SECRETARIO


DRA. GRACIELA GARCIA DIAZ
VOCAL


DR. RAMON PACHECO AGUILAR
VOCAL


DR. ROBERTO MERCADO HERNANDEZ
VOCAL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO**



**EFFECTO DE LAS AMINAS BIOGENICAS PRESENTES EN HARINAS DE PESCADO O
SUPLEMENTADAS EN LA DIETA DEL CAMARON AZUL *Litopenaeus stylirostris*.**

**TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN ACUACULTURA**

POR:

M.C. MIREYA TAPIA SALAZAR

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**DR. TREVOR SMITH
UNIVERSITY OF GUELPH ON., CA
DIRECTOR EXTERNO**

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Quiero de dedicar en especial esta investigación a Lazaro Tapia Escamilla y Juana Salazar Vda. de Tapia por haberme dado el Don de la vida, por ser el mejor ejemplo de lucha constante hacia la superación y inculcado todas las herramientas necesarias para lograr el éxito.



A MIS HERMANOS, CUNADAS Y SOBRINOS

José Francisco, Bernardo, Lázaro, Benito, Eva Luz, María del Socorro, Sebastiana, Rosalinda, Paty, José Francisco Jr., Paola, Pamela, Bernardo Francisco, Leslie, Mirian, Karina, Ramses, Mima, Norma, Karen y Carlos. Gracias por brindarme su apoyo y los bellos momentos que hemos pasado.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez y Dr. Denis Rique por la dirección y todo el apoyo que me han brindado para la realización de este trabajo de Investigación.

Al Dr. Ramón Pacheco Aguilar y M.C. María Elena Lugo por su apoyo en el análisis de aminas biogénicas en alimentos por cromatografía líquida de alta resolución.

Al Dr Trevor Smith y Andrew Harris por su asesoría en el análisis de aminas biogénicas por cromatografía líquida de alta resolución y haberme permitido trabajar durante un año en su laboratorio de investigación.

Al Dr. Roberto Mercado Hernández por su asesoría estadística.

A la Granja de Camarón Aquastrat y Seprofin por haber proporcionado los organismos utilizados en este estudio.

Al IFOMA, ISSF y Fundación Chile por haber proporcionado las harinas de pescado experimentales.

INUAL- TEPUAL por haber realizado los análisis de aminas biogénicas en las dietas experimentales.[®]

A CONACyT y al International Council for Canadian Studies (ICCS) por las becas otorgadas a mi persona durante el programa doctoral.

A mis compañeros de grupo Maricultura: Adriana García, Martha Nieto, América Salinas, Sandra de la Cruz, Laura Treviño, Alejandra Rocha, Adrian Salgado, Luis Peña, Claudio Guajardo, Martín Camarena, José Luis Sánchez y Servando Quiroz gracias por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de deporte Maestra Lili, Lety, Yadira, Karina, Aisa, Misael, Edí y Carlos, gracias por brindarme su apoyo y amistad y haberme inculcado en mí el hábito del deporte.

A Paula, Sandra, Dominique, Rak, Kees, Nick, Nicholas, Sudip, Swami, Sankar, Sanjeey por haber compartido gratos momentos durante mi estancia de investigación.

Mary Ann Elliott y Tom por haberme abierto las puertas de su casa durante mi estancia de investigación y brindarme todo su apoyo incondicional.

FINANCIAMIENTO

Esta investigación estuvo financiada por:

Comunidad Económica Europea bajo el contrato de investigación número C11*-CT93-0300

Universidad Autónoma de Nuevo León, México (PAYCYT)

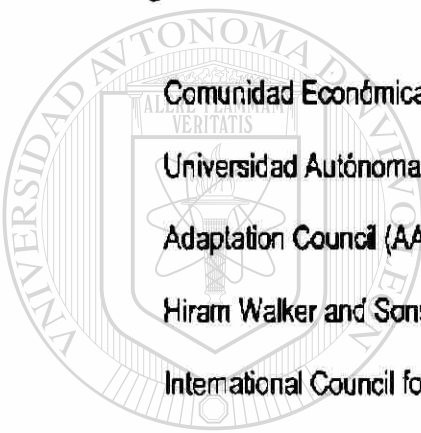
Adaptation Council (AAC)

Hiram Walker and Sons, Ltd. Windsor, Ontario

International Council for Canadian Studies (ICCS)

Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (OMAFRA)

Agricultural Adaptation Council (AAC)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Abreviaciones

C	Cadaverina,
CA	Consumo de alimento (g)
CadH	Concentración de cadaverina en hepatopáncreas de camarón
CadM	Concentración de cadaverina en músculo de camarón
DA	Harina de pescado elaborada a partir de anchoveta descompuesta
DH	Harina de pescado elaborada a partir de arenque descompuesto
ELN	Extracto libre de nitrógeno
ETQ	Etoxiquin
F	Feniletilamina
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
FRA	Harina de pescado elaborada a partir de anchoveta fresca
FRH	Harina de pescado elaborada a partir de arenque fresco
gL ⁻¹	Gramos por litro
GP	Ganancia en peso (%)
H	Histamina
L	Litros
MFRA	Harina de pescado elaborada a partir de anchoveta medianamente fresca
mg	miligramos
mg Kg ⁻¹	Miligramos por kilogramo
N	Nitrógeno
NH ₃ + NH ₄	Amonio total
NO ₂	Nitritos
NO ₃	Nitratos
°C	Grados centígrados
OD	Oxígeno disuelto
P	Putrescina
P	Peso (g)
PMS	Pérdida de materia seca
ppm	Partes por millón
S	Sobreviviencia (%)
SD	Desviación estándar.

Spd	Espemidina
SpdH	Concentración de espermidina en hepatopáncreas de camarón
SpdM	Concentración de espermidina en músculo de camarón
Spm	Espemina
SpmH	Concentración de espemina en hepatopáncreas de camarón
SpmM	Concentración de espemina en músculo de camarón
T	Tiramina
TCA	Tasa de conversión alimenticia
TVN	Nitrógeno volátil total
UI	Unidades internacionales
UNAL/FCB	Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



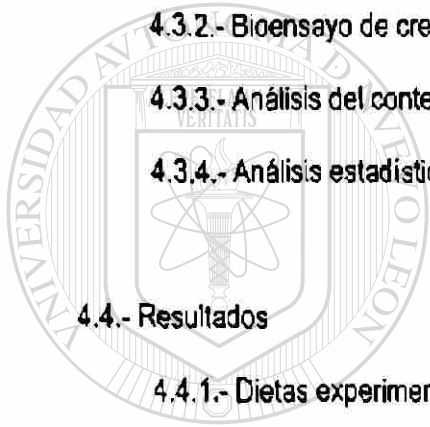
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Indice

	Página
Resumen	1
Introducción general	3
Bases bioquímicas y fisiológicas de las aminas biogénicas	4
Descomposición del pescado	4
Producción de aminas biogénicas	8
Metabolismo de las aminas	9
Histamina	9
Poliaminas	10
Efectos	13
Importancia	15
Originalidad	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
Hipótesis	17
Parte I: frescura de la materia prima	18

1.1.- Resumen	18
1.2.- Introducción	19
1.3.- Material y métodos	21
1.3.1.- Harinas de pescado experimentales	21
1.3.2.- Dietas experimentales	23
1.3.2.1.- Elaboración de dietas experimentales	26
1.3.3.- Bioensayo de crecimiento	28
1.3.4.- Análisis de aminos en tejido de camarón	30
1.3.5.- Análisis estadísticos	31
1.4.- Resultados	31
1.4.1.- Harinas de pescado experimentales	31
1.4.2.- Dietas experimentales	32
1.4.3.- Bioensayo de crecimiento	35
1.4.4.- Niveles de aminos en tejido de camarón	37
1.5.- Discusiones	40
1.5.1.- Harinas de pescado experimentales	40
1.5.2.- Bioensayo de crecimiento	42
1.5.2.1.- Consumo de alimento	42
1.5.2.2.- Ganancia en peso	44
1.5.2.3.- Tasa de conversión alimenticia	45
1.5.2.4.- Supervivencia	46
1.5.2.5.- Contenido de aminos en tejido	47
1.6.- Conclusiones	48

Capítulo IV.- Suplementación de aminas biogénicas	48
4.1.- Resumen	49
4.2.- Introducción	51
4.3.- Material y métodos	52
4.3.1.- Dietas experimentales	52
4.3.2.- Bioensayo de crecimiento	55
4.3.3.- Análisis del contenido de aminas en tejido de camarón	56
4.3.4.- Análisis estadístico	56
4.4.- Resultados	56
4.4.1.- Dietas experimentales	56
4.4.2.- Bioensayo de crecimiento	60
4.4.2.1.- Suplementación de histamina	60
4.4.2.2.- Suplementación de cadaverina	62
4.4.2.3.- Suplementación de putrescina	63
4.4.2.4.- Suplementación de espermidina	64
4.4.2.5.- Suplementación de espermina	65
4.4.3.- Niveles de aminas en tejido de camarón	67
4.4.3.1.- Suplementación de histamina	67
4.4.3.2.- Suplementación de cadaverina	69
4.4.3.3.- Suplementación de putrescina	71



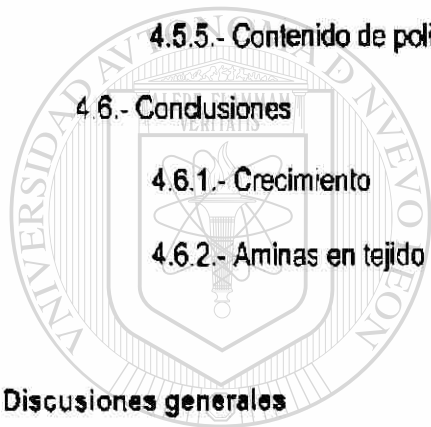
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4.4.3.4.- Suplementación de espermidina	73
4.4.3.5.- Suplementación de espermina	75
4.5.- Discusión	77
4.5.1.- Contenido de aminos en los alimentos experimentales	77
4.5.2.- Consumo de alimento	78
4.5.3.- Ganancia en peso	81
4.5.4.- Supervivencia	84
4.5.5.- Contenido de poliaminas en tejido de camarón	85
4.6.- Conclusiones	88
4.6.1.- Crecimiento	88
4.6.2.- Aminos en tejido	89
Discusiones generales	90
<hr/>	
Conclusiones generales	94
Referencias	95
Anexo I Análisis de aminos biogénicas en alimentos, ingredientes y tejido de camarón por cromatografía de alta resolución	108
Anexo II Análisis de endotoxinas en alimentos e ingredientes por medio de un método colorimétrico	118



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

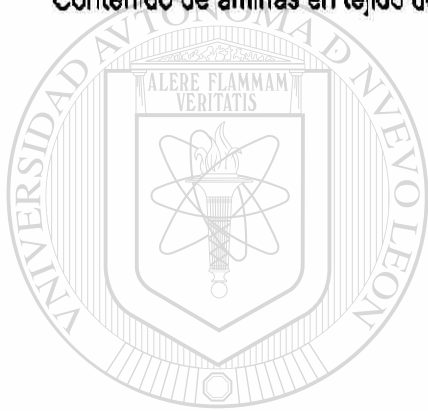
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



Índice de Tablas

Número		Página
1	Especies de bacterias capaces de degradar aminoácidos para formar aminas biogénicas	7
2	Composición química de las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque.	22
3	Composición química de las harinas de pescado elaboradas a partir de anchoveta.	23
4	Ingredientes y composición química de las dietas experimentales para salmón.	24
5	Formulas de los alimentos para camarón suplementados con harinas de arenque.	25
6	Formulas de los alimentos para camarón suplementados con harinas de anchoveta.	26
7	Condiciones de experimentación para los bioensayos de frescura de la materia prima.	30
8	Composición química de los alimentos para camarón suplementados con harinas de arenque y anchoveta.	33
9	Contenido de aminas biogénicas en los alimentos suplementados con harinas de arenque.	34
10	Resultados del bioensayo de crecimiento en los organismos alimentados con dietas suplementadas con harinas de arenque.	36
11	Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con las dietas suplementadas con harinas de anchoveta.	37
12	Formula base para las dietas suplementadas con aminas	53
13	Condiciones de experimentación para los bioensayos de las dietas suplementadas con aminas.	55
14	Composición química de las dietas suplementadas con aminas.	58
15	Contenido de aminas en los alimentos para camarón suplementados con diferentes tipos y concentración de aminas.	59
16	Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con histamina.	60
17	Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con cadaverina.	62

18	Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con putrescina.	63
19	Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con espermidina.	63
20	Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con espermina.	65
21	Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con histamina.	67
22	Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con cadaverina .	69
23	Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con putrescina.	71
24	Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con espermidina.	73
25	Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con espermina.	75



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Indice de figuras

Figura		Página
1	Degradación del ATP	4
2	Glicólisis anaerobia y aeróbica	5
3	Metabolismo de la histamina	9
4	Transformación metabólica de las poliaminas	12
5	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con harinas de pescado elaboradas a partir de arenque.	38
6	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con harinas de pescado elaboradas a partir de anchoveta.	39
7	Ganancia en peso de los organismos alimentados con histamina.	61
8	Ganancia en peso de los organismos alimentados con espermina.	66
9	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con histamina.	68
10	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con cadaverina.	70
11	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con putrescina.	72
12	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con espermidina.	74
13	Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con espermina.	76

RESUMEN

Durante el proceso de deterioro de la materia prima usada para producir harina de pescado, se generan entre otros compuestos aminas biogénicas y posiblemente endotoxinas de origen bacteriano (lipopolisacáridos) que pueden afectar los parámetros biológicos del camarón. Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Evaluar el efecto de harinas de pescado manufacturadas a partir de diferente grado de frescura de la materia prima y 2) Evaluar el efecto de la suplementación de aminas en dietas para camarón a niveles crecientes sobre el crecimiento y la sobrevivencia del camarón azul así como el contenido de estos compuestos en tejido.

Para una primera etapa, se evaluaron harinas de arenque (2) y anchoveta (3) elaboradas a partir de pescado con diferente grado de frescura y que se caracterizaban por contener un alto contenido de aminas biogénicas (5 dietas). Cuatro dietas adicionales fueron elaboradas con la harina de arenque elaborada a partir de pescado fresco y suplementadas con aminas biogénicas a diferentes combinaciones pero en concentraciones semejantes a las encontradas en la harina elaborada a partir de arenque descompuesto. Estos alimentos fueron evaluados durante 28 y 36 días en camarón azul (peso inicial 75 mg) con 5 replicados y 10 organismos por acuario. Las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque o anchoveta medianamente fresca y descompuesta redujeron significativamente el consumo de alimento y la ganancia en peso. La suplementación combinada de histamina (559 mg kg^{-1}) y cadaverina (620 mg kg^{-1}) en dietas para camarón incrementó significativamente estos parámetros biológicos. Por otro lado, se observó una mortalidad del 15 y 9% en los camarones que consumieron las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque y anchoveta descompuesta, aunque para esta última la diferencia no fue significativa. Los niveles de histamina y putrescina en tejido de camarón fueron menores a los límites de detección; mientras que cadaverina, espermidina y espermina fueron detectadas. La concentración de cadaverina en

tejido de camarón se incrementó con el contenido de cadaverina dietaria. El contenido de LPS en las harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima descompuesta fue analizado mediante el uso de un kit comercial; desafortunadamente en las harinas de pescado se encontraron compuestos que causaron reacción cruzada, lo cual impidió la determinación del contenido de dichos compuestos.

En una segunda etapa, se evaluaron 26 dietas experimentales suplementadas con niveles crecientes (0, 600, 1200, 2400, 3600 y 4800 mg kg⁻¹) de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina durante 28 días en camarón azul (peso inicial 72 mg) con 5 (histamina y cadaverina) ó 3 replicados (putrescina, espermidina y espermina) y 10 organismos por acuario. La suplementación de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina no afectó el consumo de alimento y sobrevivencia. La tasa de conversión alimenticia solamente fue afectada por la presencia de espermina, los organismos alimentados con 1100 y 3400 mg kg⁻¹ mostraron el mejor valor. La ganancia en peso fue afectada cuadráticamente por la suplementación de histamina y espermina, con valores máximos para las niveles de 1200 y 2400 mg kg⁻¹ de histamina y 1100 mg kg⁻¹ de espermina y valores decrecientes para los niveles mayores. La concentración de histamina y putrescina en el tejido de los organismos alimentados con estas dietas fue por debajo de los límites de detección (50 pmol mL⁻¹). La cadaverina dietaria afectó linealmente el contenido de esta amina en el tejido; mientras que putrescina, espermidina y espermina afectaron linealmente el contenido de espermidina.

Con estos resultados concluimos que la frescura de la materia prima afecta el consumo de alimento y la ganancia en peso del camarón azul *L. stylirostris*. La sobrevivencia en algunas ocasiones puede ser afectada por el consumo de harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima descompuesta; este efecto negativo solamente es mas evidente cuando se utiliza materia prima almacenada durante un largo periodo de tiempo y a temperatura ambiente. El efecto negativo observado en

los parámetros biológicos evaluados no es causado por la presencia de aminas, si no por otras sustancias tóxicas generadas durante el deterioro del pescado. La adición de niveles moderados de histamina y espermina mejora el crecimiento; sin embargo altos niveles de suplementación reducen éste parámetro. El camarón puede metabolizar histamina, putrescina y espermina para formar otras aminas o excretarlas tal como se ha observado en aves y mamíferos. El almacenamiento de cadaverina dietaria en tejido de camarón y la conversión de espermina a espermidina por este organismo, tiene un alto costo energético lo cual explica la reducción en crecimiento observada en la presente investigación.

INTRODUCCION GENERAL

Uno de los ingredientes utilizados en la elaboración de dietas para organismos acuáticos, especialmente para especies carnívoras, es la harina de pescado. Este ingrediente es una rica fuente de energía, proteína, aminoácidos azufrados y ácidos grasos esenciales (Barlow & Windsor, 1984); su valor nutricional, sin embargo, varía principalmente debido al tipo de materia prima utilizada, y a la modificación y disponibilidad de los elementos nutritivos durante su almacenamiento, y durante la elaboración y manipulación del producto final (Pike, 1996). Durante la manufactura de la harina de pescado (etapas de almacenamiento y secado) se forman ciertas sustancias (aminas biogénicas, mollerósina) que pueden causar una reducción del consumo de alimento, pobre crecimiento e incluso mortalidades (Pike, 1996; Subramanyam, 1996); por lo que ha sido necesario la implementación de puntos críticos de control de calidad en cada una de las etapas de manufactura de este ingrediente con el fin de evitar afectar su calidad nutricional y disminuir o eliminar las sustancias tóxicas que pudieran afectar el buen rendimiento de los organismos que consumen dichas harinas. El presente trabajo trata de determinar el efecto de las aminas biogénicas presentes en harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima descompuesta o suplementadas sobre el crecimiento y sobrevivencia del camarón azul *L. stylirostris* (así como cuantificar los

lipopolisacáridos posiblemente presentes en harinas elaboradas a partir de pescado descompuesto) y establecer las concentraciones máximas permisibles de aminas biogénicas en harinas de pescado utilizadas para la elaboración de alimentos para este crustáceo.

BASES BIOQUIMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LAS AMINAS

BIOGENICAS

DESCOMPOSICION DEL PESCADO

En organismos vivos el ATP (adenosiltrifosfato) funciona como un donador de energía en un sin número de procesos metabólicos; este es formado por la reacción entre el adenosil difosfato (ADP) y fosfocreatina; cuando este reservorio disminuye, el ATP es regenerado del ADP por refosforilación durante el proceso de la glicólisis. Después de la muerte del pez la regeneración del ATP cesa y este a su vez es degradado por un sin número de reacciones de defosforilación y deaminación hasta convertirse en inosina monofosfato (IMP) el cual a su vez es posteriormente degradado a hipoxantina (Hx) y ribosa (Huss, 1983). Fig 1.

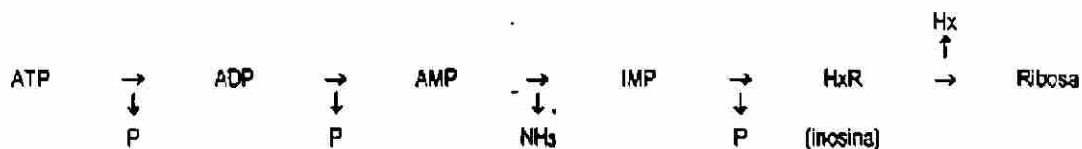


Fig. 1.- Degradación del ATP (Huss, 1983)

Debido a la falta de oxígeno, la glicólisis se desarrolla en condiciones anaerobias y su producto final es el ácido láctico (fig. 2), el cual causa una disminución en los valores de pH y por lo tanto en la

capacidad de las proteínas de retener agua, favoreciendo así las condiciones para el desarrollo de la actividad bacteriana y enzimática. La catepsina D tiene una actividad óptima en valores de pH de 4 y es de las enzimas más importantes para iniciar la degradación de las proteínas endógenas a péptidos, los que a su vez son degradados por otras catepsinas (A, B, C). De esta forma las proteínas se descomponen en péptidos de diferentes tamaños, que después son hidrolizados finalmente en aminoácidos y por último degradados (descarboxilados) en aminas biogénicas, por medio de las enzimas bacterianas (op cit).

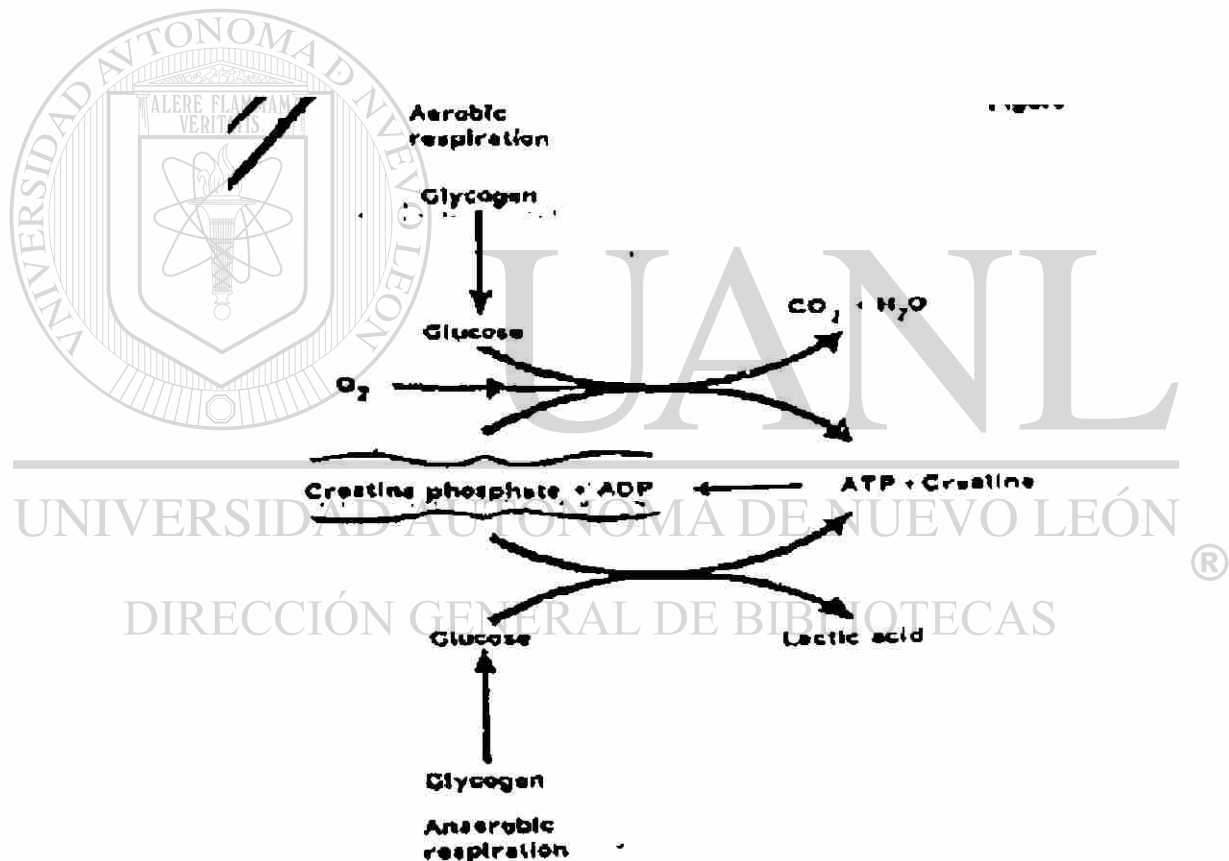


Fig. 2.- Glicolisis anaeróbica y aeróbica (Huss, 1983)

El pescado se deteriora desde el momento de su captura, y el lapso en que se desencadena este proceso es menor a 24 horas; la velocidad a la cual se lleve a cabo este deterioro depende de la

especie, del tiempo, de la temperatura de almacenamiento así como del grado de contaminación microbiológica post captura (Pike & Hardy, 1997). Este proceso envuelve mecanismos microbiológicos y no microbiológicos. La deterioración no microbiológica es causada por enzimas proteolíticas y lipolíticas endógenas que son encontradas en la cabeza y las vísceras del pez y que atacan los órganos y tejido circundante después de la muerte; estas enzimas degradan las proteínas de alto peso molecular proporcionando los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano. En la degradación microbiana actúan las enzimas provenientes de los microorganismos presentes durante la descomposición del pescado, este tipo de degradación da origen a la formación de aminas biogénicas, ácidos orgánicos, ácido sulfúrico, trimetilamina, ácido acético, amoníaco, cetonas, aldehídos, etc.

El tipo de flora bacteriana presente en peces depende de las condiciones del medio ambiente, estación del año, factores ambientales, tipo de almacenamiento post captura, especie capturada etc. (Klausen & Lund, 1986). Así, en los peces subtropicales se han aislado microorganismos mesófilos; tal como *Bacillus* spp, *Coryneformes* y *Micrococcus*; mientras que en organismos de aguas frías la flora predominante es constituida por psicrófilos (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* spp. etc). En peces marinos recién capturados se encuentran presentes *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Coryneformes*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Cytophaga* (Huss, 1983; Taylor & Speckhard; 1983; Lesel, 1984); mientras que en agua dulce la flora bacteriana este representada por *Aeromonas*, *Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Coryneformes*, *Flavo bacterium* y *Alcaligenes* (Lesel, 1984).

Tanto bacterias Gram negativas G(-) como positivas G(+) son responsables de la decarboxilación de los aminoácidos formando aminas biogénicas; sin embargo las G(-) son las que se encargan principalmente de la producción de estos compuestos (Tabla 1).

Tabla 1.- Especies de bacterias capaces de descarboxilar aminoácidos y producir aminas biogénicas.

Bacteria	Gram	Lisina descarboxilasa	Arginina descarboxilasa	Ornitina descarboxilasa	Histamina descarboxilasa	Fenilalanina desaminasa
Acinetobacter	-	-	+	-		
Citrobacter freundii*	-	+/-	+	d	+	-
Edwardsiella tarda*	-	+		+		-
Edwardsiella ictaluri*	-	+		+		-
Enterobacter	-	+/-	+	+		-
Escherichia	-	+	+	+		-
Hafnia alvei*	-	+	-	+	+	-
Klebsiella pneumoniae	-	+/-	-	+	+	-
Proteus vulgaris	-	-	-	-		+
Proteus mirabilis	-	-	-	+		+
Proteus morganii	-	-	-	+	+	+
Proteus rettgeri	-	-	-	-		+
Pseudomonas cepacia	-	+	+	d+		
Pseudomonas malbei	-	-	+	-		
Pseudomonas maltophilia	-	+	-	-		
Salmonella	-	+	+	+		-
Serratia	-	+		+		-
Shigella	-	D	+	d		
Vibrio alginoliticus*	-	+		-		
Vibrio cholerae	-	+		-		
Yersinia ruckeri*	-	-	+/-	+/-		-

Fuente: Pelczar & Reid, 1980; Taylor & Speckhard, 1983; Koneman *et al.*, 1985; Jay, 1986; Hilmer & Yoshinaga, 1987; Brock & Madigan, 1984)

* Especies de bacterias que causan enfermedades en peces, d= reacción positiva tardía.

PRODUCCION DE AMINAS BIOGENICAS

Los aminoácidos son degradados mediante dos vías: la desaminación oxidativa y la decarboxilación. La desaminación oxidativa convierte un aminoácido al correspondiente cetoácido, produciendo principalmente amoníaco; este mecanismo permite a los microorganismos utilizar los aminoácidos libres. La decarboxilación se lleva a cabo mediante la liberación del grupo α -carboxilo de los aminoácidos y produce aminas biogénicas y dióxido de carbono (Louisot, 1983). La cantidad así como el tipo de amina biogénica presente en los alimentos depende de múltiples factores: presencia de microorganismos capaces de decarboxilar y de un cofactor apropiado para inducir la decarboxilación, disponibilidad adecuada de aminoácidos, factores ambientales que favorezcan el crecimiento bacteriano, condiciones que conduzcan la síntesis de decarboxilasa, proceso de decarboxilación subsecuente, tipo de aminoácido predominante en la materia prima (Kranmer *et al.*, 1991); así la agmatina y putrescina son producidas a partir de la decarboxilación de arginina y ornitina; mientras que la histamina, cadaverina, tiramina, fenilalanina son generadas a partir de histidina, lisina, tirosina y fenilalanina respectivamente. La espermidina y espermina son generadas a partir de la putrescina por medio de la adición de grupos aminopropilo.

Las aminas biogénicas son producidas durante el proceso final de la ruptura de las proteínas; sin embargo el tipo de amina y su concentración dependerá del estado de putrefacción; así por ejemplo, la tiramina y la cadaverina son detectadas al inicio del proceso de descomposición (Yano *et al.*, 1992, citado por Flores *et al.*, 1996).

HISTAMINA

La histamina es formada por la descarboxilación de la L-histidina. Esta amina puede ser metabolizada por un proceso de deaminación en presencia de la diamino oxidasa o metilada en presencia de un grupo donador de metilo (S-adenosil metionina) y la enzima histamina N-metiltransferasa (HNMT); los productos de esta deaminación o metilación son el ácido acético imidazol deaminado y la 1-metil-4[β-aminoetil] imidazol (metilhistamina, Fig. 3).

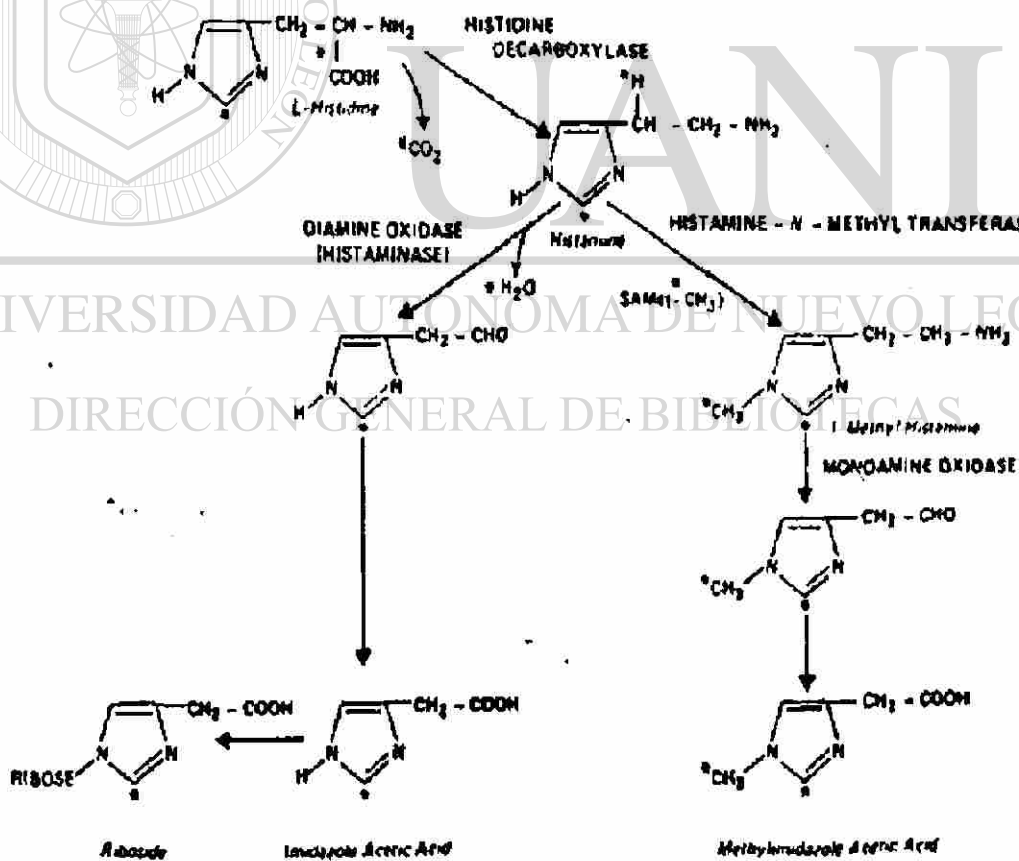


Fig 3.- Metabolismo de la histamina

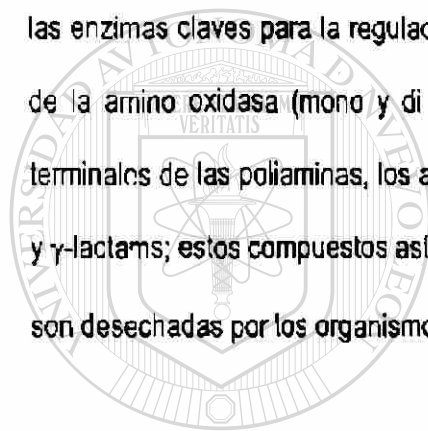
Los dos productos metabólicos (imidazol deaminado y metilhistamina) son posteriormente metabolizados para formar ácido acético ribosilimidazol y subsecuentemente deaminados (mono amino oxidasa) para dar origen al ácido acético metilimidazol. Esta vía de metabolización varía de especie a especie; así tenemos que por ejemplo la deaminación de la histamina y la conversión a ácido acético ribosilimidazol es la principal ruta de metabolismo en ratas y menor en el hombre, gatos y perros; sin embargo, para otros organismos, i.e. conejos y cerdos, ambas rutas de metabolización son importantes (Beaven, 1978).

La distribución de la histamina a lo largo del tracto intestinal es conocida en una gran variedad de especies. Los niveles más bajos ($< 2 \mu\text{g g}^{-1}$) a lo largo del tracto digestivo se observan en especies agástricas y teleosteos primitivos. En todos los vertebrados menores en donde el estómago y las células encargadas de la secreción de ácido clorhídrico han aparecido, la histamina es abundante en el estómago, pero no en el resto del tracto digestivo. En peces, anfibios y reptiles, por ejemplo los niveles de histamina varían de 0.1 a $2 \mu\text{g g}^{-1}$ en el intestino comparado con $5 - 20 \mu\text{g g}^{-1}$ en el estómago; solamente en mamíferos la histamina es abundante tanto en el intestino como en el estómago (Beaven, 1978).

POLIAMINAS

La concentración de poliaminas en tejido está regulada por dos mecanismos, el catabolismo y la excreción. El primer paso de la biosíntesis de las poliaminas es la descarboxilación de la ornitina por la acción de la ornitina descarboxilasa (ODC) la cual da origen a la putrescina; esta a su vez sirve como base para formar espermidina y espermina a través de la transferencia secuencial de grupos

aminopropil, proporcionados por la S-adenosilmetionina decarboxilada (dAdoMetDC), y la acción de las enzimas espermidina y espermina sintetasa. Durante el proceso de catabolismo, la espermina y la espermidina pueden ser degradadas para formar espermidina y putrescina respectivamente, por medio de su acetilación en la posición N-1 así como la remoción de los residuos aminopropil proporcionados originalmente por la dAdoMetDC; la enzima que cataliza este paso es una poliamina oxidasa (PAO) flavin adenina dinucleótida dependiente. Las enzimas ornitina decarboxilasa (ODC), S-adenosilmetionina decarboxilasa (AdoMetDC) y la acetilCoA N-acetil transferasa (SSAT) actúan como las enzimas claves para la regulación de este proceso. La deaminación oxidativa a través de la acción de la amino oxidasa (mono y di amino oxidasa, cobre dependiente) va dar origen a los productos terminales de las poliaminas, los aldehídos; los cuales a su vez son oxidados para formar aminoácidos y γ -lactams; estos compuestos así como las poliaminas acetiladas son las formas en que las poliaminas son desechadas por los organismos (Fig. 4).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

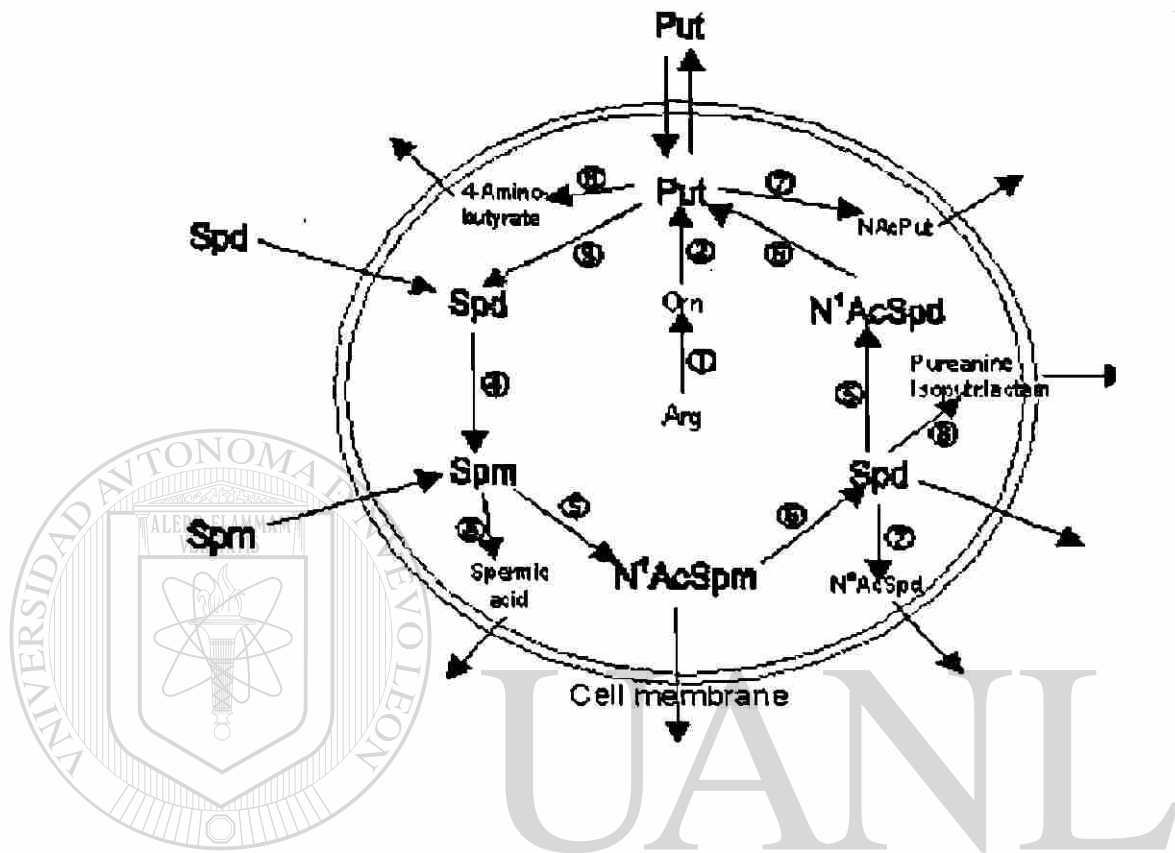


Fig.4.- Transformación metabólica de poliaminas y vías de transporte a través de la membrana

Enzima: (1) arginasa; (2) ornitina decarboxilasa; (3) espermidina sintetasa; (4) espermina sintetasa; (5) acetil CoA: espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa; (6) poliamina oxidasa; (7) acetil CoA: espermidina N¹-acetiltransferasa(nuclear); (8) Cu²⁺-dependent amino oxidasa (diamina oxidasa) + aldehído dehidrogenasa; Arg: arginina, Put: putrescina, Spd: espermidina, Spm: espermina, NAcPut: N-acetil putrescina, N¹AcSpm: N¹-acetil espermidina, N⁴AcSpd: N⁴-acetil espermidina, Orn: ornitina]

Estas enzimas se localizan en hígado, riñón y la mucosa intestinal (Louisot, 1983). La capacidad para metabolizar las aminas va a depender de un sin número de factores; así infecciones en el intestino, presencia de compuestos inhibidores (alcohol), concentración de la amina, compuestos sinérgicos (i.e. la cadaverina potencializa la toxicidad de la histamina debido a la inhibición de la enzima DAO), edad

de los organismos (los organismos jóvenes son más sensibles) son algunos factores que afectan la tasa de degradación de estas sustancias (Bakker, 1994).

EFFECTOS

Las aminas se encuentran naturalmente presentes a bajas concentraciones en muchos ingredientes y alimentos no constituyendo un peligro su consumo; sin embargo altas concentraciones es un indicativo de descomposición y su consumo puede llegar a causar envenenamiento (Tarján & Jánossy, 1978; citado por Flores *et al.*, 1996; Askar & Treptow, 1986 citado por Maijala *et al.*, 1995; Pike & Hardy, 1992; Bakker, 1994; Errola *et al.*, 1996).

Las poliaminas son cationes orgánicos ubicuos cuya presencia esta correlacionada con el incremento de la tasa de proliferación celular, sugiriendo que estas intervienen en algunos eventos anabólicos, por ejemplo: síntesis de DNA, RNA y proteínas; estabilización de membranas (Morgan, 1992), protección del DNA contra procesos térmicos de desnaturalización (Seiler, 1992); inducción de la división citoplasmática (Morgan, 1992); incremento de la permeabilidad celular en intestino (Osman *et al.*, 1998); estimulación de la maduración bioquímica y morfológica de las células (Peulen *et al.*, 1998; Romain *et al.*, 1998); y algunos le han atribuido efectos antioxidantes (Ha *et al.*, 1998).

Se ha visto que la suplementación de espermidina o espermina causa un desarrollo precoz de la mucosa gástrica del intestino de organismos vertebrados (Konturek *et al.*, 1998; Peulen *et al.*, 1998; Olaya *et al.*, 1999) ya que acelera los cambios bioquímicos y morfológicos sufridos durante su desarrollo (Romain *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha observado que incrementa la actividad enzimática

(maltasa, sucrasa, maltasa, aminopeptidasa (Doufor *et al.*, 1998), acelera la maduración del sistema inmune (Lar Steege *et al.*, 1997), etc.

La etapa inicial donde se suministra la primera alimentación con alimento artificial balanceado a los organismos de importancia comercial, es la etapa más crítica debido principalmente a que su sistema digestivo no está completamente maduro y la adaptación a éste tipo de alimento les toma tiempo; por otra parte, la presencia de compuestos inhibidores, i.e. el inhibidor de tripsina presente en la pasta de soya, provoca daños considerables al intestino. El uso de dietas a base de pasta de soya en lechones recién destetados (Grant, *et al.*, 1989) y aves (Mogridge *et al.*, 1996) causa inhibición de las funciones intestinales (i.e. absorción de nutrientes); sin embargo, la suplementación de putrescina ha logrado reducir estos efectos adversos de este inhibidor; debido a que esta poliamina promueve el crecimiento celular e incrementa la absorción de nutrientes.

El efecto positivo de las poliaminas sobre el crecimiento ha sido ampliamente reportado en organismos vertebrados. En aves y ratas se ha observado que la adición de putrescina (Smith, 1990; Til *et al.*, 1997), cadaverina (Smith *et al.*, 1996b; Til *et al.*, 1997), espermidina (Smith *et al.*, 1996a; Jeevanadam *et al.*, 1997; Til *et al.*, 1997) y espermina (Sousadias & Smith, 1995; Til *et al.*, 1997) en cantidades por encima de 2000 mg kg⁻¹ reduce significativamente el crecimiento; sin embargo la utilización de alimentos suplementados con 2000 mg kg⁻¹ de putrescina o 500 mg kg⁻¹ de espermidina se ha observado promueve significativamente el crecimiento de las aves; solamente la adición de espermina a concentraciones por arriba de 6000 mg kg⁻¹ ha causado mortalidades considerables (Sousadias & Smith, 1995; Til *et al.*, 1997).

En peces, Watanabe *et al.* (1987) y Fairgrieve *et al.* (1994) observaron que la suplementación de histamina en dietas causa lesiones intestinales en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*; sin embargo, concluyen que estos daños no afectaron ninguno de los parámetros biológicos evaluados. Cowey & Cho (1992) y Fairgrieve *et al.* (1998) por su parte, reportan una reducción del crecimiento y pobre crecimiento de *O. mykiss* alimentados con 13, 300 mg kg⁻¹ de putrescina y 2000 mg kg⁻¹ de histamina respectivamente.

En camarón se ha observado que la utilización de harinas de pescado con altos niveles de aminas biogénicas ha reducido el crecimiento y el consumo de alimento (Abdo de la Parra, 1994; Ricque *et al.*, 1998); solamente en organismos pequeños ha causado mortalidades de hasta un 20% (Abdo de la Parra, 1994; Cruz-Suárez *et al.*, 1999); aunque el uso de harinas de pescado con niveles moderados de aminas biogénicas incremento la ganancia en peso del camarón (Tapia-Salazar, 1996; Cruz-Suárez *et al.*, 1999), de ahí en fuera no existe ningún otro estudio.

IMPORTANCIA

La harina de pescado es uno de los principales ingredientes utilizados en la alimentación de camarón; sin embargo, la calidad nutricional depende de las condiciones de almacenamiento, procesado de la materia prima y almacenado del producto terminado. Además de la reducción de la calidad nutricional de la harina durante su elaboración se producen sustancias tóxicas tales como aminas biogénicas y lipopolisacáridos, los cuales afectan el crecimiento y sobrevivencia de organismos que las consumen. En lo que respecta a la alimentación en camarón es importante determinar si el uso de harinas de pescado con cantidades considerables de aminas biogénicas y la posible presencia de endotoxinas reducen el crecimiento y la sobrevivencia del camarón.

ORIGINALIDAD

En la actualidad no existen estudios sobre el efecto de aminas biogénicas y lipopolisacáridos en el camarón; el presente trabajo contribuirá con los primeros resultados sobre los efectos de estos compuestos en *L. stylirostris*; además se generará información sobre el metabolismo de las aminas en camarón y finalmente se pretende establecer los límites máximos permisibles de estos compuestos en harinas de pescado utilizadas en la elaboración de alimentos balanceados para camarón.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las aminas biogénicas puras sobre el crecimiento y sobrevivencia del camarón azul y su impacto sobre la concentración de aminas en tejido; y definir si las aminas biogénicas generadas durante el procesamiento de harinas de pescado son responsables de la disminución en el crecimiento que se ha observado en camarón cuando es alimentado con harinas elaboradas a partir de pescado mal conservado.

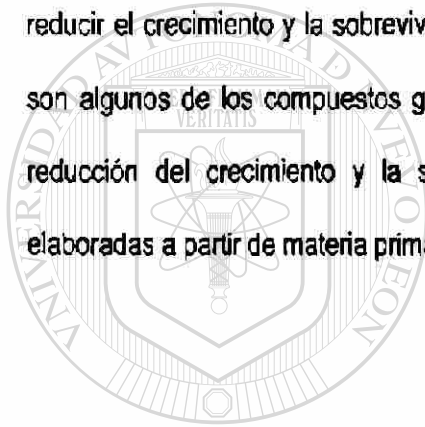
OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Establecer si la frescura de la materia prima afecta el crecimiento y la sobrevivencia del camarón azul *L. stylirostris*.
- 2.- Determinar el efecto de aminas biogénicas puras sobre el crecimiento y la sobrevivencia del camarón azul *L. stylirostris*.
- 3.- Generar información sobre el metabolismo de las aminas en el camarón.

- 4.- Establecer si las harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima almacenada durante un largo periodo de tiempo y en condiciones no muy sanitarias contienen niveles medibles de LPS, los cuales podrían ser también responsables de reducir el crecimiento y la sobrevivencia del camarón.

HIPOTESIS

Las harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima descompuesta son capaces de reducir el crecimiento y la sobrevivencia del camarón azul. Las aminas biogénicas y los lipopolisacáridos son algunos de los compuestos generados durante el deterioro del pescado y son responsables de la reducción del crecimiento y la sobrevivencia del camarón cuando consumen harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima deteriorada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PARTE I: EFECTO DE LA FRESCURA DE LA MATERIA PRIMA

1.1.- RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la frescura de la materia prima y de las aminas biogénicas sobre la ganancia en peso del camarón azul *L. stylirostris* así como el impacto de éstas sobre el contenido de aminas en tejido de camarón. Adicionalmente, las harinas de pescado que causaron mortalidades fueron analizadas para determinar en contenido de endotoxinas mediante el uso de un kit comercial.

Dos harinas de pescado fueron elaboradas a partir de arenque con diferente grado de frescura de la materia prima e incluidas en dietas para camarón a un 27.6%. Cuatro dietas más fueron suplementadas con la harina de pescado elaborada a partir de arenque fresco y combinaciones de aminas (CHPT, HPT, CPT, CH) a concentraciones semejantes a las encontradas en la harina elaborada a partir de arenque descompuesto. Un segundo grupo de harinas de pescado fue elaborado a partir de anchoveta fresca, medianamente fresca y descompuesta e incluidas en un 30%. Estos alimentos (9) fueron evaluados en camarón azul *L. stylirostris* con un peso promedio inicial de 77 y 72 mg durante 28 o 36 días.

La suplementación de harinas de pescado elaboradas a partir de arenque o anchoveta medianamente fresca o descompuesta redujo el consumo de alimento y causó un pobre crecimiento del camarón; además, se observaron mortalidades del 15 y 9% en los camarones alimentados con las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque o anchoveta descompuesta. La adición de aminas,

especialmente cadaverina e histamina a una concentración de 620 y 560 mg kg⁻¹ incremento la ganancia en peso. El contenido de aminas en tejido del camarón alimentado con las dietas suplementadas con harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima con diferente grado de frescura y/o, diferentes combinaciones de aminas no fue afectado. Desafortunadamente fue imposible cuantificar el contenido de endotoxinas presentes en las harinas de pescado que causaron mortalidades a camarón azul; debido a interferencias de algunos compuestos presentes en las harinas de pescado experimentales.

Con estos resultados concluimos que la frescura de la materia prima disminuye el consumo de alimento y la ganancia en peso del camarón azul *L. stylirostris* de menos de 100 mg. La supervivencia de esos animales es afectada por el consumo de harinas elaboradas a partir de pescado descompuesto. El efecto negativo observado en los parámetros biológicos evaluados en el presente trabajo no fue causado por el consumo de aminas biogénicas, sino por la presencia de otras sustancias tóxicas generadas durante el deterioro de la materia prima. La suplementación de histamina y cadaverina mejoro la ganancia en peso por un incremento en el consumo de alimento.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



1.2.- INTRODUCCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La frescura de la materia prima es un criterio de calidad que se emplea generalmente para la selección de harinas de pescado para su uso en alimentos para organismos acuáticos (Pike & Hardy, 1997). Se ha observado que la suplementación de este tipo de harinas elaboradas a partir de pescado descompuesto disminuye la ganancia en peso y el consumo de alimento tanto en peces (Pike & Hardy, op cit; Anderson *et al.*, 1997; Opstvedt *et al.*, 1999) como en camarón (Ricque *et al.*, 1998).

Durante el deterioro del pescado un sin número de compuestos son generados; las aminas biogénicas son formadas por la descarboxilación de aminoácidos por enzimas decarboxiladoras de bacterias principalmente Gram negativas (G-). Estos microorganismos son destruidos durante la elaboración de la harina de pescado, cesando de esta manera la generación de estos compuestos. Por otro lado, las G(-) se caracterizan por contener lipopolisacáridos en su pared celular, estos compuestos al igual que las aminas biogénicas son termoestables (Freeman, 1985).

En camarón, Rique *et al.* (1998) concluyen que el deterioro del pescado reduce el consumo de alimento y el crecimiento del camarón azul *L. stylirostris*, blanco *L. vannamei* o tigre *P. monodon*; sin embargo la supervivencia no se ve afectada. Cruz-Suárez y colaboradores (1994; 1996) por su parte observaron en juveniles de camarón blanco *L. vannamei* alimentados con una dieta suplementada con una harina de pescado que se caracterizaba por contener altos niveles de aminas biogénicas (H, C, P, T y F, 11390 mg kg⁻¹) una mortalidad del 16 y 31% en 28 y 36 días respectivamente. Esta última investigación lleva a pensar que la presencia de bacterias gram negativas durante la descomposición del pescado contribuye con una cantidad considerable de aminas biogénicas y posiblemente de lipopolisacáridos como para causar mortalidad al camarón.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima descompuesta sobre la ganancia en peso y supervivencia del camarón azul *L. stylirostris*, y precisar si las aminas biogénicas y/o endotoxinas son las responsables de reducir el consumo de alimento y el crecimiento del camarón y además causar mortalidades considerables.

1.3.- MATERIAL Y METODOS

1.3.1.- HARINAS DE PESCADO EXPERIMENTALES

Un primer lote de harina de pescado fue proporcionado por el instituto de investigación Herring Oil and Meal Industry (ISSF), en Bergen Noruega. Personal de este instituto elaboró dos harinas de pescado a partir de arenque *Clupea harangus* con diferente grado de frescura de la materia prima (Tabla 2). La harina de pescado elaborada a partir de arenque fresco (FRH) fue elaborada después de 36 horas de conservación de la materia prima a una temperatura de 0.5 °C (barco con bodega refrigerada) y procesada en una planta comercial para obtener una harina semi-seca (Norse-Lt 94). La harina de arenque descompuesto (DH) fue elaborada a partir de la misma materia prima pero almacenada a temperatura ambiente (10-15°C) durante 9 días previos a su procesamiento. Ambas harinas fueron secadas en un ultra rotor. La temperatura del aire de entrada y de salida, así como en la harina fue de 300, 85 y 75 °C respectivamente. Estas harinas fueron analizadas por el ISSF para proteína cruda, humedad, ceniza, lípidos, TVN y digestibilidad en mink de acuerdo a los métodos 5983 (ISO, 1979), 6496 (ISO, 1983), 5984 (ISO, 1978), Ba -38 (AOCS, 1984), 2.065 (AOCS, 1984) y Skrede (1979). El contenido de aminos fue determinado por el Laboratorio Torry Research, Scotland siguiendo la metodología descrita por Seiler & Knödgen (1985).

Tabla 2.- Composición química de las harinas de arenque (base húmeda).

	FRH	DH
Humedad %	7.6	6.1
Proteína %	73.4	73.4
Lípidos %	8.8	11.3
Ceniza %	11.1	9.7
TVN en la materia prima (mgN 100g ⁻¹)	10-15	110
TVN en la harina (mgN 100g ⁻¹)	160	200
Proteína soluble (% N total)	24.5	27.5
Digestibilidad en mink (%)	92.7	92.2
Contenido de aminas (mg kg ⁻¹)		
Histamina	9	2763
Cadaverina	79	3254
Putrescina	73	1465
Tiramina	21	1337
Total	182	8819

Un segundo lote de harinas de pescado fue proporcionado por la Asociación Internacional de Productores de Harinas y Aceites de Pescado (IFOMA); este lote de harinas estaba formado por tres muestras de harinas elaboradas a partir de anchoveta (Tabla 3). Los periodos de almacenamiento de la materia prima fueron 12, 25 y 36 horas post captura para dar origen a una harina de pescado elaborada a partir de pescado fresco (FRA), medianamente fresco (MFRA) y descompuesto (DA). La temperatura de almacenamiento para la materia prima utilizada en la elaboración de las dos últimas harinas experimentales fue 20-28°C. Estas harinas fueron manufacturadas en una planta procesadora de harinas de pescado en Chile y secadas a baja temperatura (80 °C) usando dos secadores en secuencia (flama directa e indirecta); los solubles de pescado fueron reincorporados a la torta de prensa antes de su secado; durante el proceso de manufactura se estuvo adicionando antioxidante ETQ en cantidades suficientes para obtener un residuo de 100 mg kg⁻¹. Las muestras de harinas de pescado experimentales fueron tomadas por lo menos 30 minutos después de haber empezado el proceso. El TVN en la materia prima y solubles de pescado fueron analizadas en la planta procesadora por el método 920-03 (AOAC). La concentración de aminas así como

la digestibilidad en mink de estas harinas fue analizado por el Laboratorio Torry Research Station, Scotland de acuerdo a las metodologías descritas por Seiler & Knödgen (1985) y Skrede (1979) respectivamente. El contenido de proteína soluble, proteína, lípidos, y ceniza en las harinas experimentales fue analizado en el Laboratorio del Programa Maricultura UANL/FCB, México utilizando los métodos Bradford (1976), Kjeldhal (Tecator, 1987), Soxhlet (Tecator, 1983) y 942.05 (AOAC, 1990) respectivamente. El extracto libre de nitrógeno fue calculado por diferencia.

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

	FRA	MFRA	DA
Humedad %	9.4	11.0	11.0
Proteína cruda %	66.0	64.2	62.4
Lípidos %	8.0	7.6	8.8
Ceniza %	14.3	14.5	14.8
TVN materia prima (mg N 100g ⁻¹)	14	30	50
TVN Concentrado de solubles (mg N 100g ⁻¹)	106	190	239
Proteína Soluble Harina de pescado (% N total)	20.97 ^{a1}	25.21 ^b	27.64 ^c
Proteína Soluble Harina de pescado (% Prot)	5.51 ^{a1}	6.37 ^b	6.81 ^b
Digestibilidad de la proteína en mink (%)	91.4	89.7	89.8
Contenido de aminas (mg kg ⁻¹)			
Histamina	28	1850	4701
Cadaverina	51	803	1599
Putrescina	35	446	916
Tiramina	-	285	657
Total	114	3384	7873

¹ Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas (α 0.05)

1.3.2.- DIETAS EXPERIMENTALES

Todas las dietas experimentales fueron formuladas de acuerdo a los requerimientos nutricionales para peneidos recomendados por Akiyama *et al.* (1991). Para el bioensayo con harinas de arenque se siguió el diseño experimental propuesto por el ISSF. Este diseño incluyó dos dietas con harinas de pescado elaboradas a partir de arenque con diferente grado de frescura de la materia prima. Cuatro

dietas adicionales fueron suplementadas con la harina de pescado elaborada a partir de arenque fresco y diferentes combinaciones de aminos a concentraciones similares a las encontradas en la harina de pescado elaborada a partir de arenque descompuesto (Tabla 4). El contenido de aminos así como la composición química de éstos alimentos fueron analizados por el ISSF de acuerdo a las metodologías descritas en la sección de harinas de pescado experimentales.

Tabla 4.- Ingredientes y composición química de las dietas experimentales para salmón.

Dietas	FRH	CH	FRH+CHPT	FRH+CPT	FRH+HPT	FRH+CH
Ingredientes (as fed)						
Harina de pescado %	61.3	61.3	61.3	61.3	61.3	61.3
Aceite de pescado ¹ %	20.6	19.1	20.6	20.6	20.6	20.6
Maíz precocido ² %	16.2	17.7	15.6	15.8	15.8	15.8
Lecitina de soya ³ %	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitaminas ⁴ %	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Minerales ⁵ %	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Carophylpink (3%) %	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Aminas suplementadas (mg kg ⁻¹)						
Histamina	-	-	1690	-	1690	1690
Cadaverina	-	-	1950	1950	-	1950
Putrescina	-	-	850	850	850	-
Tiramina	-	-	810	810	810	-
Composición química (as fed)						
Proteína %	48.0	47.2	48.1	48.2	48.2	48.3
Humedad %	3.7	3.7	4.3	4.5	4.4	4.4
Geniza %	7.7	6.7	7.5	7.5	7.7	7.6
Lípidos %	25.3	26.0	26.0	25.9	25.5	25.9
Contenido de aminos (mg kg ⁻¹)						
Histamina	48	1742	1584	61	1628	1423
Cadaverina	104	2156	1649	1724	137	1424
Putrescina	67	828	624	627	727	76
Tiramina	44	866	720	720	749	62
Total	263	5592	4577	3132	3241	2985

¹Norsalmoil, Norsildmel, Bergen, Norway

²Cadrico B.V. Rotterdam

³Denofa, Norway

⁴Cantidad por kg de dieta : Vit A 3000 IU, Vit D3 600 IU, Vit E 160 mg, B1 12 mg, B2 24 mg, B6 12 mg, Vit C 60 mg, Calpan 48 mg, Vit H 0.6 mg, Folina 6 mg, Niacina 120 mg, Vit B12 0.024 mg, MPB/K3 12 mg

⁵Cantidad por kg de dieta: Mg 500 mg, Cu 5 mg, Mn 10 mg, K 400 mg, Zn 80 mg, Fe 50 mg.

Desafortunadamente el ISSF no tenía más muestras de estas harinas experimentales para evaluarlas en camarón, por lo cual se decidió incluir las dietas para salmón como un ingrediente en los alimentos para camarón. Estas dietas fueron incluidas al 45%, lo cual equivaldría a una inclusión de harina de pescado del 27.6% (Tabla 5).

Tabla 5.- Formulas para camarón suplementadas con harinas de arenque (% base húmeda) .

Dietas	FRH	DH	FRH+CHPT	FRH+CPT	FRH+HPT	FRH+CH
Dieta para salmón	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0	45.0
Harina de trigo	14.5	13.5	14.2	14.2	14.7	14.4
Pasta de soya	35.3	36.3	35.6	35.6	35.1	35.4
Colesterol ¹	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
ETC ²	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitaminas ³	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Minerales ⁴	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Hexametafosfato de sodio ⁵	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Acido algínico ⁶	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Flavorpack ⁷	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

¹ SIGMA, No. Cat. C-3292

² Dresen Química, México

³ INVE Bassrode, Belgium: Ascorbic acid 60000 ppm, Ascorbyl polyphosphate 60000 ppm, Vit. A 4000 IU g⁻¹, Vit. K3 16000 ppm, Vit. B1 24000 ppm, Vit. D3 3200 IU g⁻¹, Vit. B2 16000 ppm, Vit. E 60000 ppm, Ca Pant. 30000 ppm, Vit. K 400 ppm, Vit. B6 30000 ppm, Niacine 20000 ppm, Vit. B12 80 ppm, Folic ac 4000 ppm, dry matter 98%, crude ash 32.7%.

⁴ INVE Bassrode, Belgium: Zn 40000 ppm, Cu 20000 ppm, , Fe 1 ppm, Se 100 ppm, I 2000 ppm, Co 2000 ppm, Mn 16000 ppm, dry matter 91.86 %, crude protein. 4.17%, crude fat 0.36%, crude ash 27.2%, crude fiber 0.21%.

⁵ Aldrich, No. Cat. 30, 555-3

⁶ SIGMA, No. Cat. A-7128

⁷ INVE Basrod, Belgium.

Para el caso de las harinas de anchoveta, fueron elaboradas tres dietas experimentales; las harinas de pescado fueron incluidas en un 30%, contribuyendo con el 50% de la proteína total en la dieta

(Tabla 6). Para éste experimento una dieta comercial (Rangen migaja = R1) proporcionada por la granja de camarón Aquastrat S.A. de C.V. fue incluida como un control externo.

Tabla 6 - Fórmulas para camarón suplementados con harinas de anchoveta (% base húmeda).

Dietas	FRA	MFRA	DA
FRA	30.3		
MFRA		31.2	
DA			32.1
Harina de trigo	23.6	22.4	21.8
Pasta de soya	34.7	34.9	35.1
Aceite de pescado ¹	3.7	3.8	3.4
Lecitina de soya ²	2.5	2.5	2.5
Colesterol ³	0.14	0.14	0.13
Acido alginico ⁴	1.00	1.00	1.00
Hexametáfosfato de sodio ⁵	3.00	3.00	3.00
ETQ ⁶	0.02	0.02	0.02
Vitaminas ⁷	0.25	0.25	0.25
Minerales ⁸	0.25	0.25	0.25
Flavorpack ⁹	0.50	0.50	0.50

¹Inua-Tepual, Chile

²F-100, Central Soya S.A de C.V

³SIGMA, No. Cat. C-329

⁴SIGMA, No. Cat. A-7128

⁵Aldrich, No. Cat. 30, 555-3

⁶Dresen Química, México

^{7,8,9}INVE Basrod, Belgium.

1.3.2.1.- ELABORACION DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES

Todos los ingredientes fueron molidos, pesados y mezclados en una batidora kitchen Aid de una capacidad de 4 L. Primeramente los ingredientes mayores y menores fueron mezclados separadamente durante 5 minutos; posteriormente ambas mezclas de ingredientes fueron mezcladas por 5 minutos más. La lecitina de soya y el aceite de pescado fueron mezclados y colocados en baño maria

durante 3 minutos y posteriormente adicionados al resto de la mezcla de alimento. El attractante fue disuelto en 100 mL de agua tibia e incorporado a la mezcla. Finalmente 150 mL de agua tibia fueron adicionados al alimento y mezclado hasta formar una pasta consistente. Esta pasta fue extruída en un molino de carne Hobart con orificios de 1.6 mm en el dado. Los alimentos fueron secados en una secadora eléctrica durante 8 minutos a 100°C y dejados a temperatura ambiente durante 24 horas; posteriormente estos alimentos fueron guardados en contenedores de plástico y almacenados a 4°C.

Las dietas fueron analizadas para confirmar su composición proximal en el Laboratorio del Programa Maricultura para humedad, proteína cruda, lípidos, ceniza y fibra siguiendo las metodologías citadas en la sección de harinas de pescado. La pérdida de materia seca en las dietas fue analizada por inmersión en agua marina a 26°C y 35 g L⁻¹ durante una hora y siguiendo el método descrito por Aquacop (1978), con 3 replicados para cada dieta.

El muestreo de los alimentos experimentales para el análisis de aminos se realizó de la siguiente manera: el alimento fue distribuido homogéneamente en una charola metálica, el área donde fue distribuido el alimento se dividió en 4 secciones y a su vez cada sección fue dividida en 4 partes. Una muestra de 1 gramo de los segmentos de la segunda división fue tomada, teniéndose un total de 32 g por alimento. El contenido de aminos en las dietas experimentales fue analizado por la compañía Inual-Tepual antes y después de que los alimentos fueron sometidos a la prueba de estabilidad por HPLC de acuerdo a la metodología descrita por Seiler & Knödgen (1978).

1g	1g	1g	1g
1g	1g	1g	1g
1g	1g	1g	1g
1g	1g	1g	1g

La concentración de liposacáridos en las harinas y dietas experimentales fue determinada mediante el uso de un kit comercial (ver anexo).

1.3.3.- BIOENSAYO DE CRECIMIENTO

Dos bioensayos de crecimiento con una duración de 28 y 36 días (Bioensayo I y II) fueron llevados en las instalaciones del Programa Maricultura de la FCB/UANL, México para evaluar el efecto de la frescura de la materia prima en harinas de pescado elaboradas a partir de arenque (Bioensayo I) y anchoveta (Bioensayo II).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La sala de experimentación cuenta con un sistema de recirculación de agua marina sintética. Estas instalaciones cuentan con un filtro de cartucho de 50 μm , un fraccionador de espuma, un filtro biológico, un filtro de carbón activado, un inyector de ozono y un esterilizador de U.V. para mantener la calidad del agua. Las instalaciones tienen además un intercambiador de calor para conservar la temperatura constante. Para el bioensayo I se utilizaron acuarios de fibra de vidrio de un volumen de 60 L; estos tanques se encuentran integrados en un sistema de recirculación. En el bioensayo II se ocuparon acuarios de 10 L, los cuales fueron colocados dentro de los tanques de preengorda (500 L) para mantener

constante la temperatura. Se realizaron cambios diarios de agua del 42% del volumen total para mantener la calidad del agua.

Los organismos para el bioensayo I y II fueron proporcionados por el laboratorio de producción de postlarvas de camarón Maritec y la granja de camarón Aquastrat. Para el bioensayo I y II se emplearon juveniles de camarón azul *L. stylirostris* con un peso promedio de 77 y 72 mg. Cada tratamiento fue evaluado en 5 replicados y con 15 o 10 organismos por acuario.

Los organismos fueron alimentados dos veces por día (a las 12:00 y 15:00 horas); suministrando en la primera ración el 50% de la ración diaria; el resto del alimento fue dado en la segunda alimentación. Al día siguiente (7:00 horas) los restos de alimento fueron cuantificados visualmente antes de que los acuarios fueran limpiados.

El porcentaje de alimentación diaria al inicio de estos experimentos fue del 15% de la biomasa presente en cada acuario. Este porcentaje de alimentación equivalió a 11 mg de alimento diario por individuo, es decir 5.7 mm de pellet diarios que dividido en dos raciones nos daría 2.8 mm de pellet por ración. Este porcentaje de alimentación fue reducido a los 14 días de experimentación al 10% de la biomasa presente en cada acuario y al finalizar el bioensayo se manejo un porcentaje de alimentación del 12% y del 9 al 18% para los organismos alimentados con las dietas suplementadas con las harinas elaboradas a partir de arenque y anchoveta respectivamente. Estos porcentajes de alimentación equivalieron a una cantidad de alimento que varió entre 10 y 14 y entre 30.7 y 46 mg de alimento diario, es decir entre 5.14 y 7.2 mm de pellet y entre 15.78 y 23.65 mm de pellets dividido en dos raciones.

Las condiciones de calidad de agua durante el desarrollo de estos experimentos son resumidas en la Tabla 7.

Tabla 7.- Condiciones de experimentación.

	Bioensayo I	Bioensayo II
Temperatura (°C)	27.5	27.2
Salinidad (g L ⁻¹)	34.8	35.4
pH	8.1	8.1
NH ₃ +NH ₄ (ppm)	0.36	0.65
NO ₂ ⁻ (ppm)	0.44	1.65
NO ₃ ⁻ (ppm)	44	96.8
OD (ppm)	5.40	4.95
Fosfatos (ppm)	1.00	0.85

La ganancia en peso, consumo de alimento, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia fueron estimadas para cada tanque utilizando las siguientes fórmulas: ganancia en peso% = $[(\text{peso promedio final} - \text{peso promedio inicial}) / \text{peso promedio inicial}] \times 100$; consumo individual de alimento = $\sum_{i=1}^{20} [(\text{ración del alimento en el día } i - \text{restos de alimentos en el día } i) / \text{número de camarones presentes en el tanque para el día } i]$; tasa de conversión alimenticia = $[\text{consumo de alimento} / (\text{peso promedio final} - \text{peso promedio inicial})]$; sobrevivencia = $[\text{No. de organismos al final del periodo } i / \text{No. de organismos al inicio del experimento}] \times 100$.

1.3.4.- ANALISIS DE AMINAS EN TEJIDO DE CAMARON

Después de haber finalizado el bioensayo de crecimiento, los organismos fueron dejados sin alimentar durante 24 horas antes de iniciar con la toma de muestras. Cada acuario fue muestreado completamente y fue considerado como una unidad experimental. Los hepatopáncreas fueron separados del resto del cuerpo; todas las muestras de tejido fueron colocadas en nitrógeno líquido por 24 horas, liofilizadas y empacadas al vacío para su posterior análisis. El análisis de aminas se realizó por

cromatografía líquida de alta resolución HPLC (ver anexos) en hepatopáncreas y el resto del camarón sin hepatopáncreas (denominado músculo), en el laboratorio de Animal & Poultry Science de la Universidad de Guelph, On. , Ca.

Para la cuantificación de aminos en tejido de camarón se realizaron 5 extracciones por tratamiento (1 por replicado) y una (muestras de hepatopáncreas de camarón) o dos (muestras de músculo de camarón) inyecciones por extracción.

1.3.5.- ANALISIS ESTADISTICOS

Para determinar la eventual existencia de diferencias significativas entre las dietas evaluadas, los resultados de estos experimentos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza simple, con el programa computacional SPSS para windows versión 2. Los valores promedios de las dietas fueron comparados mediante un análisis de comparación múltiple de medias Duncan a un nivel de significancia de 0.05. Los resultados del alimento comercial no se tomaron en cuenta en el análisis estadístico.

1.4.- RESULTADOS

1.4.1.- HARINAS DE PESCADO EXPERIMENTALES.

El contenido de lípidos, proteína soluble, TVN y aminos se incremento con el deterioro de la materia prima (Tabla 2 y 3). La proteína soluble en las harinas de pescado elaboradas a partir de pescado fresco fue de 24.5 y 20.97 % N total. Para las harinas elaboradas a partir de pescado de compuesto, fue de

27.5 y 27.6% %N total. La digestibilidad de la proteína en Mink en las harinas elaboradas a partir de arenque no fue afectada; sin embargo, las harinas elaboradas a partir de anchoveta medianamente fresca y descompuesta redujeron su digestibilidad en 2 puntos. El contenido de proteína en las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque no fue afectado, en cambio fue reducido de 2 y 4 puntos para las harinas elaboradas a partir de anchoveta medianamente fresca y descompuesta respectivamente. El contenido de TVN en las harinas experimentales se incrementó linealmente con el deterioro de la materia prima; para las harinas elaboradas a partir de arenque fresco y descompuesto el valor de TVN fue de 10 y 110 mg N 100 g⁻¹ respectivamente y de 14, 30 y 50 mg N 100⁻¹ para las harinas elaboradas a partir de anchoveta fresca, medianamente fresca y descompuesta. El contenido total de aminas biogénicas se incrementó con el deterioro del pescado, siendo de 182 y 8819 mg kg⁻¹ para las harinas elaboradas a partir de arenque fresco y descompuesto y de 114, 3384 y 7873 mg kg⁻¹ para las elaboradas a partir de anchoveta fresca, medianamente fresca y descompuesta. Para el primer grupo de harinas experimentales las aminas predominantes fueron cadaverina (3254 mg kg⁻¹) e histamina (2763 mg kg⁻¹), seguidas por putrescina (1465 mg kg⁻¹) y tiramina (1337 mg kg⁻¹); mientras que para el segundo grupo, la amina biogénica predominante fue histamina (4701 mg kg⁻¹), seguida por cadaverina (1599 mg kg⁻¹), putrescina (916 mg kg⁻¹) y tiramina (657 mg kg⁻¹).

1.4.2. - DIETAS EXPERIMENTALES

La composición química de las dietas experimentales suplementadas con harinas de arenque y anchoveta con diferente grado de frescura de la materia prima se muestra en la Tabla 8. La composición de las dietas experimentales fue cercana a los valores teóricos establecidos. Los contenidos promedios de humedad, proteína, lípidos, ceniza y fibra para las dietas suplementadas con harinas de arenque fueron de 8.8±0.2, 39.1±0.1, 12.7±0.1, 7.5±0.1 y 1.1±0.1% respectivamente y de 8.3±0.2, 39.6±0.2, 8.8±0.3,

8.6±0.3 y 2.0±0.1% para las dietas suplementadas con las harinas de anchoveta. La composición de la dieta comercial fue 41.7% para proteína, 9.5% para lípidos, 10.5% para ceniza y 2.1% para fibra. La frescura de la materia prima afectó la estabilidad de los alimentos experimentales; la pérdida de la materia seca de la dieta donde se incluyó la harina elaborada a partir de arenque descompuesto fue incrementada 1.4 puntos; mientras que la inclusión de las harinas elaboradas a partir de anchoveta medianamente fresca y descompuesta generó un aumento de 2.4 y 1.4 puntos respectivamente. Para el caso de la dieta comercial la pérdida de la materia seca fue de 7.9%.

Tabla 8. - Alimentos para camarón suplementados con harinas de arenque (% base húmeda)

	ARENQUE					
	FRH	DH	FRH+CHPT	FRH+CP	FRH+PT	FRH+CH
Dietas						
Humedad	8.9	8.3	8.8	8.9	8.4	8.7
Proteína	39.1	39.2	39.2	38.9	39.1	39.2
Lípidos	12.7	12.6	12.6	12.8	12.6	12.9
Ceniza	7.5	7.2	7.5	7.5	7.5	7.5
Fibra	0.9	1.2	1.3	1.2	1.0	1.2
ELN	30.8	31.1	30.6	30.6	31.4	30.5
PMS	8.3±2	9.7±2	8.4±1	6.4±1	7.9±2	7.9±1

	ANCHOVETA			
	FRA	MFRA	DA	R1
Dietas				
Humedad	8.2	8.2	8.6	9.8
Proteína	39.9	39.5	39.5	41.7
Lípidos	8.7	8.6	9.1	9.5
Ceniza	8.3	8.7	8.6	10.5
Fibra	1.9	2 *	1.9	2.1
ELN	33.0	32.9	32.1	25.4
PMS	11.9b ¹	14.5a	13.3a	7.93

¹ Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

El contenido de aminas en las dietas experimentales para camarón antes y después de la prueba de estabilidad está presentadas en la Tabla 9.

Tabla 9.- Contenido de aminas biogénicas antes (A) y después (D) de la prueba de estabilidad en los alimentos (mg kg⁻¹)

ARENQUE												
	FRH		DH		FRH+CHPT		FRH+CPT		FRH+HPT		FRH+CH	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
H	17	17	608	50	538	113	0	75	549	57	559	127
C	11	0	653	26	632	74	561	122	69	0	620	81
P	14	0	426	18	331	37	323	63	446	41	5	12
T	5	0	298	26	80	61	241	77	261	33	0	34
Spd	Na	3	Na	18	Na	8	Na	36	Na	7	Na	26
Total	48	20	1985	97	1581	293	1125	373	1325	138	1184	280

ACHOVETA								
	FRA		MFRA		DA		R1	
	A	D	A	D	A	D	A	D
H	40	<50	577	99	1538	255	<5	<50
C	66	<50	191	<50	401	<50	<50	<50
P	33	<50	169	<50	394	52	<50	<50
T	60	<50	56	<50	227	<50	<50	<50
Spd	130	<130	124	<130	93	<130	<130	<130
Total	329	<50	1117	<50	2653	<50	<50	<50

Na= no analizado.

El contenido de aminas biogénicas totales en los alimentos para camarón donde fueron incluidas las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque fresco y descompuesto fue de 48 y 1985 mg kg⁻¹, y de 329, 1117 y 2653 mg kg⁻¹ para el caso de las dietas suplementadas con las harinas de pescado elaboradas a partir de anchoveta fresca, medianamente fresca y descompuesta. En las dietas donde CHPT, CPT, HPT y CH fueron suplementadas el contenido de aminas biogénicas totales fue de 1581, 1125, 1325 y 1184 mg kg⁻¹ respectivamente. Para la dieta comercial el contenido de aminas biogénicas antes y después de la prueba de estabilidad fue menor a los límites de detección. Después de la

prueba de estabilidad en las dietas experimentales, el contenido de aminos fue alrededor del 20% del valor inicial.

1.4.3.- BIOENSAYO DE CRECIMIENTO

Los resultados del bioensayo de crecimiento en los organismos alimentados con las dietas suplementadas con harinas de arenque y combinaciones de aminos son mostrados en la Tabla 10. Los organismos que consumieron la dieta suplementada con la harina de pescado elaborada a partir de arenque descompuesto disminuyeron el consumo de alimento, ganancia en peso y supervivencia en un 14, 10 y 14% respectivamente. Los organismos alimentados con las combinaciones CHPT, CPT, y HPT consumieron la misma cantidad de alimento (0.43g), en cambio la suplementación con CH incremento significativamente el valor de éste parámetro (0.45 g). La ganancia en peso de los organismos alimentados con la dieta suplementada con CH fue mayor (393%) en comparación con los organismos alimentados con la dieta que contenía la harina elaborada a partir de arenque fresco (354%). Los organismos alimentados con la dieta comercial mostraron un pobre crecimiento al final del experimento (318%) en comparación con el resto de las dietas experimentales. La supervivencia fue reducida significativamente por el deterioro del arenque: los organismos alimentados con la dieta que contenía la harina elaborada a partir de arenque descompuesto presentaron una supervivencia del 76%, mientras que los alimentados con la dieta que contenía la harina de arenque fresco presentaron una supervivencia del 89% al final del experimento. La supervivencia de los organismos alimentados con las diferentes combinaciones de aminos fue mayor al 92% al final del experimento.

Tabla 10.- Consumo de alimento, crecimiento, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia de los organismos alimentados con dietas suplementadas con harinas de arenque.

	FRH	DH	FRH+CHPT	FRH+CPT	FRH+HPT	FRH+CH	Sig.
Peso (g) ¹							
Inicial	.077±0.01	.077±0.01	.077±0.01	.077±0.01	.077±0.01	.077±0.01	0.9999
14 días	.174±0.03	.169±0.03	.169±0.03	.175±0.03	.173±0.03	.179±0.03	0.3200
28 días	.348±0.06b	.335±0.07a	.358±0.06b	.356±0.06b	.297±0.08a	.385±0.06b	0.0174
Garancia en peso(%)²							
14 días	128±11	119±9	118±10	125±6	123±11	133±3	0.1138
28 días	354±15abc	317±15a	350±23ab	348±25ab	360±11bc	393±23c	0.0149
Consumo de alimento(g) ²							
14 días	.14±.005ab ³	.13±.006a	.14±.001b	.14±.003b	.14±.004b	.14±.002b	0.0451
28 días	.43±.008b	.37±.010a	.43±.021b	.43±.012b	.42±.021b	.45±.021c	0.0000
Tasa de conversión alimenticia²							
14 días	1.42±.12	1.47±.09	1.54±.12	1.47±.07	1.39±.11	1.46±.03	0.1968
28 días	1.56±.06	1.49±.09	1.59±.11	1.61±.08	1.54±.18	1.49±.10	0.4692
Sobrevivencia (%) ²							
14 días	97±4	93±8	97±5.96	97±4	99±3	97±4	0.6579
28 días	89±6b	76±11a	93±6.57b	95±9b	92±9b	96±4b	0.0057

¹ Medias de valores individuales (5 X 15 = 75 organismos por tratamiento al inicio del experimento)

² Medias de 5 valores obtenidos a partir de los replicados a los 14 y 28 días del bioensayo

³ Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

Los resultados del bioensayo de crecimiento en los organismos alimentados con las dietas suplementadas con harinas de anchoveta son mostrados en la Tabla 11. Los camarones alimentados con las harinas elaboradas a partir de anchoveta medianamente fresca y descompuesta consumieron menos alimento (0.65g), en comparación con los organismos alimentados con la dieta suplementada con harina de anchoveta elaborada a partir de pescado fresco (0.82g), estos organismos presentaron además los más pobres crecimientos (463 y 516%). La supervivencia fue reducida en un 8% en los organismos que consumieron la dieta que contenía la harina elaborada a partir de anchoveta descompuesta, sin embargo la diferencia no llegó a ser significativo.

Tabla 11.- Consumo de alimento, crecimiento, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia de los organismos alimentados con las dietas suplementadas con harinas de anchoveta.

Dieta	FRA	MFRA	DA	R1	Sig.
Peso (g)¹					
Inicial	.072±.01	.072±.01	.072±.01	.072±.01	0.9726
14 días	.21±.06	.18±.06	.18±.07	.15±.03	0.1709
28 días	.46±.15a ²	.35±.12b	.33±.11b	.26±.08	<0.0001
36 días	.58±.20a	.42±.15b	.43±.14b	.30±.09	<0.0001
Ganancia en peso (%)²					
14 días	186±22	159±33	153±33	111±18	0.2047
28 días	527±90a	375±87b	364±55b	260±27	0.0113
36 días	694±163a	463±133ab	516±121b	318±62	0.0554
Consumo de alimento(g)²					
14 días	.19±.02	.18±.02	.20±.05	.13±.01	0.6827
28 días	.56±.07a	.46±.05b	.45±.08b	.34±.02	0.0459
36 días	.82±.13a	.65±.09b	.65±.09b	.49±.02	0.0357
Tasa de conversión alimenticia²					
14 días	1.43±.10	1.61±.31	1.82±.30	1.66±.18	0.0904
28 días	1.48±.14	1.74±.36	1.74±.17	1.84±.21	0.1869
36 días	1.66±.19	2.04±.48	1.79±.29	2.21±.38	0.2567
Sobrevivencia (%)²					
14 días	96±6	98±5	92±5	98±5	0.1780
28 días	88±5	94±6	86±5	96±5	0.0745
36 días	86±5	88±11	78±18	94±9	0.4347

¹ Medias de valores individuales (5 X 10 = 50 organismos por tratamiento)

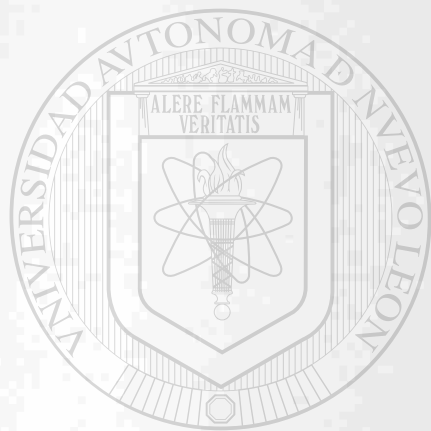
² Medias de 5 valores obtenidos a partir de los replicados a los 14, 28 y 36 días del bioensayo

³ Letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

1.4.4.- NIVELES DE AMINAS EN TEJIDO DE CAMARON

Las aminas detectadas en tejido de camarón fueron cadaverina, espermidina y espermina; los valores histamina y putrescina fueron por debajo de los límites de detección ($50 \mu\text{g mg}^{-1}$). Los niveles para las tres primeras aminas variaron de 7.8 a 63 y de 73 a 393 $\mu\text{g mg}^{-1}$ en el músculo y hepatopancreas respectivamente. La suplementación con harina de pescado elaborada a partir de arenque descompuesto o

la suplementación de aminos no afectó significativamente el contenido de aminos en el tejido del camarón; sin embargo, observamos que los organismos que consumieron las dietas suplementadas con la harina elaborada a partir de arenque descompuesto y las suplementadas con cadaverina incrementaron ligeramente la concentración de este compuesto en el tejido (Fig. 5).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIOTECNICAS

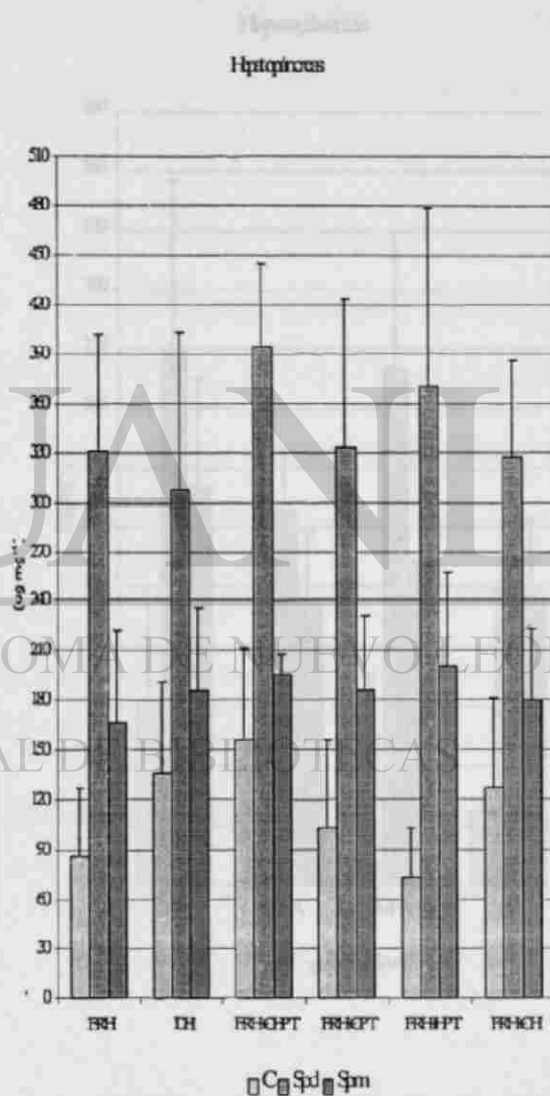
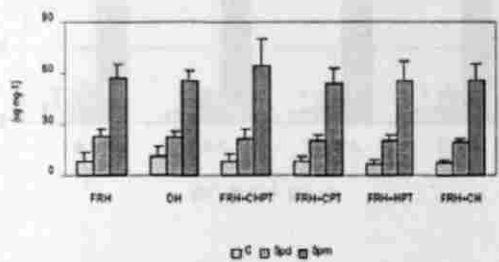


Fig 5.- Contenido de aminos en tejido de camarón alimentados con dietas suplementadas con harinas de arenque

La dieta suplementada con harina de pescado elaborada a partir de anchoveta descompuesta incremento significativamente el contenido de cadaverina en el músculo del camarón ($P = 0.0369$). Las concentraciones de las diferentes aminas en músculo y hepatopáncreas de camarón variaron entre 3.4 y 76 y entre 37 y 269 $\mu\text{g mg}^{-1}$ respectivamente (Fig 6).

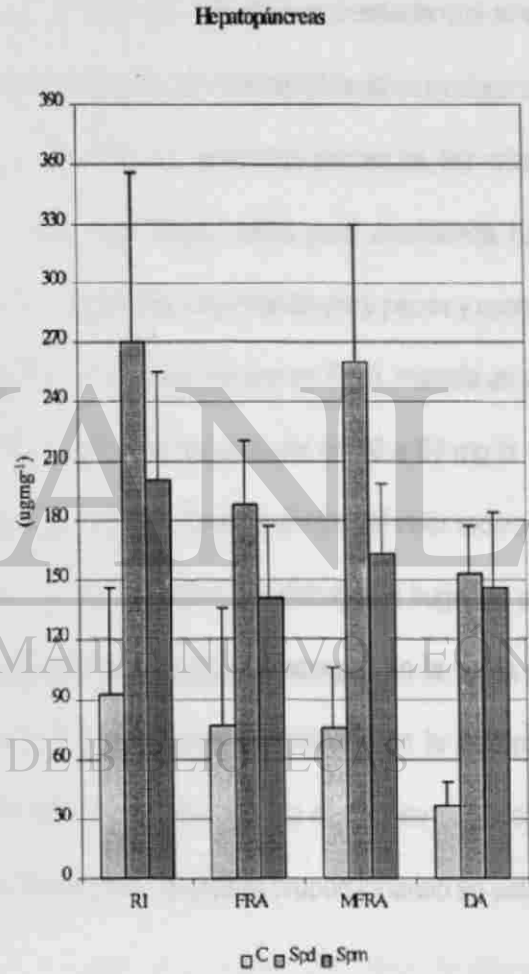
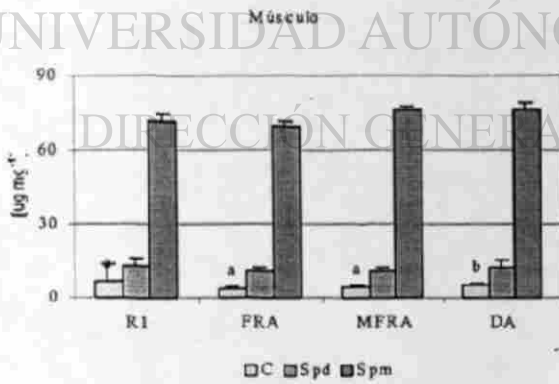
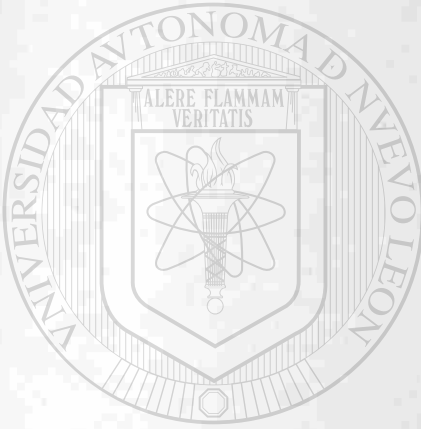


Fig 6.- Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con dietas suplementadas con harinas de anchoveta.

1.5.- DISCUSIONES

1.5.1.- HARINA DE PESCADO EXPERIMENTALES

Pike (1996) reportó valores de TVN para harinas de arenque elaboradas a partir de pescado fresco, medianamente fresco y descompuesto de 22, 62 y 143 mg N 100 g⁻¹ y recomienda que el valor de TVN en la materia prima para la elaboración de harinas de pescado para salmónidos no sea mayor a 50 mg N 100g⁻¹ de lo contrario el crecimiento del salmón es reducido. En el ámbito comercial, los criterios de calidad para la selección de harinas de pescado, tanto para peces como para crustáceos han sido determinados por cada empresa. La compañía TRIPESCA en Chile, recomienda para peces y camarón un valor de TVN en la materia prima de 100 y 120 mg N 100 g⁻¹. El grupo Austral en Perú, maneja un valor de 100 a 150 mg N 100 g⁻¹ y en México, el grupo PROESA utiliza un rango entre de 50 a 80 mg N 100 g⁻¹. Para el primer grupo de harinas experimentales el valor de TVN se encuentra dentro del valor recomendado por Pike (1996); mientras que para el segundo grupo los valores están por debajo del sugerido por este investigador y por los valores usados por compañías comerciales que se encargan de la venta de esta materia prima. Es importante remarcar que el valor de TVN solamente es aplicable en la materia prima (pescado) y no al producto terminado (harina de pescado) debido a que durante el proceso de secado de la materia prima algunas bases nitrogenadas, tal como el amonio, se volatilizan proporcionando en este último caso un valor real bajo.

Mundheim & Opstvedt (1993) por otro lado, observaron en harinas de pescado elaboradas a partir de arenque con diferente grado de frescura de la materia prima valores de 20 a 30% de nitrógeno soluble. Por su parte, Aksnes & Mundheim (1997) reportaron valores de 18.8 a 22.3%. Los valores de

proteína soluble en las harinas de pescado experimentales oscilaron de 20 a 27% concordando con los valores citados por estos investigadores.

Pike & Hardy (1997) reportan que para obtener un máximo crecimiento en salmónidos se deben utilizar harinas de pescado elaboradas a partir de arenque y anchoveta con un nivel de aminos totales (histamina, cadaverina, putrescina y tiramina) no mayor a 2000 y 4000 mg kg⁻¹. En las harinas de pescado utilizadas en éste experimento el contenido de aminos totales fue de 8819 y 7873 mg kg⁻¹ para las harinas elaboradas a partir de arenque y anchoveta descompuesta. Es bien conocido que el tipo de amina así como los niveles encontrados en el producto final, depende principalmente del tiempo y condiciones de almacenado del pescado, número y tipo de bacteria presentes durante el proceso de deterioro, así como del daño físico que sufre el pescado durante su captura (Pike, 1996). En la harina elaborada a partir de arenque descompuesto las aminos predominantes fueron cadaverina e histamina; mientras que para la harina elaborada a partir de anchoveta descompuesta fue histamina.

El efecto del deterioro de la materia prima sobre la digestibilidad de la proteína es variable.

Aksnes & Mundheim (1997) y Pike (1996) observaron en mink una disminución de 1.6 puntos en la digestibilidad de la proteína en harinas elaboradas a partir de arenque descompuesto. En el presente trabajo, la harina de arenque elaborada a partir de pescado descompuesto muestra un descenso de tan sólo 0.2 puntos; mientras que para las harinas elaboradas a partir de anchoveta medianamente fresca y descompuesta, la digestibilidad in vivo in mink fue reducida 1.6 y 1.7 puntos respectivamente.

Uno de los parámetros que más afectan la digestibilidad de la proteína es la temperatura debido a la formación de puentes disulfuros en la proteína durante el proceso de secado. Aksnes & Mundheim (1997) y Pike (1996) observaron en mink una disminución en la digestibilidad de la proteína de

5.9 y 4.2 puntos cuando la harina fue secada a 95 y 140°C respectivamente. Por su parte, Nieto-López (1995) reportó una disminución de 40 puntos de la digestibilidad de proteína evaluada en camarón blanco *L. vannamei* debido al sobrecalentamiento de la harina de pescado (105°C durante 5 horas). Este mismo autor determinó la digestibilidad in vivo de la proteína de nuestro segundo lote de harinas de pescado experimentales en camarón blanco *L. vannamei* y observó que la digestibilidad de la proteína presentaba diferencias significativas entre las tres harinas ($P = 0.0005$): la digestibilidad de la proteína en las harinas elaboradas a partir de anchoveta fresca, medianamente fresca y descompuesta fue de 83.1(a), 75.6(a) y 104.1(b)% respectivamente. Los solubles de pescado contienen principalmente aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular, que al ser consumidos por el camarón son absorbidos inmediatamente; sin embargo estos no son aprovechados; el pobre crecimiento observado en los organismos alimentados con las harinas elaboradas a partir de pescado descompuesto nos permite confirmar lo antes mencionado. Por otro lado, los compuestos de los solubles de pescado son fácilmente lixiviados al contacto con el agua, causando un error por solubilidad en la determinación de la digestibilidad in vivo; el valor de digestibilidad in vivo de la proteína de la harina elaborada a partir de arenque descompuesto fue mayor al 100%, indicando que la solubilidad de la proteína de la harina de pescado causa una sobre estimación de este valor.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.5.2.- BIOENSAYO DE CRECIMIENTO.

1.5.2.1. - CONSUMO DE ALIMENTO

La alimentación del salmón del Atlántico (Pike & Hardy, 1997; Anderson *et al.*, 1997; Opstvedt *et al.*, 1999) y fletan del Atlántico (Aksnes & Mundheim, 1997) con dietas suplementadas con harinas de pescado elaboradas a partir de arenque o anchoveta descompuesta ha mostrado disminuir el consumo de alimento. En camarón, se ha observado que la disminución en el consumo de alimento es más notable para

L. stilyirostris y *P. monodon* que para *L. vannamei*, ya que, para *L. vannamei*, la disminución en el consumo de alimento fue significativa solo para los organismos de 1 g (Risque *et al.*, 1998).

Ha sido ampliamente reportado que el deterioro de la materia prima genera un sin número de metabolitos tales como TMA (trimetilamina), DMA (dimetilamina), formaldehído, compuestos sulfurados, amoníaco, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, etanol, propanol y isopropanol; los cuales dan origen al mal olor y sabor del pescado (Fraser & Sumar, 1998). Hughes (1991) observó que la adición de TMA en dietas para salmón del Pacífico redujo el consumo de alimento. En el presente estudio, el consumo de alimento fue drásticamente disminuido cuando los organismos consumieron las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque o anchoveta descompuesta, confirmando que el consumo de este tipo de harinas de pescado son antipalatables para el camarón probablemente debido a la generación de este tipo de compuestos.

Por otro lado, Mendoza y colaboradores (1997) evaluaron el efecto atrayente de varias sustancias (feromonas y aminas biogénicas) en langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, observando que la cadaverina fue el mejor atrayente para esta especie. En el presente estudio, se observó que las combinaciones de CHPT, CPT y HPT no incrementaron el consumo de alimento, contrariamente a la combinación CH. Posiblemente la presencia de putrescina y tiramina en la dieta para camarón produzca un efecto anti atrayente, lo cual explicaría los resultados observados en estos bioensayos, sin embargo se necesita realizar más experimentos para poder confirmar esta hipótesis.

1.5.2.2. - GANANCIA EN PESO.

Pike (1996) observó en salmón del Atlántico un crecimiento específico de 1.2 y 1.5% por día en organismos alimentados con dietas donde fueron suplementadas harinas de arenque y anchoveta elaboradas a partir de pescado descompuesto; mientras que los organismos alimentados con las harinas de arenque y anchoveta elaboradas a partir de pescado fresco presentaron un crecimiento específico de 1.7 y 1.6% respectivamente. Aksnes & Mundheim (1997) por su parte reportaron una fuerte disminución de crecimiento en salmón del Atlántico alimentado con una dieta suplementada con una harina elaborada a partir de arenque descompuesto. El primer grupo de harinas de pescado fue evaluado por Opstvedt y colaboradores (1999) en salmón del Atlántico observando una drástica disminución en el crecimiento (212 vs 99 g).

En camarón, Rique y colaboradores (1998) evaluaron el segundo grupo de harinas de pescado y reportan una disminución en la ganancia en peso de 20 y 15% en *P. monodon* y *L. stylirostris* alimentados con la harina de pescado elaborada a partir de anchoveta descompuesta; mientras que el crecimiento de *L. vannamei* fue afectado solo en organismos de menos de 1g. En el presente estudio, el crecimiento del camarón fue disminuido en 10 y 26 % cuando fueron alimentados con las dietas suplementadas con las harinas de pescado elaboradas a partir de arenque y anchoveta descompuesta.

En aves se ha reportado un incremento en el crecimiento con dietas suplementadas con 2000 mg kg⁻¹ de putrescina; sin embargo, la suplementación por encima de este nivel de inclusión disminuyó la ganancia en peso (Smith, 1990). En salmónidos, el efecto de la suplementación de aminas sobre el crecimiento es contradictorio. Watanabe y colaboradores (1987) reportaron que el uso de harinas de pescado conteniendo 70 mg histamina kg⁻¹ en dietas para trucha arco iris incrementó ligeramente la

utilización neta de la proteína. Fairgrieve *et al.* (1994), Cowey & Cho (1992) y Fairgrieve *et al.* (1998) por su parte concluyen que la suplementación de aminas (cadaverina, putrescina, histamina) no mejoró la ganancia en peso. En camarón, Cruz-Suárez *et al.* (1996b) observaron un incremento del 8% en la ganancia en peso del camarón blanco alimentado con una harina de pescado que se caracterizaba por contener niveles moderados de aminas biogénicas (746 mg kg⁻¹). En el presente estudio se observó un incremento en peso de los organismos alimentados con las combinaciones de HPT y CH; esta última combinación incremento 11% este parámetro. La manera en que la suplementación de histamina y cadaverina mejoraron el crecimiento en este experimento no quedó clara siendo necesario realizar más experimentos para poder concluir si este efecto positivo es debido al consumo de cadaverina o histamina o posiblemente es un efecto combinado.

1.5.2.3. - TASA DE CONVERSION ALIMENTICIA.

Nakazoe *et al.* (1994), Romero *et al.* (1994), Clancy *et al.* (1995), Anderson *et al.* (1997), Pike & Hardy (1997), Ricque *et al.* (1998) y Opstvedt *et al.* (1999) han evaluado harinas de pescado hechas con materias primas de diferente grado de frescura y observaron que la tasa de conversión alimenticia no fue afectada significativamente por el consumo de estas harinas. Los productos generados en el deterioro del pescado durante su almacenamiento solo actúan sobre el consumo de alimento (efecto anti palatable) y en ocasiones sobre la sobrevivencia (efecto tóxico) pero no sobre la calidad nutricional de la harina terminada. En el presente estudio el deterioro de la materia prima no tuvo ningún efecto significativo sobre este parámetro.

1.5.2.4. - SOBREVIVENCIA.

El efecto de la frescura de la materia sobre la supervivencia en camarón no ha sido muy claro. Cruz-Suarez y colaboradores (1994) reportan una disminución del 20% en la supervivencia del camarón blanco *L. vannamei* alimentados con harinas de pescado ricas en aminas biogénicas (3491 mg kg⁻¹). Ricque *et al.* (1998) por su parte concluyeron que la supervivencia no fue afectada en tres especies de camarón (*L. stylirostris*, *L. vannamei* y *P. monodon*) alimentados con el segundo grupo de harinas experimentales utilizadas en este estudio. En el presente caso observamos una mortalidad significativa en los organismos que consumieron la harina elaborada a partir de arenque descompuesto (89 vs 76); también la supervivencia de los organismos que consumieron la harina elaborada a partir de anchoveta descompuesta fue ligeramente disminuida (86 vs 78%). Al observar el contenido de aminas totales en las harinas experimentales elaboradas a partir de arenque y anchoveta descompuesta, observamos que las concentraciones son muy similares (8819 y 7873 mg kg⁻¹); se tenía la sospecha de que el consumo de aminas biogénicas en altas concentraciones podría afectar la supervivencia del camarón, sin embargo pudimos demostrar en el presente estudio que estas no son las responsables de causar mortalidad. Cabe recalcar que el tiempo de almacenado de la materia prima para la harina elaborada a partir de arenque descompuesto fue de 9 días, mientras que para la harina elaborada a partir de anchoveta descompuesta fue de 36 horas. La variación en el tiempo de almacenado de esta materia prima nos hace suponer que durante la descomposición del arenque otros compuestos tóxicos fueron generados causando mortalidad al camarón y los cuales no fueron producidos durante el deterioro de la anchoveta.

Pensamos que los lipopolisacáridos provenientes de la pared celular de las bacterias G(-) son las responsables de esta mortalidad, desafortunadamente debido a que se presentaron interferencias en

los análisis de endotoxinas fue imposible constatar que estos compuestos fueron los responsables de reducir dramáticamente la sobrevivencia del camarón.

1.5.2. 5. - CONTENIDO DE AMINAS EN TEJIDO.

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) han sido relacionadas con procesos de crecimiento y regeneración de tejido (Bardocz *et al.* , 1993; Seidel & Scemama, 1997). En el presente estudio, los niveles de poliaminas en hepatopáncreas fueron aproximadamente 3 veces mayor en comparación con el músculo del camarón; estas diferencias son de esperarse debido a que el hepatopáncreas tiene mucho mayor actividad metabólica en comparación con el músculo.

El alimento así como la presencia de bacterias presentes en el tracto digestivo son fuentes de aminas; aunque existen reportes donde se muestra que el aporte de aminas por microorganismos es mínimo y es el alimento la principal fuente de aminas (Noack *et al.* , 1996). En el presente trabajo, los organismos se dejaron sin alimentar 24 horas antes del muestreo con el fin de evitar una posible aportación de aminas por el alimento. Con estos argumentos podemos decir que los altos niveles de aminas detectados en el tejido del camarón provienen de este y no del alimento; el metabolismo de cada una de las aminas presentes en el tejido del camarón será discutido en el próximo capítulo.

1.6. - CONCLUSIONES

Con estos resultados podemos concluir que:

- a) La frescura de la materia prima tanto de harinas de pescado elaboradas a partir de arenque y anchoveta descompuesta afecta el consumo de alimento y el crecimiento del camarón azul *L. stylirostris*.
- b) La (s) sustancia(s) causante(s) de mortalidad en camarón no se encuentra presente en todas las harinas elaboradas a partir de pescado descompuesto, si no que es (son) generada(s) bajo ciertas condiciones de almacenado.
- c) Las aminas no son las causantes de estos efectos negativos, por el contrario la combinación de cadaverina e histamina mejoró la ganancia en peso por un incremento en el consumo de alimento.
- d) La frescura de la materia prima no afecta la concentración de aminas en tejido de camarón.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PARTE II: SUPLEMENTACION DE AMINAS BIOGENICAS

2.1. - RESUMEN

Se ha demostrado que la suplementación dietaria con harinas de pescado conteniendo grandes cantidades de aminas biogénicas reduce el consumo de alimento y la ganancia en peso del camarón y en algunas ocasiones la supervivencia puede ser mermada. Por otro lado, ha sido observado que el uso de harinas de pescado con niveles moderados de aminas incrementa la ganancia en peso del camarón. Se sospecha que las aminas biogénicas a altas dosis pudieran ser las causantes del efecto negativo sobre el crecimiento y a la vez pueden actuar como un promotor de crecimiento a bajas concentraciones. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la adición de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina en alimentos para camarón a diferentes niveles de suplementación sobre el crecimiento, consumo de alimento y sobrevivencia del camarón azul *L. stylirostris*, así como el contenido de éstos compuestos en el tejido de camarones alimentados con estas dietas experimentales.

Se fabricó una dieta basal cumpliendo los requerimientos nutricionales para camarón azul; y a partir de ésta dieta fueron elaboradas 25 alimentos adicionales; los cuales fueron suplementados con histamina, cadaverina, putrescina, espermidina ó espermina a 600, 1200, 2400, 3600 y 4800 mg kg⁻¹. Estas dietas experimentales fueron evaluadas durante 28 días en *L. stylirostris* con un peso promedio inicial que vario de 66 a 75 mg, con 5 (histamina y cadaverina) o 3 (putrescina, espermidina y espermina) replicados por tratamiento y 10 organismos por acuario.

La suplementación de histamina y cadaverina no afectó el consumo de alimento; en cambio la adición de putrescina, espermidina y espermina incrementaron este parámetro. La adición de histamina y espermina mejoraron significativamente la ganancia en peso; los organismos alimentados con 1200 y 2400 mg kg⁻¹ de histamina y 1100 mg kg⁻¹ de espermina mostraron los mejores crecimientos, este mismo resultado fue observado en los organismos alimentados con las dietas suplementadas con espermidina a todos los niveles de suplementación; sin embargo los altos niveles de suplementación de estas aminas así como la adición de cadaverina redujeron este parámetro. La tasa de supervivencia no fue afectada por la suplementación de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina o espermina. La tasa de conversión alimenticia solamente fue afectada significativamente por la suplementación de espermina, la suplementación de 1100 mg kg⁻¹ dio la mejor tasa de conversión (1.5).

Los organismos alimentados con histamina y putrescina dietaria presentaron concentraciones de estas aminas en tejido por debajo de los límites de detección (50 µg mg⁻¹); en cambio la adición de putrescina, espermidina y espermina en los alimentos incrementaron significativamente la concentración de espermidina en el tejido de los organismos alimentados con dichos alimentos.

Con estos resultados concluimos que la suplementación de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina a las dosis evaluadas en este estudio no afectó la supervivencia. La suplementación de histamina, putrescina, espermidina y espermina incrementó la ganancia en peso; sin embargo altos niveles de suplementación provocaron una reducción en este parámetro. La suplementación de 1100 mg kg⁻¹ de putrescina así como todos los niveles de suplementación de

espermidina y espermina incrementaron la ingesta de alimento. El camarón cuenta con sistemas para metabolizar aminas ya sea para formar nuevas aminas (i.e. putrescina y espermina son metabolizadas para formar espermidina) o para excretarlas tal como ha sido reportado en otros organismos.

2.2. - INTRODUCCION

Las aminas biogénicas se encuentran naturalmente presentes a bajas concentraciones en ingredientes y alimentos, no constituyendo un peligro su consumo (Bardocz *et al.*, 1993); sin embargo su presencia a elevadas concentraciones es indicativo de un proceso de deterioro (ten Brink, *et al.*, 1990; Sander *et al.*, 1996; Veciana-Nogues *et al.*, 1997) y su ingesta puede ocasionar cambios en la presión sanguínea (feniletilamina), disminución de la motilidad del intestino, diarrea, estimulación de la secreción de ácido gástrico (histamina), capacidad vasoactiva (histamina) etc.

En aves, el consumo de histamina ha provocado erosión de la molleja (Galleguillos, 1995); mientras que la suplementación de putrescina (Smith, 1990), cadaverina (Smith *et al.*, 1996b), espermidina (Smith *et al.*, 1996a) y espermina (Smith & Sousadias, 1995) a elevadas concentraciones redujo el consumo de alimento y el crecimiento.

Debido a que estos compuestos son termoestables han sido utilizados como criterios de calidad para la selección de harinas de pescado utilizadas para la elaboración de alimentos acuícolas (Messerich, 1994; citado por Subramayam, 1996; Cruz-Suárez *et al.*, 1995; Pike & Hardy, 1997). El efecto de la alimentación a peces con dietas suplementadas con aminas no está claro. Cowey & Cho (1992) concluyeron que el suministro de alimentos suplementados con altos niveles de putrescina (13300 mg kg

1) a trucha arco iris reduce su crecimiento y así como el consumo de dicho alimento; sin embargo, cuando esta poliamina fue suplementada a 4000 mg kg⁻¹ no causó ningún efecto negativo. Fairgrieve *et al.* (1994) y Castro (1991) por su parte observaron que la alimentación de histamina causó lesiones en el intestino de la trucha arco iris; sin afectar el crecimiento, tasa de conversión alimenticia, consumo de alimento y sobrevivencia. En camarón, se ha reportado una disminución en el consumo de alimento, crecimiento y en algunas ocasiones mortalidades cuando fueron alimentados con dietas suplementadas con harinas de pescado caracterizadas por contener altos niveles de aminas biogénicas (H, C, P, T y F, 3491 mg kg⁻¹); aunque, cuando utilizaron harinas de pescado con niveles moderados de estos compuestos (746 mg kg⁻¹) se observó una mejora en la ganancia en peso (Abdo de la Parra, 1994; Tapia-Salazar *et al.*, 1996). En el bioensayo donde se evaluó el efecto de la combinación de aminas biogénicas (parte I), se observó un efecto promotor de crecimiento en los camarones alimentados con la dieta suplementada con cadaverina e histamina. Debido a que fue imposible determinar si la mejora en ganancia fue ocasionada por el consumo de cadaverina o histamina; el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina a niveles crecientes sobre el crecimiento y sobrevivencia del camarón azul *L. stylirostris* así como su impacto en el contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con estas dietas.

2.3. - MATERIAL Y METODOS

2.3.1. - DIETAS EXPERIMENTALES

Una dieta basal (control) fue formulada (Tabla 12) cubriendo los requerimientos nutricionales para peneidos establecidos por Akiyama *et al.* (1991). 25 dietas experimentales mas

fueron elaboradas a partir de esta fórmula base y suplementadas con 1000, 2000, 4000, 6000 y 8000 mg kg⁻¹ de sales de aminas (histamina hidrociorada, cadaverina dihidrociorada, putrescina dihidrociorada, espermidina trihidrociorada o espermina tetrahidrociorada) para obtener en los alimentos concentraciones de aminas libres: 600, 1200, 2400, 3600 y 4800 mg kg⁻¹ para las dietas suplementadas con histamina (2-[4-imidazolyl] ethylamine); 500, 1100, 2300, 3500 y 4600 mg kg⁻¹ para las suplementadas con cadaverina (1-5 diaminopentane); 500, 1100, 2200, 3300 y 4400 mg kg⁻¹ para las suplementadas con putrescina (1,4-diaminebutane tetramethylenediamine); 500, 1100, 2200, 3400 y 4500 mg kg⁻¹ para las suplementadas con espermidina (N-[3-aminopropil]-1,4-butanediamine) y 500, 1100, 2300, 3400 y 4600 mg kg⁻¹ para las suplementadas con espermina (N,N'-bis [3-aminopropil]-1,4-butanediamine). La dieta control fue manufacturada una sola vez para ser usada en todos los experimentos. Una dieta comercial, Rangen migaja, fue utilizada como control externo en los bioensayos nutricionales donde las dietas suplementadas con histamina y cadaverina fueron evaluadas. La dieta comercial utilizada para el primer bioensayo fue proporcionada por la granja de camarón Aquastral S.A. de C.V. (R1) y para el segundo fue suministrada por el distribuidor en México del alimento de la compañía Rangen Inc. (R2).

Tabla 12. Fórmula base (% base húmeda).

	(%)
Harina de pescado ¹	29.20
Pasta de soya ²	36.10
Harina de trigo ³	23.10
Mezcla vitamínica ⁴	0.25
Mezcla mineral ⁵	0.25
Coestero ⁶	0.14
Acido algínico ⁷	3.00
Hexametáfosfato de sodio ⁸	1.00
Etoxiquin ⁹	0.02
Lecitina de soya F-100 ¹⁰	2.50
Aceite de pescado ¹¹	3.93
Flavorpack ¹²	0.50

¹ Fundación Chile. Composición química: humedad 7.2%, proteína 70.5%, lípidos 8.4%, ceniza 14%, arena 0.1%, cloruros 2.3%, FFA 4.6%, histamina 545 ppm y TVN 105 mg 100g⁻¹

² Proteínas Naturales S.A. de C.V., Monterrey, Nuevo León

³ Harina de trigo para consumo humano (SAMs, Club)

^{4,12} INVE Bassrode, Belgium

⁶ SIGMA No. Cat. C-3292

⁷ Aldrich, USA, No. Cat. 18094-7

⁴ Aldrich, No. Cat. 30, 555-3;

⁸ Dresen Química, México

¹⁰ Central Soya, USA

¹¹ Inual-Tepual, Santiago, Chile.

Las dietas fueron elaboradas como se describió en la sección elaboración de dietas experimentales en la parte I. Las sales de aminos así como el atrayente fueron disueltas en 100 mL de agua y posteriormente incorporadas al resto de los ingredientes y mezclados durante 10 minutos antes de extraer. El análisis proximal así como el análisis de la pérdida de la materia seca en las dietas experimentales fueron llevados a cabo en este laboratorio utilizando las metodologías citadas en la sección dietas experimentales de la parte I. Cada dieta fue evaluada para pérdida de la materia seca con 6 replicados por dieta. El contenido de aminos antes y después de la prueba de estabilidad fue analizado por HPLC. Los análisis de aminos en las dietas suplementadas con histamina y cadaverina fueron realizados por la compañía Inual-Tepual en Chile; el resto fue analizado en el Departamento de Animal & Poultry Science de la Universidad de Guelph, Guelph, On., Ca. (Ver anexos para detalles).

2.3.2. - BIOENSAYO DE CRECIMIENTO

Estos experimentos fueron llevados a cabo en las instalaciones descritas anteriormente utilizando acuarios de fibra de vidrio de un volumen de 10 litros. Diariamente se realizó un recambio del 42% del volumen total de agua para mantener la calidad del agua en estos acuarios. Las dietas experimentales fueron evaluadas por 28 días en *Litopenaeus stylirostris* con un peso promedio inicial que varío de 61 a 76 mg, utilizando 5 (histamina y cadaverina) o 3 (putrescina, espermidina y espermina) replicados por dieta y con 10 organismos por acuario. Las condiciones de experimentación para estos bioensayos son resumidas en la Tabla 13. Los organismos utilizados para el bioensayo donde las dietas suplementadas con histamina y cadaverina fueron proporcionados por la granja de camarón Aquastrat y el laboratorio de postlarvas de camarón Manitec. Los organismos utilizados en el resto de los otros experimentos fueron proporcionados por la granja de camarón Seprofin.

Tabla 13.- Condiciones de experimentación.

Bioensayo	Histamina	Cadaverina	Putrescina y Espemidina	Espermina
Temperatura (°C)	28	28	29	29
Salinidad (g L ⁻¹)	35	35	30	30
pH	8.1	8.1	8.2	8.2
NH ₃ +NH ₄ (ppm)	0.66	0.66	0.68	0.68
NO ₂ ⁻ (ppm)	1.75	1.75	0.75	0.75
NO ₃ ⁻ (ppm)	98.5	98.5	146	146
OD (ppm)	4.9	4.9	5.0	5.0
Fosfatos (ppm)	0.5	0.50	0.45	0.45

2.3.3.- ANALISIS DEL CONTENIDO DE AMINAS EN TEJIDO DE CAMARON.

El procedimiento de muestro así como el método para el análisis de aminos en tejido de camarón fueron realizadas siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo III. Para la cuantificación de aminos en tejido de camarón se realizaron 5 (histamina y cadaverina) ó 3 (putrescina, espermidina y espermina) extracciones por tratamiento (1 por replicado) y una (muestras de hepatopáncreas de camarón) o dos (muestras de músculo de camarón) inyecciones por extracción.

2.3.4.- ANALISIS ESTADISTICO

Para determinar la forma de la curva de respuesta a niveles crecientes de cada una de las aminos evaluadas se realizó un análisis de regresión por contrastes ortogonales (Montgomery, 1991) utilizando el programa computacional SAS (1987). La tendencia lineal o cuadrática fue considerada significativa cuando $P \leq 0.05$. Las dietas comerciales fueron excluidas de los análisis estadísticos.®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.4. - RESULTADOS

2.4.1. - DIETAS EXPERIMENTALES

La composición química de las dietas experimentales es presentada en la Tabla 14. El contenido nutricional de las dietas experimentales fue cercano a los valores teóricos calculados. Los contenidos de humedad, proteína, lípidos, ceniza, fibra, extracto libre de nitrógeno y la pérdida de la

materia seca en las dietas experimentales fueron de 8.3 ± 0.4 , 40.8 ± 0.5 , 9.3 ± 0.2 , 8.5 ± 0.4 , 1.5 ± 0.2 , 31.7 ± 0.7 y $5.5\pm 0.9\%$ respectivamente. Para el caso de las dietas comerciales fueron de 8.6 ± 2 , 40.3 ± 2 , 9.3 ± 0.2 , 10.8 ± 0.4 , 2.6 ± 0.7 , 28.6 ± 3.0 y $6.3\pm 2\%$ respectivamente.

El contenido de aminas en las dietas experimentales es presentado en la Tabla 15. El contenido real de cada una de las aminas suplementadas en las dietas experimentales fue superior a las concentraciones teóricas; el nivel de histamina, cadaverina, putrescina y espermina variaron de 0.33 a 16%, de 2.39 a 9.8%, de -11.64 a 18.6% y de -18.40 a 2.82% de sus concentraciones teóricas. Las dietas suplementadas con espermina fueron las únicas que en su totalidad presentaron concentraciones por debajo de los niveles teóricos establecidos (-5.8 a -13.13%). Después de sumergir muestras de alimento en agua marina durante 1 hora, la concentración de aminas varió de 25 a 28, 18 a 31, 10 a 27, 20 a 47, 51 a 61% del valor inicial para las dietas suplementadas con histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina respectivamente. Para la dieta control los contenidos de histamina, espermidina y espermina fueron de 46, 69 y 64% del valor inicial; mientras que las concentraciones de cadaverina y putrescina fueron por debajo de los límites de detección. Para el caso de la dieta comercial, los niveles de aminas antes y después del análisis de la pérdida de la materia seca fueron menores a los límites de detección.

Tabla 14.- Composición química de las dietas suplementadas con aminos (% as fed).

	Humedad	Proteína	Lípidos	Ceniza	Fibra	ELN	PMS
Histamina							
0	8.4	40.0	9.3	8.7	1.7	31.9	5.8±.6
600	8.1	40.3	9.3	8.1	1.6	32.6	5.5±.8
1200	8.8	40.7	9.2	7.9	1.2	32.3	5.8±.5
2400	8.3	40.8	9.2	9.2	1.3	31.2	5.9±.5
3600	8.5	40.5	9.5	9.2	1.5	30.9	6.3±1
4800	8.2	41.3	9.2	8.5	1.6	31.2	6.3±.3
R(1)	9.8	41.7	9.4	10.5	2.1	26.5	7.9±.9
Gadaverina							
0	8.4	40.0	9.3	8.7	1.7	31.9	5.2±.6
500	8.4	40.2	9.4	8.4	1.8	31.8	5.7±.5
1100	8.6	40.3	9.5	8.5	1.6	31.5	5.5±.7
2300	9	40.7	9.5	8.2	1.7	30.9	5.5±.7
3500	8.9	40.6	9.2	8.2	1.6	31.5	5.2±1.3
4600	9	41.4	8.6	8.2	1.5	31.3	5.8±.6
R(2)	7.3	38.8	9.1	11	3.1	30.7	4.7±.9
Putrescina							
0	8.4	40.0	9.3	8.7	1.7	31.9	6.3±.6
500	7.9	40.1	9.5	8.4	1.5	32.6	5.9±1.8
1100	8.2	41.5	9.5	8.2	1.4	31.2	6.6±.6
2200	8	41.2	9.4	8.2	1.3	31.9	7.5±1.3
3300	7.9	41.0	9.3	8.3	1.2	32.4	7.3±.9
4400	7.8	41.0	9.2	8.6	1.3	32.1	6.9±1
Espermidina							
0	8.4	40.0	9.3	8.7	1.7	31.9	3.7±.7
500	8.1	40.3	9.1	8.4	1.6	32.5	4.9±1
1100	8	41.2	9.4	9	1.8	30.8	4.6±1
2200	8.1	41.1	9.2	8.3	1.8	31.5	4.6±1
3400	7.9	40.8	9	8.3	1.8	32.2	4.8±2
4500	8	41.7	9.1	8.7	1.7	30.8	4.8±2
Espermina							
0	8.4	40.0	9.3	8.7	1.7	31.9	3.3±1
500	8.4	40.3	9.5	8.2	1.5	32.1	4.2±1
1100	8.2	40.8	9.6	9.2	1.3	30.9	4.0±2
2300	8.4	40.0	9.7	8	1.3	32.6	4.5±1
3400	7.6	40.9	9.6	8.2	1.2	32.5	5.3±2
4600	7.8	41.1	9.5	9.5	1.3	30.8	4.6±1

Tabla 15.- Contenido de aminos en los alimentos para camarón suplementados con aminos antes (A) y después (D) de la prueba de estabilidad (mg de amina libre kg⁻¹ de alimento).

Dietas suplementadas con histidina														
Nivel suplementado	0		500		1000		2400		3600		4800		R1	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
H	380	173	1003	242	1964	445	3123	788	4443	1110	3932	1419	<50	<50
C	115	<50	48	<50	82	<50	325	<50	75	<50	81	<50	<50	<50
P	32	<50	4	<50	21	<50	151	<50	20	<50	35	<50	<50	<50
T	30	<50	7	<50	2	<50	168	<50	9	<50	68	<50	<50	<50
Sod	125	<50	125	<50	119	<50	74	<50	133	<50	123	<50	<50	<50
Som	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150

Dietas suplementadas con cadaverina														
Nivel suplementado	0		500		1100		2300		3900		4600		R2	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	D	A
H	-	-	903	170	0	50	430	<50	394	<50	394	52	<3.5	<3.5
C	-	-	684	134	1251	222	2470	519	3419	806	4931	1547	<4.2	<4.2
P	-	-	12	<50	405	<50	30	<50	-	<50	12	<50	4.4	<2.2
T	-	-	120	<50	12	<50	149	<50	14	<50	5	90	2.8	<1.8
Sod	-	-	119	<50	118	<50	125	<50	119	<50	188	<50	1.9	<1.8
Som	-	-	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<150	<4.2	<5.2

Dietas suplementadas con putrescina														
Nivel suplementado	0		500		1100		2200		3300		4400			
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D		
H	492	170												
C	141	<2												
P	20	<2	581	57	1011	272	1964	683	3936	890	4500	1034		
T	88	<2												
Sod	88	<2												
Som	25	<5												

Dietas suplementadas con espermina														
Nivel suplementado	0		500		1100		2200		3400		4500			
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D		
H														
C														
P														
T														
Sod			406	305	1199	471	2326	891	3584	715	4602	2175		
Som														

Dietas suplementadas con espermina														
Nivel suplementado	0		500		1100		2300		3400		4500			
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D		
H														
C														
P														
T														
Sod														
Som			496	316	1050	530	2023	1032	2990	1633	4143	2403		

2.4.2.- BIOENSAYO DE CRECIMIENTO

2.4.2.1.- SUPLEMENTACION DE HISTAMINA

Los resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con dietas suplementadas con histamina se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16.- Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con histamina.

	P ^{a1} (g)	P ^{b1} (g)	CA ^{a2} (g)	CA ^{b2} (g)	GP ^{a2} (%)	GP ^{b2} (%)	TCA ^{a2}	TCA ^{b2}	S ^{a2} (%)	S ^{b2} (%)
R1	0.16	0.26	0.12	0.49	111	265	1.92	2.45	98	98
0	0.21	0.44	0.26	0.73	162	490	1.88	1.98	100	100
600	0.20	0.42	0.26	0.73	172	462	2.00	2.14	98	94
1200	0.22	0.47	0.25	0.74	191	532	1.73	1.87	100	92
2400	0.21	0.48	0.26	0.74	177	535	1.94	1.86	99	100
3600	0.21	0.44	0.25	0.73	187	490	1.83	2.01	96	98
4800	0.20	0.43	0.24	0.70	164	472	1.99	2.00	98	92
Pooled SD	0.01	0.04	0.02	0.04	14.2	49.2	0.14	0.17	4.54	8.72
Significancia										
Lineal	0.10	0.76	0.21	0.33	0.21	0.74	0.51	0.76	0.36	0.64
Cuadrática	0.14	0.04	0.73	0.15	0.09	0.04	0.17	0.17	0.93	0.63

^a Pesos promedios individuales

^b 5 valores por tratamiento

^a 14 días

^b 28 días.

El consumo de alimento, tasa de conversión alimenticia y sobrevivencia no fueron afectados significativamente por la suplementación de histamina. El consumo de alimento al final del experimento vario de 0.70 a 0.74 g; los organismos alimentados con 1200 y 2400 mg kg⁻¹ de histamina consumieron ligeramente más alimento. La tasa de conversión alimenticia vario de 1.86 a 2.14. Un

efecto cuadrático significativo ($P = 0.04$) fue observado al final del experimento en el peso final y en la ganancia en peso (Fig. 7); la suplementación de histamina a 1200 y 2400 mg kg^{-1} incremento el crecimiento en un 8.8% con respecto a la dieta control. La supervivencia al final del experimento en todos los tratamientos vario de 92 a 100%. La alimentación con la dieta comercial provocó un pobre crecimiento (265%) y una tasa de conversión alimenticia alta (2.45) en comparación con el resto de las dietas experimentales.

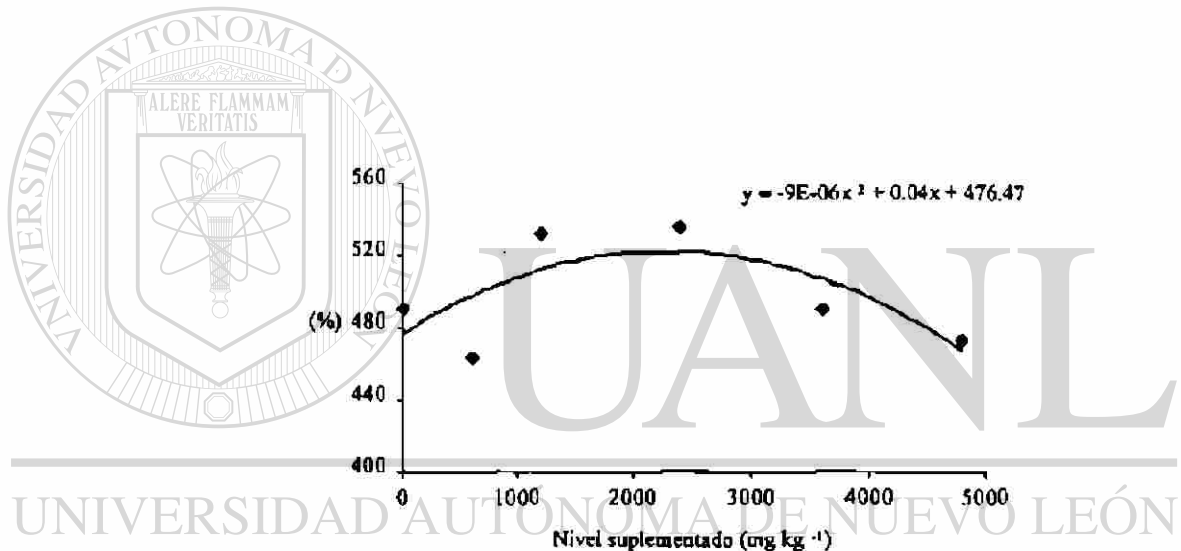


Figura 7.- Ganancia en peso de los organismos alimentados con histamina dietaria.

2.4.2.2.- SUPLEMENTACION DE CADAVERINA

La Tabla 17 muestra los resultados biológicos del bioensayo de crecimiento de los camarones alimentados con dietas suplementadas con cadaverina.

Tabla 17.- Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con cadaverina.

	P ^{a1}	P ^{b2}	CA ^{a2}	CA ^{b2}	GP ^{a2}	GP ^{b2}	TCA ^{a2}	TCA ^{b2}	S ^{a2}	S ^{b2}
	(g)	(g)	(g)	(g)	(%)	(%)			(%)	(%)
R2	0.17	0.26	0.25	0.52	124	250	2.76	2.91	98	93
0	0.27	0.43	0.34	0.70	249	471	1.82	2.04	98	99
500	0.24	0.41	0.34	0.64	220	443	2.02	1.96	100	96
1100	0.21	0.38	0.31	0.61	182	398	2.29	2.11	100	90
2300	0.26	0.43	0.34	0.67	243	484	1.85	1.98	98	92
3500	0.25	0.38	0.34	0.66	224	405	2.07	2.21	97	93
4600	0.24	0.42	0.33	0.68	218	450	2.09	2.02	100	93
Pooled SD	0.03	0.07	0.02	0.06	40.8	97.8	0.35	0.35	3.14	7.28
Significancia										
Lineal	0.89	0.90	0.68	0.76	0.80	0.80	0.56	0.74	0.75	0.29
Cuadrática	0.51	0.51	0.49	0.18	0.55	0.50	0.69	0.78	0.59	0.15

¹ Pesos individuales

² 5 valores por tratamiento

^a 14 días

^b 28 días.

El consumo de alimento, tasa de conversión alimenticia, sobrevivencia y ganancia en peso del camarón no fue afectada por el consumo de dietas suplementadas con cadaverina. El consumo de alimento y la tasa de conversión alimenticia variaron de 0.61 a 0.70g y de 1.96 a 2.21 respectivamente. La suplementación dietaria con niveles crecientes de aminos redujo la ganancia en peso en 6, 15, 1, 14 y 4% (no significativo). Al final del bioensayo, la sobrevivencia fue mayor al 90% en todos los tratamientos evaluados. Los organismos alimentados con la dieta Rangen migaja tuvieron un pobre crecimiento (250%) y una elevada tasa de conversión alimenticia (2.9).

2.4.2.3. - SUPLEMENTACION DE PUTRESCINA

Los resultados biológicos del efecto de la suplementación de putrescina en dietas para camarón se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18.- Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con putrescina.

	P ¹	P ²	CA ^{a2}	CA ^{b2}	GP ^{a2}	GP ^{b2}	TCA ^{a2}	TCA ^{b2}	S ^{a2}	S ^{b2}
	(g)	(g)	(g)	(g)	(%)	(%)			(%)	(%)
0	0.27	0.47	0.37	0.85	256	520	1.95	2.22	100	100
500	0.26	0.42	0.38	0.85	238	458	2.15	2.46	100	100
1100	0.27	0.44	0.39	0.89	256	483	2.04	2.46	100	100
2200	0.24	0.46	0.40	0.89	222	506	2.35	2.34	100	100
3300	0.28	0.5	0.40	0.93	278	592	1.93	2.09	100	100
4400	0.27	0.46	0.37	0.81	256	508	1.88	2.18	100	100
Pooled SD	0.02	0.05	0.02	0.07	29.5	64.2	0.21	0.33	-	-
Significancia										
Lineal	0.49	0.22	0.77	0.98	0.61	0.20	0.39	0.31	-	-
Cuadrática	0.57	0.73	0.11	0.16	0.59	0.81	0.11	0.66	-	-

¹ Pesos individuales

² 5 valores por tratamiento

^a 14 días

^b 28 días.

El consumo de alimento en los diferentes tratamientos vario de 0.81 a 0.93 g; se observó un incremento en este parámetro en los organismos alimentados con las dietas suplementadas con 500, 1100, 2200 y 3300 mg kg⁻¹; sin embargo, con el máximo nivel de suplementación el consumo fue menor. Los organismos alimentados con todos los niveles de suplementación redujeron la ganancia en peso entre un 3 a 12%; con excepción de la adición de 3300 mg kg⁻¹ mejoró este parámetro en un

13.84%. La tasa de conversión alimenticia no fue afectada significativamente por la suplementación de putrescina y vario de 2.1 a 2.5. Después de 28 días de experimentación, la sobrevivencia fue del 100% para todos los tratamientos.

2.4.2.4.- SUPLEMENTACION DE ESPERMIDINA

Los resultados de la evaluación de dietas suplementadas con espermidina se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19.- Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con espermidina.

	P ^{a1}	P ^{b1}	CA ^{a2}	CA ^{b2}	GP ^{a2}	GP ^{b2}	TCA ^{a2}	TCA ^{b2}	S ^{a2}	S ^{b2}
	(g)	(g)	(g)	(g)	(%)	(%)			(%)	(%)
0	0.27	0.47	0.37	0.86	257	520	1.94	2.20	100	99
500	0.26	0.48	0.40	0.86	247	538	2.15	2.23	100	100
1100	0.30	0.52	0.40	0.96	290	595	1.84	2.13	100	99
2200	0.26	0.53	0.40	0.92	253	604	2.14	2.04	100	97
3400	0.26	0.51	0.40	0.92	257	579	2.10	2.13	100	97
4500	0.29	0.56	0.41	0.93	283	639	1.94	1.99	100	97
Pooled SD	0.02	0.07	0.01	0.04	26.8	99.2	0.19	0.33	-	3.64
Significancia										
Lineal	0.53	0.21	0.03	0.06	0.43	0.21	0.87	0.41	-	0.26
Cuadrática	0.74	0.80	0.14	0.17	0.66	0.81	0.33	0.94	-	0.78

¹ Pesos individuales

² 5 valores por tratamiento

^a 14 días

^b 28 días.

El suministro a camarón de alimentos adicionados con espermidina incremento el consumo de alimento ($P = 0.06$); los organismos alimentados con las dietas suplementadas con

espermidina consumieron entre 0.86 y 0.96 g; en cambio los camarones alimentados con la dieta sin suplementar al final del experimento ingirieron 0.86g. La adición de espermidina a todos los niveles de suplementación provocó una mejor ganancia en peso, este parámetro fue mejorado hasta en un 21% con el máximo nivel de suplementación. La tasa de conversión alimenticia y la supervivencia no fueron afectadas por la alimentación con dietas ricas en esta poliamina; al final del experimento la tasa de conversión alimenticia y la supervivencia variaron de 2.04 a 2.23 y de 97 a 100% respectivamente.

2.4.2.5.- SUPLEMENTACION DE ESPERMINA

La Tabla 20 muestra los resultados de la evaluación del efecto de la suplementación de espermina en dietas para camarón.

Tabla 20.- Resultados del bioensayo de crecimiento de los organismos alimentados con espermina.

	P_{a1}	P_{b1}	CA ^{a2}	CA ^{b2}	GP ^{a2}	GP ^{b2}	TCA ^{a2}	TCA ^{b2}	S ^{a2}	S ^{b2}
	(g)	(g)	(g)	(g)	(%)	(%)			(%)	(%)
0	0.23	0.50	0.35	0.81	376	716	2.10	1.87	100	100
500	0.26	0.56	0.35	0.86	424	813	1.81	1.85	100	100
1100	0.27	0.68	0.35	0.93	451	1022	1.63	1.50	100	97
2300	0.24	0.52	0.35	0.80	404	760	1.95	1.81	100	100
3400	0.26	0.63	0.35	0.95	436	938	1.74	1.68	100	100
4600	0.22	0.41	0.35	0.88	368	571	2.20	2.54	100	97
Pooled SD	0.02	0.08	0.01	0.05	31.5	132	0.23	0.32	0	3.33
Significancia										
Lineal	0.39	0.15	0.59	0.07	0.43	0.16	0.32	0.03	0	0.47
Cuadrática	0.02	0.01	0.60	0.28	0.01	0.01	0.02	0.01	0	0.67

¹ Pesos individuales

² 5 valores por tratamiento

^a 14 días

^b 28 días.

El consumo de alimento fue incrementado por la suplementación de espermina ($P = 0.07$); los niveles de suplementación 1100 y 3400 mg kg⁻¹ causaron un mayor consumo de alimento y mejoró el crecimiento en un 1022 y 938% respectivamente (Fig 8). Sin embargo, el máximo nivel de suplementación (4600 mg kg⁻¹) redujo este parámetro en un 20%. La suplementación de espermina causó un efecto cuadrático significativo sobre la tasa de conversión alimenticia; los organismos alimentados con 1100 y 3400 mg kg⁻¹ presentaron el mejor valor (1.50 y 1.68 respectivamente); mientras que los organismos alimentados con 4600 mg kg⁻¹ obtuvieron la peor tasa de conversión (2.54). Al final de experimento la supervivencia fue mayor al 97% para todas las dietas experimentales.

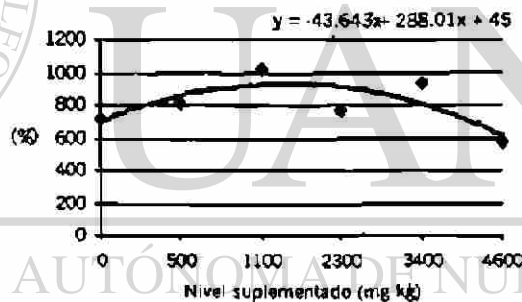


Figura 8.- Ganancia en peso de los organismos alimentados con espermina dietaria.

2.4.3.- NIVELES DE AMINAS EN TEJIDO DE CAMARON

2.4.3.1.- SUPLEMENTACION DE HISTAMINA .

El contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con las dietas suplementadas con histamina es mostrado en la Tabla 21.

Tabla 21.- Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con histamina.

Nivel suplementado (mg kg ⁻¹)	Músculo			Hepatopáncreas		
	C ¹	Spd ¹	Spm ¹	C ²	Spd ²	Spm ²
	(µg mg ⁻¹ muestra seca homogeneizada)					
R1	6	15	71	38	238	171
0	6	14	84	57	287	162
500	3	13	75	49	267	162
1200	6	14	77	58	288	158
2400	6	14	85	79	273	148
3600	6	15	82	46	272	142
4800	4	16	82	41	261	138
Pooled SD	1.8	2.9	15.6	50	77.8	40.5
Significancia						
Lineal	0.9413	0.0442	0.5175	0.7618	0.5297	0.2300
Cuadrática	0.2804	0.5856	0.9523	0.5610	0.9168	0.9510

En el tejido de los camarones alimentados con las dietas suplementadas con histamina fue solamente posible cuantificar cadaverina, espermidina y espermina (Fig. 9). Las concentraciones de histamina y putrescina estuvieron por debajo de los límites de detección (50 µmol mL⁻¹). El contenido de espermidina en músculo de camarón fue afectado significativamente por la histamina dietaria (P = 0.044), incrementándose muy ligeramente la concentración de esta amina con el nivel de

suplementación; cabe hacer mención que esto no fue observado en tejido de hepatopáncreas. Las concentraciones de cadaverina, espermidina y espermina fueron mayores en el hepatopáncreas que en el músculo del camarón.

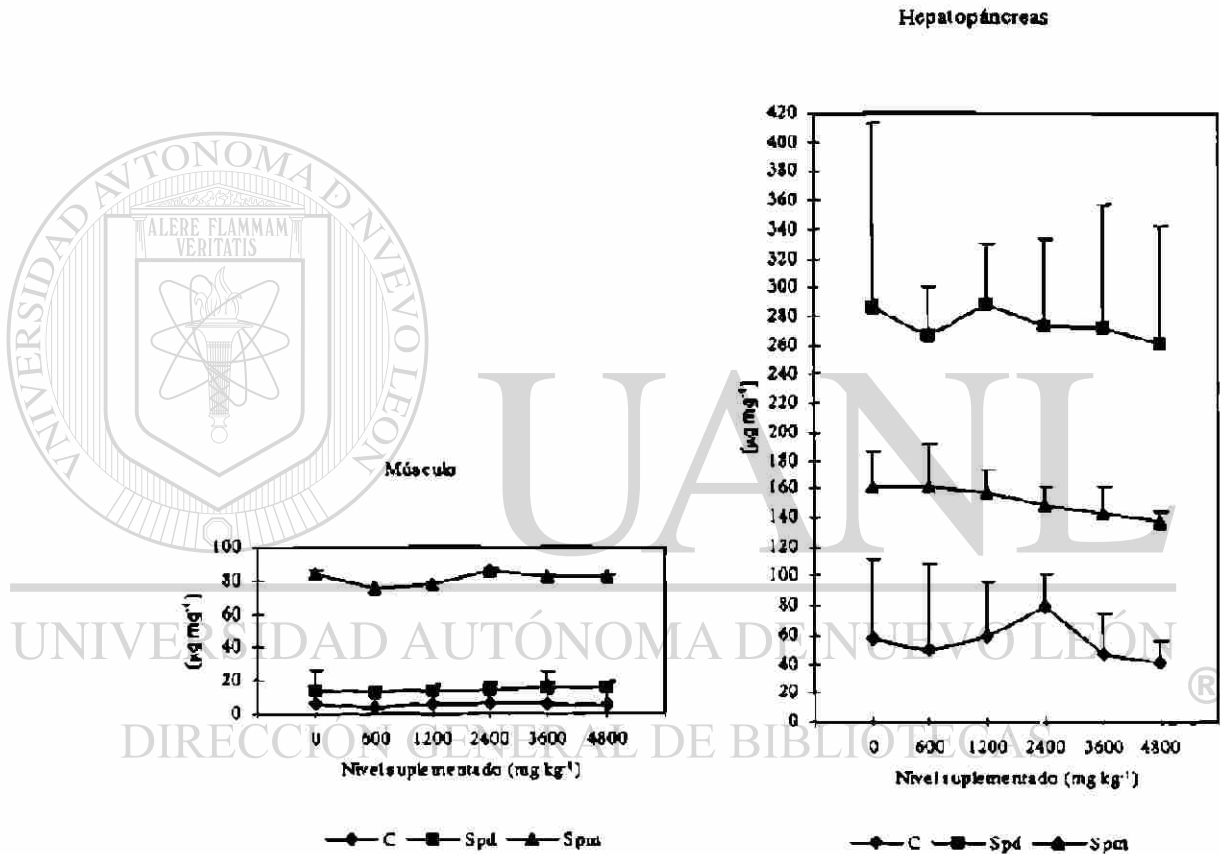


Figura 9.- Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con histamina.

2.4.3.2.- SUPLEMENTACION DE CADAVERINA.

El efecto de la suplementación de cadaverina sobre la concentración de aminas en tejido de camarón es mostrado en la Tabla 22.

Tabla 22.- Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con cadaverina.

Nivel suplementado (mg kg ⁻¹)	Músculo			Hepatopáncreas		
	C ¹	Spd ¹	Spm ¹	C ²	Spd ²	Spm ²
	(µg mg ⁻¹ de muestra seca homogeneizada)					
R2	3	17	39	27	270	247
0	8a	15	39	58a	500	269
500	8a	19	45	105a	398	249
1100	9a	16	46	154a	431	246
2300	13a	14	42	307b	432	248
3500	18b	18	45	331b	453	243
4600	25b	12	39	506b	440	261
Pooled SD	5.6	4.1	13.1	102	92	49
Lineal	0.0001	0.1011	0.7840	0.0001	0.8245	0.8546
Cuadrática	0.2146	0.2387	0.1661	0.8578	0.4400	0.3985

La concentración de cadaverina en tejido de camarón se incrementó linealmente con el consumo de cadaverina dietaria (Fig. 10); los organismos que consumieron las dietas suplementadas con 2300, 3500 y 4600 mg kg⁻¹ de cadaverina presentaron las mayores concentraciones. Las concentraciones de esta poliamina en el músculo y hepatopáncreas del camarón aumentaron de 3 a 25 y de 27 a 506 µg mg⁻¹ respectivamente. Las cantidades de espermidina y espermina en tejido no fueron afectadas por el consumo de esta poliamina; variando de 12 a 19 y de 398 a 500 µg mg⁻¹ para tejido de músculo y de 39 a 54 y de 246 a 268 µg mg⁻¹ para de hepatopáncreas. Las concentraciones de histamina y putrescina en los tejidos analizados fueron por debajo de los límites de detección.

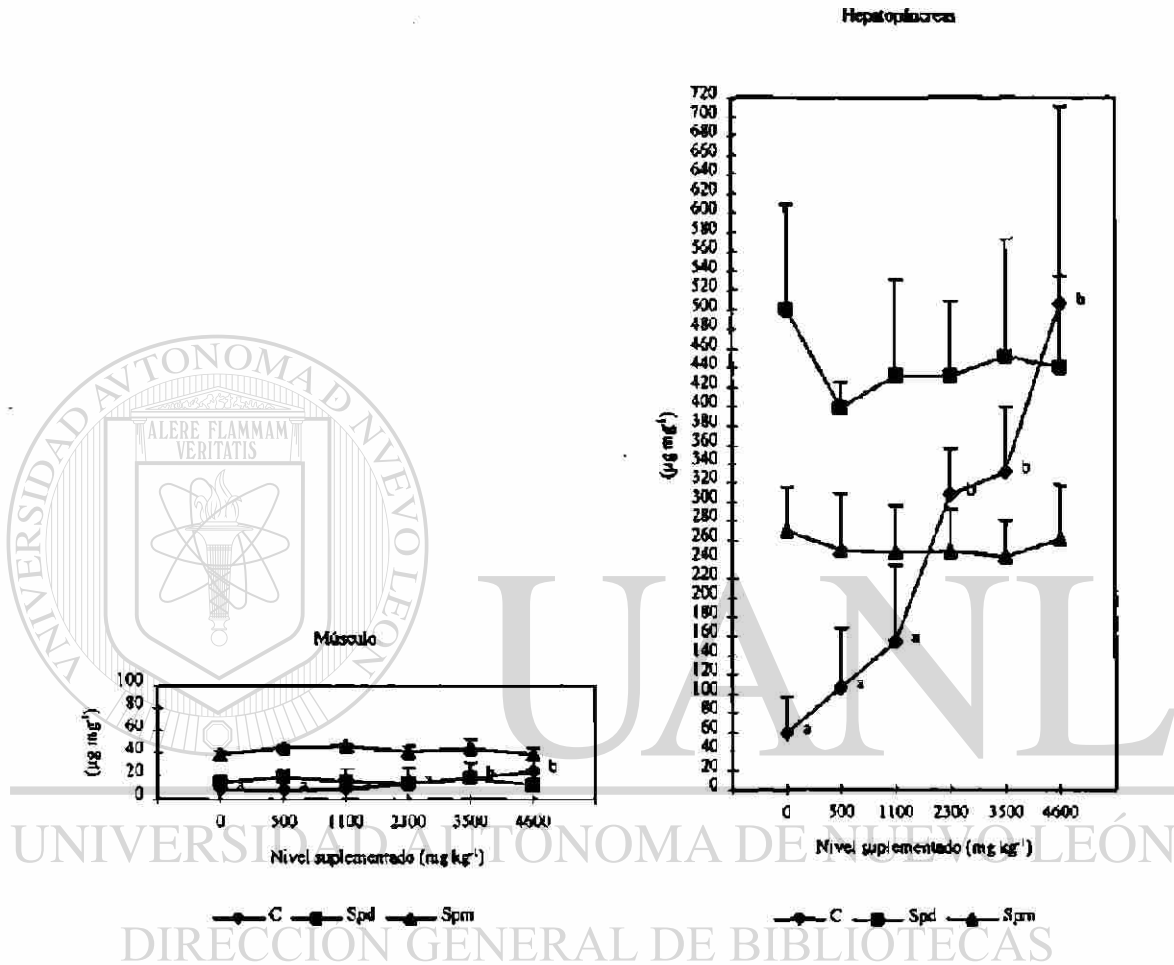


Figura 10.- Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con cadaverina.

2.4.3.3.- SUPLEMENTACION DE PUTRESCINA.

El contenido de aminos en el tejido de los camarones alimentados con dietas suplementadas con putrescina es presentado en la Tabla 23.

Tabla 23.- Contenido de aminos en tejido de camarón alimentados con putrescina.

Nivel suplementado (mg kg ⁻¹)	Músculo		Hepatopáncreas	
	Spd ¹	Spm ¹	Spd ²	Spm ²
	(µg mg ⁻¹ de muestra seca homogenizada)			
0	21a	70	257a	173
500	26a	77	304a	162
1100	30a	67	353a	124
2200	34b	72	409a	171
3300	28a	68	500b	163
4400	31a	65	534b	162
Pooled SD	7.4	10.7	79	36
Significancia				
Lineal	0.0318	0.2463	0.0002	0.8585
Cuadrática	0.0643	0.6398	0.6108	0.6078

Las concentraciones de histamina y putrescina en los diferentes tejidos del camarón fueron por debajo de los límites de detección (50 µmol mL⁻¹). La suplementación de putrescina aumentó linealmente la concentración de espermidina en músculo y hepatopáncreas (Fig. 11); incrementándose de 21 a 34 y de 257 a 534 µg mg⁻¹ respectivamente; los organismos alimentados con 3300 y 4400 mg kg⁻¹ presentaron la mayor concentración en hepatopáncreas; mientras que los alimentados con 2200 mg kg⁻¹ presentaron la mayor concentración en tejido. La concentración de espermina tanto en músculo como hepatopáncreas no fue afectada por el consumo de esta poliamina; las concentraciones de esta amina variaron entre 65 y 72 y entre 124 y 173 µg mg⁻¹ para músculo y

hepatopáncreas respectivamente.

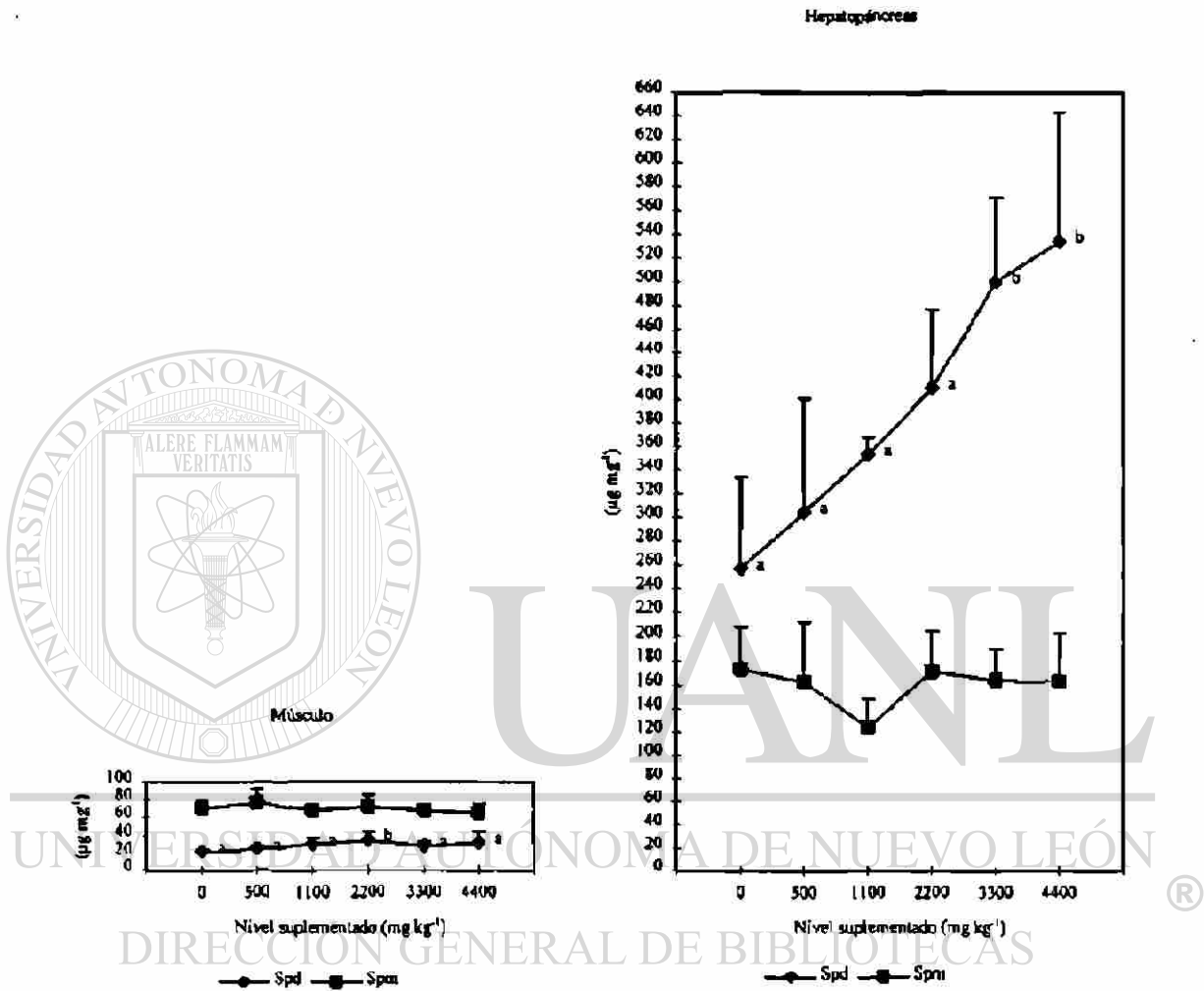


Figura 11- Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con putrescina.

2.4.3.4.- SUPLEMENTACION DE ESPERMIDINA.

El efecto de la suplementación con espermidina dietaria sobre la concentración de aminas en tejido de camarón es mostrado en la Tabla 24.

Tabla 24.- Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con espermidina.

Nivel suplementado (mg kg ⁻¹)	Músculo		Hepatópáncreas	
	Spd ¹	Spm ¹	Spd ²	Spm ²
	(µg mg ⁻¹ de muestra seca homogenizada)			
0	21a	70	257a	173
500	25a	86	397a	151
1100	28a	83	504a	155
2200	32b	74	629b	184
3400	33b	80	729b	172
4500	37b	77	980b	214
Pooled SD	5.2	12.1	111	35
Significancia				
Lineal	0.0001	0.9883	0.0001	0.0856
Cuadrática	0.3091	0.4351	0.9600	0.1480

Los niveles de putrescina, cadaverina e histamina en el tejido de los camarones alimentados con las dietas suplementadas con espermidina estuvieron por debajo de los límites de detección. La espermidina dietaria incremento linealmente el contenido de esta amina en el tejido de camarón ($P = 0.0001$; Fig 12); los valores crecieron de 21 a 37 y 257 a 980 µg mg⁻¹ para músculo y hepatopáncreas respectivamente. Los camarones que consumieron las mayores concentraciones de espermidina dietaria presentaron concentraciones significativamente más grandes que los organismos alimentados con la dieta control y los menores niveles de suplementación. La suplementación de espermidina no afectó el contenido de espermina en el tejido de camarón; las concentraciones de esta

poliamina variaron entre 70 y 86, y entre 151 y 214 $\mu\text{g mg}^{-1}$ para músculo y hepatopáncreas, respectivamente. Cabe remarcar que el incremento lineal de la espermidina en el tejido de hepatopáncreas fue cercano al nivel de significancia ($P = 0.085$).

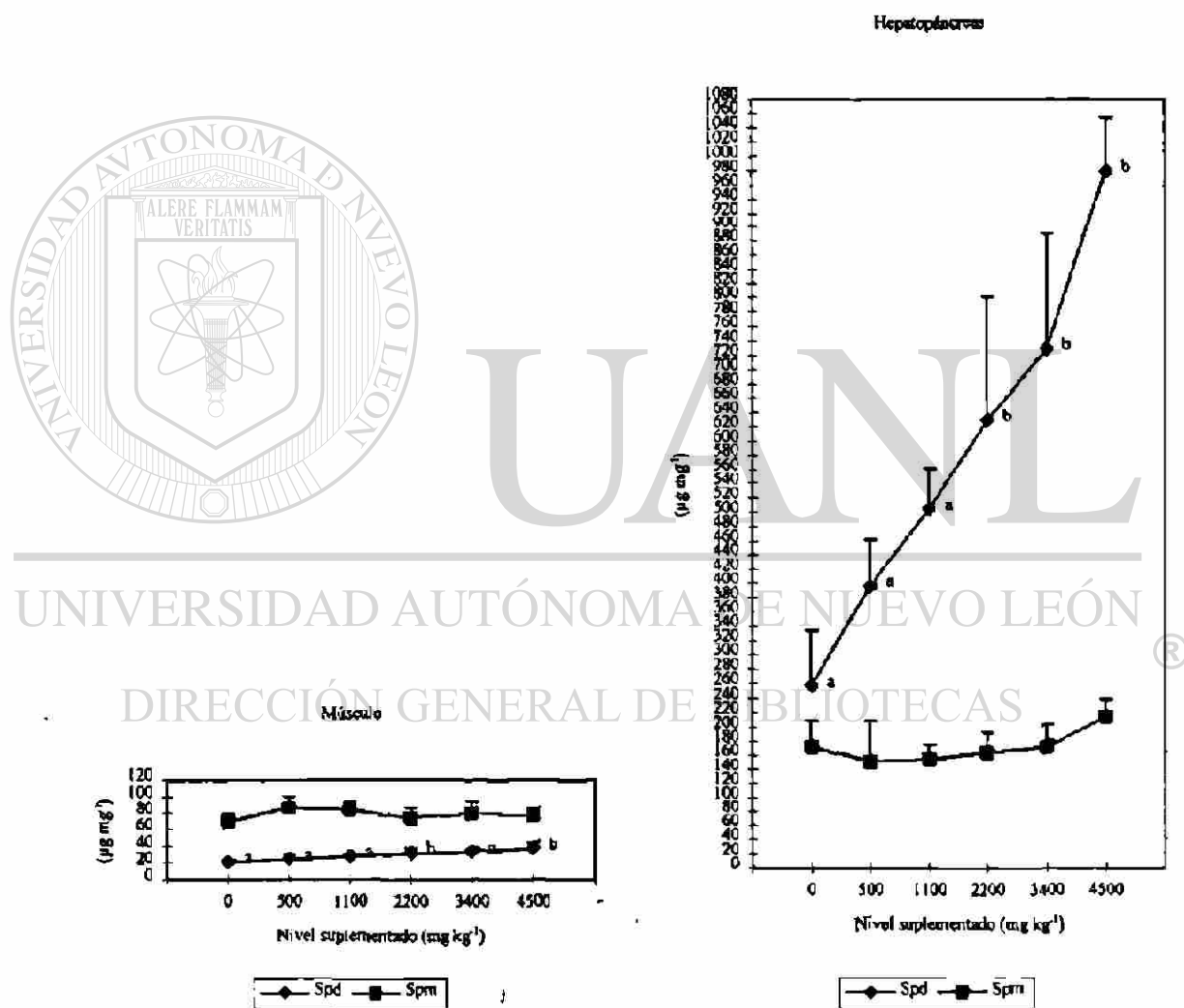


Figura 12.- Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con espermidina.

2.4.3.5.- SUPLEMENTACION DE ESPERMINA.

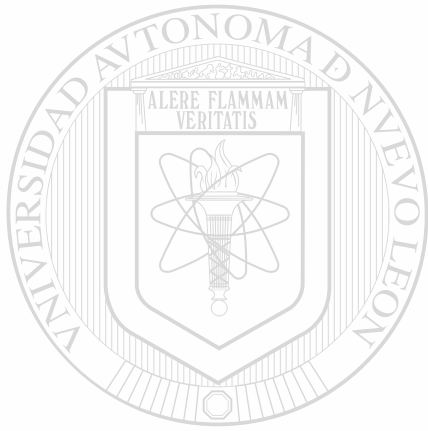
Las concentraciones de aminas en el tejido de los camarones alimentados con espermina son presentadas en la Tabla 25.

Tabla 25.- Contenido de aminas en tejido de camarón alimentados con espermina.

Nivel suplementado (mg kg ⁻¹)	Músculo		Hepatopáncreas	
	Spd ¹	Spm ¹	Spd ²	Spm ²
	(µg mg ⁻¹ de muestra seca homogeneizada)			
0	18a	72	545a	212
500	23a	82	812a	207
1100	21a	85	828a	255
2300	28b	77	795a	243
3400	29b	76	1002b	212
4600	37b	72	770a	193
Pooled SD	4.9	13.3	186	51
Lineal	0.0001	0.3733	0.1330	0.5526
Cuadrática	0.4184	0.2450	0.0802	0.2003

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las concentraciones de histamina, cadaverina y putrescina fueron por debajo de los límites de detección. La alimentación de espermina al camarón incremento significativamente la concentración de espermidina en el músculo y hepatopáncreas (Fig. 13); con aumentos de 18 a 37 y de 545 a 1002 µg mg⁻¹ respectivamente. La alimentación de dietas suplementadas con espermina a camarón, no afecto la concentración de esta amina en tejido. La cantidad de esta amina vario entre 72 y 85, y entre 193 y 255 µg mg⁻¹ para músculo y hepatopáncreas respectivamente.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

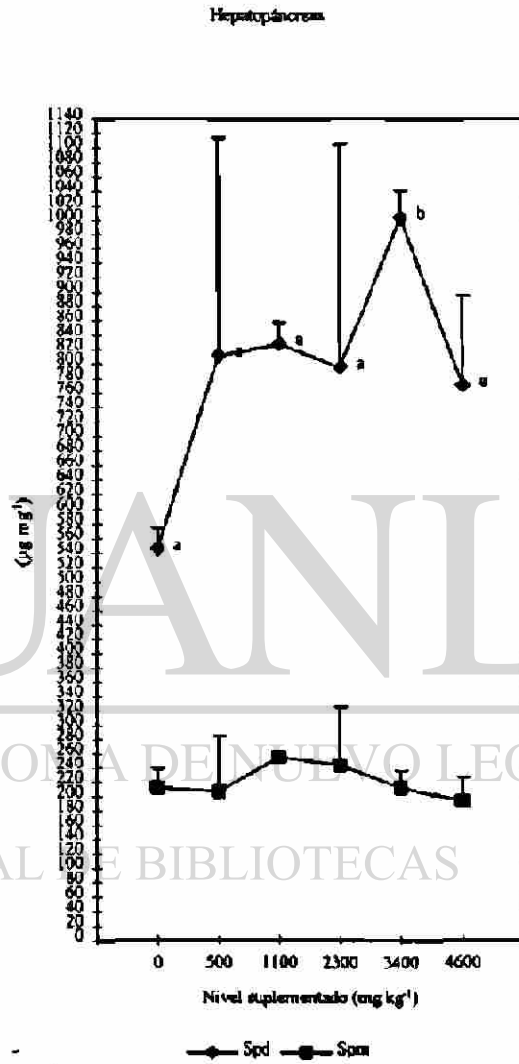
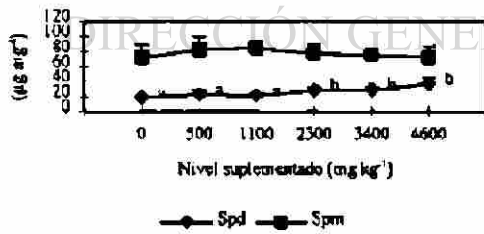


Figura 13.- Contenido de aminas en tejido de camarones alimentados con dietas suplementadas con espermina.

2.5.- DISCUSION

2.5.1.- CONTENIDO DE AMINAS EN LOS ALIMENTOS EXPERIMENTALES

En general las concentraciones de cada amina suplementada en las dietas experimentales estuvieron cercanas o ligeramente superiores a los valores teóricos calculados; solamente en algunos alimentos (dietas suplementadas con espermina) las concentraciones fueron por debajo a los valores teóricos previamente establecidos. Esto se explica por la presencia de aminas intrínsecas en los ingredientes utilizados para elaborar las dietas experimentales; los cuales se pueden ver en el análisis de aminas en la dieta control; solamente tres aminas (histamina, cadaverina y espermidina) presentaron niveles sustanciales en las dietas control: histamina 380-492 mg kg⁻¹; cadaverina 115-141 mg kg⁻¹ y espermidina 88- 125 mg kg⁻¹.

Cabe hacer mención que los alimentos suplementados con cadaverina e histamina así como la dieta sin suplementar fueron realizados por el laboratorio de análisis químicos de la compañía Inual-Tepual. Al comparar en contenido de aminas presentes en la dieta sin suplementar obtenidos por la compañía y los realizados por nosotros observamos que las concentraciones son muy similares, por lo que podemos inferir que los errores analíticos cometidos fueron mínimos.

Una de las características generales de las aminas es su elevada solubilidad en agua (Morgan, 1992). Las concentraciones de las aminas, principalmente histamina, cadaverina, putrescina y espermidina, fueron reducidas hasta en un 70% después de haber sumergido muestras de dichos alimentos durante una hora en agua marina, confirmándose con estos resultados dicha propiedad. En

el caso de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) cuando estas se encuentran en forma de hidroclouros son altamente solubles en agua; sin embargo cuando la espermina se encuentra presente en forma de sales de fosfatos su solubilidad disminuye y tiende a formar cristales (Seiler, 1994). Todas las poliaminas utilizadas en el presente estudio fueron en forma de sales cloradas; sin embargo, las dietas suplementadas con espermina solamente perdieron alrededor entre 31 y 49% del nivel suplementado. A pesar de que los hidroclouros de aminas son solubles en agua es probable que la constante de solubilidad de cada uno de estos compuestos sea diferente entre ellos, lo cual explicaría las diferencias en los porcentajes de aminas encontrados en los alimentos después de haberlos sumergido en agua marina.

2.5.2. - CONSUMO DE ALIMENTO.

En aves se ha observado que el uso de alimentos conteniendo grandes cantidades de aminas biogénicas suplementadas o provenientes de harinas de pescado elaboradas a partir de materia prima descompuesta disminuye drásticamente el consumo de alimento (Huisman *et al.*, 1992). Galleguillos (1995) alimento pollos con dietas suplementadas con diferentes niveles de histamina; observó que la adición de 1500 y 3000 mg kg⁻¹ redujo el consumo de dichos alimentos en un 7%. Smith y colaboradores (1996b) por su parte reportan que la suplementación de cadaverina en alimentos para pollos disminuyó linealmente el consumo de alimento conforme el nivel de esta poliamina se incrementó. Estos mismos efectos han sido reportados en ratas; Til *et al.* (1997) observaron que el suministro de alimento conteniendo 10 000 mg kg⁻¹ de cadaverina redujo 10% la ingesta de esta dieta. En peces, Fairgrieve y colaboradores (1998) observaron que la alimentación con dietas suplementadas con 2000 mg kg⁻¹ de histamina a trucha arco iris redujo el consumo de alimento. Watanabe *et al.* (1987)

y Fairgrieve *et al.* (1994) por su parte reportaron distensiones abdominales en truchas alimentadas con dietas suplementadas con histamina; sin embargo el consumo de este alimento no fue reducido.

El efecto de las poliaminas en aves y ratas sobre el consumo de alimento ha sido relacionado con su carga catiónica y peso molecular. Jeevanandam *et al.* (1997) observaron que ratas alimentadas con 500 y 1000 mg kg⁻¹ de espermidina consumieron menos alimento (469 y 414 g) en comparación con aquellas que ingirieron la dieta sin suplementar (480 g). Til *et al.* (1997) por su parte, reportan que el suministro de alimentos conteniendo hasta 10 000 mg kg⁻¹ de tiramina no redujo el consumo de dichos alimentos; sin embargo cuando adicionaron cadaverina, putrescina, espermidina y espermina, los niveles máximos redujeron significativamente este parámetro.

En aves, Smith (1990) reporta una disminución en el consumo de alimento cuando adiciono cantidades considerables de putrescina. Smith *et al.* (1996a) por otra parte concluyen que la adición por encima de 4000 mg kg⁻¹ de espermidina reduce significativamente (9-17%) la ingesta de alimento; en cambio la suplementación de pequeñas cantidades (500 mg kg⁻¹) lo incremento (6%). Sousadias & Smith (1995) observaron que la adición de espermina en un rango de 4000 a 10000 mg kg⁻¹ redujo el consumo de alimento de 2.15 hasta 64.77%. Cowey & Cho (1992) reportan en trucha que la suplementación de 4,000 mg kg⁻¹ de putrescina no afecto significativamente el consumo de alimento; no obstante, cuando la incluyeron a 13,300 mg kg⁻¹ lo redujo 51%.

En el bioensayo donde se evaluó la suplementación de histamina, se observó que la adición de 1200 y 2400 mg kg⁻¹ aumenta ligeramente el consumo de alimento (1%); sin embargo el máximo nivel de suplementación (4800 mg kg⁻¹) lo redujo 4%. Cuando la cadaverina fue evaluada,

vimos que el consumo de alimento fue disminuido aun con el nivel mínimo de suplementación (2.86 - 12.85%). Al evaluar el efecto combinado de estas aminas se observó que la dieta suplementada con histamina y cadaverina a 559 y 620 mg kg⁻¹ incremento la ingesta de dicho alimento en un 7%. Al parecer la combinación de cadaverina e histamina tiene un efecto sinérgico, lo cual podría explicar el aumento en el consumo de esta dieta evaluada. Mendoza y colaboradores (1997) concluyen que la putrescina y la cadaverina funcionaron como atrayentes para langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*; cabe remarcar que la cadaverina resulto ser más eficaz. Las diferencias entre los resultados reportados por estos investigadores y los obtenidos en estos experimentos pueden deberse a las especies (camarón y langostino) y/o metodologías utilizadas.

Por otro lado, observamos que la adición de putrescina en alimentos para camarón incrementó el consumo de alimento en 9.4% cuando esta se suplemento a 3300 mg kg⁻¹; mientras que el máximo (4400 mg kg⁻¹) lo redujo 4.7%. Los camarones alimentados con todas las dietas suplementadas con espermidina consumieron mas alimento en comparación con los organismos que consumieron la dieta control; los organismos alimentados con 1100 mg kg⁻¹ ingirieron la mayor cantidad de alimento. Cabe mencionar que los organismos que consumieron la dieta conteniendo el nivel máximo de suplementación comieron menos alimento al final del experimento; parece ser que la espermidina promueve el consumo de alimento más que la putrescina. Por otro lado, cuando la espermina fue adicionada a 1100 y 3400 mg kg⁻¹ aumento la ingesta de alimento en 17%; sin embargo, al igual como ha sido observado en organismos vertebrados, el máximo nivel de suplementación (4600 mg kg⁻¹) redujo el consumo de esta dieta 8.4%.

2.5.3. - GANANCIA EN PESO.

Una reducción en el incremento en peso ha sido reportado en aves debido al consumo de histamina. Galleguillos (1995) observó que el suministro de alimentos suplementados con 1500 mg kg⁻¹ de histamina a pollos redujo este parámetro 14%. Harry et al., (1976) por su parte reportan que la adición de 4000 mg kg⁻¹ de histamina en alimento para aves mermó el crecimiento y causó además erosión de la molleja. Esto mismo ha sido observado cuando la cadaverina fue suplementada por encima de 6000 mg kg⁻¹ (Smith *et al.*, 1996b). En peces, Watanabe y colaboradores (1987) observaron que la alimentación a truchas con una dieta suplementada con una harina de macarela, la cual contenía 70 mg kg⁻¹ de histamina, incrementó la utilización de proteína neta. Fairgrieve *et al.* (1994) por su parte concluyen que la suplementación de histamina en alimentos para trucha causó daños intestinales; sin embargo, la ganancia en peso no fue afectada.

En el presente estudio, la suplementación de 1200 y 2400 mg kg⁻¹ de histamina incrementó el crecimiento hasta un 8% y la adición de 4800 mg kg⁻¹ lo redujo 3.7%. Cuando la cadaverina fue evaluada se observó una disminución en este parámetro en los organismos que consumieron todas las dietas suplementadas con esta poliamina, la ganancia en peso fue reducida hasta en un 15%; es importante remarcar que la dieta suplementada con histamina y cadaverina a 559 y 620 mg kg⁻¹ incrementó el crecimiento hasta un 11%; parece ser que la histamina *per se* promueve el crecimiento, pero cuando la cadaverina es adicionada este efecto positivo es todavía más evidente.

En organismos vertebrados ha sido ampliamente reportado que la carga y el peso

molecular de las poliaminas están directamente relacionadas con su toxicidad (putrescina < espermidina < espermina). Til *et al.* (1996) reportan que la ingesta de putrescina, espermidina y espermina a bajas concentraciones por las ratas no afecta su crecimiento; sin embargo cuando se adiciono 10 000 mg kg⁻¹ este parámetro fue reducido en 10, 15 y 51% respectivamente. Jeevanandan *et al.* (1997) por su parte reportan que la ingesta por ratas de un alimento conteniendo 2000 mg kg⁻¹ de espermidina redujo 19% el crecimiento.

En pollos este mismo efecto ha sido observado. Smith (1990) observó que la alimentación con una dieta suplementada con 2000 mg kg⁻¹ de putrescina a pollos mejoró la ganancia en peso en un 34%; sin embargo la adición de esta poliamina por encima de este valor lo redujo drásticamente. Sousadias & Smith (1995) reportan que la adición de 500 mg kg⁻¹ de espermidina mejoro la tasa de crecimiento (22.5%); aunque niveles de suplementación por encima de este valor redujo este parámetro. i.e. la adición de 2000 mg kg⁻¹ de espermidina disminuyo en crecimiento en 6.5%. Smith *et al.* (1996a) por su parte concluyen que la espermina fue la poliamina mas tóxica para pollos, el suministro de 2000 mg kg⁻¹ causó una reducción del crecimiento en un orden del 32% y con la suplementación de 10 000 mg kg⁻¹ mermo este parámetro en un 94%. En peces, Cowey & Cho (1992) observaron que la alimentación de 13, 300 mg kg⁻¹ de putrescina a trucha arco iris redujo el crecimiento en 41% sin embargo cuando esta poliamina fue adicionada a 4000 mg kg⁻¹ este efecto negativo no fue visto.

Durante el metabolismo de las poliaminas un sin números de metabolitos son formados, existen reportes que no solamente las poliaminas si no también sus metabolitos pueden actuar como promotor de crecimiento. Lakanen *et al.* (1992) observaron que los metabolitos de la espermidina y

espermina (metil espermidina y metil espermina) fueron tan efectivos como estas poliaminas en promover la conversión de B-DNA y Z-DNA.

En la presente investigación observamos que la adición de putrescina en dietas para camarón produjo un pobre crecimiento; aunque, la suplementación de 3300 mg kg⁻¹ incrementó este parámetro en un 14%. Al evaluar la espermidina vimos que la ganancia en peso fue mejor en los organismos alimentados con esta poliamina, incrementándose hasta un 12.8% con el máximo nivel de suplementación. Cuando se evaluó la espermina observamos que los mejores crecimientos (42.7 y 31%) fueron obtenidos con niveles moderados de suplementación (1100 y 3400 mg kg⁻¹). Parecer ser que estas aminas posiblemente actúen como un promotor de crecimiento tal y como ha sido observado en otros organismos; sin embargo más información al respecto es requerida.

No solamente altas concentraciones de poliaminas pueden causar toxicidad, sino también sus respectivos metabolitos. Averill-Bates *et al.* (1993) demostraron que los productos de la metabolización de la espermidina fueron responsables de causar citotoxicidad en células de hamsters. Averill-Bates *et al.* (1994) observaron que los peróxidos y aldehídos formados a partir de la oxidación de la espermina contribuyen con la citotoxicidad de dicha poliamina. En el presente estudio se observó que la espermina redujo el crecimiento, especialmente con el nivel máximo de suplementación; es posible que algunos de los metabolitos generados por esta poliamina durante su metabolización contribuyen a reducir el crecimiento del camarón; desafortunadamente los metabolitos de esta poliamina no fueron analizados.

2.5.4. - SOBREVIVENCIA.

Las mortalidades observadas en pollos alimentados con dietas suplementadas con histamina o harinas de pescado conteniendo grandes cantidades de aminas biogénicas, especialmente histamina (Harry *et al.* , 1976; Brugh, 1984; Osuna, 1985; Brugh & Wilson, 1986) se deben principalmente a que la histamina incrementa la secreción de ácido clorhídrico en el estomago causando erosión de la molleja.

En el caso de las poliaminas, en aves se ha reportado que la mortalidad esta directamente relacionada con su carga catiónica y su peso molecular. Smith (1990), Smith *et al.* (1996a) y Smith *et al.* (1996b) concluyen que la suplementación de putrescina, espermidina o cadaverina en alimentos para pollos no reduce la sobrevivencia. Sousadias (1991) y Til *et al.* (1997) por su parte reportan mortalidades en pollos y ratas alimentadas con una dieta suplementada con 6000 y 10 000 mg de espermina kg^{-1} . En peces, los pocos estudios con aminas biogénicas han demostrado que la adición de histamina (Watanabe *et al.*, 1987; Fairgrieve *et al.* , 1994, 1998) o putrescina (Cowey & Cho, 1992) no ha logrado causar mortalidades. En el presente trabajo, la suplementación de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina o espermina a los diferentes niveles evaluados no afecto significativamente la sobrevivencia; solamente el efecto negativo se vio reflejado en la reducción del crecimiento.

2.5.5. - CONTENIDO DE POLIAMINAS EN TEJIDO DE CAMARÓN.

Se ha observado que los tejidos con una elevada actividad fisiológica (páncreas, intestino, hígado y riñón) contienen altos niveles de poliaminas; mientras que los tejidos con baja actividad (músculo) contiene mucho menos; estas diferencias se deben a que los primeros poseen una elevada actividad metabólica y se encuentran en un constante estado de renovación (Bardocz *et al.*, 1993; Seidel & Scemama, 1997). Seidel & Scemama (1997) reportan en tejido de ratas concentraciones de cadaverina, putrescina, espermidina y espermina: estómago 1048, 451, 246, y 28 μM ; duodeno 3043, 1152, 426 y 191 μM ; jejunum 2216, 1246, 198, 102 μM ; ileum 314, 65, 0, 0 μM y para colon 680, 63, 88 y 7 μM respectivamente. En el presente estudio, las concentraciones de estas aminas fueron más elevadas en el hepatopáncreas que en el músculo; los valores variaron en un rango de 18 a 86 $\mu\text{g mg}^{-1}$ y de 124 a 1002 $\mu\text{g mg}^{-1}$ para músculo y hepatopáncreas respectivamente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La histamina es una de las primeras sustancias vasoactivas identificadas en el cuerpo, se encuentra presente en tejido de mamíferos, reptiles, aves, insectos, bacterias etc. En mamíferos, la histamina es catabolizada por dos vías: una es la deaminación, en presencia de la diaminoxidasa; y la otra es la metilación del anillo imidazol en presencia de la enzima N-metiltransferasa. Esta amina es almacenada en células "mast" de tejido y basófilos en sangre. En algunos órganos en shock, contienen grandes cantidades de células "mast" y cantidades letales de histamina. La histamina una vez que ha sido liberada es rápidamente metabolizada, dejando el torrente sanguíneo en cuestión de minutos, apareciendo en casi todos los tejidos como metabolitos de esta (Beaven, 1978). Amould (1986) reportó que la carcinina sintetasa del cangrejo *Carcinus maenas* puede metabolizar histamina neuronal y

probablemente histamina exógena; la ausencia de histamina en el tejido de los camarones alimentados con histamina nos hace suponer que este organismo cuenta con un sistema que le ayuda a metabolizar esta amina ya sea para excretarla o almacenarla; desafortunadamente los metabolitos de esta amina no fueron analizados. Por otro lado, la suplementación de histamina incremento significativamente la concentración de espermidina en el músculo de camarón; ninguna explicación sobre este fenómeno fue encontrada como para correlacionar la histamina dietaria y la concentración de espermidina en tejido.

La información disponible sobre la concentración de cadaverina en tejido animal es muy poca. Heringsson & Heringsson (1983) observaron que los productos oxidativos de la cadaverina podrían tener importancia en varios procesos fisiológicos y niveles patológicos en ratas preñadas.

Las aminas pueden ser transformadas por enzimas oxidativas para ser excretadas o catabolisadas para formar otras poliaminas o metabolitos de estas. Así tenemos que Smith *et al.*

(1996b) observaron que la suplementación de cadaverina no afectó la concentración de esta poliamina en tejido de pollos, indicando que esta fue metabolizada. En el presente trabajo, un incremento lineal en la concentración de cadaverina en tejido de camarón fue observado; todo parece indicar que el camarón no puede metabolizar la cadaverina dietaria almacenándola en tejido. Los organismos que consumieron las dietas suplementadas con cadaverina presentaron un menor crecimiento al final del experimento; posiblemente la acumulación de esta amina en el tejido tenga un costo energético, causando una reducción de la ganancia en peso. Por otro lado, se ha reportado que la cadaverina puede servir como sustrato para la formación de putrescina y espermidina; esta reacción, sin embargo, procede solamente al 5% de la tasa de reacción convencional (Morgan, 1998). En el actual estudio, la concentración de espermidina y espermina no fue afectada por el consumo de esta amina,

indicando que esta reacción no es realizada por este crustáceo.

Smith (1990) concluye que la alimentación de dietas suplementadas con putrescina a pollos incrementó linealmente las concentraciones de putrescina y espermidina en el tejido de aves; mientras tanto, Cowey & Cho (1992) observaron que el suministro de alimentos adicionados con esta poliamina no afectó el contenido de poliaminas en el tejido de la trucha arco iris. Bardocz (1993) por su parte demostró que el 20% de la alimentación de putrescina a ratas fue absorbida intacta a través de la pared del intestino y el resto (80%) fue convertido en otras poliaminas o metabolitos. En el presente estudio, la alimentación de dietas suplementadas con putrescina a camarón incrementó linealmente la concentración de espermidina en el tejido; pocos valores de putrescina fueron observados por encima de los límites de detección para esta amina lo cual nos indica que el camarón puede metabolizar putrescina para formar espermidina y posiblemente otras poliaminas.

Smith y colaboradores (1996a) observaron que la alimentación de dietas suplementadas con espermidina dietaria a pollos incrementó la concentración hepática de putrescina, espermidina y N¹-acetil espermidina. En el actual experimento, la alimentación con dietas suplementadas con espermidina a camarón resultó incrementar solamente la concentración de espermidina en el tejido. Por otro lado, ha sido observado que la espermidina y espermina dietaria pueden ser absorbidas intactas desde la pared del intestino en mamíferos (Seidel & Scemama, 1997). En el presente estudio, la concentración de espermidina aumento linealmente en tejido con el nivel de suplementación en la dieta lo cual nos indica que el camarón absorbió esta poliamina intacta tal y como ha sido observado en animales vertebrados.

La conversión de espermina en otras poliaminas o sus metabolitos por animales vertebrados es el camino para protegerse de su efecto tóxico. Ferioli *et al.* (1998) observaron que ratas pueden convertir espermina en espermidina y putrescina. Sousadias & Smith (1995) por su parte reportan que los pollos la metabolizan en espermidina y N¹ acetil espermidina. En el presente estudio, espermina fue convertida en espermidina.

Ha sido reportado que espermina causa citotoxicidad en células de mamíferos (Brunton *et al.*, 1991; Averill-Bates *et al.*, 1993), pero también los metabolitos de espermina (Averill-Bates *et al.*, 1994). En el presente estudio, solamente se observó una disminución en el crecimiento de los organismos alimentados con las alta dosis de espermina dietaria, lo que parece confirmar la eficiencia del sistema de detoxificación por conversión de espermina a espermidina. Cabe la posibilidad de observar mortalidades cuando se utilicen niveles de suplementación mucho mayores a los evaluados en el presente estudio.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2.6.- CONCLUSIONES.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.6.1. - CRECIMIENTO.

1. La suplementación de 1200 y 2400 mg kg⁻¹ de histamina causó un efecto promotor de crecimiento; sin embargo a altas dosis de suplementación redujo este parámetro en 3.6%.
2. La cadaverina dietaria no tuvo un efecto sobre el crecimiento del camarón. El efecto promotor de crecimiento observado con la suplementación de cadaverina + histamina fue debido a la histamina o al efecto combinado de ambas, pero no a la cadaverina por sí sola.

3. La suplementación de 500 a 3300 mg kg⁻¹ de putrescina incremento el consumo de alimento. La ganancia en peso solamente fue mejorada cuando se suplementaron 3300 mg kg⁻¹ de putrescina.
4. La espermidina dietaria incremento el consumo de alimento, la ganancia en peso y mejoró la tasa de conversión alimenticia. Es posible que la espermidina actúe como un promotor de crecimiento.
5. La suplementación de espermina no afecto la supervivencia del camarón; pero aumento el consumo de alimento, incremento la ganancia en peso y mejoró la tasa de conversión alimenticia; sin embargo cabe remarcar que el nivel máximo de suplementación redujo el crecimiento y empeoró la tasa de conversión alimenticia tal como ha sido observado en aves.

2.6.2. - AMINAS EN TEJIDO.

La histamina y putrescina dietaria no fueron detectadas en tejido de camarón indicando

2. que estas aminos dietarias se acumulan en tejido de camarón; posiblemente este organismo es incapaz de metabolizarla para excretarla o bien formar nuevas aminos.
3. El camarón transforma la putrescina dietaria en espermidina y posiblemente en metabolitos de putrescina y/o espermidina.
4. El camarón absorbe de manera intacta la espermidina dietaria y la almacena en tejido tal como se ha observado en otras especies.
5. Este crustáceo transforma la espermina dietaria en espermidina y posiblemente en metabolitos de espermidina y espermina, indicando que utilizan esta vía de metabolización con el fin de evitar una posible toxicidad por este compuesto; sin embargo la transformación de espermina en espermidina tiene un alto costo energético para el camarón, lo cual explicaría el pobre crecimiento observado con la dosis mas alta.

DISCUSIONES GENERALES

El efecto negativo de la frescura de la materia prima sobre el consumo de alimento y ganancia en peso de aves (Huisman et al., 1992), peces (Pike & Hardy, 1997; Anderson et al., 1997; Opstved et al., 1999) y crustáceos (Riqué et al., 1998) ha sido ampliamente comprobado. La reducción en el consumo de alimento se ha relacionado con la generación de ciertos compuestos durante el deterioro del pescado. En aves, se ha visto que la suplementación con niveles mayores de 1500 mg kg⁻¹ de histamina (Galleguillos, 1995); putrescina (1990); cadaverina (Smith et al., 1996b); espermidina (> 4000 mg kg⁻¹; Smith et al., 1996a) y espermina (Sousacías & Smith, 1995) reduce el consumo de alimento. En peces, la presencia de trimetil amina (Hughes, 1991) así como putrescina (13, 300 mg kg⁻¹; Cowey & Cho, 1992) e histamina (2000 mg kg⁻¹; Fairgrieve et al., 1998) ha logrado afectar negativamente este parámetro biológico. En el presente estudio observamos que altos niveles de suplementación de histamina y espermina y cualquier nivel de cadaverina (aun con bajos niveles de suplementación) redujeron este parámetro; sin embargo la presencia de 1200 y 2000 mg kg⁻¹ de histamina; 3300 mg kg⁻¹ de putrescina, 1100 y 3400 mg kg⁻¹ de espermina así como todos los niveles de suplementación de la espermidina incrementaron la ingesta de los alimentos suplementados con estos compuestos. Cabe hacer mención que la alta solubilidad de las aminas permitió que estas actuaran alrededor de 1/4 de su concentración presente en los alimentos experimentales; esto posiblemente impidió detectar un efecto más drástico sobre el consumo de alimento para los mas altos niveles de suplementación. Por otro lado, las aminas presentes en las harinas de pescado elaboradas a partir de pescado descompuesto se solubilizan en la misma proporción que cuando estas sustancias fueron agregadas, por lo que podemos casi asegurar que

los compuestos responsables de reducir significativamente este parámetro son otros y no las aminas biogénicas.

De igual manera se ha observado que la histamina (Galleguillos, 1995; Harry et al., 1976); cadaverina (Smith et al., 1996b); putrescina (Smith, 1990); espermidina (Sousadias & Smith, 1995) y espermina (Smith et al., 1996) redujo significativamente el crecimiento de las aves; sin embargo, la suplementación de 2000 mg kg⁻¹ de putrescina logro incrementar significativamente este parámetro. En peces, se ha visto que solamente la suplementación de 13, 300 mg kg⁻¹ de putrescina logro reducir el crecimiento. En el presente estudio observamos que niveles moderados de histamina, putrescina, espermina y espermidina incrementaron este parámetro; solamente la adición de cadaverina causo una ligera merma del crecimiento.

En aves solamente se han reportado mortalidades debido a la presencia de altos niveles de suplementación de espermina (> 6000 mg kg⁻¹) y erosión de la molleja causado por un incremento en la secreción de ácido clorhídrico en el estómago de las aves. En peces se ha visto que la adición de histamina (Fairgrieve et al., 1994; Fairgrieve et al., 1998) no causaron mortalidad alguna. En el presente estudio observamos que los alimentos suplementados con histamina, cadaverina, putrescina, espermidina y espermina no mermaron la sobrevivencia del camarón.

La toxicidad de las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) esta ampliamente relacionado con su carga catiónica y peso molecular, es decir la espermina es la poliamina más catiónica y por consiguiente la más tóxica para organismos superiores vertebrados. Los organismos vertebrados cuentan con un sistema detoxificante (mono y di amino oxidasa) para metabolizar estos compuestos. Sin

embargo, la capacidad para degradarlos depende de un sin número de factores, tal como la presencia de infecciones en el intestino, presencia de compuestos inhibidores (alcohol), concentración de la amina, compuestos sinérgicos (i.e. la cadaverina potencializa la toxicidad de la histamina debido a la inhibición de la enzima DAO), edad de los organismos (los organismos jóvenes son más sensibles) etc., así mismo se ha observado que los productos de degradación de las poliaminas pueden causar toxicidad; aunque también se ha visto que estos compuestos a ciertas concentraciones pueden actuar como un promotor de crecimiento. En el presente estudio observamos que el camarón cuenta con un sistema para degradar histamina, transformar la putrescina y espermina en espermidina y almacenar en tejido la cadaverina y espermidina sin que la sobrevivencia pudiera llegar a ser afectada.

La decarboxilación de los aminoácidos para formar aminas biogénicas generalmente es llevada a cabo por bacterias gram negativas (G-). Estos organismos poseen lipopolisacáridos (LPS), también llamados endotoxinas, los cuales presentan efectos tóxicos comunes para los vertebrados superiores: en humanos se presentan síntomas como pirogenicidad, disminución de la fagocitosis, inflamación, diarrea, etc. En langosta *Homarus Americanus* se ha observado coagulación intravascular, no coagulación de la sangre, reducción del número de hemocitos en la sangre etc; esta misma respuesta ha sido reportada en otros organismos acuáticos, tal como *Limulus polyphemus*, *Sacculina carcini*, *Carcinus maenus* e incluyen varias especies de camarones: *P. aztecus*, *P. setiferus*, *P. duorarum* etc. (Levin, 1998). El camarón cuenta con el sistema profenol oxidasa (proPO), el cual se encarga de eliminar los patógenos que hayan podido penetrar al interior del organismo; este sistema es estimulado por glucanos β -1,3 de hongos, peptidoglicanos bacterianos o LPS de bacterias gram negativas (Vargas-Albores & Ortega-Rubio, 1994; Vargas-Albores, 1995a; Vargas Albores, 1995b; Vargas-Albores et al., 1996; Hernandez-López et al., 1996). Los β glucanos han sido propuestos como inmunoestimulantes;

sin embargo durante un largo periodo de alimentación pueden llegar a reducir significativamente el consumo de alimento, ganancia en peso y sobrevivencia; generalmente las mortalidades se presentan después de los 14 días de experimentación (Scholz et al., 1999). En los experimentos donde las dietas suplementadas con las harinas de pescado elaboradas a partir de pescado descompuesto fueron evaluadas se observó una reducción en el crecimiento y consumo de alimento en las dos primeras semanas de alimentación y una mortalidad creciente a partir de los 14 días. Es posible que estos compuestos se encuentren presente en este tipo de harinas de pescado, ya que los LPS son termoestables a altas temperaturas. Se trató de cuantificar la cantidad de LPS presentes en las harinas de pescado experimentales (ver anexo II para detalles); desafortunadamente se presentó una reacción cruzada lo cual impidió confirmar dicha hipótesis.

Pike & Hardy (1997) han establecido que los límites máximos de aminos totales presentes en harinas de pescado elaboradas a partir de anchoveta y arenque para su uso en alimentación de peces no debe exceder de 2000 y 4000 mg kg⁻¹, de lo contrario una reducción sobre el crecimiento y consumo de alimento será observado. En el presente estudio observamos que las harinas elaboradas a partir de pescado medianamente fresco y descompuesto y con un nivel de aminos mayor a 3300 mg kg⁻¹ logro reducir el crecimiento y el consumo de alimento. La sobrevivencia fue solamente afectada significativamente por la harina elaborada a partir de arenque descompuesto; sin embargo hay que hacer mención que la sobrevivencia de los organismos alimentados con la harina elaborada a partir de anchoveta descompuesta también fue reducida ligeramente. Estas variaciones nos hace pensar que la cantidad del(os) compuesto(s) presente(s) en esta última harina no se presentó en la concentración requerida para reducir significativamente este parámetro. De los resultados de obtenidos a partir de estudio del efecto de la suplementación de las aminos biogénicas sobre la sobrevivencia podemos

confirmar que estos compuestos no son los responsables de disminuirla si no que son otros compuestos (LPS?) generados durante la descomposición del pescado. A pesar de que las aminas biogénicas no son las responsables de estos efectos negativos debido a que son compuestos termoestables deben seguir siendo consideradas como indicadores indirectas de calidad para la selección de harinas de pescado.

CONCLUSIONES GENERALES

1.- La descomposición bacteriana de la materia prima utilizada en la elaboración de harinas de pescado reduce significativamente el consumo de alimento, crecimiento y en algunas ocasiones la sobrevivencia del camarón azul *Litopenaeus stylirostris* cuando se alimentan con tales harinas.

2.- Las aminas biogénicas (histamina, putrescina, espermidina y esperrina) en concentraciones moderadas incrementan la ganancia en peso; sin embargo altos niveles de suplementación causan un detrimento de este parámetro. Estos niveles no se pueden alcanzar con los niveles comunes de inclusión dietario de harinas de pescado, aún cuando sean muy ricos en aminas biogénicas.

3.- Las mortalidades observadas en camarones alimentados con harinas producidas a partir de pescado deteriorado no son causadas por las aminas biogénicas *per se*, sino por otros compuestos generados durante el deterioro del pescado (LPS?). Sin embargo, las aminas biogénicas son solo indicadores de la presencia de tales compuestos tóxicos.

4.- El nivel máximo tolerable de aminas totales en harinas de pescado usadas para camarón azul es de

2000 mg kg⁻¹ para harinas elaboradas a partir de anchoveta y 4000 mg kg⁻¹ para las elaboradas a partir de arenque.

REFERENCIAS

- A.O.A.C., 1990. 12th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Elliam Horritz Ed. Washington, D.C. 684pp.
- Abdo-de la Parra, Ma.I., 1994. Estudio de algunos parámetros de calidad de harinas de pescado utilizadas en la nutrición de camarón blanco *P. vannamei*. Tesis de maestría, FCB/UANL, México, 114pp.
- Akiyama, D.W., Dominy, W.G. & Lawrence, A.L., 1991. Penaeid shrimp nutrition for the commercial feed industry. Revised. In: Akiyama, D. W. and Tan, R., Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition, Workshop, Thailand and Indonesia, American Soybean Association, pp 80-97.
-
- Aksnes, A. & Mundheim, H. 1997. The impact of raw material freshness and processing temperature for fish meal on growth, feed efficiency and chemical composition of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture 149: 87-106.
- 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.
- Anonimo. 1992. Is putrescine an essential nutrient for avians?. Nutrition reviews. vol. 50. No.3:81-83
- Aquacop. 1978. Study on nutritional requirements and growth of *Penaeus merguensis* in tanks by means of purified and artificial diets. Proceedings, World Mariculture Society, 9:225-234.
- Amould, J.-M., 1986. La β -alanylation, une voie de neutralisation de l'histamine dans le système nerveux central de *Carcinus maenas*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 65, 1898-1902.

- Averill-Bates DA., Agostinelli E, Przybytkowski E & Mondovi B., 1994. Aldehyde dehydrogenase and cytotoxicity of purified bovine serum amine oxidase and spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Cell Biol.*, 72(1-2):36-42.
- Averill-Bates DA, Agostinelli E, Przybytkowski E, Mateescu MA., & Mondovi, B., 1993. Cytotoxicity and kinetic analysis of purified bovine serum amine oxidase in the presence of spermine in Chinese hamster ovary cells. *Arch Biochem Biophys.*, 300(1):75-79.
- Bakker, N.P.M., 1994. Biogenic amines threat in high protein feed. Feed mix, the International Journal on Feed Nutrition and Technology. 2(1):7-11.
- Bardocz, S., 1993. The role of dietary polyamines. *Eur. J. Clin. Nutr.* 47(10), 683-690.
- Bardocz, S., Grant, G., Brown, D.S.; Ralph, A. & Pusztai, A., 1993. Polyamines in food - implications for growth and health. *J. Nutr. Biochem.*, 4, 66-71.
- Barlow, S.M., & Windsor, L., 1984. Subproductos de pesquería. IAFMM. Boletín Técnico No. 19, CSR, Handbook of nutritional Supplements, II:253-272.
- Beaven, M.A., 1978. Histamine: its role in physiological and pathological processes. In: Dukor P., Kallós P., Tmka Z., Waksman B.H., de Weck A.L. (Series Edts), Monographs in Allergy. S. Karger, Basel. 61p.
- Bohinski, R.C., 1991. Metabolismo de los aminoácidos y nucleótidos. *Bioquímica*. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, 5ta edición, 737pp.
- Brock, T.D., & Madigan, M.T., 1994. *Microbiología*. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S.A.
- Brugh, M. & Wilson, R.L., 1986. Effect of dietary histamine on broiler chickens infected with avian retrovirus S1133. *Avian. Dis.*, 30(1), 199-203.
- Brugh, M., 1984. Effects of feed additives and feed contaminants on the susceptibility of chicken to viruses. *Prog. Clin. Biol. Res.* 161, 229-234.

- Brunton, V.G., Grant, M.H. & Wallace, H.M., 1991. Mechanisms of spermine toxicity in baby hamster kidney (BHK) cells. The role of amine oxidases and oxidative stress. *Biochem. J.*, 15,280(Pt 18), 193-198.
- Castro, C.E., 1991. Harina de Pescado: Utilización y principales problemas asociados a su uso en distintas especies. Servicios alimenticios mejorados. Simposium metionina-harina de pescado, Ixtapa, Zihuatanejo, Méx., 43pp.
- Clancy, S., Beames, R., Higgs, D., Dosanjh, B., Haard, N., & Toy, B., 1995. Influence of spoilage and processing temperature on the quality of marine fish protein sources for salmonids. *Aquaculture Nutrition*, 1(3): 169-177.
- 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.*, 94, 2496-2473.
- Cruz-Suárez, L.E., Abdo de la Parra, Ma.I., Ricque-Marie, D., Pike, I.H. & Castro E. 1994. Effect of different biotoxicological score fish meals and synthetic DL-Gizzerosine added in *Penaes vannamei* feeds. World aquaculture Society, New Orleans USA, January 12-18, 1994. Abstracts in the Proceedings.
- Cruz-Suárez, L.E., Ricque, D., Abdo de la Parra Ma.I., Tapia-Salazar, M. & Nieto-López, M., 1995. Índices de calidad de harinas de pescado y su efecto en la producción de camarón. *Revista Acuicultura del Ecuador*, 12:12-30.
- Cruz-Suárez, L.E., Abdo de la Parra, Ma.I., Nieto-Lopez, M., Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Mendoza-Alfaro, R., Pike, I.H. & Galleguillos, M., 1996a. Further results about the effects of fish meals with different chicken biotoxicological scores on *Penaes vannamei* juveniles. Book of Abstracts Aquaculture America '96, Arlington, TX., February 14-17, 1996. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

- Cruz-Suárez, L.E., Abdo de la Parra, Ma.I., Nieto-Lopez, M., Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Mendoza-Alfaro, R., Pike, I.H. & Galleguillos, M., 1996b. Final evaluation of different biotoxicological score fish meals on *Penaeus vannamei* juveniles. Book of Abstracts VIIIth International Symposium on Nutrition and Feeding and Fish, August 11-15, Collage Station TX..
- Cruz-Suárez, L.E., Abdo de la Parra, Ma.I., Ricque-Marie, D., & Galleguillos, M., 1999. Gizzard erosion score in chicken as a quality criterion for fishmeals fed to the American Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* II.- Effect of low and medium scored fish meals and an artificially produced high score fish meal. Final report for research grant C11*-CT93-0300 Commission of the European Community, reference paper 5.
- Doufor, C., Dandrifosse, G., Forget, P., Vermesse, F., Romain, N., Lepoint P., 1998. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology*, 95, 1, 12-116.
- Errola, S., Majjala, T., Roig Sagués, A. X., Salminen, M. & Hirvi, T., 1996. Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*, *Journal of food science*. Volume 61, No. 6, 1243-1246.
- Fairgrieve W. T., Meyers, M.S., Hardy, R.W., & Dong, F.M., 1994. Gastric abnormalities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amine supplemented diets or chicken gizzard-erosion-positive fish meal. *Aquaculture*, 127. 219-232.
- Fairgrieve, W.T., Dong, F.M. & Hardy, R.W., 1998. Histamine effects feed acceptability but not protein utilization by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: proceedings, VIII International Symposium on Nutrition and Feeding of fish & Crustacean Nutrition. Las Palmas de Gran Canaria Spain. June 1-4, Book abstracts, 017.
- Feroli, M.E., Sessa, A., Rabellotti, E., Tunico, P., Pinotti, O. & Perin, A., 1998. Changes hepatic polyamine catabolism in elderly rats. *Liver.*, 18(5), 326-330.

Flores, M., Aristoy, M-Concepción & Toldrá, F., 1996. Biogenic polyamines affect activity of aminopeptidase B and Alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *Journal of food Science*. Volume 61. No. 1. 13-27.

Fraser, O. P. & Sumar, S., 1998. Compositional changes and spoilage in fish (part II)- microbiological induce deterioration. *Nutrition & Food Science*. 6, 325-329.

Freeman, B.A., 1988, *Microbiología de Burrows*. Editorial interamericana Mc Graw-Hill. 22 Edición.

Galleguillos, M., 1995. Efectos de la histamina sobre el score biototoxicológico (inédito). Fundación Chile. 8pp.

Grant, A.L., Holland, R.E., Whillam, T.J., King, K.J., & Liesman, J.S. 1989. Effects of dietary amines on the small intestine in calves fed soybean protein. *American Institute of Nutrition*. 1034-1041 pp.

Ha HC, Sirisoma NS, Kuppasamy P, Zweier JL, Woster PM. & Casero RA Jr., 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15:95(19):11140-5

Harry, G., Tucker, J.F. & Laursen-Jones, A.P., 1976. The role of histamine and fishmeal in the incidence of gizzard erosion and proventricular abnormalities. *Brit. Poultry Sci.*, 16: 69-78.

Heningsson A.C. & Heningsson, S., 1983. *In vitro* metabolism of cadaverine in the pregnant rat. *Agents. Actions*, 13 (2-3), 262-264.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 113C. No.1, pp 61-66.

Hilmer, A.F., Yoshinaga, D.H., 1987. Table for estimating histamine formation in skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*, at low nonfreezing temperatures. *J. Food Science*, 49, 4, 67-70.

Hughes, S.G., 1991. Response of first feeding spring *Chinook salmon* to four potential chemical modifiers

of feed intake. *The progressive Fish-Culturist*, 53, 15-17.

Huisman, J., Van Kempen, G.J.M., Bos, K.D., Verstraten, A.J.M.A. & Fentener J.M. Van Vlissingen.

1992. Effect of fish meal quality and biogenic amines on performance in piglets and chickens.

Nutrition & Food Research Annual Report, TNO Biotechnology and Chemistry Institute, Zeist, the Netherlands, 12-13.

Huss, H. H., 1983. Fresh fish quality and quality changes. A training manual prepared for the

FAO/DANIDA training programme on fish Technology and quality control. FAO Fisheries Series.

No. 29, 27-59.

Jay, J. M., 1986. *Model Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold. Third edition. 75-81, 227-238 pp.

Jeevanadam, M., Holaday, N. J., Begay, C.K. & Petersen, S.R., 1997. Nutritional efficacy of a spermidine supplemented diet. *Nutrition*, 13 (9), 788-794.

Klausen, N.K. & Lund, E., 1986. Formation of biogenic amines un herring and mackerel. *Z. Lebenm Unter Forch.*, 182:459-463.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, V.R., & Sommers, H.M., 1985. *Diagnóstico microbiológico texto y atlas color*. Editorial Médica Panamericana.

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ, Szlachcic A. & Hahn EG., 1998. Polyamines and epidermal growth factor in the recovery of gastric mucosa from stress-induced gastric lesions. *J Clin Gastroenterol*;27 Suppl 1:S97-104

Kranner, P., Bauer, F., & Hellwig, E. 1991. Investigations on the formation of histamine in raw sausages. In proceedings of 37th. International Congress of Meat Science and Technology, 1-6 September, Kulmbach, Germany. P 889-891.

Lakanen JR, Coward JK. & Pegg AE., 1992. Alpha-Methyl polyamines: metabolically stable spermidine and spermine mimics capable of supporting growth in cells depleted of polyamines. *J Med*

Chem., 35(4):724-34.

Levin, J., 1998. The horse crab: A model for gram negative sepsis in marine organisms and humans. In Bacterial Endotoxins: Pathophysiological Effects, Clinical Significance, and Pharmacological Control. Alan R. Liss, Inc. 3-15.

Lesel, R., 1984. Flore bacterienne du tractus digestif des poissons: facteur de variation quantitative. Bactériologie Marine. Marseille 17-18-19 mai, 1982. Editions du CNRS, Paris, 1984, pp 141-149.

Louisot, P., 1983. Destinées des groupements carboxyliques et aminés des amino-acides. Biochimie générale et médicale, structurale, métabolique et sémiologique. Editorial SIMEP. pp 1008.

Majjala, R., Errola, S., Lievonen, S., Hill, P., & Hirvi, T., 1995. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw material. Journal of Food Science. Volume 60, No. 6, 1187-1190.

Mendoza, R., Montemayor, J. & Verde, J., 1997. Biogenic amines and pheromones as feed attractants for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture Nutrition, 3(3),167-174.

Mcgridge, J.L., Smith, T.K. & Sousadias, M.G., 1996. Effect of feeding raw soybean on polyamine metabolism in chicks and the therapeutic effect of exogenous putrescine. J. Anim. Sci., 74:1897-1904.

Montgomery, Douglas C., 1991. Diseño de análisis de experimentos. Editor Nicolás Grepe P. Grupo editorial Iberoamericana S.A. de C.V. 589 pp.

Morgan, D.M., 1992. Polyamines. In Methods in Molecular Biology. Vol. 79. Polyamines Protocols. Morgan, D. Ed. Humana Press Inc. Totowa, NJ.

Morgan, D.M., 1998. Polyamines. In Polyamine Protocols, Methods in Molecular Biology, 79, Humana press, Totowa, NJ.

- Mundheim, H. & Opstvedt, J., 1993. Growth rate of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fish meal with varying content of water soluble protein. pp 847-855 in Kaushik S.J. and Luquet P (Editors). Fish Nutrition in practice. Proceedings of the IVth. International Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Biarritz (France), June 24-27, 1991. Ed. INRA, Paris, Les Colloques, No. 61.
- Nakazoe, J., Castro, R., Yokoyama, M. & Nakazawa, A., 1994. Biological evaluation of fish meal produced in Chile. In: Fish Nutrition and Feeding. Proceedings of the Vth International Symposium (C.B. Cowey and R.P. Wilson editors), 7-10 Sept. 1992, Santiago, Chile. *Aquaculture*, 124, 362.
- Nieto-Lopez, M., 1995. Efecto de las diferencias en el procesamiento de las harinas de pescado y la toxicidad de las mismas, sobre la digestibilidad aparente en el camarón blanco del Pacífico (*Penaeus vannamei* Boone), en condiciones de laboratorio. Tesis de licenciatura. FCB/UANL, 98pp.
- Noack, J., Kleessen, B., Lorenz, A. & Blaut, M., 1996. The effect of alimentary polyamine depletion on germ-free and conventional rats. *Nutritional Biochemistry*. 7: 560-566.
- Olaya, J., Neopikhanov V. & Uribe, A. 1999. Lipopolysaccharide of *Escherichia coli*, polyamines, and acetic acid stimulate cell proliferation in intestinal epithelial cells. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 35, 43-48.
- Opstvedt, J., Mundheim, H., Nygård, E., Aase, H. & Pike, I.H., 1999. Reduced performance from fishmeal from stale fish is not due to increased content of biogenic amines 1. Studies with Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture Nutrition*, submitted for publication.
- Osman NE, Westrom B, Wang Q, Persson L. & Karlsson B., 1998. Spermine affects intestinal *in vitro* permeability to different-sized molecules in rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, 120(2):211-6.

- Osuna, O., 1985. Vómito negro, modelos experimentales y concentración de histidina en harina de pescado. *Avicultura profesional*, 2(4):143-146.
- Peulen O, Pirllet C, Klimek M, Goffinet G. & Dandrfosse G., 1998. Comparison between the natural postnatal maturation and the spermine-induced maturation of the rat intestine. *Arch Physiol Biochem.*, 106(1):46-55
- Pelczar, M.J. & Reid, R.F., 1980. *Microbiología*. Editorial Mc Graw Hill. Traducción por Dr. Leopoldo Hontañón y Cagigal. pp 432.
- Pike, I. H., 1996. 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. & Hardy, R., 1997. Standards for Assessing Quality of Feed ingredients. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. and Akiyama, D.M. (Editors), *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*, Vol 6. 473-492 pp. Edited by World Aquaculture Society Baton Rouge, Louisiana.
- Pike, I.H. & Hardy, R., 1992. Shrimp feed ingredients quality standards. I.A.F.M.M.I. In: L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque (Compiladores) . *Compilado de documentos Harinas y aceites de pescado en nutrición animal*. FCB/UANL, Noviembre de 1992, 176pp.
- Ricque D., Cruz-Suárez, L. E., Abdo-de la Parra, Ma. I. & Pike, I., 1998. Raw material Freshness, a quality criterium for fish meal fed to shrimp. *Aquaculture*, 165, 95-109.
- Romain N, Gesell MS, Leroy O, Forget P, Dandrfosse G. & Luk GD. 1998. Effect of spermine administration on pancreatic maturation in unweaned rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*;120(2):379-84.
- Romero, J.J., Castro, C.E., Díaz, A.M., Reveco & M., Zaldivar, J., 1994. Evaluation of methods to certify the premium quality of chilean meals. In: *Fish Nutrition and Feeding. Proceedings of the Vth*

International Symposium (C.B. Cowey and R.P. Wilson editors), 7-10 Sept. 1992, Santiago, Chile. *Aquaculture*, 124, 351-358.

Sander, J.E.; Cai, T.; Dale, N. & Bennett, L.W., 1996. Development of biogenic amines during fermentation of poultry carcasses. *Appl. Poultry Sci.*, 161-165.

SAS., 1987. SAS User's Guide: Statistics Inst. Inc.: Cary, NC.

Scholz, U., Garcia-Diaz, G., Ricque, D., Cruz-Suárez L.E., Vargas-Albores, F. & Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176, 271-283.

Seidel, E. R. & Scemama, J.L., 1997. Gastrointestinal polyamines and regulation of mucosal growth and function. *Nutritional Biochemistry*, 8: 104-111.

Seiler, H. & Knödgen, B., 1978. Determination of di and polyamines by high performance liquid chromatography separation of their 5-dimethylaminoanaphthalene-1-sulfonyl derivates. *J. Chromatography*, 145, 29-39.

Seiler, H. & Knödgen, B., 1985. Determination of polyamines and related compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography improved separation systems. *J. Chromatography*, 339, 45-57.

Seiler, N., 1992. The role of polyamines in cell biology. In *Chemistry of the Living Cell*. Bittar, E. E., Ed., JAI Press: Greenwich, CT., 3, 509-528.

Seiler, N., 1994. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. 26-36.

Skrede, A., 1979. Utilization of animal by-products in mink nutrition: IV. Fecal excretion and digestibility of nitrogen and amino acids in mink fed cod fillet or meat-and bone meal. *Acta Agric. Scand.*, 29, 241-257.

Smith, T.K., 1990. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. PSEBM,

94,332-336.

Smith, T.K., Mogridge, T., & Sousadias, M.G., 1996a. Growth-promoting potential and toxicity of spermidine, a polyamine and biogenic amine found in food and feedstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 518-521.

Smith, T.K., Fleming, H.E., & Seddon, I.R., 1996b. The effect of dietary cadaverine on chick growth and intestinal polyamine metabolism. *FASEB J.* 10, A512, 2951.

Sousadias, M.G., 1991. Effect of dietary spermine on growth and polyamine metabolism in the chick. Msc. Thesis. Nutricional Sciences Dep., University of Guelph, Guelph, Ontario, Ca. Pp 1-114.

Sousadias, M.G. & Smith, T.K., 1995. Toxicity and growth-promoting potential of spermine when fed to chicks. *J. Anim. Sci.*, 73, 2375-2381.

Subramanyam, M., 1996. Calidad de Ingredientes en la producción y el rendimiento de alimentos para acuicultura. In: R. Mendoza, L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque, Memorias del Segundo Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 7-9 de Noviembre de 1994, Monterrey. FCB/UANL, pp 243-

281.

Tapia-Salazar, M., 1996. Efecto del score biotxicológico sobre el crecimiento y la sobrevivencia del camarón blanco *P. vannamei*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de N.L., México.

Tapia-Salazar, M., Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D. & Galleguillos M., 1999. Gizzard erosion score in chicken as a quality criterion for fish meals fed to the American Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. IV.- Evaluation of commercial samples of low to high scored fish meals on very small shrimp. Final report for research grant C11*-CT93-0300 Commission of the Europe Community, reference paper 7.

Taylor, S.L. & Speckhard, M., W., 1983. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna.

Tecator, 1983. Fat extraction on feeds with the Soxtec System HT - The influence of sample preparation and extraction media. Application note AN 67/83 (1983.06.13). Soxtec System HT Manual, Tecator AB, Sweden.

Tecator, 1987. Determination of Kjeldahl Nitrogen Content with Kjettec System 1026. Application note AN 86/87 (1987.02.18). Kjettec 1026 Manual, Tecator AB, Sweden.

ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J. & Huis in 't Veld, J. H. J., 1990. Occurrence and formation of biologically active amine in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 11, 73-84.

ter Steege JC, Buurman WA. & Forget PP., 1997. Spermine induces maturation of the immature intestinal immune system in neonatal mice. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 25, 3, 332-40.

Til, H.P., Falke, H.E., Prinsen, M.K. & Willems, M.I., 1997. Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem. Toxicol.* 35(3-4), 337-348.

Vargas-Albores, F. y Ortega-Rubio, A., 1994. El sistema inmune de los insectos. *Tópicos de Investigación y posgrado*, IV (1):21-28.

Vargas-Albores, F., 1995a. Sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). *Ciencia*, 46, 33-45.

Vargas-Albores, F., 1995b. The defense system of brown shrimp (*Penaeus californiensis*): Humoral recognition and cellular responses. *Journal of Marine Biotechnology*, 3:153-156.

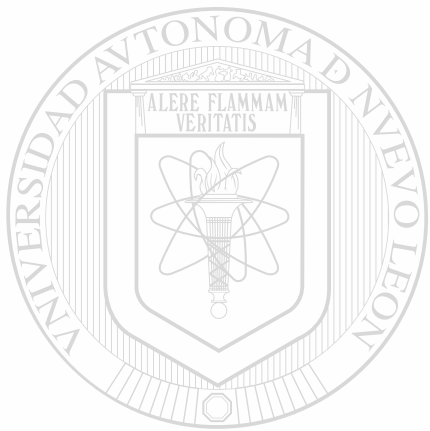
Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, Y., Jiménez-Vega, F., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., y Yepiz-Plascencia, G., 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. In: R. Mendoza, L. E. Cruz-Suárez y D. Ricque Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuicola, Noviembre de 1996, Monterrey, FCB/UANL.

Veciana-Nogues, M.T.; Marine-Font, A. & Vidal-Carou, C., 1997. Biogenic amines in fresh and canned

tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4324-4328.

Watanabe, T., Takeuchi, T., Satoh, S., Toyana, K. & Okusumi, M., 1987. Effect of dietary histidine or histamine on growth and development of stomach erosion in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53(7), 1207-1214.

Zar, J.R., 1974. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.



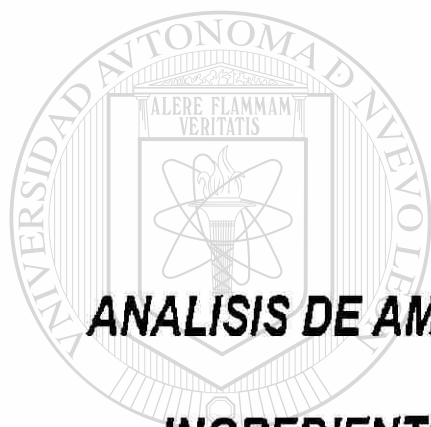
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ANEXO I



ANÁLISIS DE AMINAS BIOGENICAS EN ALIMENTOS, INGREDIENTES Y TEJIDO DE CAMARON POR

CROMATOLOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CARACTERISTICAS DEL HPLC

Cromatografo VARIAN STAR

Programa para colecta de datos Workstation V 4.01 W ADCB

Sistema de reparto de solventes Varian 9010

Detector fluorescente Varian 9070

Autoinyector Varian 9100I

Columna de intercambio cationico ALKION 4 X 150 mm (Laboratorio Pickering)

Precolumna ALKION

Modulo de reacción post columna y calentador de columna a 50°C laboratorio Pickering PC X 5000.

Longitud de onda de excitación y emisión 330 y 466. Debido a que se presento una gran cantidad de aminoácidos en las muestras de tejido se opto por cambiar la longitud de honda a 430 y 600 nm para excitación y emisión respectivamente a partir del tiempo 1 a 2.6 min; posteriormente se retomo la longitud

de onda a sus respectivos valores.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PREPARACION DE LA FASE MOVIL

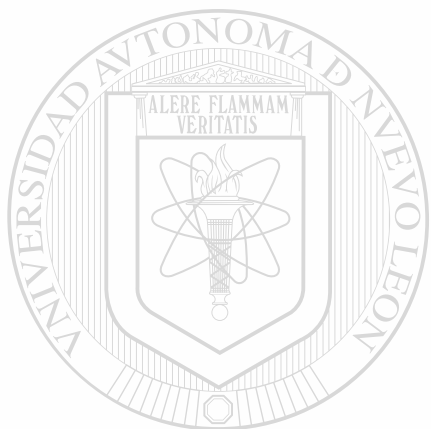
En las primeras etapas de estandarización del método se estuvieron comprando los reactivos directamente de la compañía Pickering Laboratories; debido a que resultaba demasiado costosa la compra de la fase móvil se optó por elaborar nuestros propios reactivos siguiendo los porcentajes de cada químico indicado en cada una de las fases móviles. Todos los eluentes utilizados en la fase móvil deberán de ser filtrados con matraz de filtración de vacío y un filtro de membrana de 0.45μ (tipo HA; Scientific Products & Equipments).

		1 lt	2 lt
A "K600"	2-propanol 11%	110 ml	220 ml
	Fosfato de potasio di básico 0.9%	9 g	18 g
	Acido acético 0.3%	3 ml	6 ml
	Agua 86%	completar	completar
	pH 6.0		
B "K563"	Cloruro de potasio 5%	50 g	100 g
	2-propanol 4%	40 ml	80 ml
	Fosfato de potasio di básico 0.9%	9 g	18 g
	Acido acético 0.3%	3 ml	6 ml
	Agua 90%	completar	completar
	pH 5.63		
C "K130"	2-propanol 4%	40 ml	80 ml
	Fosfato de potasio di básico 0.7%	7 g	14 g
	Hidróxido de potasio 0.5%	5 g	10 g
	Agua 95%	completar	completar
	pH 13		
OD 104	Hidróxido de potasio 3%	30 g	60 g
OPA diluyente	Acido bórico 3%	30 g	60 g
	Agua 95%	completar	completar
	pH 10.4		

NOTA: Medir exactamente 950 ml por botella para cada fase móvil

FASE MOVIL

Intervalo de tiempo (min)	A "K500" (%)	B "K563" (%)	C "K130" (%)
0-6	100	0	0
6.01-25	0	100	0
25.01-27.00	0	0	100
27.01-30.00	100	0	0



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CURVA DE CALIBRACION

1. Estándares para la curva de calibración de poliaminas

* Prepararlos todos en TCA al 10%

Solución madre

Solución madre para preparar 10 ml: concentración de 5000nmol/ml excepto para cadaverina (4000nm/ml) y espermidina (2500nm/ml)

	MW	g/mol	Conc. Requerida		
			(nmol/ml)	mg/ml	
1 Tiramina	137.2	g/mol	5000	0.686	6.9
2 Histamina	184.1	g/mol	5000	0.921	9.2
3 Putrescina	161.1	g/mol	5000	0.806	8.1
4 Cadaverina	175.1	g/mol	4000	0.700	7.0
5 Espermidina	254.6	g/mol	2500	0.637	6.4
6 Espermina	348.2	g/mol	5000	1.741	17.4

***** No olvidar este paso *****

Para preparar 250nmol/ml:

Diluir 1.25 ml of 5000nmol/ml a 25 ml en 10% TCA

2. Secuencia completa para curva de calibración

* Usar TCA al 10% para diluciones

	Concentración deseada	Dilución
A	Para obtener 150 nm/ml	3.0 ml de 250 nm/ml, diluir a 5 ml.
B	Para obtener 100 nm/ml	2.0 ml de 250 nm/ml, diluir a 5 ml.
C	Para obtener 75 nm/ml	1.5 ml de 250 nm/ml, diluir a 5 ml.
D	Para obtener 50 nm/ml	1.0 ml de 250 nm/ml, diluir a 5 ml.
E	Para obtener 25 nm/ml	1.0 ml de 250 nm/ml, diluir a 10 ml.
F	Para obtener 10 nm/ml	2.0 ml de 25 nm/ml, diluir a 5 ml.
G	Para obtener 5 nm/ml	2.0 ml de 25 nm/ml, diluir a 10 ml.
H	Para obtener 2.5 nm/ml	1.0 ml de 25 nm/ml, diluir a 10 ml.

3. Secuencia de concentraciones utilizadas durante el análisis de aminas biogénicas en alimentos y tejido

* Usar TCA al 10% para diluciones

	Concentración deseada	Dilución
D	Para obtener 50 nm/ml	4.0 ml de 250 nm/ml, diluir a 20 ml.
E	Para obtener 25 nm/ml	5.0 ml de 250 nm/ml, diluir a 50 ml.
F	Para obtener 10 nm/ml	8.0 ml de 25 nm/ml, diluir a 20 ml.
G	Para obtener 5 nm/ml	4.0 ml de 25 nm/ml, diluir a 20 ml.
H	Para obtener 2.5 nm/ml	2.0 ml de 25 nm/ml, diluir a 20 ml.
I	Para obtener 1.0 nm/ml	0.8 ml de 2.5 nm/ml, diluir a 20 ml.

4. Tiempo de retención de cada amina

Amina	Tiempo de retención (min)	Límite de detección (pmol/ml)
Tiramina	3.628	50
Histamina	7.228	50
Putrescina	8.926	50
Cadaverina	9.934	40
Esperridina	14.70	40
Esperrina	19.979	25

METODO DE EXTRACCION DE AMINAS CON TCA PARA MUESTRAS DE ALIMENTOS E INGREDIENTES

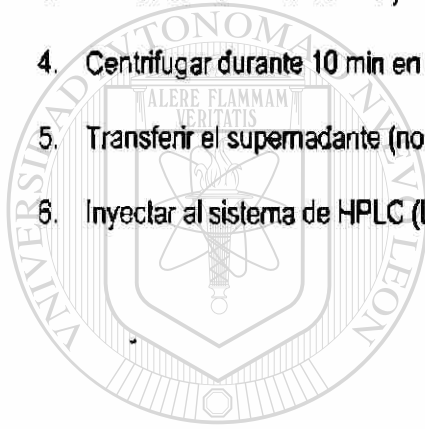
- 1.- Pesar 2 gramos de muestra molida y adicionar 50 ml de TCA al 10%.
- 2.- Homogenizar durante 5 minutos a una velocidad de 5 en un homogenizador Sorval Mixer Omnimixer.
- 3.- Transferir la muestra homogenizada a un tubo de plástico cónico para centrifuga con una capacidad de 50 ml.
- 4.- Mezclar, invirtiendo en tubo varias veces y tomar una alicuota de 1ml y transferirlo a un tubo de 1ml para centrifuga.
- 5.- Centrifugar durante 10 min en una microcentrifuga Fisher a 13, 600 g
- 6.- Hacer diluciones

Tipo de muestra	Dilucion	
Muestras que contengan mas de 4000 ppm de poliaminas suplementadas	1:100	Tomar 50 µl del supernadante y transferirlo a un tubo de vidrio 18X100 y adicionar 4950 µl TCA al 10%
Muestras que contengan por debajo de 4000 ppm de poliaminas suplementadas e ingredientes de origen animal	1:20	tomar 250 µl del supernadante y transferirlo a un tubo de vidrio 18X100 y adicionar 750 µl de TCA al 10%
Muestras sin suplementar e ingredientes de origen vegetal	1:1	-

- 7.- Transferir una muestra a un tubo de vidrio para HPLC
- 8.- Inyectar al sistema de HPLC.

METODO DE EXTRACCION DE AMINAS CON TCA PARA MUESTRAS DE MUSCULO DE CAMARON

1. Colocar en un tubo de plástico (vol 12 ml) 75 mg de muestra molida y adicionar 2 ml de TCA al 10%.
2. Homogeneizar durante 2 minutos a una velocidad de 4.5 en un homogeneizador OMNI International 5000.
3. Tomar una alícuota de 1ml y transferirlo a un tubo de 1ml para centrifugar.
4. Centrifugar durante 10 min en una microcentrifuga Fisher a 13, 600 g
5. Transferir el supernadante (no realizar diluciones) a un tubo de vidrio para HPLC (vol de 1.5 ml).
6. Inyectar al sistema de HPLC (Loop 50 μ l, volumen de llenado 70 μ l, volumen de inyección 50 μ l).



UANL

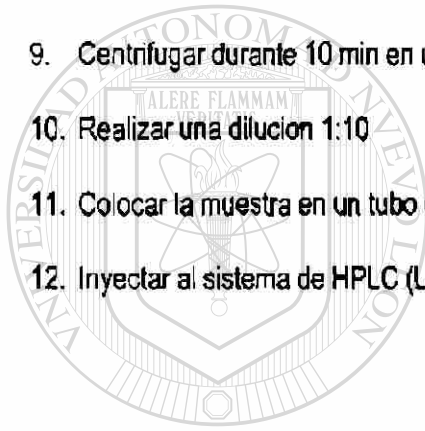
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



METODO DE EXTRACCION DE AMINAS CON TCA PARA MUESTRAS DE HEPATOPANCREAS DE CAMARON

7. Colocar en un tubo de plástico (vol 12 ml) 10 mg de muestra molida de hepatopancreas y adicionar 300 μ l de TCA al 10%.
8. Homogeneizar durante 30 segundos utilizando un desintegrador de tejido Fisher Scientific Modelo 300.
9. Centrifugar durante 10 min en una microcentrifuga Fisher a 13, 600 g
10. Realizar una dilucion 1:10
11. Colocar la muestra en un tubo de vidrio para HPLC (vol de 1.5 ml).
12. Inyectar al sistema de HPLC (Lop 50 μ l, volumen de llenado 70 μ l, volumen de inyección 50 μ l).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

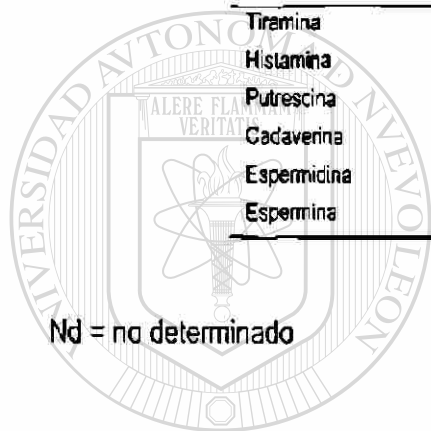


EFICIENCIA DE RECUPERACIÓN

Se determino la eficiencia de recuperación con este método para cada una de las aminas. A una muestra de alimento se le adiciono una cantidad conocida de aminas. El procedimiento de extracción utilizado fue el que se llevo a cabo para cada tipo de muestra.

Amina	Ingredientes y dietas	Músculo de camarón	Hepatopancreas de camarón
Tiramina	99±4	nd	nd
Histamina	92±3	91±24	88±3
Putrescina	101±5	98±34	94±1
Cadaverina	105±4	88±25	97±1
Espermidina	100±2	95±17	94±1
Espermina	98±4	95±3	93±4

Nd = no determinado

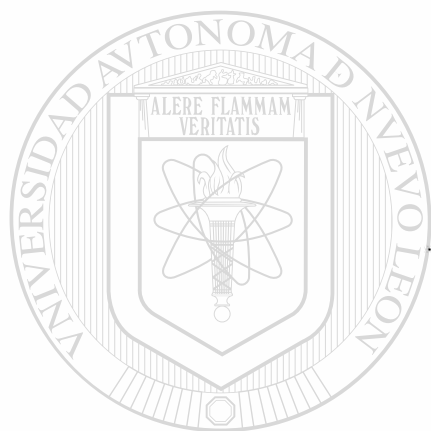


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ANEXO II

UANL

ANÁLISIS DE ENDOTOXINAS EN ALIMENTOS E

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

INGREDIENTES POR MEDIO DE UN MÉTODO

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

COLORIMÉTRICO.

Para llevar a cabo la cuantificación de LPS se utilizó un método colorimétrico "Pyrochrome" Limulus Amoebocyte Lysate adquirido de la compañía CAPE COD en Falmouth, MA. El método utilizado fue el método cromogénico punta final

MATERIAL

Todo el material que se utilice deberá estar libre de pirógenos. Este tipo de material se puede adquirir comercialmente o bien dejar el material durante una noche en una solución del 1% de detergente alcalino; lavar de 8 a 10 veces con agua de la llave tibia, 5 veces con agua destilada o deionizada y 1 vez con agua libre de pirógenos. Secar en una estufa de aire caliente. El material seco se envuelve en papel aluminio y se coloca en una estufa a 1805 °C por 3 horas o 250°C por 30 min.

1.- Pipetas de 1 mL, 5 mL y 100 µl libres de pirógenos

2.- Tubos de plástico de 5 mL libres de pirógenos

3.- Tubos Ependorf de 1 mL libre de pirógenos

4.- Vasos de precipitado de 100 mL libres de pirógenos

5.- Espátula libre de pirógenos.

6.- Microplacas libres de pirógenos

7.- Lector de placas

8.- incubadora

REACTIVOS

1.- Pyrochrome:

Reconstituir el extracto de *Limulus polyphemus* en 3.2 mL de buffer pyrochrome, mezclar (toma de 3 a 5 mL rehidratarse completamente). Tapar con papel parafilm-M y almacenar a 2- 8 °C o colocarlo en hielo cuando no se este utilizando. Este compuesto puede ser utilizado por un periodo no mayor a 3 horas después de su reconstitución

2.- Pyrochrome reconstitution buffer.

3.- Estándar de endotoxinas

Reconstituir cada vial con 1.0, 2.0 y 0.5 mL de LAL reagent water (LAL) para obtener una concentración de 1.0, 2.0 y 0.5 EU/mL respectivamente. Mezclar en un vortex por unos segundos y almacenar a temperatura ambiente. Este compuesto es estable por 8 horas después de su reconstitución.

4.- Diazo reagents

Reconstituir el vial 1 (nitrito de sodio) con el contenido del vial 1a (HCl); reconstituir el vial 2 (sulfato de amonio) con 4 mL de agua destilada y reconstituir el vial 3 (NEDA) con 4 mL de agua destilada.

5.- Acido acético al 50%

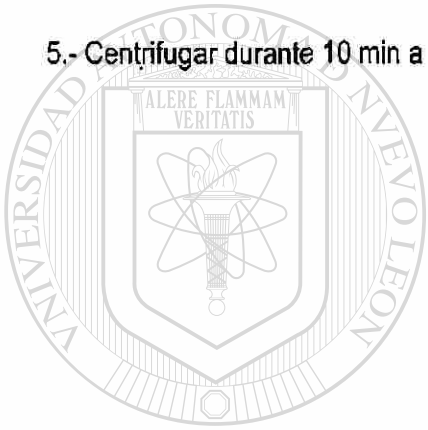
6.- LAL reagent water

Es agua esteril para inyección sin la presencia de bacterias

7.- Agua destilada

EXTRACCION DE LPS EN ALIMENTOS Y HARINAS DE PESCADO

- 1.-Pesar 100 mg de muestra finamente molida.
- 2.- Agregar 5 mL de agua libre de endotoxina
- 3.- Homogenizar durante 1 minutos a una velocidad de 4.5 en un homogenizador OMNI International 5000.
- 4.- Tomar una alícuota de 1mL y colocarla en un tubo ependor de 1.5 mL
- 5.- Centrifugar durante 10 min a 13, 000 g.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

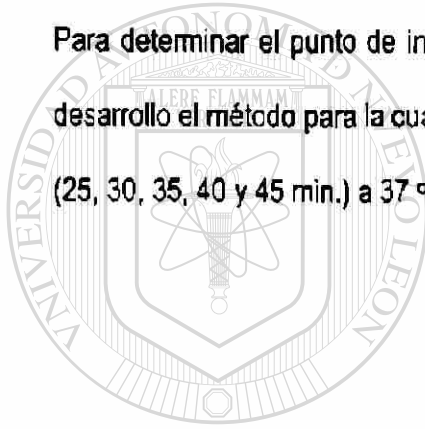
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CURVA DE CALIBRACION

Solución	Concentración (EU/mL)	Cantidad de agua a adicionar
Madre	1.0	
1	0.25	2 mL de agua a la solución madre
2	0.125	100 µl de la solución 1 + 300 µl de agua
3	0.0625	200 µl de la solución 2 + 200 µl de agua
4	0.03125	200 µl de la solución 3 + 200 µl de agua
5	0.01625	200 µl de la solución 4 + 200 µl de agua

Para determinar el punto de incubación se preparó una serie de concentraciones de endotoxinas, se desarrollo el método para la cuantificación de endotoxinas; únicamente se vario el tiempo de incubación (25, 30, 35, 40 y 45 min.) a 37 °C; estableciéndose que a 45 min. fue el mejor tiempo de incubación.



UANL

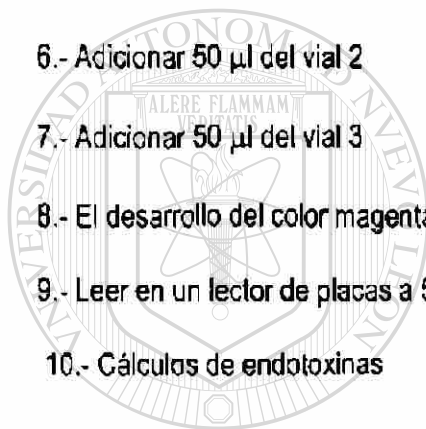
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CUANTIFICACION DE LPS EN ALIMENTOS Y HARINAS DE PESCADO

- 1.- Adicionar 50 μ l de cada muestra en una microplaca
- 2.- Adicionar 50 μ l de pyrochome
- 3.- Mezclar lentamente
- 4.- Incubar 45 min.
- 5.- Parar la reacción adicionando 50 μ l del vial 1
- 6.- Adicionar 50 μ l del vial 2
- 7.- Adicionar 50 μ l del vial 3
- 8.- El desarrollo del color magenta se llevará a cabo en un tiempo de 3 min.
- 9.- Leer en un lector de placas a 540-550 nm.
- 10.- Cálculos de endotoxinas



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

$$X = (y - b)/a$$

®

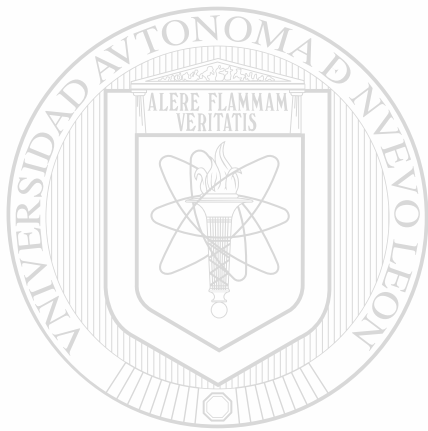
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

y = densidad optica (nm)

x = Concentración de endotoxina

a = pendiente

b = intercepto en Y



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



