

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por brindarme la oportunidad de llegar a este momento; a mis padres, Lucía y Alfredo, por la paciencia y el apoyo incondicional; a mis hermanos por el cariño que siempre me han demostrado.

A las autoridades de la Escuela Politécnica del Ejército.

A mi director de tesis, Ing. Juan Ortiz, por la capacidad científica, profesional y la confianza depositada en mí, durante la elaboración del proyecto

De manera muy especial agradezco, a la Escuela Politécnica Nacional, al Dr. Patricio Castillo y a la Dra. Florinela Muñoz por abrirme las puertas de tan prestigiosa institución, haberme apoyado con sus conocimientos, ciencia, experiencia y sabios consejos. Al grupo de trabajo del Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, gracias por el apoyo brindado.

A todos los profesionales que en forma teórica y práctica han forjado el espíritu para llegar a este momento de trascendental importancia en mi vida.

A los compañeros y amigos, con los que he compartido tantos momentos felices y otros no tanto, a lo largo de la carrera.

En general a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron y me ayudaron para culminar este ideal.

A todos, gracias.

Ana Lucía Alfaro Chávez

DEDICATORIA

**A mis padres, con mucho cariño.
Por haber hecho posible cada logro**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Hoja de legalización de firmas	ii
Certificación	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice de contenidos	vi
Listado de tablas	ix
Listado de cuadros	xii
Listado de figuras	xiv
Listado de anexos	xvi
Resumen	xvii
Abstract	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos de la investigación	4
1.1.1 Objetivo general	4
1.1.2 Objetivos específicos	4
1.2 Marco Teórico	4
1.2.1 Siluriformes	4
1.2.1.1 Familia Astroblepidae	5
1.2.1.2 Clasificación	6
1.2.2 Metabolismo en peces	10
1.2.2.1 Hábitos alimenticios	12
1.2.3 Enzimas	12
1.2.3.1 Clasificación de las enzimas	12
1.2.3.2 Enzimas Digestivas	14

1.2.3.2.1	Proteasas	14
1.2.3.2.2	Serininil Proteasas	14
1.2.3.3	Proteasas Digestivas en Peces	15
1.2.3.4	Actividad Enzimática	16
1.2.3.4.1	Espectrofotometría de la Actividad Enzimática	17
1.2.3.4.2	Unidades enzimáticas	17
1.2.3.4.3	Ensayos con proteínas como sustratos	18
1.2.3.4.4	Ensayos con sustratos cromogénicos	18
1.2.3.5	Grado de hidrólisis	18
1.2.3.6	Cuantificación de proteínas	19
1.2.3.6.1	Método de Lowry	19
1.3	Hipótesis	20
 CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		 21
2.1	Participantes	21
2.2	Zona de estudio	21
2.3	Diseño	24
2.4	Procedimientos	26
2.4.1	Análisis bromatológicos	26
2.4.1.1	Determinación de humedad	26
2.4.1.2	Determinación de ceniza	28
2.4.1.3	Contenido de Proteína	29
2.4.1.4	Grasa	31
2.4.2	Preparación de las formulaciones alimenticias	32
2.4.3	Recolección de las muestras	33
2.4.4	Mantenimiento de <i>Daphnia pulex</i> (pulgas de agua)	33
2.4.5	Mantenimiento y alimentación de preñadillas	34
2.4.5.1	Medición y pesaje de preñadillas	34
2.4.6	Preparación de los extractos enzimáticos de las preñadillas	36
2.4.7	Ensayos enzimáticos	38
2.4.7.1	Actividad caseinolítica	38
2.4.7.2	Descripción de los blancos	39
2.4.7.3	Descripción del ensayo enzimático	40

2.4.7.4 Actividad con sustrato cromogénico	42
2.4.7.5 Descripción de los blancos	42
2.4.7.6 Descripción del ensayo enzimático	44
2.4.8 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	46
2.4.9 Cuantificación de Grado de Hidrólisis	47
2.5 Análisis de Datos	48
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	49
3.1 Análisis bromatológicos	49
3.2 Seguimiento de parámetros productivos y morfométricos	50
3.2.1 Mortalidad	50
3.2.2 Peso	51
3.2.3 Longitud Total	53
3.2.4 Longitud Parcial	55
3.2.5 Ancho	56
3.2.6 Espesor	58
3.2.7 Ancho cefálico	60
3.2.8 Longitud cefálica	63
3.2.9 Parámetros bioproductivos	65
3.3 Preparación de los extractos enzimáticos de preñadillas	66
3.4 Ensayos enzimáticos	67
3.4.1 Actividad caseinolítica	67
3.4.2 Actividad con sustrato cromogénico	68
3.4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	69
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	79
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	81
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	89

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

En la actualidad la suficiente producción de alimento para uso humano como animal, es un problema que involucra la conservación, diversificación e intensificación de la producción agropecuaria, puesto que la población crece de manera exponencial y el planeta cuenta con recursos no renovables, por lo que la ictiología y acuicultura juegan un papel de suma importancia para sentar una base en la seguridad alimentaria de comunidades que dependen de esta forma de alimentación (Muñoz *et al.*, 2009).

La acuicultura es una alternativa adecuada para proveer alimento de excelente calidad con características apetecibles por el mercado, ya que su producción cuenta con características propias, materia altamente digerible, contenido proteico elevado, alta concentración de ácidos grasos poli-insaturados, entre otros (Ortiz, 2008).

Además de una producción masiva de especies acuícolas, se está estudiando la diversificación de estos cultivos con otras especies, como es el caso de dorada *Sparus aurata*, lubina *Dicentrarchus labrax*, rodaballo *Psetta maxima*, lenguado senegalés *Solea senegalensis*, las cuales son especies que tienen un valor comercial importante por presentar ciertas características como su crecimiento elevado y un amplio mercado (Sáenz *et al.*, 2005).

Desde hace algún tiempo se lleva a cabo la intensificación de la crianza de peces, gracias al conocimiento de los requerimientos nutricionales en cada una de las fases, dentro del proceso productivo, que necesita del conocimiento detallado de las necesidades nutricionales antes mencionadas de las distintas especies a cultivar y también del conocimiento para cubrirlas con dietas especializadas que mantengan en condiciones óptimas a los animales para llegar a una transformación energética rentable (Moyano, 2006).

En Ecuador, se ha generalizado la crianza de truchas, lo cual genera serios problemas para otras especies, como es el caso de la preñadilla (*Astroblepus sp.*) que, en la actualidad, se encuentra en la lista de peces en peligro de extinción de la FAO, y ha sido peligrosamente desplazada por las especies introducidas (Muñoz *et al.*, 2009).

Antiguamente, las preñadillas eran encontradas en los ríos de la sierra ecuatoriana; sin embargo, en la actualidad ha llegado a ser considerada una de las once especies en peligro de extinción, con el agravante para nuestro país, que ciertas especies de esta familia son endémicas del Ecuador (Moreano *et al.*, 2005).

La preñadilla, *Astroblepus sp.*, es una familia en la que se ha investigado poco, por lo que no se conocen sus hábitos alimenticios. Para determinar una dieta, que permita extender la crianza de *Astroblepus sp.*, se deben conocer sus requerimientos nutricionales, por lo que se plantea caracterizar el perfil enzimático del tracto digestivo de la preñadilla, específicamente del estómago e intestino, que permitirá conocer sus necesidades metabólicas, así como también las facilidades que tengan para asimilar de manera eficaz los nutrientes aportados en la dieta (Moyano, 2006).

La riqueza ictiológica del Ecuador, debido a su ubicación y clima, es inmensa, por lo que es de suma importancia el preservar los ecosistemas, para que al ser estudiados se facilite la diversificación de especies para acuicultura, evitando perder germoplasma íctico que es una amenaza para la ictiofauna nativa (Ortiz, 2009).

El crecimiento poblacional de los peces depende de: su capacidad digestiva, necesidad de oxígeno y de los requerimientos metabólicos propios de cada especie. Los nutrientes necesarios varían dependiendo de las enzimas producidas por cada individuo. La actividad de las enzimas digestivas y la utilización de los nutrientes son factores clave para optimizar la alimentación, ya que dependiendo de las enzimas que se producen se dan los hábitos alimenticios de los peces, lo que puede ser aprovechado para formular dietas adecuadas para cada especie, pues la actividad de las enzimas digestivas en los peces varía por especie y se ve influenciada por la edad, la cantidad y composición de las dietas (Debnath, 2006).

En distintos proyectos se propone analizar y caracterizar la actividad de las proteasas digestivas de diversas especies, Sáenz *et al.* (2005), Essed, Fernández, Alarcón y Moyano (2002), que estudiaron a ciertos bagres y *Pseudoplatystoma coruscans* (Lundstedt, 2002_a). Estos estudios prestan especial atención a las proteasas puesto que su papel es fundamental en la hidrólisis proteica, siendo la proteína el nutriente más importante para la alimentación de las especies cultivadas (Moyano, 2006).

Astroblepus sp. es una familia con varios representantes nativos del Ecuador y que en la actualidad se encuentra amenazada, por la alteración del hábitat y la predación por otras especies; sin embargo, esta especie es importante para el país, puesto que es considerada un bioindicador de ecosistemas y en la antigüedad era consumida ampliamente y era símbolo de nuestra cultura (Moreano *et al.*, 2005).

Según Moreano *et al.*, 2005, la importancia cultural de la preñadilla se da desde épocas precolombinas, en las que algunas culturas le atribuyeron propiedades relacionadas con la fertilidad femenina, para aumentar la secreción de leche materna, se conoce también que los Incas usaron a las preñadillas como monedas de intercambio y era parte del tributo de etnias. En épocas de colonización este pez se tributaba en Cuaresma. El acervo cultural de la preñadilla es mayor, pues de ella se deriva el nombre de la provincia de Imbabura, que quiere decir criadero de preñadillas (Moreano *et al.*, 2005).

Actualmente la situación poblacional de la preñadilla es alarmante, dado que según estudios de índices de crecimiento poblacional, tamaño efectivo de la población, abundancia, área de ocupación, extensión de ocurrencia, número de subpoblaciones y calidad del hábitat, se ha determinado a *Astroblepus sp.* como críticamente en peligro (Ortiz *et al.*, 2006), por lo que distintas instituciones buscan mejorar los conocimientos de su comportamiento y conservación.

Se espera que, con el presente trabajo se dé un paso adelante en la conservación de esta especie de valor nutricional, histórico y cultural. Los resultados obtenidos buscan permitir una piscicultura para conservación, a partir del análisis que cuantifique la actividad proteásica, lo cual permitirá proyectar una dieta aprovechable para el metabolismo de la preñadilla.

El trabajo fue realizado en distintos laboratorios: el análisis bromatológico se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Bromatología del Centro de Investigaciones Acuícolas, CENIAC; la fase de adaptación y mantenimiento de las preñadillas fue en los laboratorios de acuicultura del Instituto de Ciencias Agropecuarias IASA I, y los análisis de la actividad proteásica se realizaron en el Laboratorio de Investigación Aplicada de la Escuela Politécnica Nacional.

1.1 Objetivos de la investigación

1.1.1 Objetivo general

Determinar la actividad proteásica digestiva de preñadilla (*Astroblepus sp.*) bajo diferentes formulaciones nutricionales experimentales y en condiciones controladas, con el fin de conocer su metabolismo y preservarla.

1.1.2 Objetivos específicos

- Preparar tres dietas experimentales, con diferentes fuentes de proteína, para el mantenimiento de *Astroblepus sp.*
- Determinar parámetros básicos bioproductivos como tasa de crecimiento específico (TCE), factor de conversión alimentaria (FCA) e índice de condición corporal (ICC) en etapas tempranas de crecimiento.
- Comparar la actividad proteásica detectada en dos órganos del aparato digestivo de *Astroblepus sp.*, en dos períodos de vida, con cada una de las dietas experimentales.
- Verificar las preferencias alimenticias de la preñadilla por la actividad proteásica detectada en las dos porciones del aparato digestivo, como en cada etapa de crecimiento.

1.2 Marco Teórico

1.2.1 Siluriformes

Los Siluros son peces de piel desnuda y cuerpo deprimido, adaptados mayoritariamente a los fondos de los ambientes acuáticos. Poseen barbillas en el mentón y en los maxilares con función sensorial y aletas dorsales y/o pectorales provistas de espinas defensivas. Son conocidas comúnmente como catfish, pez gato o bagres (Rossi & Luchini, 2004).

Los Siluros se encuentran distribuidos ampliamente en los Andes, desde Bolivia hasta Panamá, por lo que son de interés para ecologistas y biólogos evolutivos (Ortiz, *et al.*, 2006)

1.2.1.1 Familia Astroblepidae

La familia Astroblepidae es muy cercana a la Loricaridae. Las diferencias más significativas son las aberturas branquiales inhalantes y exhalantes; los intestinos cortos; la cintura pélvica móvil anteroposteriormente, lo que les permite trepar superficies con su ventosa bucal y la presencia de pseudopene en los machos (Galvis *et al.*, 1997).

En términos generales, esta familia se presenta como un pez carnoso y sin escamas, de un tamaño reducido, que alcanza un promedio de 12 cm de largo, en su edad adulta. Vive en aguas corrientes muy aireadas, enterrado bajo las piedras y entre las raíces de plantas acuáticas. Cuenta con un disco bucal que le permite adherirse a las superficies y escalar paredes, con la ayuda de sus aletas pectorales (Moreano, 2005).

Las preñadillas eran consumidas ampliamente en la antigüedad; sin embargo, ahora es difícil hallarla debido a que se han alterado los lugares donde habitaba. Este pez era símbolo de la provincia de Imbabura, donde se le atribuían magníficas características nutritivas debido a su alto contenido proteico (Moreano, 2005).

Es importante mantener las especies y recuperarlas para preservar los recursos genéticos de la ictiofauna, evitando alterar la integridad de los ecosistemas (Ortiz, 2009).

Los hábitos de la preñadilla son predominantemente nocturnos, tienen ojos poco desarrollados, razón por la cual, el día permanecen escondidos. Es principalmente carnívora (Briñez, 2004). Una característica bastante rara entre peces e invertebrados se da en la familia *Astroblepidae*, debido a que a nivel ecológico existe evidencia de un comensalismo epizoico larval con dípteros *Chironomidae* (Ortiz *et al.*, 2006).

En estudios realizados por Ortiz *et al.*, 2006, se menciona que el número cromosómico somático de las muestras analizadas en *Astroblepus* es 52 cromosomas ubicados en 6 grupos más el par sexual XX o XY, siendo 1 par de cromosomas submetacéntricos grandes, 7 pares submetacéntricos medianos, 3 metacéntricos grandes, 3 pares de telocéntricos grandes, 8 pares metacéntricos medianos, 3 telocéntricos pequeños y 2 cromosomas metacéntricos sexuales.

1.2.1.2 Clasificación

Clase: *Actinopterygii*.

Subclase: *Neopterygii*.

Infraclase: *Teleostei*.

Superorden: *Ostariophysi*.

Orden: *Siluriformes*.

Familia: *Astroblepidae*.

Subfamilias: 0

Géneros: *Astroblepus*

Especies: 54

Las especies de *Astroblepus* son:

- *Astroblepus boulengeri* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus brachycephalus* - (Günther, 1859).
- *Astroblepus caquetae* - Fowler, 1943.
- *Astroblepus chapmani* - (Eigenmann, 1912).
- *Astroblepus chimborazoi* - (Fowler, 1915).
- *Astroblepus choate* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus cirratus* - (Regan, 1912).
- *Astroblepus cyclopus* - (Humboldt, 1805).
- *Astroblepus eigenmanni* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus festae* - (Boulenger, 1898).
- *Astroblepus fissidens* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus formosus* - Fowler, 1945.
- *Astroblepus frenatus* - Eigenmann, 1918.
- *Astroblepus grixalvii* - Humboldt, 1805.
- *Astroblepus guentheri* - (Boulenger, 1887).
- *Astroblepus heterodon* - (Regan, 1908).
- *Astroblepus homodon* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus jurubidae* - Fowler, 1944.
- *Astroblepus labialis* - Pearson, 1937.
- *Astroblepus latidens* - Eigenmann, 1918.
- *Astroblepus longiceps* - Pearson, 1924.
- *Astroblepus longifilis* - (Steindachner, 1882).
- *Astroblepus mancoi* - Eigenmann, 1928.
- *Astroblepus mariae* - (Fowler, 1919).
- *Astroblepus marmoratus* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus micrescens* - Eigenmann, 1918.
- *Astroblepus mindoense* - (Regan, 1916).
- *Astroblepus nicefori* - Myers, 1932.
- *Astroblepus orientalis* - (Boulenger, 1903).

- *Astroblepus peruanus* - (Steindachner, 1877).
- *Astroblepus phelpsi* - Schultz, 1944.
- *Astroblepus pholeter* - Collette, 1962.
- *Astroblepus pirrensis* - (Meek & Hildebrand, 1913).
- *Astroblepus praeliorum* - Allen, 1942.
- *Astroblepus prenadillus* - (Valenciennes, 1840).
- *Astroblepus regani* - (Pellegrin, 1909).
- *Astroblepus rengifo* - Dahl, 1960.
- *Astroblepus retropinnus* - (Regan, 1908).
- *Astroblepus riberae* - Cardona & Guerao, 1994.
- *Astroblepus rosei* - Eigenmann, 1922.
- *Astroblepus sabalo* - (Valenciennes, 1840).
- *Astroblepus santanderensis* - Eigenmann, 1918.
- *Astroblepus simonsii* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus stuebeli* - (Wandolleck, 1916).
- *Astroblepus supramollis* - Pearson, 1937.
- *Astroblepus taczanowskii* - (Boulenger, 1890).
- *Astroblepus theresiae* - (Steindachner, 1907).
- *Astroblepus trifasciatus* - (Eigenmann, 1912).
- *Astroblepus ubidiai* - (Pellegrin, 1931).
- *Astroblepus unifasciatus* - (Eigenmann, 1912).
- *Astroblepus vaillanti* - (Regan, 1904).
- *Astroblepus vanceae* - (Eigenmann, 1913).
- *Astroblepus ventralis* - (Eigenmann, 1912).
- *Astroblepus whymperi* - (Boulenger, 1890) (www.fishbase.org. 2008)

Actualmente, las poblaciones de preñadillas han disminuido, debido a los cambios ligados al desarrollo económico, deterioro del hábitat y la introducción de especies foráneas; a lo cual se agrega la sensibilidad de la preñadilla por ser un bioindicador, razón por la cual es catalogada como especie críticamente amenazada en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Moreano, 2005).

Para desarrollar proyectos de conservación de la preñadilla y, en general, cualquier especie se debe suministrar un alimento adecuado, que cubra los requerimientos nutricionales del animal, que sea de su agrado, que no contenga componentes que puedan alterar las condiciones y características del animal y que garanticen la rentabilidad de la producción de preñadillas (Essed *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se busca analizar el perfil proteásico del tracto digestivo (estómago e intestino) de preñadillas en distintas etapas de crecimiento, para determinar el metabolismo y necesidades alimenticias básicas.

Esto permitirá observar los posibles cambios en el metabolismo de la preñadilla, en caso de que su perfil enzimático cambie durante su crecimiento. Al analizar a las preñadillas desde tempranas edades se las puede adaptar a cierto tipo de alimento para que sea aprovechado al máximo dependiendo de su equipamiento enzimático.

Las proteasas son las encargadas del aprovechamiento de las proteínas que ingresan al organismo y que, a su vez, son la parte fundamental de la dieta de la mayoría de organismos (Essed *et al.*, 2002).

Astroblepus sp. pertenece al orden de los Siluriformes, que no ha sido estudiada a profundidad, por lo que las oportunidades de investigación son extensas. Una vez conocido el perfil enzimático del estómago e intestino, se puede continuar con el estudio de la histología de órganos, la intensificación de su reproducción; o, dentro del mismo campo de la bioquímica digestiva, se puede dar respuesta a los planteamientos de Moyano (2006) referentes a los parámetros cinéticos de enzimas de especies acuícolas cultivadas.

Debido a la importancia de la preñadilla, se han realizado diversas investigaciones como estudios poblacionales de identificación genética y ecológica para buscar mecanismos de seguridad de germoplasmas acuáticos para preservar la riqueza natural del Ecuador.

En el Ecuador, actualmente, se han encontrado 16 especies de *Astroblepus*, de las cuales, las más abundantes son *A. trifasciatus*, *A. chocotae*, *A. caquetae*, *A. chapmani*, *A. homonodon*, *A. longifilis* y *A. marmoratus* (Muñoz *et al.*, 2009), las mismas que se encuentran repartidas en los pisos subtropical oriental, occidental hasta el alto andino (Barriga, 1991).

De las especies nombradas, las que se encontraron mayormente en las zonas de recolección (Araque, Pasa y Miraflores), en la región Sierra, fueron *Astroblepus micrescens* y *Astroblepus marmoratus*, por lo que la investigación se efectuó en estas especies.

Astroblepus micrescens



Figura 1.1 *Astroblepus micrescens*. a. región dorsal. b. región ventral (Muñoz *et al.*, 2009).

Como se puede ver en la Figura 1.1, *Astroblepus micrescens*, según lo mencionan Briñez (2004) y Muñoz *et al.* (2009), es un siluro de coloración oscura en la región dorsal con manchas pardas en todo el cuerpo, papilas en la región anterior a la aleta dorsal. Como característica principal, no posee aleta adiposa sino una terminación abrupta, además, todas las aletas presentan espinas que superan en su longitud a los radios blandos; sus ojos son pequeños, dorsales; una boca inferior ventosa, exhibe dos barbicelos cortos a los lados del labio superior. Presenta dientes bicúspides en las filas superiores, irregulares en el centro y a los lados incisivos, dientes inferiores bicúspides grandes.

De estudios realizados en Colombia, analizando tractos digestivos, se determinó que esta familia se alimenta principalmente de restos de insectos acuáticos y dípteros (Briñez, 2004).

Astroblepus marmoratus

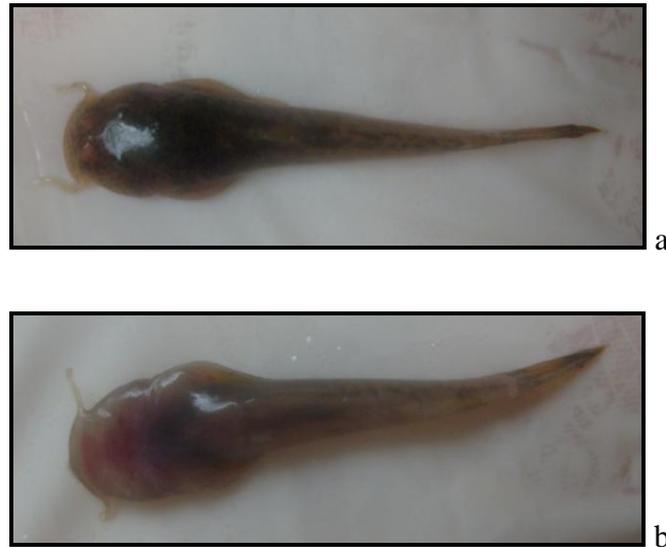


Figura 1.2 *Astroblepus marmoratus*. a. región dorsal. b. región ventral

Los individuos de esta especie (Figura 1.2), como los describe Maldonado *et al.* (2005), son de color café manchado con negro, con algunos puntos oscuros en la aleta caudal, presentan una serie externa de dientes unicúspides en el premaxilar, dientes mandibulares bicúspides, los barbillones se extienden más allá de la apertura branquial, el primer radio dorsal es tan largo como la cabeza, las ventrales inician cerca del primer radio de la aleta dorsal y se extienden un poco más allá de la apertura anal, que se sitúa entre la mitad de la base de las ventrales y el primer radio anal. Presenta aleta adiposa desarrollada.

1.2.2 Metabolismo en peces

Al ser los peces un grupo sumamente numeroso y diverso, presenta muchas adaptaciones tanto morfológicas como fisiológicas y de comportamiento; pero las más importantes son las estrategias de alimentación y de respuesta al estrés, dependiendo de aspectos propios de cada organismo, con lo que, incluso peces de la misma especie pueden utilizar estrategias distintas por el lugar o la época en la que se encuentran (Martínez y Ríos, 2003).

El aspecto nutricional es de suma importancia para el cultivo de un organismo, por lo que es necesario establecer sus requerimientos nutritivos, sus capacidades digestivas y de transformación de los alimentos. En la actualidad, se plantean dos aspectos en la alimentación de especies acuáticas, que son: a) maximizar el rendimiento técnico de la producción, mediante el empleo de alimentos más adecuados a las necesidades fisiológicas de cada especie, en sus diferentes etapas de crecimiento; y, b) aumentar el beneficio económico, mediante el desarrollo de los alimentos adecuados desde una perspectiva tecnológica, basada en el valor nutritivo y el costo, la disponibilidad y la facilidad de procesado de las diferentes materias primas (Moyano, 2006).

La función del aparato digestivo es la de interfase entre el alimento y el organismo del animal, pues es donde se lleva a cabo la manipulación inicial, la hidrólisis y la transferencia de los nutrientes necesarios para el organismo, en donde las enzimas cumplen papeles primordiales, permitiendo degradar las macromoléculas hasta volverlas digeribles para el organismo (Moyano, 2006).

En estudios citados por Essed *et al.* (2002), se sugiere que para la cría en cautiverio de cualquier especie desde sus primeras etapas, es necesario habituarla a un alimento que satisfaga las necesidades metabólicas, por lo que es fundamental conocer la bioquímica digestiva., tema de la presente investigación.

Para obtener mayor eficacia en el crecimiento de los organismos en cautiverio es necesario explotar los aspectos nutricionales de la especie en cuestión. La proteína es de mucha importancia pues es un componente estructural, así como la función que cumple a nivel celular, de crecimiento y reparación de tejidos, por lo que es necesario analizar su asimilación en el organismo, especialmente en el aparato digestivo (Celis *et al.*, 2005).

La alimentación es, en todos los organismos, el proceso por el que se obtiene energía y nutrientes necesarios para el crecimiento, reproducción y demás funciones metabólicas, los peces tienen estructuras y mecanismos de alimentación distintos para explotar diversas fuentes alimenticias vegetales y animales presentes en su hábitat.

1.2.2.1 Hábitos alimenticios

Tanto los modos de alimentación como los tipos de alimento se encuentran asociados con la forma del cuerpo y el aparato digestivo, ya que estas modificaciones les permiten aprovechar una fuente de alimento en particular y el acceso al mismo (Martínez y Ríos. 2003).

El parámetro para conocer el hábito alimentario del pez es el índice LIR, que es la Longitud Intestinal Relativa, en el cual se relaciona la longitud del intestino, con la longitud total del pez, como es mencionado por Sáenz *et al.* (2005). Generalmente, los peces omnívoros poseen índices mayores que los peces carnívoros; los últimos muestran valores de este índice inferiores a 1 (Sáenz *et al.*, 2005).

También existen estructuras que permiten reconocer los hábitos alimenticios de una especie en particular, como las estructuras en la cavidad bucofaríngea o las espinas branquiales que pueden presentar especializaciones; éstas últimas, en el caso de peces carnívoros son cortas, gruesas, ampliamente espaciadas y puntiagudas para evitar que las presas escapen por las branquias ocasionándoles daño, en los peces zooplanctófagos están menos espaciadas, con longitud y grosor intermedios (Martínez y Ríos, 2003).

1.2.3 Enzimas

Según Lehninger 2005, “*las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones metabólicas*”. Con la excepción de las ribozimas, todas las enzimas conocidas son proteínas. Son capaces de acelerar reacciones químicas con una gran especificidad, sin formar subproductos y no intervienen en el balance de la reacción catalizada.

1.2.3.1 Clasificación de las enzimas

Existe un acuerdo internacional para la clasificación y nomenclatura de las enzimas, que evita ambigüedades al momento de nombrarlas. Este sistema está basado en la clase de reacción catalizada por cada enzima a la que se asigna un número. Cada

clase es dividida en subclases y sub-subclases (Lehninger, 1981). Las clases y subclases están detalladas en el cuadro 1.1.

Las enzimas, generalmente, poseen un nombre corto para su uso habitual, pero también se les asigna un nombre sistemático, más preciso, que identifica al tipo de reacción que catalizan. En caso de necesitar una identificación inequívoca, se emplea el número de clasificación, precedido de las siglas EC que significa Comisión de Enzimas. La primera cifra representa el nombre de la clase; la segunda cifra, la subclase; la tercera cifra, la sub-subclase; y, la cuarta cifra corresponde a la enzima específicamente (Lehninger, 1981).

Cuadro 1.1 Clasificación de las enzimas

1. Oxidorreductasas	2. Transferasas
Deshidrogenadas	Trasnsaldolasa y transcetolasa
Oxidasas	Acil-metil-glucosil- y fosforiltransferasas
Reductasas	Quinasas
Peroxidasas	
Catalasas	
Oxigenasas	
3. Hidrolasas	4. Liasas
Esterasas	Descarboxilasas
Glucosidasas	Aldolasas
Peptidasas	Hidratasas
Fosfatasas	Deshidratasas
Tiolasas	Sintasas
Fosfolipasas	Liasas
Amidasas	
Desamidasas	
Ribonucleasas	
5. Isomerasas	6. Ligasas
Racemasas	Sintetasas
Epimerasas	Carboxilasas
Isomerasas	
Mutasas (no todas)	

Fuente (York, 2004)

1.2.3.2 Enzimas Digestivas

Las enzimas presentes en el aparato digestivo son un reflejo del hábito alimentario de cada especie, puesto que permiten el rompimiento del alimento para que sea asimilable por el organismo. Éstas son secretadas a lo largo del tracto digestivo, para descomponer las macromoléculas nutritivas, a fin de que puedan ser absorbidas a través del torrente sanguíneo.

Las principales enzimas digestivas, tal como lo menciona Manber *et al.* (2005) en su publicación, son: a) las amilasas, presentes principalmente en la saliva y jugos pancreáticos e intestinales, actúan sobre los carbohidratos, b) las proteasas, presentes en los jugos gástricos, hidrolizan a las proteínas, y c) las lipasas que degradan las grasas.

1.2.3.2.1 Proteasas

Las proteasas, son enzimas digestivas, su papel es fundamental en la hidrólisis de la proteína, que es el nutriente clave para la alimentación de la mayoría de especies.

Las proteasas se clasifican en serinil proteasas, aspartil proteasas, tiol proteasas, zinc proteasas (Fersht, 1999). Mayoritariamente, las enzimas digestivas pertenecen al grupo de las serinil proteasas.

1.2.3.2.2 Serinil Proteasas

Estas enzimas tienen un residuo de serina muy reactivo en su sitio activo, son endoproteasas. A más del residuo de serina, interviene un residuo de histidina y un residuo de ácido aspártico en el proceso catalítico. Forman una triada catalítica característica de este grupo, en el cual cada enzima tiene una especificidad distinta por el sustrato, debido a sus diferencias estructurales en las cavidades donde se aloja el sustrato, junto al sitio activo de la enzima. Todas las proteasas pertenecientes a esta subclase tienen en común los primeros 3 dígitos del código asignada por la EC 3.4.21 (Reyes y Emedith, 2008).

1.2.3.3 Proteasas Digestivas en Peces

Las vísceras de los peces son fuente potencial de distintas enzimas, sobre todo de proteasas, las cuales se clasifican por su sensibilidad al pH, en ácidas y alcalinas. Las proteasas digestivas de los peces se pueden usar ampliamente en el área médica, farmacéutica, vinícola, entre otras, debido a la catálisis que presentan, pues muestran una baja temperatura óptima, baja termoestabilidad y alto pH óptimo, a diferencia de las enzimas homólogas de mamíferos terrestres (Reyes y Emedith, 2008).

En los peces con estómago, las glándulas de la mucosa gástrica secretan ácido clorhídrico y pepsinógeno, para cubrir los parámetros óptimos de actividad de la pepsina, lo que facilita la posterior hidrólisis completa de las proteínas a restos de aminoácidos por las enzimas del intestino medio y posterior, en un ambiente alcalino. En los peces, sin estómago, la digestión de las proteínas se da por una elevada actividad proteolítica alcalina en el intestino, igual que en los primeros estadíos de vida de los peces con estómago (Martínez y Ríos, 2003).

La determinación de los cambios de la actividad enzimática, a través de las etapas de crecimiento de la preñadilla, permitirá prever cambios digestivos que darán la pauta adecuada para formular el debido complemento alimenticio, que cubra las necesidades nutricionales en cada etapa (Alarcón, 1995). Esto también, permitirá adaptar gradualmente a las larvas a un alimento para su edad madura, pues al conocer el perfil enzimático de la larva se pueden añadir microagregados en sus dietas, a fin de compensar la baja producción o carencia de cierta enzima o metabolito y garantizar la eficiencia de absorción del alimento suministrado (Alarcón, 1995).

Essed *et al.* (2002) indica que es interesante establecer relaciones, tanto entre los niveles de actividad proteásica ácida y alcalina, como dentro de esta última, entre la tripsina y la quimotripsina. Esto ayuda a determinar los hábitos alimenticios de los organismos ya que se ha descrito que, en las especies eminentemente carnívoras existen niveles muy altos de pepsina, que resultan menores en los peces omnívoros o herbívoros. Igualmente, en los peces carnívoros la cantidad de tripsina es mayor que la de quimotripsina y parece existir una estrecha relación inversa entre la pepsina gástrica y la quimotripsina.

Tabla 1.1 Principales enzimas, secretadas en forma de pro enzimas en peces

Enzima	Actividad	Órgano	Especie
Pepsina	Hidrólisis de las uniones internas.	Estómago	Todas las especies con estómago.
Tripsina	Hidrólisis de las uniones internas, aminoácidos de carga positiva.	Páncreas.	Todas las especies.
Chimo tripsina	Hidrólisis de las uniones internas, aminoácidos con enlaces aromáticos.	Páncreas.	Todas las especies.
Elastasa	Hidrólisis de las uniones internas.	Páncreas.	Todas las especies.
Colagenasa	Hidrólisis de las uniones internas.	Páncreas.	Todas las especies.
Carboxipeptidasas A y B	Hidrólisis de las uniones externas.	Páncreas.	Todas las especies.
Carboxilesterasa	Hidrólisis de los péptidos.	Páncreas.	Todas las especies.
Amilasa	Hidrólisis de los almidones (1-4).	Páncreas.	Todas las especies.
Quitinasa	Hidrólisis de las quitinas.	Estómago, páncreas y otros tejidos.	Especies que se alimentan principalmente de insectos y crustáceos.
Complejo lipasa colipasa	Hidrólisis de los triacylgliceroles especialmente de posición.	Páncreas.	Todas las especies.
Esterasas	Hidrólisis de los triacylgliceroles y otros lípidos.	Páncreas.	Todas las especies.
Ribonucleasas	Hidrólisis de los ácidos nucleicos.	Páncreas.	

Fuente: en Ortiz *et al.*, 2008

1.2.3.4 Actividad Enzimática

La actividad enzimática se encuentra definida por la velocidad a la cual una enzima cataliza la reacción y es expresada como moles de sustrato consumido o moles de producto formado por unidad de tiempo; la actividad específica es la actividad enzimática por mg de proteína.

Existen factores que influyen en la actividad enzimática, como la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, los cofactores o coenzimas, la presencia de sales y otros metabolitos que actúan como inhibidores (Casamayor y González, 2008).

1.2.3.4.1 Espectrofotometría de la Actividad Enzimática

Al medir cambios en la absorbancia, a lo largo del tiempo se puede monitorear la formación del producto o desaparición del sustrato, por la ley de Lambert-Beer, según la cual:

$$Abs = a * b * c \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

Abs: Absorbancia

a: Coeficiente de extinción molar

b: Longitud del paso de luz o camino óptico

c: Concentración

Fuente: Casamayor y González, 2008.

1.2.3.4.2 Unidades enzimáticas

Se conoce como unidad de actividad enzimática (U) a la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/ml) (González, 2004).

En el S. I. la unidad de actividad enzimática es el Katal, que se define como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato en producto, por segundo. Como 1 mol son 10^6 μmoles y 1 minuto son 60 segundos, 1 katal equivale a 60×10^6 U (Casamayor y González, 2008).

El número de recambio de la enzima es el número de reacciones elementales que realiza la enzima, por cada centro activo y unidad de tiempo; y se puede conocer con el peso molecular de la enzima pura y el número de centros activos por molécula de enzima (González, 2004).

1.2.3.4.3 Ensayos con proteínas como sustratos

Para estos ensayos espectrofotométricos se usa como base el método de Anson el cual mide la cantidad de producto formado de una proteína, caseína o hemoglobina. Se debe detener la reacción de hidrólisis con ácido tricloro acético para que precipiten el sustrato sin degradar y la enzima, de modo que los péptidos resultantes se mantengan estables en la solución (Universidad de la Habana, 2008).

1.2.3.4.4 Ensayos con sustratos cromogénicos

Los sustratos cromogénicos al entrar en contacto con la enzima se transforman, formándose una nueva estructura molecular coloreada que puede ser observada espectrofotométricamente.

Según los protocolos e información proveniente de la Universidad Pablo de Olavide (2008), en el caso de las proteasas, la interacción específica con el sustrato (DL-BApNA) se produce a través del residuo de fenilalanina. La hidrólisis de este enlace peptídico genera entre otros productos de reacción, la p-nitroanilida, de color amarillo, lo que permite seguir espectrofotométricamente el progreso de la reacción mediante la medida de la velocidad de formación de este producto, para lo cual se mide el aumento de absorbancia de la disolución con el tiempo, a la longitud de onda de máxima absorción de la p-nitroanilina ($\lambda_{max}=400$ nm, coeficiente de extinción molar, $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para distintas concentraciones iniciales de DL-BApNA. La concentración de producto se obtiene con la ley de Lambert-Beer.

1.2.3.5 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis permite seguir y controlar la hidrólisis de proteínas.

$$GDH = \frac{h}{h_{total}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

GDH grado de hidrólisis
h número de enlaces peptídicos hidrolizados
h_{total} número total enlaces peptídicos

Para medir el grado de hidrólisis existen distintos métodos, que se basan principalmente en la determinación de nitrógeno soluble luego de la precipitación de la proteína con ácido tricloroacético; la determinación de los grupos α -amino libre, y la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados pHs (Guadix *et al.*, 2000).

1.2.3.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas es necesaria en un sinnúmero de investigaciones, en la purificación de una proteína específica, para conocer la actividad específica de una enzima, diagnosticar enfermedades, entre otras.

1.2.3.6.1 Método de Lowry

Es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. En el que se dan dos reacciones. La primera, se conoce como reacción de Biuret y se da en un medio alcalino, donde los iones Cu^{2+} se unen a las proteínas para formar complejos con enlaces peptídicos de las proteínas. Los complejos Cu^{2+} -proteína provocan un desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, con lo que se exteriorizan los residuos fenólicos de tirosina. La segunda reacción, ocurre igualmente en medio alcalino, se da una reducción del reactivo Folin-Ciocalteau por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presente en la mayoría de las proteínas. El cobre actúa como catalizador. Estos grupos fenólicos reducen el ácido fosfomolibdotúngstico, que es de color amarillo y principal constituyente del reactivo Folin-Ciocalteau, resultando un complejo color azul intenso, que absorbe a una densidad óptica entre 650 y 750 nm (Martínez, 2007).

1.3 Hipótesis

La actividad proteásica digestiva de *Astroblepus sp.* es similar a especies piscícolas de hábitos carnívoros.

La actividad proteásica digestiva de *Astroblepus sp.* es mayor cuando el animal es sometido a una dieta de alimento vivo.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación, en su fase experimental, se desarrolló en el laboratorio de bromatología del CENIAC (Centro de Investigaciones Acuícolas); en los laboratorios de acuicultura del IASA del Departamento de Ciencias de la Vida de la ESPE; y en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, de la Escuela Politécnica Nacional.

2.2 Zona de Estudio

El estudio se realizó en dos fases: a) fase de campo, en la que se realizaron las recolecciones de muestras de preñadillas, y b) fase de laboratorio, en la que se mantuvo, analizó y verificó distintos parámetros tanto de la preñadilla como de su hábitat.

La recolección de las muestras se realizó en tres zonas:

Lugar: Araque (Figura 2.1), ubicado a 78° 12' 499'' (Oeste) y 0° 11' 48'' (Norte), y a una altitud de 2670 m snm, en el cantón Otavalo de la provincia de Imbabura.



Figura 2.1 Mapa de ubicación de zona de recolección de preñadillas, Araque.

Google® earth 2009

Lugar: Miraflores (Figura 2.2), ubicada a $78^{\circ} 38' 43''$ (Oeste) y $1^{\circ} 15' 15''$ (Sur), y a una altitud de 2580 m snm, en el cantón Ambato, provincia Tungurahua.

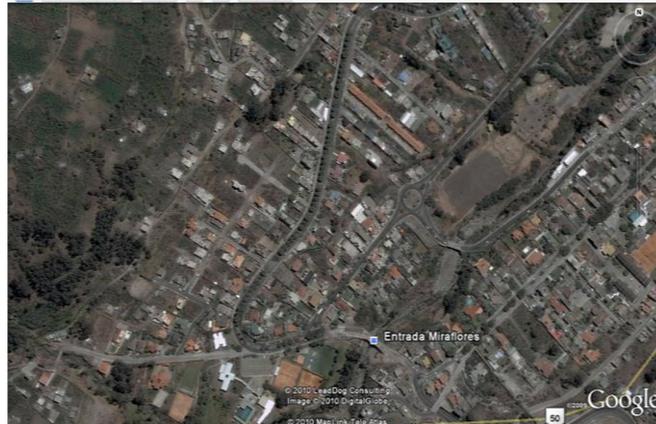


Figura 2.2 Mapa de ubicación de zona de recolección de preñadillas, Miraflores.

Google® earth 2009

Lugar: Pasa (Figura 2.3), ubicada a $78^{\circ} 43' 50''$ (Oeste) y $1^{\circ} 16' 09''$ (Sur), a una altitud de 3125 m snm, en el cantón Ambato, provincia Tungurahua.

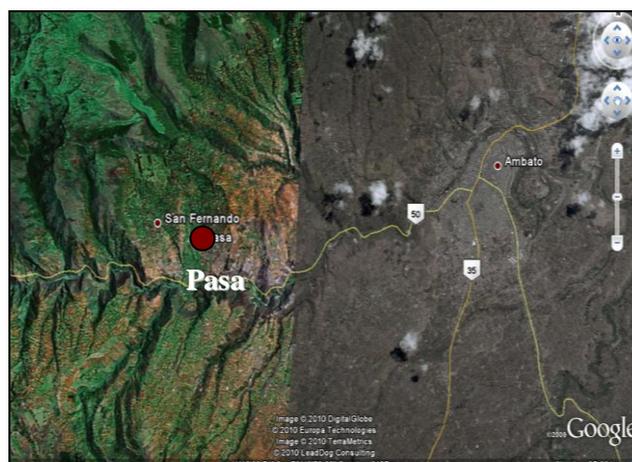


Figura 2.3 Mapa de ubicación de zona de recolección de preñadillas, Pasa.

Google® earth 2009

Los posteriores análisis se realizaron en tres laboratorios distintos, los cuales se detallan a continuación

Lugar: Laboratorio de bromatología, CENIAC (Centro de Investigaciones Acuícolas) (Figura 2.4), Papallacta, ubicado a $78^{\circ} 09' 00''$ (Oeste) y $0^{\circ} 22' 04''$ (Sur), a una altitud de 3290 m snm, en el cantón Baeza, provincia Napo.



Figura 2.4 Mapa de ubicación de Centro de Investigaciones Acuícolas CENIAC. Google[®] earth 2009

Lugar: Laboratorios de Acuicultura, IASA, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ciencias Agropecuarias, Escuela Politécnica del Ejército (Figura 2.5), ubicado en la Hacienda “El Prado”, provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando, a $78^{\circ} 24' 44''$ (Oeste) y $0^{\circ} 23' 20''$ (Sur), a una altitud de 2748 m snm.



Figura 2.5 Mapa de ubicación del Instituto de Ciencias Agropecuarias IASA I.

Google® earth 2009

Lugar: Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Escuela Politécnica Nacional, campus José Rubén Orellana (Figura 2.6). Ubicado en el sector centro oriental de Quito a 78° 29' 19" (Oeste) y 0° 12' 35" (Sur), a una altitud de 2806 m snm, en el cantón Quito, provincia Pichincha.



Figura 2.6 Mapa de ubicación de la Escuela Politécnica Nacional.

Google® earth 2009

El período de investigación fue de abril del 2009 a marzo del 2010, tuvo una duración de 11 meses.

2.3 Diseño

En el presente trabajo se aplicó un Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con 3 repeticiones. Se evaluaron tres tipos de formulaciones alimenticias que se detallan en la Tabla 2.1, en distintas etapas de crecimiento (Tabla 2.2) de *Astroblepus sp.*

Tabla 2.1 Formulaciones alimenticias planteadas para la etapa de mantenimiento de las preñadillas.

Formulaciones Alimenticias	Constituyentes	Proteína	Grasa	Fibra	Humedad
Dieta 1	Nutrafin*	46%	5%	2%	7.8%
Dieta 2	Pulgas de agua** + Tubifex*	52%	12%	5%	5%
Dieta 3	Espirulina* + Maní* (adición de atractante)	36,61%	23,1%	2,07%	5%

* Según especificaciones del producto comercial.

** Díaz *et al.*, 2004.

Las preñadillas fueron clasificadas por su tamaño (Tabla 2.2) debido a que fueron colectadas de su hábitat, por lo que se desconocía su edad.

Tabla 2.2 Grupos de preñadillas por tamaños

Grupo	Denominación	Tamaño
P1	Pequeños	>3,50 cm <6,00 cm
P2	Grandes	>6,00 cm

Los tratamientos fueron los que se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Tratamientos suministrados a las preñadillas estudiadas.

Tratamiento	Especificación
P1D1	Preñadillas pequeñas bajo alimento comercial nutrafin.
P1D2	Preñadillas pequeñas bajo dieta de pulgas de agua con tubifex.
P1D3	Preñadillas pequeñas bajo dieta de maní con espirulina.
P2D1	Preñadillas grandes bajo alimento comercial nutrafin.
P2D2	Preñadillas grandes bajo dieta de pulgas de agua con tubifex.
P2D3	Preñadillas grandes bajo dieta de maní con espirulina.

A cada pecera se le asignó un tratamiento distinto por sorteo, se realizaron tres repeticiones, por lo que se trabajó con 18 peceras, en las que se encontraban 2 preñadillas en cada una, 36 preñadillas en total. Se las mantuvo durante 9 semanas bajo la alimentación correspondiente para posteriormente analizar la actividad proteásica encontrada en dos secciones del tracto digestivo (estómago e intestino).

2.4 Procedimientos

2.4.1 Análisis bromatológicos

Se realizaron análisis bromatológicos a las muestras de preñadillas que se encontraban almacenadas en el laboratorio de acuicultura del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA I) de la Escuela Politécnica del Ejército, para conocer su composición y a partir de ello determinar, posteriormente, las dietas que se suministraron.

2.4.1.1 Determinación de la humedad

Para determinar la humedad, se trabajó con una muestra de 2 preñadillas grandes. Se homogenizó la muestra de preñadillas a 10 000 rpm en un homogenizador, durante 5 min. Como se muestra en la Figura 2.1.



Figura 2.7 Homogenización de las preñadillas. Homogenizador Nihonseiki Kaisha, modelo Nissei AM-8

Se colocó alrededor de 1 g de muestra en cada crisol de porcelana, previamente deshidratado y que haya permanecido en el desecador hasta el momento de utilizarlo, al cual se pesó en una balanza Mettler Toledo, modelo AG 245; y se colocaron los crisoles con la muestra en la estufa, a 110° C, durante 2 horas (Figura 2.8).



Figura 2.8 Estufa para determinar el contenido de humedad en preñadillas. Secado en estufa Isuzu Seisakusho Co. Ltda., modelo Azisai.

Los crisoles se enfriaron en el desecador para evitar que las muestras absorban humedad. Posteriormente, se pesaron los crisoles con la muestra y se calcularon los porcentajes de humedad, según la expresión:



Figura 2.9 Crisoles con las muestras de preñadilla extraídas la humedad.

$$\%H = \frac{P_f - P_i}{P_m} * 100 \quad (\text{Ec.3})$$

Donde:

%H porcentaje de humedad

P_f peso final del crisol con la muestra luego de ser enfriada en el desecador

P_i peso inicial del crisol vacío

P_m peso de muestra colocado en el crisol

2.4.1.2 Determinación de la ceniza

Se siguieron los pasos del procedimiento anterior, pero los crisoles con la muestra se colocaron en la mufla, a 600° C, durante 3 horas.



Figura 2.10 Mufla Isuzu Seisakusho Co. Ltda., modelo N° 51152126 para determinación de contenido de cenizas en las muestras de preñadilla.

Los crisoles con la muestra se enfriaron en el desecador para evitar que las muestras absorban humedad.

Se pesaron los crisoles con la ceniza y se calcularon los porcentajes de contenido de cenizas según la siguiente expresión:

$$\%C = \frac{P_f - P_i}{P_m} * 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

%C porcentaje de ceniza

P_f peso final del crisol con la ceniza luego de ser enfriada en el desecador

P_i peso inicial del crisol vacío

P_m peso de muestra colocado en el crisol

2.4.1.3 Contenido de Proteína

Para determinar el porcentaje de proteína que contiene la muestra se empleó el Método Kjeldahl por triplicado y un blanco, de la siguiente manera:

Cada matraz de digestión Kjeldahl contuvo 1 g de muestra homogenizada y se agregó 3 g del catalizador [K₂SO₄ / CuSO₄] (9:1) y 15 ml de H₂SO₄ concentrado. Se colocó el matraz en el digestor (Figura 2.11) y se mantuvo con calentamiento medio hasta obtener una coloración verdosa que indica que la mineralización ha concluido.

Al enfriarse la muestra se añadieron 120 ml de agua destilada con 3 gotas de rojo de metilo y 70 ml de NaOH (J. T. Baker) al 45%. Se destila sobre 50 ml de H₂SO₄ (Merck) 0,1 N con 3 gotas de rojo de metilo.

Al destilado se añadió 0,45 g de biftalato de potasio (KOOC-C₆H₄-COOK), 150 ml de agua destilada y 6 gotas de fenolftaleína (Panreac) 0,5% en alcohol etílico al 95% y se tituló con NaOH 0,1 N hasta obtener una coloración anaranjada.

Para determinar el porcentaje de proteína en la muestra se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\%N = \frac{M * 1000}{mlNaOH * 240,229} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

%N porcentaje de nitrógeno

M g de biftalato de potasio utilizado

$$\%P = \frac{V * N * 1,4 * factor}{m} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

%P porcentaje de proteína

V ml de NaOH (0,1 N) consumido en la titulación

N contenido de N en la muestra

m masa de la muestra (g)

El factor para determinar el contenido de proteína es 6,25, valor que se utiliza para carne, pescado, huevo, leguminosas y proteínas en general (CENIAC, 2009).



Figura 2.11 Destilador-Digestor Advantec Sanshin Industrial Co. Ltd.,
modelo NDGS-200

2.4.1.4 Grasa

Para determinar el contenido de grasa la muestra homogenizada se secó durante 30 minutos a 100° C y se molió en un molino Wiley Pulverizar Cat, modelo WT-50.

Se pesaron 2g de muestra en cada dedal de extracción previamente pesado y tapado con algodón. Se pesaron los balones de extracción y se colocan en el sistema soxhlet, al igual que los dedales, como se muestra en la Figura 2.12. Se adicionaron 140 ml de dietil éter (Kanto Chemical Co. Inc.) en cada balón e inicia el reflujo, por 6 horas, luego de lo cual se evapora el solvente bajo la sorbona. Posteriormente, se secaron los balones en la estufa a 100° C por 10 minutos, se enfriaron en el desecador y se pesaron para calcular el porcentaje de grasa en la muestra (CENIAC, 2009).



Figura 2.12 Sistema soxhlet Advantec, modelo LB-160

$$\%G = \frac{P_f - P_i}{P_m} * 100 \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde:

%G porcentaje de grasa

P_f peso final del balón con la muestra luego de ser enfriada en el desecador

P_i peso inicial del balón vacío

P_m peso de muestra colocado en el balón

2.4.2 Preparación de las formulaciones alimenticias

Para preparar las formulaciones alimenticias se consideraron los análisis bromatológicos y los estudios previos realizados para determinar la cantidad a suministrar, según los cuales se determinó que se debía suministrar 276 mg de proteína cruda diaria por unidad experimental.

La cantidad de proteína diaria se determinó alimentando a un grupo de preñadillas animales a saciedad, con alimento comercial nutrafin.

Se prepararon tres formulaciones alimenticias: D1, D2 y D3 que se detallan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Preparación de formulaciones alimenticias para preñadillas en estudio

Dieta	Componentes	Contenido proteico total
D1	Alimento comercial Nutrafin	46%
D2	Tubifex	52%
	Pulgas de agua	
D3	Espirulina	36,61%
	Maní	

En la dieta D2 debido a que la presentación en la que se adquiere tubifex no es consumida por las preñadillas, fue preciso molerlo en un mortero. Las pulgas se suministraron a los peces junto con el agua en la que se mantenían en una concentración de 5 pulgas / ml.

A la dieta D3 fue necesario añadirle un atractante de sabor en concentración de 1mg de atractante/kg de alimento.

2.4.3 Recolección de las muestras

Para recolectar las muestras, se emplearon redes de captura a fin de no dañar a los animales y fue realizada en las zonas de Araque (Imbabura), Miraflores y Pasa (Tungurahua).

Se midió la temperatura, pH, conductividad, sólidos disueltos totales y oxígeno disuelto, con un multiparamétrico y concentración de nitritos, fosfatos y alcalinidad por espectrofotometría del agua, en cada una de las zonas.

2.4.4 Mantenimiento de *Daphnia pulex* (pulgas de agua)

Para mantener las pulgas de agua fue necesario acondicionar el agua de la siguiente manera:

En un litro de agua reposada durante 24 horas, se disolvieron 1,9 g de CaSO_4 , mientras que en 19 litros de agua igualmente reposada se mezclaron 2,4 g de MgSO_4 , 3,84 g de NaHCO_3 y 0,16 g de KCl . Se mezclaron las dos soluciones y la mezcla se mantuvo 24 horas en aireación y se pusieron las pulgas de agua (Díaz *et al.*, 2004).

El agua dura reconstituida para el mantenimiento de las pulgas, fue preparada semanalmente, para un recambio del 75%. Las pulgas de agua se mantuvieron con aireación permanente y se alimentaron con 0,4 g de espirulina diaria.

2.4.5 Mantenimiento y alimentación de preñadillas

Las muestras recolectadas fueron clasificadas por su tamaño. Se formaron dos grupos: pequeños, de 3,5 cm hasta 6,0 cm de longitud total, y los grandes, de 6,0 cm de longitud total en adelante. Se colocaron 2 individuos por pecera, las cuales tienen una capacidad de 27 l, de los cuales 15 l fueron útiles, es decir que la densidad poblacional fue de 0,133 peces/l; 7,5 l de agua/pez. Se mantuvo aireación permanente y con recambio diario de 25% de agua. Los aireadores también fueron limpiados diariamente. El agua con que se realizó el recambio se mantuvo en reposo durante 24 horas antes de su empleo.

A cada pecera se le asignó el tratamiento resultante de un sorteo y los animales fueron alimentados de lunes a viernes luego del recambio de agua durante nueve semanas. Se suministró el alimento una sola vez al día para disminuir la acumulación de sólidos. Durante los fines de semana los animales consumieron el alimento sobrante de la semana.

La cantidad de alimento suministrada se basó en experiencias previas realizadas en el IASA con las preñadillas, que establecieron el consumo y el deterioro del agua.

2.4.5.1 Medición y pesaje de preñadillas

Semanalmente se tomaron medidas de longitud total, longitud parcial, ancho, espesor, longitud cefálica, ancho cefálico y peso de cada preñadilla. No se diferenció el sexo de cada animal puesto que en los individuos pequeños no se observa un desarrollo gonadal diferenciado.

Este procedimiento se llevó a cabo con los animales adormecidos, con esencia de clavo, en una concentración de 3,2 ppm, en 250 ml de agua, reposada y manteniéndolos en ésta durante 2 minutos. Todas las mediciones se realizaban luego de secar al animal.

La Figura 2.13 muestra el proceso de medición de longitud total y parcial de una preñadilla.

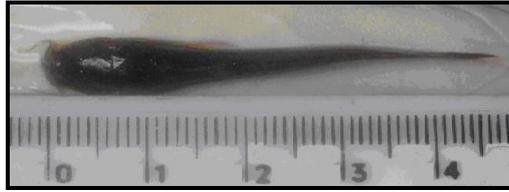


Figura 2.13 Medición de preñadillas.

A partir de las medidas obtenidas y las fórmulas respectivas se determinaron los parámetros bioprodutivos:

○ Tasa de crecimiento específico: $TCE = \left(\frac{\ln W_{xf} - \ln W_{xi}}{t} \right) * 100$ (Ec. 8)*

Donde:

W_{xf} peso final (g)

W_{xi} peso inicial (g)

t días de crianza

○ Factor de conversión alimenticia: $FCA = \frac{Ai}{Bg} + \left[\left(\frac{W_{xf} + W_{xi}}{2} \right) * m \right]$ (Ec. 9)*

Donde:

Ai total de alimento ingerido

Bg biomasa ganada

m animales muertos

○ Índice de condición corporal: $ICC = \left(\frac{P}{Lt^3} \right) * 100$ (Ec. 10)*

Donde:

P peso corporal (g)

Lt Longitud total (cm)

*Fuente: en Ortiz, 2008.

2.4.6 Preparación de los extractos enzimáticos de preñadillas

Al final del período de alimentación, las preñadillas fueron sometidas a ayuno, durante 48 horas, a fin de vaciar sus tubos digestivos y, posteriormente, fueron dormidos con esencia de clavo en una concentración de 3,5 ppm, en 250 ml de agua, reposada y se mantuvo al animal durante 3 minutos.

Se retiró el tracto digestivo de las preñadillas y se separó el estómago y el intestino, para determinar si existen diferencias en las actividades proteásicas que actúan en estas porciones del tracto digestivo. Se tomó la longitud del intestino para calcular el LIR (Longitud Intestinal Relativa) con la siguiente fórmula

$$LIR = \frac{L_i}{L_t} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde:

LIR Longitud intestinal relativa.

L_i Longitud del intestino.

L_t Longitud total del pez.

Fuente: Sáenz, 2005.

Los extractos enzimáticos se obtuvieron tras homogenizar las porciones digestivas, con tampón 0,1 M glicina/HCl, pH=2, en el caso de los estómagos; o, con tampón 0,1M tris/HCl, pH=8,5, en el caso de los intestinos (Lundstedt *et al.*, 2002_b), en una proporción 1:10, 1:20 o 1:30 según cada animal, muestras homogenizadas se almacenaron a -20° C para posteriormente sonicarlas en un sonicador Branson, modelo 1510, durante 15 minutos, en tres intervalos de 5 minutos, con un espacio entre cada

intervalo de 30 segundos. Las muestras fueron colocadas en hielo durante la sonicación para evitar su calentamiento (Cuervo *et al.*, 2005).

En las Figuras 2.14 y 2.15 se muestran los diagramas de flujo para la obtención de los extractos de estómagos e intestinos respectivamente.

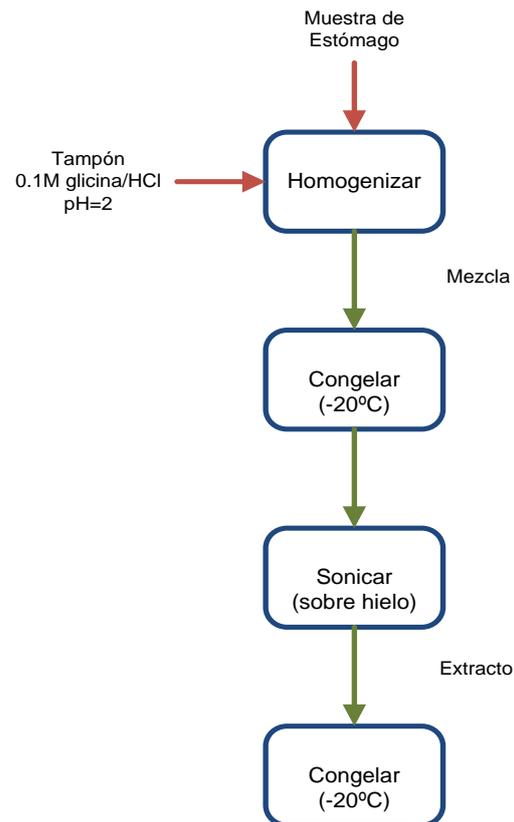


Figura 2.14 Diagrama de flujo para la obtención de los extractos de estómagos (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Cuervo *et al.*, 2005 y modificado por Alfaro, 2009)

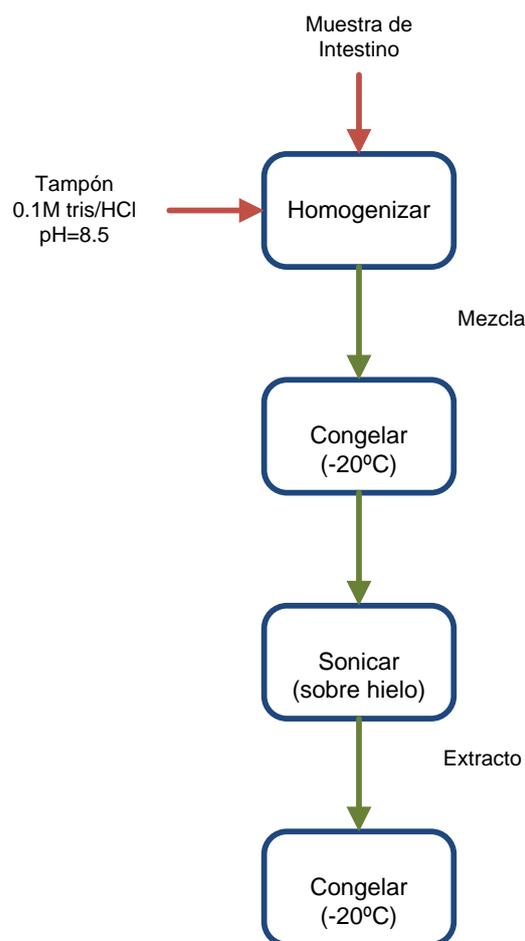


Figura 2.15 Diagrama de flujo para extractos de intestinos (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Cuervo *et al.*, 2005 y modificado por Alfaro, 2009)

2.4.7 Ensayo enzimático

Para determinar la actividad proteolítica en las muestras se utilizaron dos métodos, el de Anson modificado y el de sustrato cromogénico con DL-BApNA.

2.4.7.1 Actividad caseinolítica

Para el análisis de las proteasas, tanto alcalinas como ácidas, se tomó como base el método de Lundstedt *et al.* (2002_b), que trabajó con bagres sudamericanos. Aunque este es el estudio más cercano a *Astroblepus sp.*, se adaptó el protocolo de acuerdo con

análisis previos realizados en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas, Facultad de Química y Agroindustria de la Escuela Politécnica Nacional, realizados por Sinche (2009).

2.4.7.2 Descripción de los blancos

El blanco para las muestras de proteasas ácidas se preparó con 1,1 ml de la solución de caseína al 1% disuelta en 0,1 M de glicina/HCl, pH=2, con 30 μ l de tampón 0,1 M de glicina/HCl, pH=2, en lugar de extracto. Se incubó la mezcla durante 30 minutos, a 35° C, y se detuvo la reacción con 1 ml de solución de TCA al 15%. La mezcla fue centrifugada a 3000 gravedades por 3 min y la densidad óptica del sobrenadante se midió a 280 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. La figura 2.16 muestra el diagrama de flujo para la preparación y evaluación los blancos de proteasas ácidas.

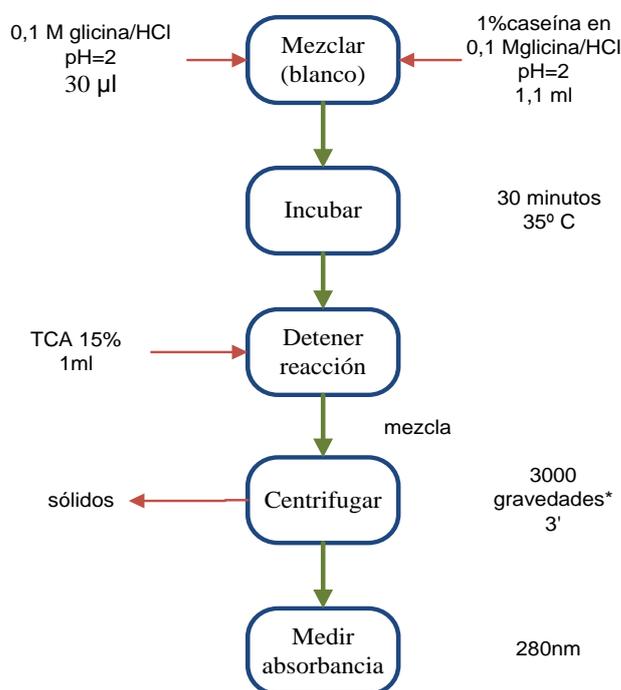


Figura 2.16 Diagrama de flujo para la determinación de actividad caseinolítica de los blancos de las enzimas proteolíticas ácidas (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Sinche, 2009).

*gravedad en centrifugación hace referencia a la fuerza ejercida sobre el cuerpo sometido a centrifugación por efecto de la rotación.

El blanco para las muestras de proteasas alcalinas se preparó con 1,1 ml de la solución de caseína al 1% disuelta en 0,1 M de tris/HCl, pH=8,5, con 30 µl de tampón 0,1 M de tris/HCl, pH=8,5 en lugar de extracto. Se incubó la mezcla durante 30 minutos, a 35° C, y se detuvo la reacción con 1 ml de solución de TCA al 15%. La mezcla fue centrifugada a 3000 gravedades por 3 min y la densidad óptica del sobrenadante se midió a 280 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. La Figura 2.17 muestra el diagrama de flujo para la preparación y evaluación de los blancos de proteasas alcalinas.

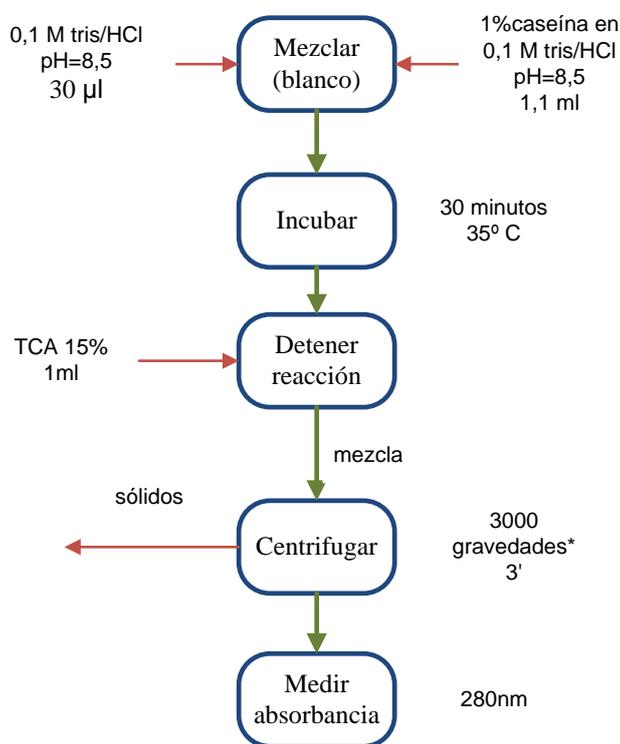


Figura 2.17 Diagrama de flujo para la determinación de actividad caseinolítica de los blancos de las enzimas proteolíticas alcalinas (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Sinche, 2009).

2.4.7.3 Descripción del ensayo enzimático

La mezcla de la reacción enzimática para proteasas ácidas, se preparó con 1,1 ml de solución de caseína al 1% caseína en 0,1 M glicina/HCl, pH=2, con una alícuota de 30 µl del extracto homogenizado y descongelado durante 90 min. La muestra se incubó

durante 30 minutos, a 35° C, y se detuvo la reacción con 1ml de la solución de TCA al 15%. La mezcla de la reacción fue centrifugada a 3000 g por 3 min y la densidad óptica del sobrenadante se midió a 280nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. La Figura 2.18 muestra el diagrama de flujo para este procedimiento.

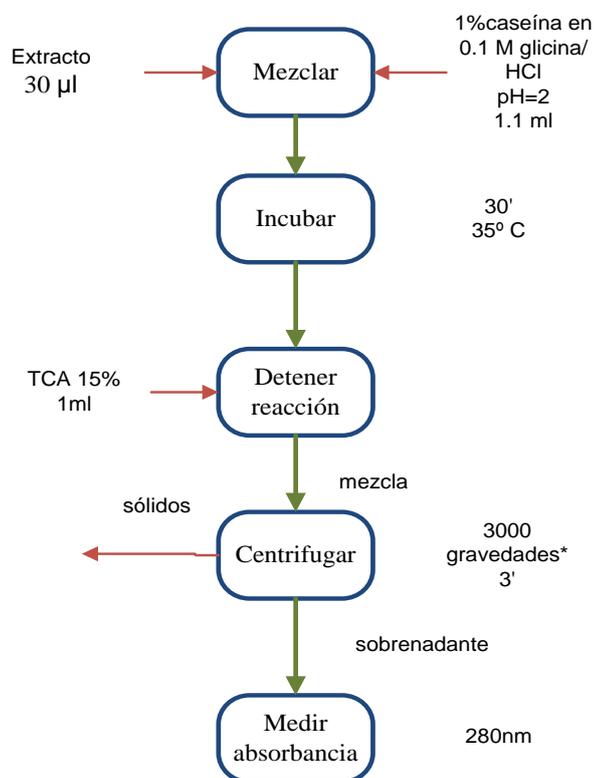


Figura 2.18 Diagrama de procesos para la determinación de la actividad caseinolítica de las proteasas ácidas presentes en los estómagos de preñadilla (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Sinche, 2009).

La mezcla de la reacción enzimática para proteasas alcalinas, se preparó con 1,1 ml de solución de caseína al 1% en 0,1 M tris/HCl, pH=8,5, con una alícuota de 30 µl del extracto homogenizado y descongelado durante 90 min. Se incubó durante 30 minutos, a 35° C, y se detuvo la reacción con 1 ml de la solución de TCA al 15%. La mezcla de la reacción fue centrifugada a 3000 gravedades por 3 min y la densidad óptica del sobrenadante se midió a 280nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240, la Figura 2.19 muestra el diagrama de flujo para este procedimiento.

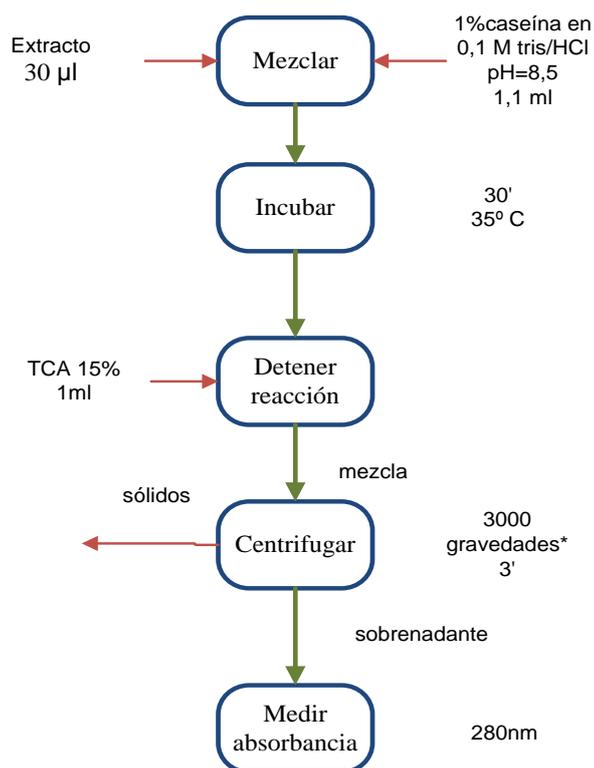


Figura 2.19 Diagrama de procesos para la determinación de la actividad caseinolítica para proteasas alcalinas de los intestinos de preñadilla (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Sinche, 2009).

2.4.7.4 Actividad con sustrato cromogénico

Como sustrato cromogénico se empleó benzoyl DL-arginina p-nitroanilide hydrochloride (DL-BApNA) (Sigma) y se siguió el protocolo propuesto por Finehout, Cantor y Lee (2005), con modificaciones de las investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Aplicadas de la Facultad de Química y Agroindustria de la Escuela Politécnica Nacional (Sinche, 2009).

2.4.7.5 Descripción de los blancos

El blanco para las muestras de proteasas ácidas se preparó con 1 ml del tampón de 0,1 M de glicina/HCl, pH=2, con 30 µl de tampón 0,1 M de glicina/HCl, pH=2, y 30

μl de la solución cromogénica 23 mM de DL-BApNA, en DMSO. Se agitó la mezcla y se midió la absorbancia a 410 nm, durante 3 minutos, con intervalos de 15 segundos, en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. Posteriormente, se dejó que continúe la reacción de hidrólisis de DL-BApNA a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia nuevamente a 410 nm. A continuación se puede observar el diagrama de flujo para este proceso, en la Figura 2.20.

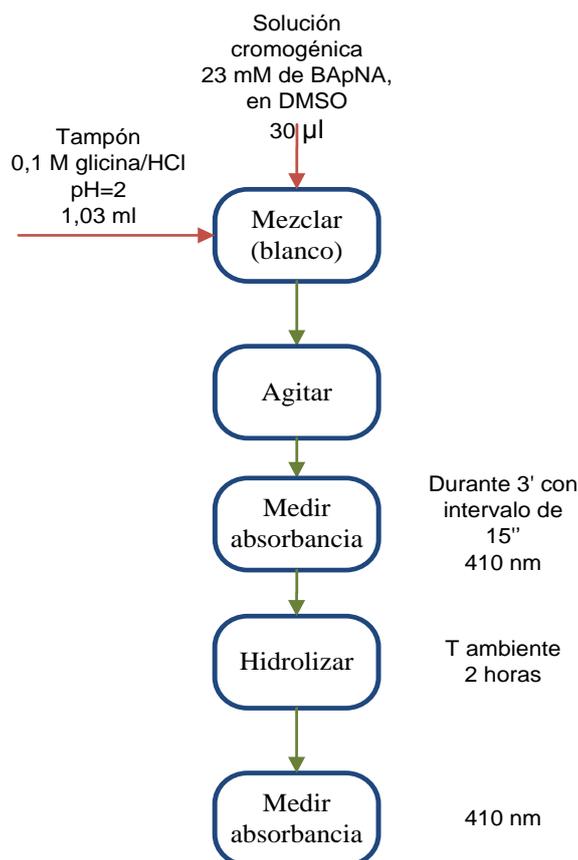


Figura 2.20 Diagrama de flujo para la determinación de hidrólisis espontánea con DL-BApNA de los blancos para las enzimas proteolíticas ácidas (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Sinche, 2009 y modificado por Alfaro, 2009).

El blanco para las muestras de proteasas alcalinas se preparó con 1 ml del tampón de 0,1 M de tris/HCl, pH=8,5, con 30 μl de tampón 0,1 M de tris/HCl, pH=8,5 y 30 μl de la solución cromogénica 23 mM de DL-BApNA, en DMSO. Se agitó la mezcla y se midió la absorbancia a 410 nm, durante 3 minutos, con intervalos de 15 segundos, en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. Posteriormente, se dejó que continúe la reacción de hidrólisis de DL-BApNA a temperatura ambiente durante 2 horas y se

midió la absorbancia a 410 nm. A continuación, se puede observar el diagrama de flujo para este proceso, en la Figura 2.21.

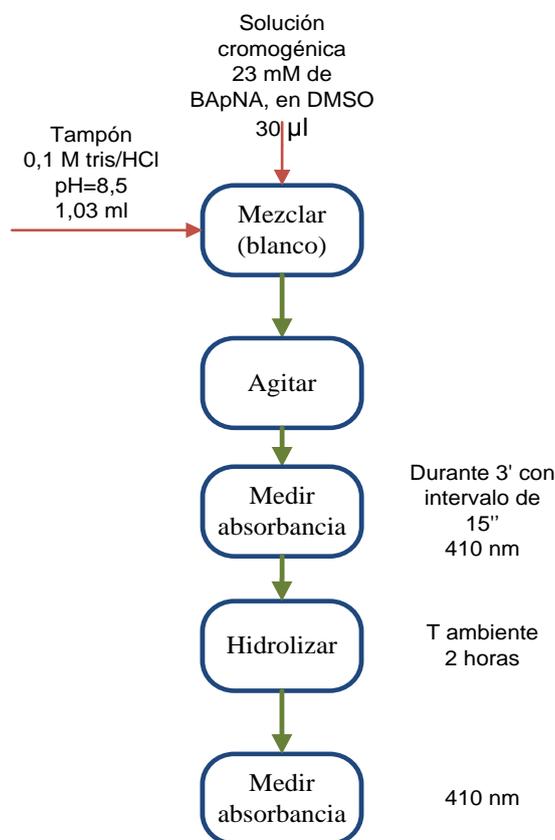


Figura 2.21 Diagrama de flujo para la determinación de hidrólisis espontánea con DL-BApNA de los blancos para las enzimas proteolíticas alcalinas (Lundstedt *et al.*, 2002_b, modificado por Sinche, 2009 y modificado por Alfaro, 2009).

2.4.7.6 Descripción del ensayo enzimático

Las muestras de proteasas como ácidas se mezclaron con 1 ml del tampón 0,1 M de glicina/HCl, pH=2, con 30 µl de extracto homogenizado y descongelado, durante 90 minutos y 30 µl de la solución cromogénica 23 mM de DL-BApNA, en DMSO. Se agitó la mezcla y se midió la absorbancia a 410 nm durante 3 minutos, con intervalos de 15 segundos, en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. Posteriormente, se dejó que continúe la reacción de hidrólisis de DL-BApNA a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia nuevamente a 410 nm. Como se indica en el diagrama de flujo para este proceso, en la Figura 2.22.

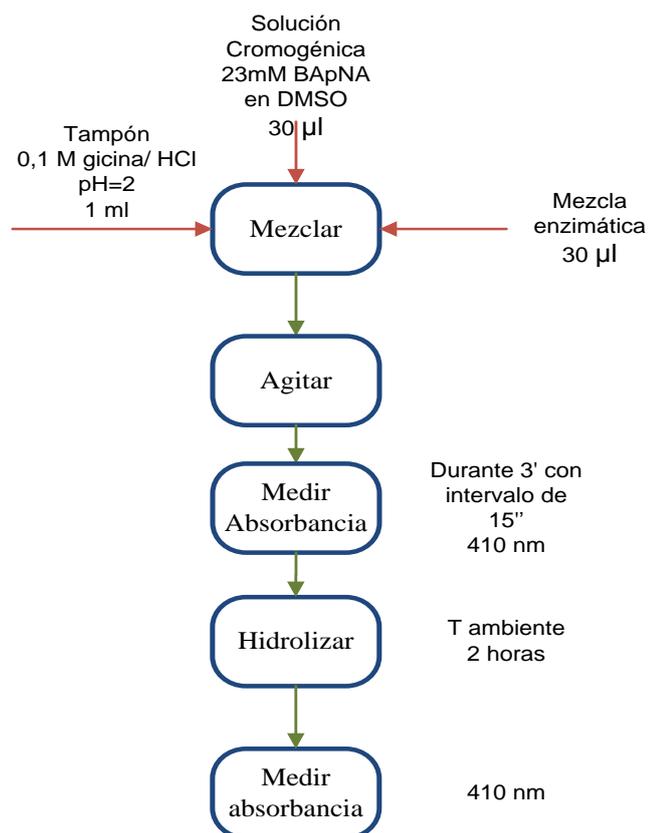


Figura 2.22 Diagrama de flujo para la determinación de actividad proteásica con DL-BApNA de las enzimas proteolíticas ácidas de los estómagos de preñadilla *Astroblepus sp.* (Lundstedt *et al.*, 2002_b; modificado por Sinche, 2009 y modificado por Alfaro, 2009).

Para las muestras de proteasas alcalinas se mezclaron 1 ml del tampón 0,1 M de tris/HCl, pH=8,5, con 30 µl de extracto homogenizado y descongelado, durante 90 minutos y 30 µl de la solución cromogénica 23 mM de DL-BApNA, en DMSO. Se agitó la mezcla y se midió la absorbancia a 410 nm durante 3 minutos, con intervalos de 15 segundos, en el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. Posteriormente, se dejó que continúe la reacción de hidrólisis de DL-BApNA a temperatura ambiente durante 2 horas y se midió la absorbancia nuevamente a 410 nm. A continuación, se puede observar el diagrama de flujo para este proceso, en la Figura 2.22.

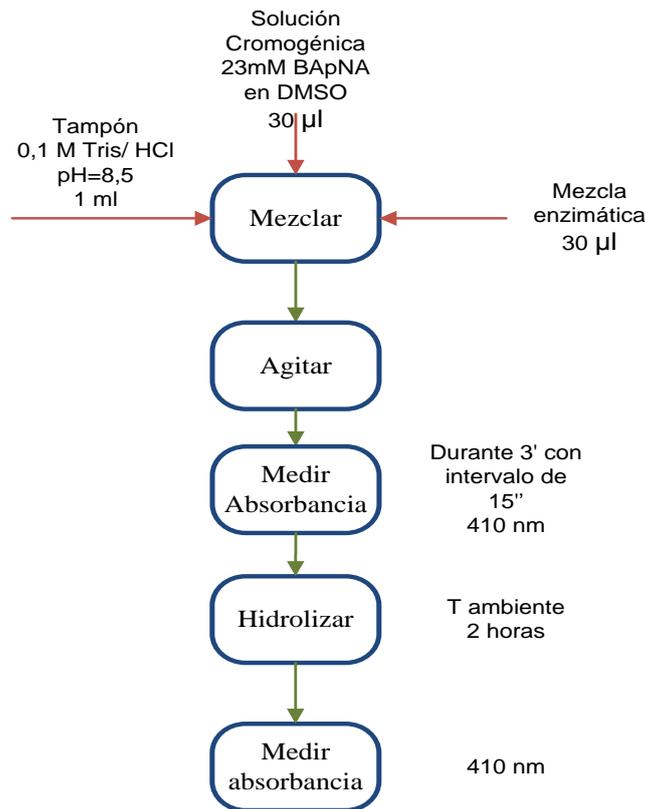


Figura 2.23 Diagrama de flujo para la determinación de actividad proteásica con DL-BApNA de las enzimas proteolíticas alcalinas de los intestinos de preñadilla *Astroblepus sp.* (Lundstedt *et al.*, 2002_b, modificado por Sinche, 2009 y modificado por Alfaro, 2009).

Se puede ver en el anexo A, ejemplos de las absorciones obtenidas de la actividad de proteasas ácidas y alcalinas con sus respectivas curvas.

2.4.8 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Para cuantificar las proteínas se empleó el método de Lowry para el cual se prepararon los siguientes reactivos

Reactivo A Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0,1 M.

Reactivo B Sulfato cúprico pentahidratado al 0,5% en citrato de sodio al 1%

Reactivo C Mezcla de 60 ml de Reactivo A con 1 ml de Reactivo B. esta mezcla se debe desechar después de 24 horas.

Reactivo de Folin Ciocalteau diluido 1:3 en agua destilada

Se mezclaron 10 µl de extracto enzimático con 144 µl de agua destilada y 769 µl de reactivo C, se agitó y permaneció en reposo durante 10 minutos. Luego, se adicionaron 77 µl de reactivo de Folin-Ciocalteau y se agitó, posteriormente, se dejó reposar por 30 minutos y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 650 nm, en el espectrofotómetro Hitachi U-1900 contra el blanco, en el que no se colocó extracto sino, agua destilada en su lugar.

Se determinó la concentración de proteínas empleando la ecuación de la recta de la curva patrón de albúmina de suero bovino.

El protocolo detallado se encuentra en el anexo B.

2.4.9 Cuantificación de Grado de Hidrólisis

Se calculó a partir del número de cadenas peptídicas hidrolizadas de caseína y el total de cadenas peptídicas de la caseína, tanto a pH 2 como a pH 8,5, para lo cual se empleó la Ecuación 2 de la siguiente manera:

$$GDH = \frac{h}{h_{total}} * 100$$

Donde

GDH grado de hidrólisis

h Concentración residual de los hidrolizados de caseína

h_{total} Concentración de la caseína antes de ser hidrolizada, a pH 2 y pH 8,5.

Fuente Nuñez, 2007.

2.5 Análisis de Datos:

Los datos obtenidos durante el mantenimiento de los peces, al igual que los datos del ensayo enzimático y las curvas del transcurso de la reacción, se ordenaron y representaron en la hoja electrónica de Microsoft® Office XP: Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Corporation). Para el análisis estadístico de los datos se empleó el programa Infostat 2010 profesional.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

La recolección de las preñadillas se hizo en tres zonas distintas de la región Sierra, y en cada uno de los puntos se midieron parámetros que se muestran en la Tabla 3.1, para repetirlos en el laboratorio (Tabla 3.2) y mantener a las preñadillas en cautiverio durante 9 semanas para posteriormente poder analizar su actividad enzimática.

Tabla 3.1 Condiciones de agua en las vertientes naturales de recolección de preñadillas. Marzo 2009.

	ARAQUE	MIRAFLORES	PASA
Temperatura (°C)	17,3	19,2	18,9
pH	6,51	7,25	7,48
Conductividad (µS)	196	189	192
Sólidos disueltos totales (ppm)	42	92	95

Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l)	4,65	4,66	4,80
Nitritos (mg (NO ₂) ⁻ /l)	0,032	0,074	0,189
Fosfatos (mg (PO ₄) ³⁻ /l)	1,42	1,67	1,34
Alcalinidad (mg (CaCO ₃) ²⁻ /l)	90	72	73

Tabla 3.2 Condiciones de agua mantenidas en el laboratorio para *Astroblepus sp.*

Parámetro	Medición
Temperatura (°C)	19°C ± 1,3
pH	7,5 ± 1
Conductividad (µS)	165 ± 15
Sólidos disueltos totales (ppm)	90 ± 6
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /l)	4,7 ± 0,5
Nitritos (mg N/l)	0,254 ± 0,08
Fosfatos (mg PO ₄ /l)	2,13 ± 1,07
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /l)	108 ± 27

3.1 Análisis bromatológico

Del análisis bromatológico realizado en el laboratorio del CENIAC con una muestra de 5 preñadillas grandes, se obtuvieron los siguientes resultados, resumidos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Resultados de análisis bromatológico de preñadillas realizado en los laboratorios del CENIAC

Análisis Bromatológico	n	Media	D.E.	CV
Humedad	3	41,78%	1,74	4,17
Ceniza	3	7,64%	0,70	9,21
Proteína	3	19,58%	0,94	4,78
Grasa	3	18,26%	1,77	9,69

3.2 Seguimiento de parámetros productivos y morfométricos

3.2.1 Mortalidad

Posterior a las 9 semanas que se mantuvieron a las preñadillas en cautiverio y alimentación proporcionada de acuerdo a la investigación, se observaron los siguientes resultados de mortalidades (Tablas 3.4, 3.5 y 3.6).

Tabla 3.4 Detalle de mortalidades de las preñadillas durante la etapa de mantenimiento de 9 semanas

Fecha	Tamaño	Dieta	Repetición	Fecha muerte
3	pequeño	2	1	29/05/2009
6	pequeño	1	3	16/06/2009
7	grande	3	3	22/06/2009
8	pequeño	2	2	29/06/2009
8	pequeño	1	2	03/07/2009
9	grande	1	2	10/07/2009
9	pequeño	2	3	09/07/2009
9	pequeño	3	3	09/07/2009
9	pequeño	3	1	13/07/2009

Tabla 3.5 Porcentajes de mortalidad por dietas

Dieta	% mortalidad
D1	5,56%
D2	8,33%
D3	8,33%

Tabla 3.6 Porcentajes de mortalidad por tamaño

Tamaño	% mortalidad
Pequeños	19,44%
Grandes	5,56%

3.2.2 Peso

Semanalmente se pesó a cada preñadilla para obtener la variación y calcular tanto los parámetros morfométricos como bioproductivos. Este procedimiento se llevó a cabo con los animales adormecidos con esencia de clavo. En el anexo D se puede observar los análisis de covarianza realizados a todos los parámetros morfométricos, que indican la relación entre los pesos iniciales y finales.

Tabla 3.7 Comparaciones de pesos inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Peso promedio inicial	Peso promedio final	Variación de peso (g)
--------	-------	-----------------------	---------------------	-----------------------

		(g)	(g)	
grande	1	3,461	2,856	-0,6
grande	2	4,214	3,790	-0,42
grande	3	5,545	4,944	-0,6
pequeño	1	0,942	0,800	-0,14
pequeño	2	0,870	0,718	-0,15
pequeño	3	0,731	0,645	-0,09

Tabla 3.8 Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable peso inicial

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	118,77	5	23,75	11,97	<0,0001
Tamaño	87,48	1	87,48	44,09	<0,0001
Repetición	13,30	2	6,65	3,35	0,0514
Tamaño*Repetición	10,14	2	5,07	2,56	0,0978
Error	49,61	25	1,98		
Total	168,38	30			

CV 51,13

* Prueba no paramétrica realizada a todos aquellos análisis estadísticos cuyo CV fue ≥ 10

Tabla 3.9 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,04508 para diferencias significativas de peso inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 1,9843 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,85	14	A	
grande	4,24	17		B

En las Tablas 3.8 y 3.9 se muestra el análisis estadístico de los grupos de preñadillas por tamaño, se ven diferencias significativas $p < 0,05$ en el peso de los animales, justificando la clasificación realizada.

Tabla 3.10 Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable peso final

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	120,59	17	7,09	9,38	0,0001
Tamaño	64,80	1	64,80	85,67	<0,0001
Dieta	3,26	2	1,63	2,16	0,1551
Repetición	7,02	2	3,51	4,64	0,0301
Tamaño*Dieta	4,84	2	2,42	3,20	0,0740
Tamaño*Repetición	6,37	2	3,19	4,21	0,0389
Dieta*Repetición	10,37	4	2,59	3,43	0,0402
Tamaño*Dieta*Repetición	8,62	4	2,16	2,85	0,0674

Error	9,83	13	0,76		
Total	130,43	30			

CV 36,17

Tabla 3.11 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67643 para diferencias significativas de peso inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,7563 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,74	14	A	
grande	3,78	17		B

En el análisis estadístico de la Tabla 3.8 se puede apreciar una diferencia significativa de peso, $p < 0,05$, en las preñadillas al iniciar la etapa de crecimiento, esta diferencia se mantiene hasta el final de la etapa de mantenimiento, pero no se observa que la dieta recibida marque una diferencia en la variable peso final en los grupos de estudio, pero al observar las variaciones de peso (Tabla 3.7) se nota que en los animales grandes la dieta D2 produce menores pérdidas de peso, 0,42 g, mientras que en los animales pequeños este efecto se produce con la dieta D3, 0,09 g, aunque con ninguna de las formulaciones se llega a obtener un incremento de peso; sin embargo, se logró mantener a los animales con las dietas propuestas para luego determinar sus actividades enzimáticas.

3.2.3 Longitud Total

El crecimiento de las preñadillas no se vio marcadamente tras analizar los datos recolectados semanalmente, sin embargo se presentaron ligeras variaciones entre cada tratamiento como se puede observar a continuación en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12 Comparaciones de longitudes totales inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Longitud total promedio inicial (cm)	Longitud total promedio final (cm)	Variación de longitud total (cm)
grande	1	7,400	7,467	0,067
grande	2	8,100	8,170	0,07
grande	3	8,400	8,420	0,02
pequeño	1	4,900	4,900	0

pequeño	2	4,450	4,525	0,075
pequeño	3	4,583	4,617	0,03

Tabla 3.13 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable longitud total inicial.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	89,28	5	17,86	35,28	<0,0001
Tamaño	79,90	1	79,90	157,86	<0,0001
Repetición	4,90	2	2,45	4,84	0,0167
Tamaño*Repetición	0,24	2	0,12	0,23	0,7924
Error	12,65	25	0,51		
Total	101,94	30			

CV 11,03

Tabla 3.14 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,52780 para diferencias significativas de longitud total inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,5061 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	4,67	14	A	
grande	7,91	17		B

En las Tablas 3.13 y 3.14 se observa el análisis de varianza de los datos iniciales, en los que se ve que los grupos de clasificación de las preñadillas por su tamaño son significativamente diferentes, $p < 0,05$.

Tabla 3.15 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable longitud total final.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	96,63	17	5,68	14,88	<0,0001
Tamaño	74,40	1	74,40	194,80	<0,0001
Dieta	0,47	2	0,24	0,62	0,5553
Repetición	4,42	2	2,21	5,78	0,0160
Tamaño*Dieta	1,77	2	0,88	2,31	0,1384
Tamaño*Repetición	1,48	2	0,74	1,93	0,1841
Dieta*Repetición	2,79	4	0,70	1,82	0,1844
Tamaño*Dieta*Repetición	2,39	4	0,60	1,57	0,2418
Error	4,97	13	0,38		
Total	101,59	30			

CV 9,56

Tabla 3.16 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,48068 para diferencias significativas de longitud total final de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,3819 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	4,70	14	A	
grande	7,95	17		B

El análisis de varianza para la variable longitud total final (Tabla 3.15) indica que ninguna dieta da resultados significativamente distintos, $p > 0,05$, en cada grupo de experimentación en sus datos finales, sin embargo, por las variaciones se puede determinar que tanto para los animales grandes como pequeños la dieta más adecuada es la D2, que se basa en tubifex y pulgas de agua (Tabla 3.12). En los animales pequeños se observa un incremento en su longitud (0,075 cm) aunque bastante similar al de los animales grandes (0,067 cm).

3.2.4 Longitud parcial

La longitud parcial se midió semanalmente a cada individuo, luego de adormecerlo con esencia de clavo, el análisis de covarianza se muestra en el anexo D y los resultados comparativos entre los datos iniciales y finales de longitud parcial se observan en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17 Comparaciones de longitudes parciales inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Longitud parcial promedio inicial (cm)	Longitud parcial promedio final (cm)	Variación de longitud parcial (cm)
grande	1	6,350	6,350	0
grande	2	6,850	6,867	0,017
grande	3	7,040	7,160	0,12

pequeño	1	4,150	4,150	0,2
pequeño	2	3,675	3,675	0
pequeño	3	3,800	3,900	0,1

Tabla 3.18 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable longitud parcial inicial

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	66,88	5	13,38	32,51	<0,0001
Tamaño	59,72	1	59,72	145,15	<0,0001
Repetición	3,69	2	1,84	4,48	0,0217
Tamaño*Repetición	0,22	2	0,11	0,27	0,7641
Error	10,29	25	0,41		
Total	77,17	30			

CV 11,80

Tabla 3.19 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,47589 para diferencias significativas de longitud parcial inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,4115 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	3,90	14	A	
grande	6,70	17		B

El análisis estadístico para la longitud parcial inicial muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) en los grupos de preñadillas formados (Tablas 3.18 y 3.19).

Tabla 3.20 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable longitud parcial final

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	80,57	17	4,74	15,74	<0,0001
Tamaño	62,69	1	62,69	208,16	<0,0001
Dieta	0,35	2	0,17	0,58	0,5746
Repetición	3,68	2	1,84	6,11	0,0134
Tamaño*Dieta	1,32	2	0,66	2,20	0,1507
Tamaño*Repetición	0,83	2	0,42	1,38	0,2854
Dieta*Repetición	2,26	4	0,56	1,87	0,1750
Tamaño*Dieta*Repetición	1,64	4	0,41	1,36	0,3013
Error	3,91	13	0,30		
Total	84,49	30			

CV 10,17

Tabla 3.21 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,42684 para diferencias significativas de longitud parcial final de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,3012 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	3,78	14	A	
grande	6,77	17		B

En el análisis para la longitud parcial final, Tabla 3.20, muestra diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tamaño de los individuos pero no se encuentran diferencias significativas, $p > 0,05$, resultantes de la dieta recibida, pero la Tabla 3.17 muestra que para los animales grandes, la dieta más conveniente es la D3 y para los animales pequeños la dieta D1 aunque el incremento en tamaño no sea muy grande.

3.2.5 Ancho

Tras la medición semanal del ancho de las preñadillas se observa el análisis de covarianza en el anexo D.

Al medir el ancho de las preñadillas se observa un decremento, lo cual coincide con la pérdida de peso que sufren los animales, pero a pesar de esto cumplen la etapa de mantenimiento para posteriormente analizar su actividad enzimática.

Tabla 3.22 Comparaciones de ancho inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Ancho promedio inicial (cm)	Ancho promedio final (cm)	Variación de ancho (cm)
Grande	1	1,050	0,967	-0,08
Grande	2	1,200	1,083	-0,12
Grande	3	1,360	1,100	-0,26
pequeño	1	0,675	0,625	-0,05
pequeño	2	0,650	0,600	-0,05
pequeño	3	0,583	0,567	-0,02

Tabla 3.23 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable ancho inicial

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,99	5	0,60	11,27	<0,0001
Tamaño	2,29	1	2,29	43,22	<0,0001
Repetición	0,33	2	0,17	3,14	0,0606
Tamaño*Repetición	0,18	2	0,09	1,69	0,2054
Error	1,33	25	0,05		
Total	4,31	30			

CV 24,53

Tabla 3.24 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17082 para diferencias significativas de ancho inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0530 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,63	14	A	
grande	1,18	17		B

Como se puede ver en el análisis estadístico del ancho inicial de las preñadillas, existe una variación significativa ($p < 0,05$) en el ancho de los individuos dependiendo de su tamaño (Tablas 3.23 y 3.24).

Tabla 3.25 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable ancho final

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,98	17	0,12	12,59	<0,0001
Tamaño	1,39	1	1,39	150,72	<0,0001
Dieta	0,01	2	0,01	0,63	0,5461
Repetición	0,09	2	0,05	5,05	0,0239
Tamaño*Dieta	0,05	2	0,02	2,66	0,1076
Tamaño*Repetición	0,07	2	0,04	4,00	0,0443
Dieta*Repetición	0,09	4	0,02	2,32	0,1121
Tamaño*Dieta*Repetición	0,05	4	0,01	1,31	0,3158
Error	0,12	13	0,01		
Total	2,10	30			

CV 11,41

Tabla 3.26 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07473 para diferencias significativas de ancho final de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0092 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,61	14	A	
grande	1,05	17		B

El análisis estadístico de los anchos finales de las preñadillas (Tabla 3.25) no muestra diferencias significativas frente a ninguna de las dietas ($p > 0,05$), pero se puede mencionar que en todos los casos hay una disminución del ancho del animal, para los animales grandes la disminución es menor cuando se les suministra la dieta D1, y en el grupo de animales pequeños la dieta que tiene el mismo efecto es la dieta D3.

3.2.6 Espesor

Debido a la morfología de las preñadillas se midió además del ancho del animal, su espesor, el cual también se analizó estadísticamente.

Tabla 3.27 Comparaciones de espesor inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Espesor promedio inicial (cm)	Espesor promedio final (cm)	Variación de espesor (cm)
grande	1	0,700	0,783	0,08
grande	2	0,717	0,817	0,1
grande	3	0,860	0,900	0,04
pequeño	1	0,475	0,500	0,03
pequeño	2	0,450	0,500	0,05
pequeño	3	0,417	0,433	0,02

Tabla 3.28 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable espesor inicial

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,79	5	0,16	10,34	<0,0001

Tamaño	0,72	1	0,72	46,88	<0,0001
Repetición	0,02	2	0,01	0,62	0,5483
Tamaño*Repetición	0,03	2	0,02	1,07	0,3568
Error	0,38	25	0,02		
Total	1,17	30			

CV 20,19

Tabla 3.29 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09181 para diferencias significativas de espesor inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0153 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,44	14	A	
grande	0,75	17		B

Al igual que en los parámetros morfométricos anteriores, el espesor inicial del animal varía significativamente ($p < 0,05$) entre los dos grupos de clasificación de las preñadillas de acuerdo a su tamaño (Tablas 3.28 y 3.29).

Tabla 3.30 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable espesor final

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,17	17	0,07	7,44	0,0004
Tamaño	0,84	1	0,84	90,53	<0,0001
Dieta	4,3E-04	2	2,1E-04	0,02	0,9772
Repetición	0,05	2	0,02	2,46	0,1240
Tamaño*Dieta	0,04	2	0,02	2,37	0,1321
Tamaño*Repetición	0,05	2	0,03	2,98	0,0861
Dieta*Repetición	0,02	4	0,01	0,63	0,6476
Tamaño*Dieta*Repetición	0,01	4	2,4E-03	0,26	0,9012
Error	0,12	13	0,01		
Total	1,29	30			

CV 14,39

Tabla 3.31 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07473 para diferencias significativas de espesor final de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0092 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,48	14	A	
grande	0,83	17		B

El análisis estadístico del espesor final de las preñadillas (Tabla 3.30) no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) debido a las dietas recibidas por los animales, en la Tabla 3.27 se nota que en todos los casos hay un incremento del espesor, que para el grupo de los animales grandes es mayor con la dieta D1 y para los animales pequeños la dieta D2.

3.2.7 Ancho cefálico

Las mediciones de la cabeza también fueron evaluadas para cada individuo, semanalmente, mostrando casi ningún cambio.

Tabla 3.32 Comparaciones de ancho cefálico inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Ancho cefálico promedio inicial (cm)	Ancho cefálico promedio final (cm)	Variación del ancho cefálico (cm)
grande	1	1,267	1,317	0,05
grande	2	1,417	1,517	0,1
grande	3	1,370	1,420	0,05
pequeño	1	0,875	0,875	0
pequeño	2	0,800	0,900	0,1
pequeño	3	0,753	0,783	0,03

Tabla 3.33 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable ancho cefálico inicial

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,61	5	0,52	21,54	<0,0001
Tamaño	2,27	1	2,27	93,92	<0,0001

Repetición	0,14	2	0,07	2,98	0,0692
Tamaño*Repetición	0,05	2	0,03	1,06	0,3619
Error	0,61	25	0,02		
Total	3,21	30			

CV 13,36

Tabla 3.34 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,1154 para diferencias significativas de ancho cefálico inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0242 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,86	14	A	
grande	1,41	17		B

El análisis estadístico del ancho cefálico inicial de las preñadillas (Tabla 3.33) muestra que existen diferencias significativas, $p < 0,05$, entre las preñadillas grandes y pequeñas.

Tabla 3.35 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable ancho cefálico final

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,63	17	0,21	19,12	<0,0001
Tamaño	2,31	1	2,31	206,77	<0,0001
Dieta	0,04	2	0,02	1,82	0,2006
Repetición	0,16	2	0,08	7,00	0,0086
Tamaño*Dieta	0,13	2	0,06	5,67	0,0169
Tamaño*Repetición	0,23	2	0,11	10,09	0,0023
Dieta*Repetición	0,14	4	0,04	3,16	0,0510
Tamaño*Dieta*Repetición	0,16	4	0,04	3,56	0,0359
Error	0,15	13	0,01		
Total	3,77	30			

CV 9,30

Tabla 3.36 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08214 para diferencias significativas de ancho cefálico final de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0112 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,83	14	A	
grande	1,40	17		B

Tabla 3.37 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21966 para diferencias significativas de ancho cefálico final de preñadillas dependiendo del tamaño y la dieta

Error: 0,0112 gl: 13

Tamaño	Dieta	Medias	n			
pequeño	3	0,78	6	A		
pequeño	2	0,82	4	A		
pequeño	1	0,88	4	A		
grande	1	1,27	6		B	
grande	3	1,42	5		B	C
grande	2	1,52	6			C

Para la variable ancho cefálico se ven diferencias significativas frente a las dietas suministradas ($p < 0,05$), en la Tabla 3.32 se ve que las variaciones son bastante similares, siendo las mejores las obtenidas con la dieta D2 en las preñadillas grandes (Tabla 3.37).

3.2.8 Longitud cefálica

Al igual que los anteriores parámetros morfométricos, la longitud cefálica se midió semanalmente, en cada individuo adormecido con esencia de clavo. En el anexo D se observa el análisis de covarianza de los datos iniciales y finales de longitud cefálica. La Tabla 3.38 muestra las comparaciones realizadas para determinar las variaciones de longitud cefálica y las Tablas 3.39 y 3.40 muestran los análisis estadísticos de la variable longitud cefálica inicial y final respectivamente, donde no se determina una variación significativa ($p > 0,05$) con las dietas suministradas.

Tabla 3.38 Comparaciones de longitud cefálica inicial y final de preñadillas

Tamaño	Dieta	Longitud cefálica promedio inicial (cm)	Longitud cefálica promedio final (cm)	Variaciones de la longitud cefálica (cm)
grande	1	1,267	1,350	0,08
grande	2	1,417	1,600	0,18
grande	3	1,480	1,580	0,1
pequeño	1	0,925	0,925	0
pequeño	2	0,825	0,825	0
pequeño	3	0,783	0,900	0,12

Tabla 3.39 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable longitud cefálica inicial

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,40	5	0,48	20,83	<0,0001
Tamaño	2,11	1	2,11	91,62	<0,0001
Repetición	0,14	2	0,07	2,99	0,0687
Tamaño*Repetición	0,03	2	0,01	0,59	0,5599
Error	0,58	25	0,02		
Total	2,97	30			

CV 13,33

Tabla 3.40 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11258 para diferencias significativas de longitud cefálica inicial de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0230 gl: 25

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,85	14	A	
grande	1,38	17		B

El análisis estadístico realizado para la longitud cefálica inicial de las preñadillas (Tabla 3.39) indica diferencias significativas, $p < 0,05$, entre los grupos de preñadillas grandes y pequeños.

Tabla 3.41 Análisis de la Varianza (SC tipo III) para la variable longitud cefálica final

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,71	17	0,22	6,68	0,0006
Tamaño	2,68	1	2,68	81,93	<0,0001
Dieta	0,04	2	0,02	0,68	0,5234
Repetición	0,20	2	0,10	3,07	0,0808
Tamaño*Dieta	0,15	2	0,07	2,25	0,1450
Tamaño*Repetición	0,12	2	0,06	1,90	0,1892
Dieta*Repetición	0,09	4	0,02	0,70	0,6045
Tamaño*Dieta*Repetición	0,07	4	0,02	0,50	0,7343
Error	0,43	13	0,03		

Total	4,14	30			
-------	------	----	--	--	--

CV 14,75

Tabla 3.42 Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14063 para diferencias significativas de longitud cefálica final de preñadillas dependiendo del tamaño

Error: 0,0327 gl: 13

Tamaño	Medias	n		
pequeño	0,89	14	A	
grande	1,51	17		B

Como en los casos anteriores el análisis estadístico de las variables morfométricas, la longitud cefálica final (Tabla 3.41) no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) frente a ninguna dieta, para la variable longitud cefálica se puede notar en la Tabla 3.38 que la dieta que da un mejor resultado para los animales grandes es la dieta D2 con una variación de 0,18 cm y para los animales pequeños la dieta D3, con 0,12 cm.

3.2.9 Parámetros bioprodutivos

Una vez obtenidos los parámetros morfométricos se pudo calcular los parámetros bioprodutivos de tasa de crecimiento específico, factor de conversión alimenticia e índice de condición corporal. De éstos, los dos primeros no presentan datos óptimos pues se dio una pérdida de peso; sin embargo, se mantuvieron a las preñadillas el período programado de período de 9 semanas para su posterior análisis enzimático que era el objetivo de la investigación.

Tabla 3.43 Parámetros bioprodutivos finales de las preñadillas, posterior al mantenimiento durante 9 semanas

Tamaño	Dieta	ICC
--------	-------	-----

grande	1	0,6859931
grande	2	0,73553537
grande	3	0,83414318
pequeño	1	0,67998878
pequeño	2	0,7749411
pequeño	3	0,65536024

El ICC tiene muestra valores positivos pero ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) con los tratamientos establecidos como se puede ver en la Tabla 3.44.

Tabla 3.44 Análisis de la Varianza (SC tipo III) de Índice de Condición Corporal

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,000055	17	0,0000032	2,08	0,0935
Tamaño	0,0000000025	1	0,0000000025	6E-03	0,9689
Dieta	0,0000011	2	0,00000056	0,36	0,7047
Repetición	0,0000051	2	0,0000025	1,63	0,2342
Tamaño*Dieta	0,0000078	2	0,0000039	2,52	0,1188
Tamaño*Repetición	0,000018	2	0,0000088	5,68	0,0169
Dieta*Repetición	0,0000047	4	0,0000012	0,76	0,5715
Tamaño*Dieta*Repetición	0,000017	4	0,0000044	2,81	0,0702
Error	0,00002	13	0,0000016		
Total	0,000075	30			

Los datos recolectados a lo largo de la etapa de mantenimiento se pueden observar detallados en el anexo C.

3.3 Preparación de los extractos enzimáticos de preñadillas

Luego de la etapa de mantenimiento en cautiverio de las preñadillas durante 9 semanas se procedió a dormirlas y extraerles el tracto digestivo. Se midió la longitud del intestino para poder determinar la Longitud Intestinal Relativa. La estadística descriptiva para el LIR calculado se muestra en el anexo E. La Tabla 3.45 muestra los valores de LIR para las preñadillas grandes y pequeñas.

Tabla 3.45 Valores de Longitud Intestinal Relativa calculado para las preñadillas de acuerdo a su tamaño

Tamaño	variable	n	Media	Mín	Máx
Pequeño	LIR	11	0,40 ± 0,03	0,28	0,55
Grande	LIR	16	0,41 ± 0,02	0,19	0,57

Al momento de preparar los extractos enzimáticos se realizaron diluciones, según el peso de cada órgano a fin de obtener extractos concentrados en cantidad suficiente para realizar los ensayos, estas diluciones se muestran en el anexo F.

Tabla 3.46 Análisis estadístico de la Varianza (SC tipo III) de la Longitud Intestinal Relativa

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	5	0,0042	0,45	0,8076
tamaño	7,0E-04	1	0,00070	0,07	0,7871
dieta	0,02	2	0,01	0,99	0,3894
tamaño*dieta	3,6E-04	2	0,00018	0,02	0,9810
Error	0,20	21	0,01		
Total	0,22	26			

CV 23,77

En la Tabla 3.46 se puede ver que el LIR no presenta diferencias significativas en los distintos tratamientos, es decir que no varía por el tamaño del animal ni por la dieta a la que fue sometido.

3.4 Ensayo enzimático

3.4.1 Actividad caseinolítica

Los resultados obtenidos de la actividad caseinolítica en estómagos e intestinos de preñadilla se muestran en las Tablas 3.47 y 3.48.

Tabla 3.47 Actividad caseinolítica de extractos de estómagos de preñadillas de acuerdo a su tamaño

Tamaño	Dieta	n	Actividad Caseinolítica Media	GDH medio
--------	-------	---	-------------------------------	-----------

			(U/mg)	(%)
Pequeño	1	4	134,28 ± 45,66	27,13
Pequeño	2	3	192,04 ± 69,50	27,22
Pequeño	3	4	767,23 ± 422,50	58,88
Grande	1	5	189,61 ± 55,89	44,29
Grande	2	6	138,84 ± 24,51	35,47
Grande	3	5	315,00 ± 88,15	59,35

Los datos recolectados en el laboratorio se muestran en el anexo H.

Tabla 3.48 Actividad caseinolítica de extractos de intestinos de preñadillas de acuerdo a su tamaño

Tamaño	Dieta	n	Actividad Caseinolítica Media (U/mg)	GDH caseína (%)
Pequeño	1	4	1827,29 ± 301,05	57,46
Pequeño	2	3	785,14 ± 150,99	20,12
Pequeño	3	4	486,15 ± 103,58	13,31
Grande	1	5	1190,30 ± 201,71	54,73
Grande	2	6	594,22 ± 69,71	31,37
Grande	3	5	642,55 ± 199,73	35,42

En las Tablas 3.47 y 3.48 se observa que aunque la actividad caseinolítica es mayor en estómagos que intestinos, el grado de hidrólisis permite determinar que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las actividades proteásicas ácidas y básicas que dependan del tamaño del pez debido a la concentración de caseína disuelta a pH 2 y pH 8,5, pero que sí cambian dependiendo de la dieta que reciben.

En el caso de los estómagos (Tabla 3.47) la dieta que determina un mayor grado de hidrólisis es la dieta 3, que se basa en espirulina mezclada con maní, tanto para los peces grandes (59,35%) como para los pequeños (58,88%).

En los intestinos (Tabla 3.48) se observa un mayor grado de hidrólisis con la dieta 1 que es alimento comercial, mostrando un GDH de 54,73% en preñadillas grandes y 57,46% en preñadillas pequeñas.

Los cálculos realizados para la obtención de los valores de actividad caseinolítica se detallan en el anexo G.

3.4.2 Actividad con sustrato cromogénico

Los resultados obtenidos con el sustrato cromogénico DL-BApNA se muestran en las Tablas 3.49 y 3.50.

Tabla 3.49 Actividad proteásica con sustrato cromogénico DL-BApNA en extractos de estómagos de preñadillas de acuerdo a su tamaño.

Tamaño	Dieta	n	Actividad con DL-BApNA Media (U/mg)	GDH DL-BApNA %
Pequeño	1	4	2,27 ± 1,29	7,1
Pequeño	2	3	1,70 ± 1,68	2,75
Pequeño	3	4	0,50 ± 0,40	14,99
Grande	1	5	0,05 ± 0,01	7,31
Grande	2	6	0,53 ± 0,22	5,34
Grande	3	5	0,70 ± 0,61	18,39

Tabla 3.50 Actividad proteásica con sustrato cromogénico DL-BApNA en extractos de intestinos de preñadillas de acuerdo a su tamaño.

Tamaño	Dieta	n	Actividad con DL-BApNA Media (U/mg)	GDH DL-BApNA %
Pequeño	1	4	41,99 ± 20,66	39,81
Pequeño	2	3	96,19 ± 21,78	61,09
Pequeño	3	4	100,64 ± 47,43	63,22
Grande	1	5	28,52 ± 6,17	54,24
Grande	2	6	39,45 ± 3,67	73,37
Grande	3	5	32,01 ± 11,67	98,03

La actividad con sustrato cromogénico DL-BApNA es mucho mayor en intestinos que en estómagos, lo que contrasta con lo observado en la actividad caseinolítica.

Con el sustrato cromogénico DL-BApNA se observa la tendencia contraria a la observada con caseína, ya que en este caso el grado de hidrólisis disminuye con el aumento de concentración proteica de la dieta que recibieron, esto se ve tanto en preñadillas grandes como en pequeñas (Tabla 3.50).

En los intestinos no se observa una tendencia ligada entre el grado de hidrólisis (Tabla 3.50) y la concentración de proteína de la dieta suministrada (Tabla 2.4).

El análisis estadístico muestra diferencias significativas en el grado de hidrólisis de estómagos e intestinos, pues en el caso de intestinos el GDH llega a ser de 98,03%, mientras que el de estómagos llega a 18,39%.

Los cálculos realizados para la obtención de los valores de actividad proteásica con sustrato cromogénico DL-BApNA se detallan en el anexo G.

3.4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

El contenido de proteína determinado por el método de Lowry se puede observar en la Tabla 3.51.

Tabla 3.51 Contenido de proteína total en estómagos e intestinos de preñadillas

Tamaño	Órgano	n	Proteína total media (mg/ml)
Pequeño	estómago	11	2,76 ± 0,36
Pequeño	intestino	11	1,97 ± 0,28
Grande	estómago	16	2,07 ± 0,23
Grande	intestino	16	1,17 ± 0,14

Como se ve en la Tabla 3.51 el contenido proteico en preñadillas pequeñas es mayor tanto en estómagos como en intestinos en relación a las preñadillas grandes, y en cada caso el contenido proteico es mayor en los estómagos que en los intestinos, lo que se demuestra con el análisis estadístico en el anexo I.

Las absorbancias obtenidas con los extractos se muestran en el anexo H.

Las actividades enzimáticas específicas con caseína y sustrato cromogénico en las muestras se presenta en las Tablas siguientes.

Tabla 3.52 Resultados de actividad caseinolítica específica en estómagos de preñadillas de acuerdo a su tamaño

Tamaño	Dieta	n	Actividad Caseinolítica Específica Media (U/mg)
Pequeño	1	4	68,21 ± 28,74
Pequeño	2	3	122,26 ± 63,83
Pequeño	3	4	176,64 ± 83,66
Grande	1	5	125,22 ± 36,85
Grande	2	6	52,55 ± 13,99
Grande	3	5	202,58 ± 31,79

Tabla 3.53 Resultados de actividad caseinolítica específica en intestinos de preñadillas de acuerdo a su tamaño

Tamaño	Dieta	n	Actividad Caseinolítica Específica Media (U/mg)
Pequeño	1	4	1233,50 ± 119,91
Pequeño	2	3	505,53 ± 228,78
Pequeño	3	4	250,91 ± 81,60
Grande	1	5	1183,35 ± 332,10
Grande	2	6	640,06 ± 136,95

Grande	3	5	733,21 ± 251,97
--------	---	---	-----------------

Al ver los resultados de las actividades caseinolíticas específicas, de igual manera se ve que los resultados son mayores para los intestinos que para los estómagos.

Tabla 3.54 Resultados de actividad específica con DL-BApNA en extractos de estómagos de preñadillas de acuerdo a su tamaño.

Tamaño	Dieta	n	Actividad específica Media con DL-BApNA (U/mg)
Pequeño	1	4	0,88 ± 0,50
Pequeño	2	3	0,61 ± 0,59
Pequeño	3	4	0,23 ± 0,20
Grande	1	5	0,03 ± 0,01
Grande	2	6	0,23 ± 0,11
Grande	3	5	0,71 ± 0,60

Tabla 3.55 Resultados de actividad específica con DL-BApNA en extractos de intestinos de preñadillas de acuerdo a su tamaño.

Tamaño	Dieta	N	Actividad específica Media con DL-BApNA (U/mg)
Pequeño	1	4	27,43 ± 12,72
Pequeño	2	3	65,83 ± 33,14
Pequeño	3	4	42,16 ± 17,23
Grande	1	5	24,97 ± 3,70
Grande	2	6	44,48 ± 11,31
Grande	3	5	35,58 ± 14,02

La actividad proteásica específica con sustrato cromogénico DL-BApNA es de igual manera que los casos anteriores, mayor para los intestinos que para los estómagos.

Los cálculos detallados para obtener estos resultados se muestran en el anexo G.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La presente investigación partió de la captura de preñadillas en tres zonas de la región Sierra del Ecuador. Las características del agua de estas zonas fueron: pH entre 6,5 y 7,5, y baja concentración de sólidos disueltos totales (entre 40 y 95 ppm), estas propiedades nos indican que este animal es un bioindicador, ya que como lo menciona Muñoz *et al.*, 2009, solo se lo encuentra en ecosistemas conservados.

Se realizaron análisis bromatológicos a muestras de preñadillas, los cuales indican que el contenido de proteína es de 19,58% y grasa 18,26% (Tabla 3.3), estos resultados obtenidos, al ser comparando con el contenido de proteína en trucha (22%), tilapia (18,9%) y atún (24,3) muestran que la preñadilla es muy rica en proteína pero también en grasa, pues la trucha presenta 11,7% de grasa, la tilapia 1,8% y el atún 2,2% según lo comparado con las especies que se mencionan en el trabajo de Ortiz, 2008, lo cual corrobora las creencias de que el nivel nutricional que brinda la preñadilla es bastante elevado. Se realizaron comparaciones con estas especies por ser las que se consumen ampliamente en nuestro medio y, además, porque son cultivadas en mayor proporción.

El alto porcentaje de proteínas que presentaron las preñadillas en el análisis bromatológico, es el motivo de la importancia de estudiar a las proteasas por el papel que desempeñan en la hidrólisis proteica, este contenido proteico es superior al de algunos peces, como por ejemplo la tilapia (18,9%), la carpa común (18,0%), pero con un contenido en grasa, mayor a los peces comparados del trabajo de Ortiz, 2008 en su investigación.

Debido al elevado porcentaje proteico encontrado en las preñadillas, las dietas que se plantearon fueron analizadas por sus contenidos de proteína.

Los peces capturados fueron clasificados de acuerdo a su tamaño y mantenidos en cautiverio durante 9 semanas, luego de lo cual se observó una mortalidad mayor en los animales pequeños (19,4%) que en los animales grandes (5,6%), pero no se encuentra relación entre la muerte de individuos con la dieta que consumieron durante su período de cautiverio. Por estas observaciones se decidió trabajar con animales que superen los 3,5 cm de longitud total debido a que en preñadillas de menor tamaño la mortalidad era mayor.

Este incremento de mortalidad en preñadillas pequeñas puede deberse a distintos factores, entre los que se puede considerar los citados por Moyano (2005), según el cual, la presencia de enzimas y sus niveles dependen de la edad, temperatura y parcialmente del alimento; sin embargo, en el presente proyecto se trabajó con animales obtenidos de su estado natural, por lo que no se puede afirmar que las preñadillas pequeñas sean menores en edad a las preñadillas grandes; pero esta podría ser la razón de los altos porcentajes de mortalidad vistos en este tamaño de preñadillas.

La mortalidad total fue del 20%, debido a que el mantenimiento en cautiverio de *Astroblepus sp.* es difícil de lograr y que, la factibilidad de mantenerlos en acuario es un proyecto en progreso, pero se obtuvieron resultados valiosos sin proveerlos de luz, con un recambio diario de agua del 25% y colocando malla en las peceras para evitar la salida de los animales, a diferencia de lo afirmado por Moreano *et al.*, 2005, según lo cual la preñadilla no se puede mantener en cautiverio.

Luego de mantener a las preñadillas en cautiverio con dietas específicas y parámetros controlados (temperatura, pH, conductividad, sólidos disueltos totales, oxígeno disuelto, nitritos, fosfatos y dureza) se observó un decremento de peso, debido a que este animal es muy sensible a cambios en su medio y su dieta natural consiste en macroinvertebrados de las zonas donde habitan, corroborando el trabajo de Villamarín *et al.*, 2007, en lo que respecta a la alimentación de preñadilla.

En el análisis estadístico de los parámetros morfométricos, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, pero en general, las pérdidas

de peso son menores en el grupo de animales pequeños, principalmente en aquellos que recibieron la dieta D3 que consistió en espirulina y maní molido, lo que pudo ser debido al tamaño de partícula del alimento, mientras que los animales grandes en cambio muestran menor pérdida de peso con la dieta D2 que consistió en pulgas de agua con tubifex, lo que confirma el hecho que *Astroblepus sp.* se alimenta en su etapa adulta exclusivamente de macroinvertebrados acuáticos que se encuentran adheridos a piedras o fondo de los lechos acuáticos.

Las longitudes totales de los animales varían en mayor medida en los animales pequeños, pudiendo ser esto debido a que las preñadillas están en crecimiento y que los individuos pequeños corresponden a animales más jóvenes. Pero en ningún caso, la longitud parcial o total se observan diferencias significativas derivadas de los tratamientos a los que fueron sometidas las preñadillas del estudio.

En general, al analizar los datos de variaciones de las medidas de peso: longitud total, longitud parcial, ancho, espesor y ancho cefálico no se aprecia ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) debida a los tratamientos realizados sobre los grupos de estudio.

El Índice de Condición Corporal no muestra diferencias significativas en ningún tratamiento, es decir que los parámetros bioproductivos de la preñadilla dependieron del tipo de alimento que se ha suministrado, esto puede deberse a que el animal es sensible y que al ser sacado de su ambiente natural y muestra una adaptación compleja al cautiverio.

Posterior a la etapa de mantenimiento de las preñadillas (en cautiverio) se procedió a extraer su tracto digestivo con el cual se calculó la Longitud Intestinal Relativa (LIR), que permitió conocer los hábitos alimenticios de los peces ya que al presentar un intestino relativamente corto en relación a la longitud total del pez, el hábito es carnívoro puesto que para digerir este tipo de alimentación se debe contar con enzimas aptas para esto, y además, esta materia restante no debe permanecer mucho tiempo en el organismo; como se puede observar en la Tabla 3.45 los resultados de la investigación muestran valores de LIR entre 0,19 y 0,57, el índice no supera a 1, a diferencia de especies como *Solea senegalensis* estudiada por Sáenz *et al.*, 2005, cuyo LIR es $2,81 \pm 0,38$ ubicándose más próximamente a los peces con hábitos omnívoros.

Astroblepus sp. presenta un intestino corto, característico de los carnívoros porque presentan grupos enzimáticos bastante activos lo que permite que asimilen los nutrientes de manera rápida, evitando que las toxinas de la carne se liberen dentro del organismo, a diferencia de los organismos herbívoros que tienen intestinos largos para que se puedan asimilar sus nutrientes sin que la liberación de toxinas sea peligrosa para el individuo.

Por estudios anteriores realizados en *Astroblepus sp.* precisamente en *Astroblepus cyclopus*, donde se indica que su dieta se basa solo en macroinvertebrados acuáticos según Villamarín *et al.*, 2007, y por el LIR calculado, se puede pensar que la preñadilla presenta altos valores de pepsina como la trucha o la dorada que se hace referencia en el trabajo de Essed *et al.*, 2002.

Luego de extraer el tracto digestivo, se separó el estómago y el intestino para la obtención de los extractos enzimáticos, se debió añadir al protocolo de Lundstedt *et al.*, 2002_b la sonicación que es parte del protocolo de Cuervo *et al.*, 2005 pero que trabaja con cepas bacterianas, por lo que fue necesario probar distintos tiempos para obtener una actividad enzimática alta por la liberación de las proteínas solubles debido a la sonicación; al elevar la actividad enzimática con el tiempo se vio que las enzimas proteasas de las preñadillas toleraban este proceso al realizarlo sobre hielo, hasta 15 minutos en tres intervalos, luego de esto la actividad bajaba notoriamente por posibles alteraciones a la molécula enzimática.

Debido a la elevada actividad enzimática que presentaron el estómago y el intestino de *Astroblepus sp.* frente a las diluciones con las cuales se prepararon los ensayos, se puede determinar que se los puede realizar más diluidos, en el caso de los estómagos, en una proporción de 1:50 (p/v) con el tampón 0,1 M glicina/HCl a pH=2, y en el caso de los intestinos, 1:100 (p/v) con el tampón 0,1 M tris/HCl a pH=8,5, ya que al leer la absorbancia, tanto en el caso del método con sustrato caseína, como en el método con sustrato DL-BApNA, se requirieron realizar nuevas diluciones.

Con los extractos obtenidos de estómago e intestino se realizaron ensayos para determinar la actividad proteásica ácida y alcalina con el protocolo de Anson modificado (caseína) y con sustrato cromogénico DL-BApNA.

En el caso de las proteasas alcalinas se observa una mayor actividad enzimática que en las proteasas ácidas, pero para poder compararlas es necesario determinar el Grado de Hidrólisis, el cual permitió determinar que con el sustrato caseína, el porcentaje de hidrólisis fue similar para las proteasas ácidas y alcalinas en los animales grandes y pequeños, mostrando ciertas tendencias.

El Grado de Hidrólisis permitió comparar las actividades enzimáticas de los estómagos e intestinos, pues al trabajar con cada extracto a distinto pH (2 y 8,5) no se podía realizar comparaciones al desconocer la dilución de los sustratos en cada uno de ellos, razón por la cual se modificaron los protocolos.

Para poder analizar y comparar la actividad proteásica ácida y alcalina se calculó el grado de hidrólisis, porque se trabajó a pH ácido y pH básico para cada extracto enzimático, lo que varía en la concentración de sustrato solubilizado a hidrolizarse.

El grado de hidrólisis de la caseína varió dependiendo de la dieta, pero no según el tamaño o el órgano de estudio, pero se puede ver un comportamiento adaptativo en los estómagos de preñadillas grandes ya que el grado de hidrólisis disminuye con el incremento de la concentración de la proteína de la dieta, al igual que en *Colossoma macropomum*, como lo menciona el trabajo de Lundstedt *et al.*, 2002_b. Los animales que fueron sometidos a la dieta D3, correspondiente a espirulina con maní, con un contenido de proteína de 36,61% presentaron el mayor grado de hidrólisis (59,35%); seguido de los animales que recibieron la dieta D1, que consistió en alimento comercial con un contenido proteico de 46%, mostrando un GDH de 44,29%, y finalmente los animales que recibieron la dieta D2, formada por tubifex y pulgas de agua, con un GDH de 35,47%. Esto puede deberse a que los niveles de proteína inducen un decrecimiento de la actividad proteásica ácida (pH=2) en los estómagos de la preñadilla.

Este comportamiento adaptativo no se observa en las preñadillas pequeñas, con el método de caseína, pero si ha sido reportado en otras especies como *Labeo rohita* según lo estudiado por Debnath *et al.*, 2006 y *Rhamdia quelen*, que menciona Lundstedt *et al.*, 2002_b. El análisis estadístico tampoco refleja diferencias entre los órganos analizados y el tamaño del pez.

El grado de hidrólisis en los intestinos no presenta un incremento o decremento debido a la concentración proteica de la dieta suministrada, por lo que no se puede pensar en una regulación de la síntesis enzimática por el contenido proteico pero sí por la presencia de derivados presentes en la dieta.

Al analizar el grado de hidrólisis de DL-BApNA sí se encontraron diferencias significativas entre los órganos analizados, siendo mayor el GDH en los intestinos (68,83%) que en los estómagos (9,31%), lo cual indica una mayor digestión a nivel intestinal esto se da tanto en preñadillas grandes como en pequeñas, lo cual contrasta con otras especies como *Sparus auratus* o *Dentex dentex*, estudiadas por Essed *et al.*, 2002, en los que se observan mayores niveles de actividad proteasa ácida en el estómago que los de actividad proteasa alcalina en el intestino, al igual que en otros tipos de bagres con los que se comparó el presente estudio, como *Pseudoplatystoma coruscans* del trabajo de Lundstedt, 2002_a.

La relación entre los valores de GDH de DL-BApNA de proteasas ácidas con los proteasas alcalinas en *Astroblepus sp.* no se asemejan a la que se describe en otros peces carnívoros de los estudios mencionados por Alarcón *et al.*, 2001. En el caso de *Astroblepus sp.* presenta una actividad proteásica similar a *Solea senegalensis*, analizada por Sáenz *et al.*, 2005, ya que la fase de digestión ácida en el estómago es menos importante que la encontrada en otros peces con estómago.

Al determinar el grado de hidrólisis del sustrato cromogénico se observa claramente el mismo comportamiento adaptativo que en los estómagos con el sustrato caseína, pero se da tanto en estómagos como intestinos, pero más marcadamente en intestinos de preñadillas pequeñas.

Las diferencias entre los métodos de cuantificación de actividad proteásica pueden deberse a la estructura y tamaño del sustrato sobre el que actúan las enzimas proteolíticas en cada método analizado.

Al encontrar en *Astroblepus sp.* un comportamiento carnívoro, se puede determinar un tipo de dieta conveniente para esta especie, si se analiza la relación enzimática que menciona Essen *et al.* (2002) para los peces carnívoros, según la cual la relación de tripsina es mayor a la de quimotripsina, por lo que la dieta debe ser baja en

aminoácidos como triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina, para que se de un mejor aprovechamiento proteico.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La actividad proteásica digestiva ácida de la preñadilla depende de la concentración de proteína que tenga el alimento suministrado, ya que el grado de hidrólisis disminuye con mayores concentraciones de proteína, lo que indica una adaptación del animal frente al alimento ingerido para inducir un aumento de la actividad proteásica ácida.

Las proteasas digestivas de la preñadilla muestran una inhibición por el sustrato, por lo que su actividad disminuye con el aumento de la concentración de proteína

Las dietas experimentales formuladas con distinta fuente proteica fueron aceptadas por las preñadillas permitiendo su mantenimiento durante la etapa de cautiverio de 9 semanas para luego pasar al análisis de su actividad proteásica.

Los parámetros bioproductivos calculados para preñadilla no son óptimos debido a que el animal tarda en adaptarse al ambiente y es muy sensible a cambios, pero no se observan cambios dependientes de los tratamientos suministrados.

La preñadilla presenta una actividad marcadamente alcalina en la digestión de proteínas, como otros bagres, e igualmente es dependiente de la concentración proteica de la dieta que consume, con sustratos que presenten un tamaño de molécula pequeño.

La preñadilla pequeña prefiere alimentos de partícula pequeña, microalgas, mientras que de grande su preferencia alimenticia es hacia microorganismos de mayor tamaño, como pulgas de agua; su carga enzimática varía con la etapa de crecimiento en la que se encuentran.

Los extractos de estómagos de *Astroblepus sp.* se pueden elaborar con una dilución de 1:50 (p/v), y los de intestinos con una dilución de 1:100 (p/v) con los tampones correspondientes, ya que las absorbancias obtenidas de su actividad permiten

aumentar la dilución debido a la marcada digestión alcalina de proteínas que se observa en estos animales.

La sonicación es un procedimiento que permite extraer las proteasas alcalinas y ácidas de *Astroblepus sp.* si se realiza sobre hielo en tres intervalos de 5 minutos con un lapso intermedio de 30 segundos, puesto que con estas condiciones se obtiene un extracto enzimático con una actividad notoriamente superior que permite una mayor dilución.

Las dietas para preñadilla deben contener bajas concentraciones de triptófano, tirosina, fenilalanina y metionina, para que puedan aprovechar de mejor manera el alimento que reciben, debido a que tienen hábitos carnívoros.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Estudiar con mayor profundidad las enzimas proteásicas que actúan en el estómago e intestino de *Astroblepus sp.* a fin de conocer más detalladamente el metabolismo de este animal.

Complementar la investigación del metabolismo de *Astroblepus sp.* con la actividad esterásica y de lípidos para tener una perspectiva más amplia del metabolismo de esta especie, además que permitiría determinar una dieta más completa al satisfacer de mejor manera el metabolismo de la preñadilla.

Continuar el estudio de la bioquímica de *Astroblepus sp.* para lograr obtener una formulación alimenticia que cubra las necesidades del animal en los distintos estadios de su vida, además prolongar el tiempo de cautiverio para observar la adaptación que logren tener al alimento suministrado.

Analizar la posibilidad de introducir carbohidratos en la dieta de la preñadilla pues en otros bagres, como *Pseudoplatystoma coruscans* se observa una elevada actividad de amilasa al variar las concentraciones de glúcidos, lo que permitiría disminuir el porcentaje de proteína en el alimento suministrado, lo que disminuiría costos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Alarcón, F. Diaz, M. Moyano, F. (2001). Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. Universidad Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería, España. <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c22/97605917.pdf>

Barriga, R. (1991). Lista de vertebrados del Ecuador. Peces de agua dulce, Biología 3. Revista de información técnico científica EPN.

Boyer, R. (1999). Conceptos en Bioquímica. México; Internacional Thomson Editores.

Brandan, N. Llanos, C. Barrios, B. Escalante, A. Ruíz, D. (2008). Enzimas. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/enzimas.pdf>

Briñez, G. (2004). Distribución altitudinal, diversidad y algunos aspectos ecológicos de la familia Astroblepidae (Pises: *Siluriformes*) en la cuenca del río Coello (Tolima). Colombia. Universidad del Tolima.

Casamayor. González. (2008). “Seminarios de Bioquímica II, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. http://minnie.uab.es/~veteri/21207/SB1_analisis_enzimatico_2008.pdf

Celis, L. García, F. Díaz, M. (2005) Caracterización de proteasas en el sistema digestivo de la langosta roja *Panulirus interruptus*. México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/pesca/acuicultura/descargas/AlimentacionyNutricion/8_Proteasas_langosta_roja.pdf

Cuervo, R. Hurtado, C. Bravo, E. Benítez, N. Torres, W. Larmat, F. (2005). Extracción y purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a partir de la bacteria carboxidótrofa *Oligotropha carboxidovorans*. Universidad de San Buenaventura Cali. Colombia. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/478/47802614.pdf>

Debnath, D. Pal, A. Sahu, N. Yengkokpam, S. Baruah, K. Choudhury, D. Venkateshwarlu, G. (2006). Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T2R-4M40046-2&_user=10&_coverDate=01%2F31%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1206452052&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=f049436cd172a197bda63d893688256f

Díaz, M. Granados, Y. Ronco, A. (2004). Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. [http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO TOPI C.html](http://www.idrc.ca/en/ev-66572-201-1-DO_TOPI_C.html)

Essed, Z. Fernández, F. Alarcón, F. Moyano, F. (2002). Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. La Cañada, España. [http://www.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol18/18\(1-4\)099-107.pdf](http://www.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol18/18(1-4)099-107.pdf)

Fernández, E. & Galván, A. (2007). 27. Métodos para la cuantificación de proteínas. Campus Universitario de Rabanales. Córdoba, España. <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA-%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>

Fersht, A. (1999). Structure and Mechanism in Protein Science. A guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. New York: W. H. Freeman and Company.

Finehout, E. Cantor, J. Lee, K. (2005). Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin. Escuela de Química e Ingeniería Biomolecular. Cornell University, Ithaca, NY, USA. <http://www.leelab.org/research/papers/Proteomics5-2319.pdf>

Galvis, G. Mojica, J. Camargo, M. (1997). Peces del Catatumbo. Colombia. Editorial D'Vinni.

González, O. (2004). Tema 11: Enzimas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco, España. <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/tema11.htm>

Guadix, A. Guadix, E. Páez, M. González, P. Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Universidad de Granada. España. <http://www.ugr.es/~ars/abstract/41-79-00.pdf>

Koolman, J., & Roehm, K. (2005). Color Atlas of Biochemistry. New York: Thieme Stuttgart.

Lowry, O., Rosenbrough, N., Raff, A., Randal, R. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent", Journal Biology Chem. N° 193, p. 255.

Lundstedt, L. Melo, J & Moraes, G. (2002_a). Induction of digestive enzymes in the brazilian catfish (*Pseudoplatystoma coruscans*). Departamento de genética y evolución, Universidad de Sao Carlos. Sao Paulo, Brasil. <http://www-heb.pac.dfompo.gc.ca/-congress/2002/Biochem/lundstedt1.pdf>

Lundstedt, L. Melo, J. Santos Neto, C & Moraes, G. (2002_b). Diet influences proteolytic enzyme profile of the south american catfish *Rhamdia quelen*. Universidad de Sao Carlos. Sao Paulo, Brasil. <http://www-heb.pac.dfo-po.gc.ca/congress/2002/-Biochem/lundstedt2.pdf>

Maldonado, J. Ortega, A. Usma, J. Galvis, G. Villa, F. Vásquez, L. Prada, S. Ardila, C. (2005). Peces de los Andes de Colombia. Colombia. Instituto Humbolt.

Manber, U. Wu, S. Gopal, B. (2005). Enzimas digestivas. México. Biblioteca AMED. <http://www.ntmexico.com/biblioteca/nutricion/enzimas.pdf>

Martínez, C. Ríos, M. (2003). Aspectos de la Alimentación de los peces y el uso de microagregados en acuicultura. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/MEMORIAS_VALIDAS/pdf/Mart%C3%A9nez.pdf

Martínez, E. Prácticas de metodología y experimentación. Bioquímica II Departamento de Bioquímica. Universidad de Navarra. <http://www.unav.es/bioquimica/CuadernoE-Martinez.pdf>

Moreano, M. Reascos, Y. Del Pino, E. (2005). Un pez gato milenario: La preñadilla, *Astroblepus ubidiai* (Siluriformes: Astroblepidae). Pontificia Universidad Católica. Quito, Ecuador. <http://www.biologia.puce.edu.ec/imagesFTP/3415.2005NuestraCiencia7.pdf>

Moyano, J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León, México. w3.dsi.uanl.mx/publicaciones/-maricultura/viii/pdf/24Moyano.pdf

Muñoz, D. Onofa, A. Tufiño, P. Ortiz, J (2009). Estudio preliminar del Género *Astroblepus*, como grupo endémico de las cuencas hidrográficas de la provincia de Zamora Chinchipe. ESPE-Simbioe.

Muñoz, F. Tobar, J. Arias, J. (2007). Respuesta a la primera alimentación en larvas de barbilla *Rhamdia sebae*. Universidad del Cauca, Colombia. <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol5/6Vol5.pdf>

Núñez, D. (2007). Identificación de proteasas vegetales con posibles aplicaciones industriales o biomédicas, a partir de especies comunes de las provincias de Bolívar y Pichincha.

Ortiz, J. (2009). Acuicultura: Generalidades y Conceptos Fundamentales. Boletín Técnico: Producción dulce acuícola en el Ecuador I. Sangolquí, Ecuador. Pp 10-14.

Ortiz, J. Rueda, D. Acosta, A. Garcés, J. Dávila, A. Solís, T. (2006). Estudio morfológico y citogenética de la preñadilla (*Astroblepus ubidiai*). Ecuador.

Reyes, Q. y Emedith, I. (2008). Estandarización de técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, Dot Blot) para evaluar la respuesta inmune humoral en ratones C3H/Hej frente a Tripsina de sardina Monterrey (*Sardinops Sagax Caerule*). Sonora, México. <https://altar.uson.mx/cgi-bin/biblio.sh/ficha.htm?tmat=T&id=18430>

Rossi, F. & Luchini, L. Tecnologías para cultivo del “randia” (*Rhamdia quelen*) para fomento de su producción comercial, en clima templado a templado-cálido. Dirección de Acuicultura. Argentina. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ peces/-piscicultura/09-randia_sagpya.pdf

Sáenz, M. Alarcón, F. Martínez, M. Ruiz, F. Díaz, M. Moyano, F. (2005). Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Instituto Español de Oceanografía. España. http://www.ieo.es/publicaciones/boletin/pdfs/bol21/bol21_10-saenz.pdf

Sinche, M. (2009). Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género *Vasconcella*.

Universidad de la Habana (2008). Enzimas. http://fbio.uh.cu/enzimol/clases_practicas

Universidad Pablo de Olavide (2008). Cinética enzimática: determinación espectrofotométrica de la constante de Michaelis-Menten de la papaína. http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/biotec_termo/practicas5TyCQ0506.pdf

Villamarín, S. Herrera, M. Falconí, A. Cáceres, S. (2007). Dieta de *Astroblepus aff. Cyclopus* (Siluriformes: Astroblepidae) Del Distrito Metropolitano de Quito. Museo de Ciencias Naturales.

