

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN ACUICULTURA



“USO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y  
CRECIMIENTO DEL PAICHE (*Arapaima gigas*) EN SU ADAPTACIÓN  
AL BIOFLOC”

Presentada por:

CÉSAR ENRIQUE ÁLVAREZ SÁNCHEZ

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGÍSTER SCIENTIAE EN  
ACUICULTURA

Lima – Perú  
2016

## **DEDICATORIA**

Me siento profundamente motivado a dedicar el presente trabajo de investigación a mi familia, por su vital soporte y motivación durante el arduo, pero satisfactorio camino de la investigación.

Asimismo, dedico este trabajo a la señorita Rocío M. por brindarme inspiración desmedida y compañía incondicional.

Fueron y seguirán siendo mi principal meta.

## **AGRADECIMIENTO**

Un profundo agradecimiento a mis profesores de la Maestría en Acuicultura de la UNALM, por compartir sus conocimientos y experiencias, especialmente a mi patrocinadora Jessie Vargas, por sus buenos consejos y perfeccionismo obstinado, que hicieron que la ejecución del presente trabajo sea una realidad.

Mil Gracias para el ingeniero Francisco Vidal, gerente de cuentas de DSM Nutritional Products, Perú por la donación de Rovimix<sup>®</sup> Stay-C 35 y la determinación exacta de la concentración de ácido ascórbico en las dietas experimentales.

Agradecimiento total a mis colegas y compañeros del Laboratorio de Acuicultura: Rocío M., José Á., Leonel A., Andrea M., Jairo Z. y Raquel B., por su dedicación y esfuerzo.

Finalmente, un profundo agradecimiento a CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por el apoyo económico recibido como participante del Proyecto de la Maestría de Acuicultura (Convenio de Gestión N°017-2013-FONDECYT).

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Biología y cultivo de <i>Arapaima gigas</i> .....	3
2.2. Requerimientos nutricionales de <i>Arapaima gigas</i> .....	4
2.3. Sistema de biofloc (SBF) .....	5
2.4. Indicadores de respuesta al estrés .....	7
2.5. Efecto del cortisol sobre la respuesta fisiológica.....	9
2.5.1. Efecto del cortisol sobre el metabolismo de carbohidratos (niveles de glucosa) 9	
2.5.2. Efecto del cortisol sobre los parámetros hematológicos .....	10
2.6. Proceso de adaptación fisiológica.....	10
2.7. Vitamina C o ácido ascórbico (AA): Funciones y Requerimientos .....	11
2.7.1. Efecto del ácido ascórbico en la dieta sobre el estado fisiológico de organismos acuáticos.....	13
2.7.2. Efecto del ácido ascórbico en la dieta sobre la tolerancia al estrés .....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
3.1. Lugar y periodo experimental.....	16
3.2. Dietas experimentales .....	16
3.3. Material biológico.....	18
3.4. Diseño Experimental .....	18
3.5. Manejo Experimental.....	18
3.5.1. Manejo experimental en la etapa de sistema de recirculación en acuicultura (SRA) .....	19
3.5.2. Manejo experimental en la etapa de sistema de biofloc (SBF) .....	19
3.6. Hipótesis planteada.....	21
3.7. Procedimientos y técnicas de recolección de datos .....	21
3.7.1. Calidad de agua .....	21
3.7.2. Parámetros productivos.....	23

3.7.2.1. Tasa de crecimiento específica (TCE) .....	23
3.7.2.2. Porcentaje de supervivencia.....	23
3.7.2.3. Factor de conversión alimenticia (FCA) .....	23
3.7.2.4. Ganancia de Peso (GP) .....	24
3.7.2.5. Densidad de carga (Kg/m <sup>3</sup> ) .....	24
3.7.3. Indicadores de respuesta fisiológica al estrés .....	24
3.7.3.1. Parámetros hematológicos .....	25
a. Índices hematimétricos.....	25
b. Concentración de hemoglobina.....	26
c. Hematocrito.....	26
d. Conteo de eritrocitos .....	26
e. Conteo total de leucocitos y trombocitos .....	26
f. Conteo diferencial de leucocitos.....	27
3.7.3.2 Parámetros metabólicos (glucosa y cortisol) .....	27
3.8. Diseño estadístico .....	27
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
4.1. Calidad de Agua .....	29
4.2. Parámetros de crecimiento.....	34
4.3. Respuestas Fisiológicas .....	40
4.3.1. Parámetros Hematológicos .....	40
4.3.2 Parámetros metabólicos (glucosa y cortisol) .....	46
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>53</b>
<b>VIII. ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Formulación de la dieta basal y valor químico proximal .....	17
Tabla 2: Métodos de muestreo para la evaluación de los parámetros físicos, químicos, productivos y fisiológicos (metabólicos o bioquímicos y hematológicos).....	22
Tabla 3: Parámetros de calidad de agua durante la fase experimental en el sistema de recirculación en acuicultura (SRA). .....	29
Tabla 4: Parámetros de calidad de agua durante la fase experimental en el sistema de biofloc (SBF). .....	30
Tabla 5: Parámetros productivos de <i>Arapaima gigas</i> , en el sistema de recirculación en acuicultura bajo diferentes niveles de ácido ascórbico, por un período de 54 días.....	35
Tabla 6: Parámetros productivos de <i>Arapaima gigas</i> , en el sistema biofloc bajo diferentes niveles de ácido ascórbico, por un período de 14 días. ....	36
Tabla 7: Valores de células rojas sanguíneas, glucosa y cortisol en <i>Arapaima gigas</i> , 4 días previos al SBF, y a los 7 y 14 días en el cultivo.....	41
Tabla 8: Trombocitos, leucocitos totales y conteo diferencial de leucocitos de <i>Arapaima gigas</i> , 4 días previos al SBF, y a los 7 y 14 de cultivo. ....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cálculo de la cantidad de Carbono necesario para la inmovilización del Nitrógeno. Tomado de Crab et al. (2012).....	6
Figura 2: Relación entre los estresores y sus efectos fisiológicos en peces. Tomado de Barton (2002).....	8
Figura 3: Diagrama de la disposición y etapas experimentales en sistemas SRA y SBF....	18
Figura 4: Cambios de las concentraciones de nitrógeno inorgánico a lo largo del periodo experimental en SBF. ....	33
Figura 5: Peso promedio final (g) de <i>Arapaima gigas</i> , después de 54 días en SRA y después de 14 días en SBF. ....	38
Figura 6: Crecimiento en peso promedio (g) de <i>Arapaima gigas</i> , en SRA (sistema de recirculación en acuicultura) y SBF (sistema de biofloc).....	39
Figura 7: Concentraciones de glucosa ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) en plasma de <i>Arapaima gigas</i> , a los 4 días previos, y a los 7 y 14 días del cultivo en biofloc. ....	47
Figura 8: Concentraciones de cortisol ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) en plasma de <i>Arapaima gigas</i> , a los 4 días previos, y a los 7 y 14 días del cultivo en biofloc. ....	48

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Unidades experimentales, pertenecientes al sistema de recirculación en acuicultura (SRA).....	67
Anexo 2: Alevín de <i>Arapaima gigas</i> (paiche), instantes previos a la biometría: .....	67
Anexo 3: Cultivo en sistema de tecnología biofloc, que se empleó de inóculo para la etapa experimental en SBF .....	68
Anexo 4: Medición de los sólidos sedimentables en los conos de sedimentación Imhoff ..	68
Anexo 5: Conteo del número de eritrocitos en una cámara de Neubauer, en solución de formol citrato más azul de toluidina (1:200) .....	69
Anexo 6: Monocito de alevín de <i>Arapaima gigas</i> , en una extensión sanguínea con tinción May Grunwald- Giemsa- Wrigth.....	69
Anexo 7: Eosinófilo (flecha gruesa) y Trombocito (flecha delgada) de alevín de <i>Arapaima gigas</i> , en una extensión sanguínea con tinción May-Grunwald -Giemsa – Wrigth. ....	70
Anexo 8: Neutrófilo (flecha gruesa) y Linfocito (flecha delgada) de alevín de <i>Arapaima gigas</i> , en una extensión sanguínea con tinción May-Grunwald -Giemsa – Wrigth. ....	70
Anexo 9: Informe de la determinación de las concentración exactas de ácido ascórbico en las dietas experimentales .....	71
Anexo 10: Manual del kit comercial de la marca Valtek diagnostics para la determinación de glucosa en plasma sanguíneo.....	72
Anexo 11: Manual del kit comercial de la marca Monobind Inc. para la determinación de cortisol en plasma sanguíneo.....	73
Anexo 12: Datos de muestreo para la evaluación de los parámetros de calidad de agua....	74
Anexo 13: Datos de muestreo para la evaluación de los parámetros productivos. ....	84
Anexo 14: Datos de muestreo para la evaluación de los parámetros fisiológicos (metabólicos o bioquímicos y hematológicos).....	88



Anexo 15: Análisis estadístico de los datos de parámetros productivos en la etapa en SRA. .....	94
Anexo 16: Análisis estadístico de los datos de parámetros productivos en la etapa en SBF. .....	96
Anexo 17: Análisis estadístico de los datos de parámetros hematológicos y metabólicos (glucosa y cortisol) en el periodo de 4 días antes del traslado al SBF .....	98
Anexo 18: Análisis estadístico de los datos de parámetros hematológicos y metabólicos (glucosa y cortisol) en el periodo de 7 días en el SBF. ....	104
Anexo 19: Análisis estadístico de los datos de parámetros hematológicos y metabólicos (glucosa y cortisol) en el periodo de 14 días en el SBF .....	110

## RESUMEN

El presente experimento fue realizado para evaluar el crecimiento y la respuesta al estrés de alevines de *Arapaima gigas* ( $26 \pm 2.36$  g), alimentados previamente con diferentes concentraciones de vitamina C, en su posterior adaptación fisiológica al sistema de biofloc (SBF). Cuatro grupos por triplicado de alevines de *A. gigas* fueron alimentados durante 8 semanas con cuatro dietas experimentales de 41.3 (dieta control), 541, 823 y 1290 mg de ácido ascórbico equivalente (AA)  $\text{Kg}^{-1}$  de alimento, en un sistema de recirculación (SRA) en 12 acuarios de vidrio de 60L, posteriormente todos los grupos, fueron trasladados al SBF, durante un periodo de adaptación de 2 semanas, a diferencia del periodo en SRA la dieta control fue ofrecida a todos los grupos experimentales. El peso final, la ganancia de peso y la tasa de crecimiento específica, fueron afectados positivamente ( $p < 0.05$ ) en el tratamiento de 823 mg AA  $\text{Kg}^{-1}$  durante el periodo en SRA. Asimismo, los alevines de *A. gigas* provenientes de los tratamiento de 823 y 1290 mg AA  $\text{Kg}^{-1}$ , mostraron una mejor respuesta fisiológica en su adaptación al SBF, reflejado en una menor variabilidad en las concentraciones de cortisol en plasma sanguíneo y en un efecto antioxidante e inmunoestimulante, apreciable en los parámetros hematológicos como concentración de hemoglobina, hematocrito, número de eritrocitos, de leucocitos y de trombocitos. Los resultados indican que altas concentraciones de AA en la dieta, por un periodo de 8 semanas, mejoran el crecimiento y el estado fisiológico en alevinos de *A. gigas*, en el proceso de adaptación al SBF, siendo la mejor concentración 823 mg AA  $\text{Kg}^{-1}$ .

Palabras Clave: *Arapaima gigas*, Ácido ascórbico, Crecimiento, Respuesta al estrés, Sistema de biofloc

## ABSTRACT

The present work was conducted to investigate the growth and the stress response of *Arapaima gigas* fingerlings ( $26 \pm 2.36$  g), fed previously with different concentrations of vitamin C in their post physiological adaptation to biofloc technology system (BFT). Four triplicate groups of *A. gigas* fingerlings were fed over eight weeks with four experimental diets 41.3 (control diet), 541, 823 y 1290 mg ascorbic acid equivalent (AA) Kg<sup>-1</sup> of feed, in twelve 60 L glass aquarium of a recirculating aquaculture system (RAS), afterwards all groups were transferred to a BFT system, over an adaptation period of two weeks. Unlike the RAS system period, only the control diet was offered to all experimental groups. Final weight, weight gain and specific growth rate were positively affected ( $p < 0.05$ ) by the 823 mg AA kg<sup>-1</sup> treatment over the RAS system period. Also, fry *A. gigas* from the treatments 823 y 1290 mg AA kg<sup>-1</sup>, showed a better physiological response in its adaptation to the BFT system, reflected in lower blood plasma cortisol variability and an antioxidant and immunostimulant effect, reflected in the haematological parameters such as hemoglobin concentration, hematocrit, number of erythrocytes, leukocytes and thrombocytes. Final results indicate that high concentrations of AA in the diet for a previous period of eight weeks, improves growth and physiological state in *A. gigas* fingerlings, in the process of adaptation to the BFT system, being the best level 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>.

Keywords: *Arapaima gigas*, Ascorbic acid, Growth, Stress Response, Biofloc Technology

## I. INTRODUCCIÓN

El agua se ha convertido en un factor limitante en la acuicultura, debido principalmente a su escasez, y por los problemas de contaminación ambiental que origina el vertimiento de los efluentes de esta actividad (Avnimelech, 2009). El uso del sistema de cultivo denominados sistema de biofloc (SBF), ha sido descrito como un sistema eficiente para el reciclaje del nitrógeno inorgánico, que es un factor limitante en cultivos intensivos, asimismo permite albergar gran densidad de individuos por unidad de cultivo, ahorrando costos, y reduciendo el impacto al ambiente (Avnimelech, 2009). Su principal propósito es el máximo aprovechamiento del agua y del espacio, con cero recambio de agua, minimizando así los efluentes vertidos hacia el ambiente, garantizando la sostenibilidad en la producción acuícola (Crab *et al.*, 2012). Además, la tecnología de biofloc es propicia para zonas desérticas, donde el recurso hídrico es limitado, tales como la franja costera peruana, que no cuenta con fuentes abundantes de agua dulce.

Algunos aspectos importantes de los sistemas de tecnología de biofloc a tomar en cuenta, son la alta concentración de sólidos suspendidos totales y la intensa aireación que genera turbulencia, podrían convertirse en condiciones potencialmente estresantes para los peces cultivados. Una adecuada aireación debe realizarse con el fin de mantener las partículas en suspensión y generar mayor disponibilidad de oxígeno para el metabolismo de las bacterias heterotróficas presentes en los flóculos microbianos, y evitar puntos de hipoxia. Los sistemas biofloc, se caracterizan por presentar durante las primeras semanas de iniciado el cultivo, las mayores concentraciones de amonio y nitritos (Azim y Little, 2008; Luo *et al.*, 2014; Long *et al.*, 2015), cuyas características de inmovilización eficiente del nitrógeno, son llevadas a cabo una vez que las colonias de bacterias heterotróficas se han establecido jerárquicamente en el sistema. Su óptimo desempeño depende de la relación existente entre la concentración propicia de sólidos, alcalinidad, de la relación carbono nitrógeno y de la disponibilidad de oxígeno disuelto en el agua, siendo el ciclo del nitrógeno complejo y dinámico (Luo *et al.*, 2014). Los sistemas de biofloc, suelen ser impredecibles y pueden por lo tanto ser un riesgo a implementar el sistema en un nivel de producción a gran escala (Crab *et al.*, 2012).

El ácido ascórbico puede mejorar la tolerancia a las concentraciones relativamente elevadas de amonio y nitritos en las primeras semanas en un sistema de biofloc. Según Liu *et al.* (2008), el ácido ascórbico en la dieta, posee un efecto positivo en el crecimiento y consumo de alimento, asimismo aumenta la tolerancia de los efectos negativos del estrés por exposición al amonio en el pez gato, *Leiocassis longirostris*. Igualmente, Wise *et al.* (1988) reportan una reducción significativa en la tasa de formación de metahemoglobina por exposición a nitritos en *Ictalurus punctatus*, alimentados con altas concentraciones de ácido ascórbico.

Estudios recientes en los aspectos nutricionales de *Arapaima gigas*, resaltan la necesidad de dietas mejor formuladas y que permitan minimizar el estrés, producto de las condiciones de cautiverio (Gandra, 2002; Cavero *et al.*, 2003; Ituassú *et al.*, 2005). En consecuencia, el estudio de los efectos de la vitamina C como uno de los micronutrientes que mejoran el estado fisiológico de los organismos, es de vital importancia en el desarrollo de un manejo de cultivo. Los requerimientos de la vitamina C varían según sea el tipo de sistemas de cultivo, del estadio o fase de crianza y permite evitar signos de avitaminosis, además son específicos para incrementar el crecimiento o para mejorar la respuesta inmune y la tolerancia al estrés (Dabrowski, 2001).

Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la suplementación adicional de vitamina C en el alimento de alevines de paiche, *Arapaima gigas*, como un promotor para su crecimiento y adaptación a sistemas de cultivo de tecnología biofloc.

Siendo los objetivos específicos:

1. Evaluar los parámetros productivos y el estado fisiológico de los alevines alimentados con suplemento adicional de vitamina C, mantenidos en un sistema de recirculación, previo a su traslado al sistema de tecnología biofloc.
2. Evaluar los parámetros productivos y la respuesta fisiológica de los alevines alimentados previamente con diferentes concentraciones de vitamina C en su adaptación al sistema de tecnología biofloc.
3. Determinar la concentración adecuada de vitamina C para la mejor adaptación de los alevines al sistema de tecnología biofloc.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Biología y cultivo de *Arapaima gigas*

El paiche, *Arapaima gigas*, es el pez con escamas más grande en la cuenca del Amazonas (Queiroz, 2000), es considerado un pez con respiración aérea obligada, y puede respirar del 50 al 100% del oxígeno vía aérea, dependiendo del tamaño del cuerpo y de la concentración de oxígeno disuelto en el agua (Stevens y Holeyton, 1978). Según Imbiriba (1994) la ubicación taxonómica del paiche es la siguiente:

Orden: Osteoglossiformes

Suborden: Osteoglossoidei

Superfamilia: Osteoglossoidae

Familia: Osteoglossidae

Género: *Arapaima*

Especie: *Arapaima gigas* Cuvier (1829).

El paiche, se encuentra distribuido en la cuenca amazónica y también en ríos de Guyana hasta Bahia en Brasil. El paiche, suele preferir ríos poco caudalosos o lagunas. Su alimentación es carnívora, se alimentan principalmente de peces pequeños, en cautiverio acepta peces vivos o muertos. El paiche, sólo presenta una gónada funcional y bien desarrolla ubicada del lado izquierdo, posee fecundación externa, con cuidado parental, iniciándose con la formación de un nido y el cuidado del mismo es realizado por ambos padres, siendo el macho responsable de la protección del cardumen de larvas alrededor de su cabeza (Tratado de Cooperación Amazónica, 1999).

El cultivo del paiche, es capaz de albergar elevadas densidades de cultivo, en comparación a otros organismos acuáticos y su cultivo en jaulas flotantes se practica con densidades de siembra elevadas otorgando una alternativa de producción (Oliveira *et al.*, 2012), aún en sistemas semi-intensivos en tierra, donde los parámetros de calidad de agua no son lo suficientemente controlados. La densidad de cultivo en jaulas no influye en el crecimiento

de juveniles de paiche, incluso se ha llegado a obtener un consumo más eficiente de la ración y disminuir la conversión alimenticia aparente, a medida que se va incrementando la densidad (Cavero *et al.*, 2003). La facilidad de incrementar la densidad del cultivo del paiche, se debe a la característica de ser un pez con respiración aérea obligatoria y de resistir altas concentraciones de amonio (Cavero *et al.*, 2004). El crecimiento en peso del paiche de 134 g, en sistemas cerrados de invernadero con circulación de agua, puede alcanzar 1.9 Kg de peso promedio en 150 días de crianza (Scorvo-Filho *et al.*, 2004). Estas características hacen del paiche una especie con gran potencial para la intensificación de su cultivo.

El paiche posee gran tolerancia al amonio no ionizado (Cavero *et al.*, 2004), características que hacen del paiche, una especie con potencial para intensificar su cultivo. Investigaciones con *A. gigas* en sistemas de biofloc, no han sido reportadas y las investigaciones en otras especies amazónicas, como el paco (*Piaractus brachypomus*) no han considerado el efecto de los sistemas de biofloc sobre el estado fisiológico de los peces, no obstante, los resultados de su cultivo en sistema de tecnología biofloc, permitieron elevar las densidades de cultivo sin diferencias significativas en los parámetros de productivos (Poleo *et al.*, 2011).

La experimentación de la adaptación del paiche en sistemas de cultivo de biofloc, obedece a la necesidad de utilizar estos sistemas super-intensivos, que permiten un ahorro de agua y reciclaje de la misma en comparación a los sistemas de cultivo convencionales, garantizando la sostenibilidad del cultivo, al ser el cultivo de SBF ambiental y económicamente sustentable. Los sistemas bioflocs, pueden contemplar un incremento de la densidad de cultivo, con miras a que el rendimiento productivo del paiche mejore, con una mejor adaptación al sistema con cero recambio de agua. Sumando la característica del paiche de respirar aire de la atmósfera, el panorama se vuelve más favorable para el éxito del cultivo del paiche en biofloc, generándose una nueva alternativa en la producción acuícola del paiche, con la ventaja de llevar la producción o cultivo a zonas donde no se cultiva tradicionalmente el paiche, por ejemplo Lima.

## **2.2. Requerimientos nutricionales de *Arapaima gigas***

Los requerimientos nutricionales dependen de la especie a ser cultivada, la edad, la fuente proteica y las condiciones ambientales, generalmente los requerimientos proteicos en peces piscívoros varían entre 30 a 55%, no obstante, no existen datos de requerimientos nutricionales para el paiche como los hay para otras especies de peces de agua cálida (NRC, 1993).

Chu-Koo *et al.* (2007) reportaron excelentes niveles de crecimiento en juveniles de paiche de 500 g de peso, utilizando dietas extruidas con 40% de proteína, alcanzando pesos finales entre 8 a 12 kilos/año en jaulas flotantes. Rabello *et al.* (2005) indicaron mejores resultados con un porcentaje de proteína de 48,6% y una relación de energía proteína de 11.6Kcal de energía por gramo de proteína bruta, con una energía digestible de 5645 Kcal/Kg de alimento.

En un estudio de digestibilidad aparente de dietas con diferente relación energía proteína en juveniles de paiche se obtuvo mejores resultados con una relación de 9Kcal de energía digestible por gramo de proteína bruta con una energía digestible de 3965 Kcal/kg, y se concluyó que la relación entre energía y proteína afecta la digestibilidad de los nutrientes y que los juveniles digieren mejor los ácidos grasos insaturados (Akifumi *et al.*, 2008).

### **2.3. Sistema de biofloc (SBF)**

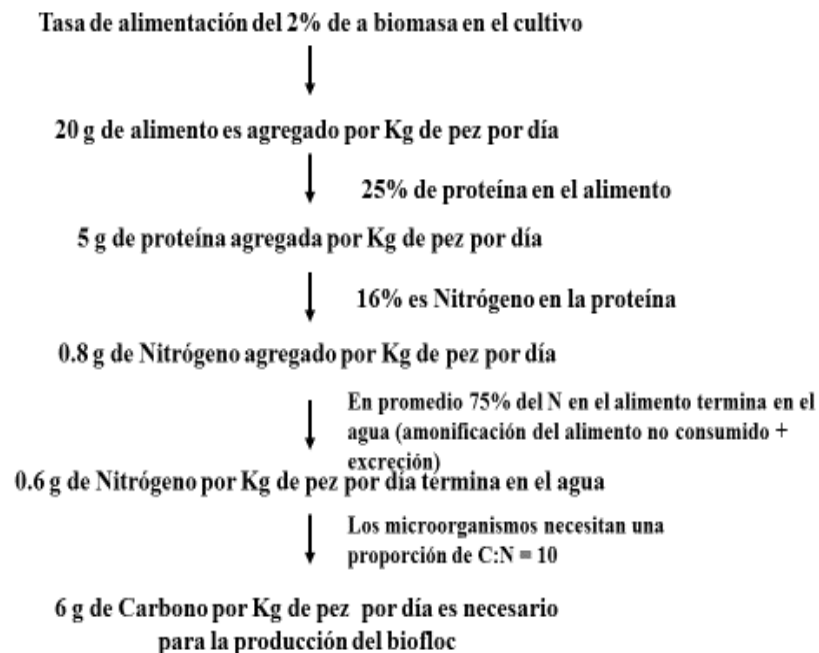
La tecnología de biofloc consiste en el co-cultivo de microorganismos favorables que cumplen una función de reciclaje del nitrógeno, manteniendo sus concentraciones en un nivel aceptable. Es necesaria una proporción elevada carbono: nitrógeno (C:N) en el sistema de cultivo, para favorecer la inmovilización del nitrógeno por las bacterias heterotróficas, mediante la adición de una fuente rica en carbono como glucosa, azúcar u otra fuente rica en carbohidratos (Figura 1). La función de las bacterias heterotróficas en los sistemas biofloc, cumple la misma función que las bacterias autótrofas en los sistemas de recirculación en acuicultura (SRA) mediante la nitrificación, la cual es reducir los niveles de compuestos nitrogenados en el sistema. De la misma manera, la mayoría de factores que afectan el proceso de nitrificación también afectan el crecimiento de las bacterias heterotróficas, dichos factores incluyen el pH, la alcalinidad, la temperatura, concentración de oxígeno, concentración de amonio y la salinidad (Ebeling *et al.*, 2006).

En los sistemas biofloc o también llamados sistemas con cero recambio de agua, se produce una compleja interacción entre la materia orgánica, el sustrato físico y gran variedad de microorganismos como fitoplancton, bacterias libres y unidas, rotíferos, ciliados, protozoos flagelados y copépodos (Ray *et al.*, 2010a). Esta productividad natural juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad del agua y en el reciclaje de nutrientes, generando proteína microbiana que sirve de alimento (McIntosh *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 2010b), implicando una disminución de la proteína alimenticia (Xu *et al.*, 2012), mejorando la eficiencia de la utilización del nitrógeno por los animales cultivados (Avnimelech, 2006).



No obstante, se presume que el aprovechamiento de la proteína microbiana, sólo puede darse en los organismos acuáticos filtradores y/o detritívoros, como por ejemplo, la tilapia (Azim y Little, 2008). Emerenciano *et al.* (2013) informaron que el uso de la tecnología de biofloc, se viene aplicando exitosamente en el cultivo de camarones peneidos y últimamente el número de investigaciones sobre la viabilidad del cultivo de peces en SBF va en aumento.

No todas las especies son capaces de soportar las condiciones de cultivo de los sistemas de biofloc, pues éstas deben cumplir con las características de tolerar niveles relativamente bajos de concentración de oxígeno disuelto, niveles de amonio y nitritos relativamente elevados, y de soportar niveles considerables de sólidos en suspensión. Es por tal motivo, en lo referente al cultivo de peces en SBF, que los peces amazónicos y tropicales son los candidatos potenciales por tolerar concentraciones pobres de oxígeno disuelto (Soares *et al.*, 2006) y presentar mecanismos de defensa contra la toxicidad de amonio que les permiten tolerar concentraciones elevadas (Chew *et al.*, 2005).



**Figura 1: Cálculo de la cantidad de Carbono necesario para la inmovilización del Nitrógeno. Tomado de Crab *et al.* (2012).**

## 2.4. Indicadores de respuesta al estrés

El estrés, según Pickering (1981), se define como una condición donde el equilibrio fisiológico u homeostasis de un organismo es perturbado por estímulos internos o externos, denominados estresores. Los estresores pueden causar una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas cuya finalidad es adaptar al individuo a las nuevas condiciones. Estas respuestas fisiológicas a los estresores son comunes en la acuicultura, afectando a los peces en cultivo.

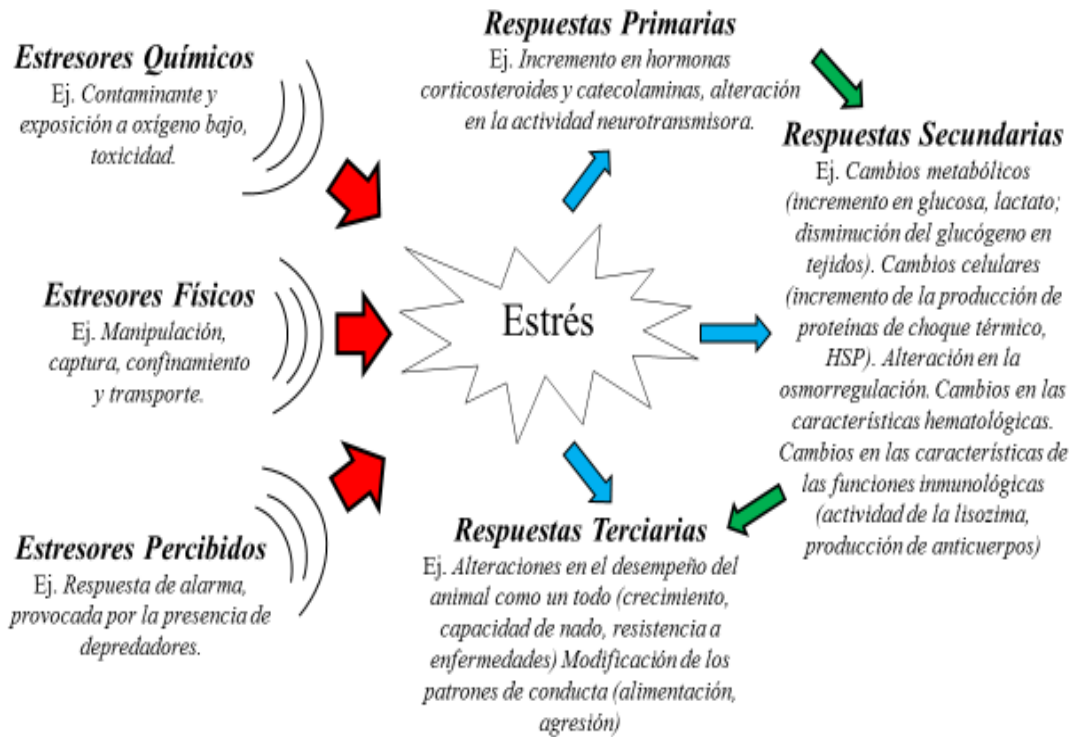
La respuesta al estrés se inicia con la activación endocrina del eje hipotálamo-pituitaria-glándulas interrenales. El núcleo preóptico hipotalámico, libera el factor liberador de corticotropina, que estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica por la pituitaria, que a su vez estimula la producción de corticosteroides por las células interrenales de los riñones anteriores (equivalente a la glándula adrenales de los peces) (Flik *et al.*, 2006).

Las respuestas fisiológicas están divididas en respuestas primarias, secundarias y terciarias (Figura 2), además pueden ser utilizadas como indicadores de cualquier alteración homeostática de los peces u organismos acuáticos (Wedemeyer, 1969).

Las respuestas primarias están mediadas por el sistema neuro-endocrino con una rápida liberación de las hormonas del estrés, catecolaminas y corticosteroides dentro del sistema circulatorio de los peces. Las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) son liberadas y sintetizadas a través de las células cromafines, células neuroendocrinas que se encuentran en la médula adrenal y los ganglios del sistema nervioso autónomo, y los corticosteroides son liberados por las células intrarrenales (Flik *et al.*, 2006).

Las respuestas secundarias, son los efectos bioquímicos y fisiológicos, asociados con el estrés y mediados por las hormonas del estrés, por ejemplo, aumento en la concentración de glucosa en plasma. Los cuadros de hiperglicemia, de ácido láctico y lisis del glucógeno almacenado en el hígado y músculo, efectos hematológicos como disminución del número de células sanguíneas rojas y blancas (Wendelaar- Bonga, 1997).

Las respuestas terciarias afectan al organismo como un todo, comprometiendo el crecimiento, resistencia a enfermedades y el éxito en la reproducción. En otras palabras las respuestas terciarias no sólo son respuestas al estrés asociados a los individuos, sino que afectan a la población, e incluyen cambios en el comportamiento.



**Figura 2: Relación entre los estresores y sus efectos fisiológicos en peces. Tomado de Barton (2002).**

La respuesta al estrés, influencia en los procesos metabólicos y por ende demanda energía (Davis y Schreck, 1997). Los estresores agudos son eventos rápidos que demandan altos niveles de secreciones de corticoides, los cuales retornan a niveles normales luego de unas horas después del evento estresante. Mientras que la secreción de corticoides es más constante bajo estresores crónicos o reiterativos, lo que influencia en un mayor coste energético (Barton *et al.*, 2005).

La exposición repetida a estresores leves, insensibiliza y atenúa la respuesta neuroendocrina y metabólica a exposiciones futuras a estresores (Reid *et al.*, 1998). La causa de la insensibilización de la respuesta a los estresores subsecuentes, puede deberse a la atenuación del eje hipotálamo-pituitaria-glándulas interrenales por la exposición a estresores leves repetitivos. En consecuencia, los niveles de glucosa en plasma sanguíneo, disminuyen, lo que implica también una atenuación de las hormonas catecolaminas, sugiriendo una habituación general a condiciones repetitivas o constantes (Barton, 2002).

## **2.5. Efecto del cortisol sobre la respuesta fisiológica**

Dentro de los corticosteroides, el cortisol es el principal en peces y su concentración en plasma se incrementa durante una situación estresante (Flik *et al.*, 2006). El cortisol, presenta acción sobre la regulación metabólica de los carbohidratos, proteínas, lípidos y alteraciones en los parámetros hematológicos. El cortisol generalmente produce un efecto de hiperglucemia, principalmente debido a un incremento en la gluconeogénesis hepática iniciada como un resultado de una proteólisis periférica, asimismo existe una variabilidad en la respuesta fisiológica causada por la liberación de cortisol entre las especies, que dependen de la intensidad y el tiempo de exposición al agente estresor (Mommsen *et al.*, 1999; Barton, 2002).

### **2.5.1. Efecto del cortisol sobre el metabolismo de carbohidratos (niveles de glucosa)**

El efecto glucocorticoide en el metabolismo de carbohidratos en peces, aumenta la acción gluconeogénica, aumentando los niveles de glucosa en plasma. En peces, la mayoría de estudios relacionados al efecto del glucocorticoide, cortisol, sobre el metabolismo de carbohidratos se basan en la concentración de glucosa en plasma y en contenido de glucógeno en el hígado como indicadores de metabólicos. Las concentraciones de glucosa en plasma, varían sustancialmente dependiendo de la especie, edad y estado metabólico del animal y quizá debido a ello los resultados de la variación de la concentración de glucosa en plasma, son inciertos (Mommsen *et al.*, 1999).

Muy poco es conocido acerca de los valores de glucosa en peces tropicales, especialmente de los peces amazónicos. Según Tavares-Dias *et al.* (2007), los niveles basales de glucosa en plasma en *Arapaima gigas*, son más elevados que los descritos para especies como *Oncorhynchus mykiss* (Rehulka, 2000), *Piaractus mesopotamicus* (Tavares-Dias y Mataqueiro, 2004), *Brycon amazonicus* y *B. orbignyanus* (Tavares-Dias 2004). Finalmente, según Mommsen *et al.*, (1999), existe algunas confusiones concernientes a la función del cortisol sobre el metabolismo de carbohidratos, además que la confianza en la concentración de glucosa en plasma puede no ser una buena aproximación en primera instancia, debido a que la glucosa en plasma es altamente variable con el estado fisiológico al no ser tan susceptible en cambios en su concentración debido a los disturbios exógenos como en mamíferos, y especialmente para muchas especies de peces carnívoros, la glucosa no parece ser un indicador de utilidad del estatus metabólico.

### **2.5.2. Efecto del cortisol sobre los parámetros hematológicos**

El número de leucocitos en peces, sufre una alteración a causa de una elevación en las concentraciones de cortisol en plasma, aumentando el número de neutrófilos (Weyts *et al.*, 1998) y disminuyendo la concentración de linfocitos, probablemente a un disturbio en las branquias y en el intestino (Wendelaar- Bonga, 1997; Weyts *et al.*, 1999). Reid y Perry (1991), sugieren que bajo condiciones de estrés crónico, el cortisol puede pre-adaptar a los eritrocitos de truchas, *Oncorhynchus mykiss*, mejorando su rendimiento respiratorio, lo que no sería posible en la ausencia de elevados niveles de cortisol. Estos efectos por parte del cortisol, son complejos pudiendo actuar como inhibidor en producción de células de la defensa inmune o preparar al organismo a los eventos estresantes.

El perfil de leucocitos son particularmente útiles como indicadores fisiológicos porque son susceptibles al estrés y pueden estar directamente relacionados con los niveles de las hormonas del estrés (Davis *et al.*, 2008). Específicamente, la liberación de glucocorticoides por un agente estresor, causa un incremento en el número de neutrófilos (neutrofilia) y una disminución en el número de linfocitos (linfopenia). Por consiguiente, la proporción entre la neutrofilia y la linfopenia, (N:L) es frecuentemente relacionada como un indicador de estrés. En general, un estresor induce a una elevación en la proporción N:L, en peces (Pulsford *et al.* 1994), aunque algunas veces sólo linfopenia es reportada (Larsson *et al.*, 1980).

### **2.6. Proceso de adaptación fisiológica**

Los factores ambientales, influyen en la respuesta de los peces a estresores, teniendo importancia en las variaciones en los parámetros hematológicos al estar relacionados directamente con la respuesta fisiológica en cuanto al número y la cantidad relativa de las células sanguíneas, siendo de gran utilidad el empleo de los índices hematológicos (Tavares-Dias y Moraes, 2004).

En consecuencia a dicha respuesta al estrés, diversas investigaciones han sido realizadas para evaluar la adaptación de los peces a nuevos escenarios con distintos factores ambientales, como la adaptación a la temperatura (Davis y Parker, 1990) y salinidad (Barton y Zitzow, 1995), entre los factores más estudiados.

El proceso de adaptación de un organismo, es un proceso de ajuste continuo de su fisiología a los cambios en el medio ambiente o de estrés ambiental (respuesta de adaptación), también conocido como homeostasia, el cual involucra muchos cambios a nivel endocrino,

metabólico e inmunológico, cambios que le permiten adaptarse a los cambios físicos, químicos y biológicos (Flik *et al.*, 2006).

Los peces, son capaces de compensar y adaptarse a las condiciones de estrés como un resultado de cambios en su comportamiento y fisiología, pero relacionado a un costo metabólico como compensación, que puede afectar el crecimiento, la reproducción y la resistencia (Schreck, 2000).

Los mecanismos homeostáticos del pez, que compromete sus respuestas al estrés para compensar y estabilizar funciones metabólicas, con la finalidad de adaptarse a las nuevas condiciones (Wedemeyer *et al.*, 1990).

## **2.7. Vitamina C o ácido ascórbico (AA): Funciones y Requerimientos**

La vitamina C, es una vitamina hidrosoluble, vulnerable a la luz, termolábil y fácil de oxidarse. Los peces, no pueden sintetizar la vitamina C debido a la falta de la enzima L-gulonolactona oxidasa, a excepción de lampreas, esturiones y peces pulmonados (Soliman *et al.*, 1985; Dabrowski, 1990; Moreau y Dabrowski, 1998; Fracalossi *et al.*, 2001). Es por tal motivo que la suplementación de vitamina C es esencial en la nutrición y bienestar de los peces. En carpa, *Cyprinus carpio*, se determinó que los requerimientos de vitamina C, aumentan a mayores temperaturas de cultivo, además el uso de la vitamina C como suplemento, influye en la composición lipídica del hígado y músculo de la carpa (DengFwu y Tse-Kun, 2002). Sin embargo, sólo 25 mg AA / Kg son necesarios para prevenir la reducción en el crecimiento y señales de deficiencias de vitamina C, en el cíclido, *Astronotus ocellatus*, (Fracalossi *et al.*, 1998), asimismo, el paco, *Piaractus mesopotamicus*, requiere una concentración de 50 mg de AA/Kg de alimento para evitar los signos de avitaminosis como hiperplasia e hipertrofia de filamentos branquiales (Martins, 1995).

No se ha demostrado una citotoxicidad por hipervitaminosis de vitamina C, sin embargo, la ausencia de esta vitamina causa malformaciones esqueléticas y cartilaginosas de tejidos, inmunosupresión, reducción de crecimiento, disminución de la mortalidad (Halver *et al.*, 1975). Juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) alimentados con deficiencias de AA en la dieta, presentan escoliosis, formación de escorbuto, malformación de los filamentos branquiales y del opérculo (Soliman *et al.*, 1986). La vitamina C o ácido ascórbico (AA), es requerida para mantener el sistema inmunológico en buen estado y la homeostasis fisiológica, basados en su función antioxidante e inmunoestimulante (Li y Lovell, 1985; Fang *et al.*, 2005), ofrece una protección contra los radicales libres que pueden afectar a

células sanguíneas como los glóbulos rojos (Adham *et al.*, 2000) asegurando el bienestar de los organismos acuáticos.

En juveniles del pez marino, *Oplegnathus fasciatus* (pez loro), alimentados con una dieta libre de AA, muestran signos de deficiencia de esta vitamina, como un crecimiento retardado, anorexia, oscurecimiento, alta mortalidad y una hipertrofia en el hígado (Wang *et al.*, 2003). La concentración mínima requerida de AA en la dieta para un óptimo crecimiento y prevención de signos de su deficiencia varía, dependiendo de la función metabólica, especie, edad, y tamaño del pez (Wilson y Poe, 1973).

La influencia del efecto sinérgico de las vitaminas C y vitaminas E es ampliamente investigado. Existe una estrecha interacción entre la vitamina C y E, principalmente debido a que la vitamina C regenera la vitamina E, en el hígado, incluso cantidades de vitamina C elevadas, pueden proteger al pez de una avitaminosis de vitamina E (Hamre *et al.*, 1997).

Bajo esta misma línea de investigación, Menezes *et al.* (2006), investigaron cuatro dietas: dieta control (sin suplementación de vitaminas), dieta con suplementación de vitamina C (800 mg Kg<sup>-1</sup>), dieta con suplementación de vitamina E (500 mg Kg<sup>-1</sup>) y una dieta con suplementación de vitamina E y C (500 y 800 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente) en juveniles de *Arapaima gigas* cultivados en tanques red, sus resultados mostraron que la suplementación de 500 mg de vitamina E Kg<sup>-1</sup> de alimento no favoreció la respuesta inmunológica, reflejado en el número de células de la respuesta inmunológica, en comparación a los peces del grupo control, sin embargo la dieta con suplementación de 800 mg vitamina C Kg<sup>-1</sup> de alimento, mejoró la respuesta inmunológica, basado en el conteo de células de la defensa orgánica comparados con la dieta control, por último la dieta con suplemento de vitamina E y C, no mostró un efecto sinérgico entre las vitaminas, basados en el perfil de células rojas sanguíneas e indicadores del sistema inmune en juveniles de *A. gigas*. Andrade *et al.* (2007), reportan que las concentraciones de vitamina C de 800 y 1200 mg Kg<sup>-1</sup> alimento son los niveles idóneos para la dieta de *Arapaima gigas*, al incrementar el número de leucocitos y disminuir los niveles de glucosa.

La NRC (1993), recomienda 50 mg AA/kg de alimento para un rendimiento óptimo de peces juveniles basado en un análisis realizado en juveniles de trucha arcoíris. Aunque la ganancia de peso y supervivencia de juveniles de *Brycon amazonicus*, alimentados con 800 mg AA/Kg de alimento, mejora significativamente (Affonso *et al.*, 2007). Juveniles de *Colossoma macropomum*, alimentados con 100 mg AA/ Kg de alimento, obtuvieron mejores

tasas de conversión alimenticia y ganancia de peso (Chagas y Val, 2003). En definitiva, la información disponible indica que las respuestas fisiológicas de los peces a niveles altos de AA en la dieta, son específicas para cada especie, cuya concentración de AA en la dieta para inducir una mejora en el estado fisiológico, dependerá de la capacidad del pez para enfrentar las diversas condiciones, por lo tanto, niveles bajos de AA son suficientes para lograr los requerimientos basales, mientras que concentraciones más elevadas pueden mejorar el rendimiento de los peces, bajo distintos escenarios en diferentes sistemas de cultivo.

### **2.7.1. Efecto del ácido ascórbico en la dieta sobre el estado fisiológico de organismos acuáticos**

La vitamina C o ácido ascórbico (AA), es requerida para mantener el sistema inmunológico en buen estado y la homeostasis fisiológica, basados en su función antioxidante e inmunoestimulante (Li y Lovell, 1985; Fang *et al.*, 2005), ofrece una protección contra los radicales libres que pueden afectar a células sanguíneas como los glóbulos rojos (Adham *et al.*, 2000) asegurando el bienestar de los organismos acuáticos.

La vitamina C, está involucrada en múltiples beneficios a diferentes niveles, en reacciones de hidroxilación biológica de un número de rutas metabólicas, como la hidroxilación de la prolina y lisina en la síntesis de colágeno, componente del tejido conectivo, vasos sanguíneos y matriz ósea, benefician la respuesta inmunológica y logran reducir las mortalidades e interviene protegiendo del daño en la peroxidación de lípidos en la membrana de algunos órganos o tejidos mejorando el estado fisiológicos de los peces (Chaterjee, 1978; Fracalossi *et al.*, 1998; Li y Lovell, 1985; Xie *et al.*, 2006; Faramarzi, 2012).

El uso de vitamina C, ha sido ampliamente estudiado en muchas especies de organismos acuáticos y sus efectos sobre el bienestar de los peces es bien conocido, al ser un nutriente esencial para los peces (Halver, 1989). La vitamina C, posee una función antioxidante y mejora el sistema inmune, para los peces en condiciones controladas promoviendo un mejor crecimiento, reproducción, mejor la respuesta al estrés, mejor resistencia a las enfermedades y mejora la cicatrización de las heridas (Martins *et al.*, 1995; Li y Robinson, 1999; Chagas y Val, 2003). El proceso de daño oxidativo, es causado por la producción de radicales libres durante los procesos metabólicos rutinarios y en condiciones estresantes, como presencia de patógenos o condiciones ambientales hostiles. La vitamina C protege del daño oxidativo generado en las membranas celulares, junto con la vitamina E generan una inhibición del



proceso oxidativo. Además de una posible regeneración de la vitamina E por parte de la vitamina C (Niki, 1987).

### **2.7.2. Efecto del ácido ascórbico en la dieta sobre la tolerancia al estrés**

La suplementación de vitamina C en la dieta, mejora la tolerancia al estrés (Zhou *et al.*, 2012; Cuaical *et al.*, 2013). Para *Colossoma macropomum*, concentraciones de vitamina C de 500 mg AA/Kg son idóneas, al mejorar su respuesta fisiológica frente a un estrés por incremento de temperatura (Roubach *et al.*, 1998). Chagas y Val (2006), detectaron que la respuesta fisiológica al estrés (hipoxia) en juveniles de *C. macropomum*, se redujo significativamente con una dieta de 500 mg AA/ Kg de alimento.

El control de las situaciones estresantes en la acuicultura se puede llevar a cabo mediante la alimentación, en otras palabras, la preparación para escenarios donde las condiciones ambientales no son favorables o condiciones simplemente diferentes. Los efectos perjudiciales de los agentes estresores, afectará menos a organismos alimentados con nutrientes capaces de mejorar la tolerancia al estrés y aumentando la supervivencia y mejorando el rendimiento del cultivo. Pitaksong *et al.* (2012), determinaron que la suplementación de vitamina C y E influye en el crecimiento, índices hematológicos y parámetros inmunológicos (actividad de la lisozima), y sus efectos son benéficos, en un pez gato híbrido (*Clarias macrocephalus x Clarias gariepinu*) en condiciones de estrés térmico y ácido, condiciones que simulan las fluctuaciones en la calidad del agua entre el día y la noche y cambios de estación (invierno-verano). Falcon *et al.* (2007), demostró que altas concentraciones de vitamina C en el alimento, mejoran la respuesta fisiológica en la adaptación de alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a un estrés por temperatura.

La concentración de ácido ascórbico, disminuye bajo la influencia de estresores, esta disminución se encuentra relacionada con la liberación de hormonas corticosteroides por parte de las glándulas suprarrenales (Dabrowski, 2001), asimismo una posible mayor liberación de cortisol afecta significativamente a una variedad de procesos metabólicos, tales como niveles de glucosa en plasma frente a escenarios de estrés (Hemre *et al.*, 1991).

En lo que respecta a *Arapaima gigas*, alimentados con un alto nivel de ácido ascórbico, su estado fisiológico y crecimiento se ven mejorados (Menezes *et al.*, 2006). En pocas palabras, los requerimientos de ácido ascórbico, incrementan en peces que son expuestos a diversos escenarios estresantes (Navarre y Halver, 1989; Hardie *et al.*, 1991). Asimismo, los efectos del estrés pueden ser minimizados a través de la suplementación de la vitamina C a altas

concentraciones en el alimento, aumentando los parámetros inmunológicos, aumento en la resistencia a enfermedades, mejoras en el crecimiento (Li y Lovell, 1985; Lin y Shiau, 2005; Ortuño *et al.*, 2003; Pitaksong *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012), razones por las cuales, el uso de la vitamina C en altas concentraciones en los organismos cultivados, es importante para mejorar la tolerancia al estrés de los organismos y con ello conseguir mejor rendimiento productivo.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar y periodo experimental

La parte experimental se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Acuicultura de la Facultad de Pesquería, ubicado en la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Lima, Perú, por un periodo total de 71 días, comprendidos entre los meses de marzo a mayo del 2015.

#### 3.2. Dietas experimentales

Se formuló una dieta basal mediante el método del tanteo, considerando los requerimientos nutricionales disponibles para alevinos de paiche (*Arapaima gigas*) con 46.35% de proteína y 5126 kcal/Kg de energía digestible (ED) (Ituassú *et al.*, 2005; Del Risco *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2008). A esta dieta basal se la suplementó con vitamina C en forma de L- ascorbil-2-monofosfato (Rovimix Stay C-35<sup>®</sup>), que posee una esterificación que protege la vitamina C de la destrucción por oxidación, en diferentes concentraciones obteniéndose 3 dietas experimentales y una dieta control (C41.3, C541, C823, C1290). En la Tabla 1 se muestra la fórmula y el valor químico proximal de la dieta, cuyo análisis proximal fue realizado por el Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos (LENA), de la UNALM, bajo la metodología AOAC (1995).

Las concentraciones de vitamina C o ácido ascórbico (AA) en la dieta, fueron investigadas bajo cuatro tratamientos: C41.3 (dieta control), C541, C823 y C1290 referidas a la suplementación de: 541, 823 y 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup> de alimento, respectivamente. El suplemento adicional de AA fue realizado sobre la dieta basal descrita en la Tabla 1, que contenía 41.3 de vitamina C (Anexo 9).

La elaboración de las dietas experimentales, C541, C823, C1290 se realizó con Rovimix Stay-C35 (Actividad-ascorbil polifosfato del 35%), sin incluir suplemento adicional sobre la dieta control (C41.3), en cantidades en base a la biodisponibilidad y pérdida en el secado que el producto recomienda, la cual es 8% más de lo recomendado. Para esto, la dieta basal fue molida hasta alcanzar partículas finas, a la cual se agregó la vitamina C en reemplazo peso a peso, según los tres valores adicionales de vitamina C para el mezclado se utilizó un

“carrier” para la mejor repartición de la vitamina C en el alimento, además se adicionó 350 mL de agua tibia por kilogramos de alimento. Por último el peletizado de las dietas se realizó en moledora de carne marca Ferton, con molde de 2mm de diámetro. El secado de los pellets, correspondientes a todas las dietas experimentales se realizó en una deshidratadora-secadora a 45 °C por 3 horas aproximadamente, hasta alcanzar un peso constante. Todas las dietas, fueron depositadas en bolsas plásticas y almacenadas en una congeladora a -20°C.

**Tabla 1: Formulación de la dieta basal y valor químico proximal**

Insumos (%)		Valor Nutricional Calculado (%)		Análisis Químico Proximal (%)	
Harina pescado	58,5	Proteína cruda	45	Proteína (Nx6,25)	46,35
Harina soya	16	Lípidos	22	Grasa	19,36
Aceite de pescado	15	Fibra	1	Fibra cruda	1,73
Harina maíz	9	Energía digestible (Kcal/100)	394	Energía total, cal/g	5126,72
Premix Aqua*	0,3	Nifex	12,58	Extracto libre de nitrógeno	15,44
Antioxidante	0,02	Metionina	1,27	Ceniza	10,69
Inhibidor de hongos	0,2	Cistina	0,49	Humedad	6,43
Cloruro de colina	0,2	Lisina	3,43		
Aglutinante	1	Calcio	2,2		
		Fósforo disponible	1,65		

\*Premix- Vitamina A 14'000,000 U.I. Vitamina D3 2'800,000 U.I. Vitamina E 140,000 U.I. Vitamina K3 8.000 g Tiamina (B1) 18.000 g Riboflavina (B2) 20.000 g Niacina 150.000 g Ácido Pantoténico 50.000 g Piridoxina (B6) 15.000 g Biotina 0.800 g Ácido Fólico 4.000 g Ácido Ascórbico 600.000 g Vitamina B12 0.030 g Manganeso 40.000 g Hierro 20.000 g Zinc 20.000 g Cobre 1.500 g Iodo 1.500 g Selenio 0.300 g Cobalto 0.150 g Antioxidante 120.000 g Carbonato de Calcio (Excipiente) c.s.p. 3,000.000 g. En base a un total de 20Kg. Energía bruta o total estimada en base a factores de obtención de energía para: proteínas= 5.64 Kcal/g; lípidos= 9.44 Kcal/g; carbohidratos o nifex= 4.11 Kcal/g (NRC, 1993).

La determinación de las concentraciones exactas del ácido ascórbico en las dietas, fueron realizadas por la empresa DSM Nutritional Products, en el laboratorio llamado Analytical Research Center, ubicado en la ciudad de Basilea, Suiza (Anexo 9). Se enviaron un total de 8 muestras de las dietas experimentales (dos muestras por cada tratamiento), empacadas en bolsas plásticas con cierre hermético de color negro, debidamente rotuladas.

### 3.3. Material biológico

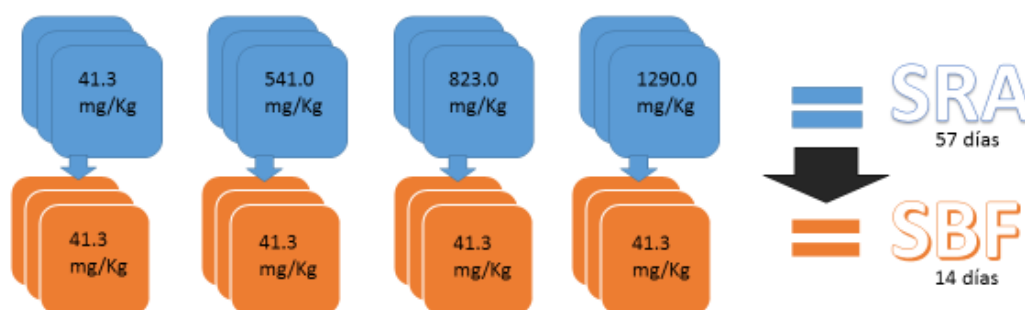
Un total de 48 alevines de paiche con peso inicial promedio de  $26 \pm 2.36$  g provenientes del centro de cultivo en Yurimaguas, Perú (Acuícola Los paiches). Fueron aclimatados a las condiciones de calidad de agua de la UNALM y a las condiciones ambientales del laboratorio por un periodo de 3 semanas.

### 3.4. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, lo cual supuso una distribución aleatoria de los alevines de paiche en doce unidades experimentales (UE), las cuales fueron acuarios de vidrio con capacidad de 60L pertenecientes a un sistema de recirculación en acuicultura (SRA). La densidad de siembra fue de 4 peces por acuario, considerándose cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de ácido ascórbico (AA): 41.3 (control), 541, 823 y 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup> de alimento y tres repeticiones por cada tratamiento.

### 3.5. Manejo Experimental

El diseño experimental presentó dos etapas: Una primera etapa, que tuvo una duración de 57 días, en la que los alevines de paiche se alimentaron con las dietas experimentales en un sistema de recirculación en acuicultura (SRA) de agua clara, mantenido mediante un filtro biológico y mecánico. Y una segunda etapa con una duración de 14 días, la cual fue realizada en un sistema de biofloc (SBF) utilizando las mismas unidades experimentales. Las disposiciones y duración de las dos etapas experimentales se grafican en la Figura 3.



**Figura 3: Diagrama de la disposición y etapas experimentales en sistemas SRA y SBF**

### **3.5.1. Manejo experimental en la etapa de sistema de recirculación en acuicultura (SRA)**

La maduración del filtro biológico del sistema de recirculación en acuicultura (SRA), se realizó con juveniles de Tilapia, *Oreochromis niloticus*, con una densidad de carga de 3 Kg m<sup>-3</sup>. Para acelerar la maduración del sistema, adicionalmente se agregó un cultivo comercial de bacterias nitrificantes marca Nutrafin-Hagen. Esto se logró a los 15 días, al obtener una acumulación en la concentración nitratos y una disminución en la concentración de amonio y nitritos indicando que el biofiltro funcionaba efectivamente. Diariamente se realizó un recambio de agua del 5% del volumen total del sistema (1.8 m<sup>3</sup>) equivalente a 0.09 m<sup>3</sup>. La aireación en el SRA se aprovisionó con el suministro de una bomba de aireación de ¼ HP, marca Sweetwater las 24 horas del día.

Una vez instalados los alevinos de paiche, fueron alimentados según los tratamientos con las cuatro dietas experimentales con una tasa de alimentación del 5% de la biomasa en cada acuario con una frecuencia de 6 veces al día (a las 8, 10, 12, 14, 16, 18 horas). Según Crescêncio *et al.* (2005) los paiches muestran mejor ganancia en peso y biomasa, tasa de crecimiento y consumo total de alimento, durante regímenes de alimentación continua. El alimento no consumido fue registrado. La limpieza de las unidades experimentales fue realizada diariamente antes de la primera y después de la última alimentación, mediante sifoneo y posterior filtrado de las heces y alimento no consumido, luego el agua que fue retirada mediante el sifoneo, fue regresada al sistema.

Se realizaron biometrías cada 15 días para la determinación de las variables de producción y ajuste de la tasa de alimentación. El día 54 de esta etapa se tomaron muestras de sangre a un alevín por replica totalizando tres alevines por cada tratamiento para la evaluación de los indicadores de la respuesta fisiológica (concentración de cortisol, glucosa y parámetros hematológicos).

### **3.5.2. Manejo experimental en la etapa de sistema de biofloc (SBF)**

El sistema de biofloc empleado en esta etapa fue implementado a partir de agua proveniente de un cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) en SBF con una relación C:N de 15:1, en volumen suficiente para llenar los 12 acuarios de 60L.

Posteriormente los alevinos de paiche fueron trasladados a este sistema respetando los tratamientos y la disposición de las unidades experimentales asignadas en la etapa anterior en SRA. El manejo del SBF se describe a continuación:

El nitrógeno amoniacal total (NAT) en el SBF, fue controlado mediante la adición de azúcar rubia (C% = 54.36) como fuente de carbono, dos horas después de la primera alimentación, la cual fue adicionada, tomando de referencia a Avnimelech *et al.* (1999), para una proporción de C: N= 15:1 considerada como adecuada según Abu Bakar *et al.* (2015) y Long *et al.* (2015). Se utilizó la siguiente fórmula para la adición de azúcar al sistema:

$$\text{Azúcar} = \frac{(\text{TA} * \text{B}) * (\%P) * (\%N) * (\%Ex)}{(0.066)}$$

Donde:

TA=Tasa de alimentación = 5%

B= Biomasa

%P= Porcentaje de proteína en el alimento

%N= Porcentaje de Nitrógeno en la proteína =16 %

% Ex= Porcentaje de excreción de Nitrógeno por el pez más la amonificación del alimento no consumido = 75 %, según Piedrahita (2003).

La cantidad de azúcar resultante, que se añadió al sistema, correspondió al 84% del alimento suministrado, porcentaje relativamente cercano al empleado por Luo *et al.* (2014) de 75% en un cultivo de tilapia en sistema biofloc.

La remoción de sólidos se realizó cuando los niveles del volumen del floc o sólidos sedimentables superaban los 50 mL/L, se realizó una remoción de los sólidos de cada unidad experimental del SBF, para garantizar un buen manejo del propio sistema (Avnimelech, 2009).

Para mantener los niveles de alcalinidad estables en 90 mg/L en promedio, se recurrió a la adición de bicarbonato de sodio para el aumento de la alcalinidad según el método de Loyless y Malone (1997).

Esta etapa experimental empezó en el día 58 del experimento y tuvo una duración de 14 días. La alimentación de todos los alevinos fue realizada utilizando sólo la dieta control (Figura 3). En todos los acuarios se mantuvo una tasa de alimentación del 4% con una frecuencia de 6 veces al día (a las 8, 10, 12, 14, 16, 18 horas).

La aireación intensa, requerida para mantener los sólidos en suspensión los sistemas de biofloc, se aprovisionó con el suministro de una bomba de aireación, ¼ HP, marca Sweetwater las 24 horas del día. Dos piedras difusoras (15 cm de longitud) fueron colocadas en dos vértices opuestos del acuario, para la generación de turbulencia y oxigenación.

Se realizó una biometría al final de la etapa en SBF, para la determinación de las variables de producción. Asimismo se extrajo una muestra de sangre a dos alevines por cada réplica totalizando seis alevines por cada tratamiento en el día 7 y 14 del experimento para la evaluación de los indicadores de la respuesta fisiológica (concentración de cortisol y glucosa y parámetros hematológicos).

### **3.6. Hipótesis planteada**

- Ho: El suplemento adicional de vitamina C en la dieta no mejora la adaptación fisiológica y los parámetros productivos de alevines de paiche, *Arapaima gigas*, cultivados en sistemas de biofloc.
- Ha: El suplemento adicional de vitamina C en la dieta mejora la adaptación fisiológica y los parámetros productivos de alevines de paiche, *Arapaima gigas*, cultivados en sistemas de biofloc.

### **3.7. Procedimientos y técnicas de recolección de datos**

#### **3.7.1. Calidad de agua**

En ambos sistemas de cultivo se controlaron los siguientes parámetros:

La temperatura del agua (°C) y oxígeno disuelto (mg/L) con un oxímetro marca YSI 55-digital, el pH con un potenciómetro marca Schott, los tres determinados diariamente 2 veces al día. Se tomaron muestras de agua (100 mL) las que fueron filtradas a través de papel filtro (1.2 µm) pre-secado para la determinación del nitrógeno amoniacal total (NAT, método de Nessler), Nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) por el método de diazotización y Nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por el método de reducción de Cadmio, mediante un espectrofotómetro (marca HACH) acorde al método APHA (1998), dos veces por semana durante la etapa en SRA y 3 veces por semana durante la etapa en SBF (Tabla 2). Los puntos de muestreo fueron realizados en la entrada y en la salida de agua del acuario en el sistema SRA.



**Tabla 2: Métodos de muestreo para la evaluación de los parámetros físicos, químicos, productivos y fisiológicos (metabólicos o bioquímicos y hematológicos).**

Tipo de Análisis	Parámetro	Unidad	Instrumento de medición	Marca	Método
Evaluación de parámetros físicos	Temperatura	°C	Oxímetro	YSI	-
	Oxígeno disuelto	mg.L <sup>-1</sup>			-
	pH	-	Potenciómetro	SCHOTT	-
	Luz	Klux	Luxómetro	-	-
	Vol. Del Floc	ml.L <sup>-1</sup>	Cono Imhoff	-	Métodos estandarizados (APHA, 1998)
SST	mg.L <sup>-1</sup>	Balanza analítica	-		
Evaluación de parámetros químicos	TAN	mg.L <sup>-1</sup>	Espectrofotómetro	HACH	HACH 8038 (Nessler)
	NO <sub>2</sub>	mg.L <sup>-1</sup>			HACH 8507 (diazonización)
	NO <sub>3</sub>	mg.L <sup>-1</sup>			HACH 8039 (Reducción de Cd)
	Alcalinidad	mgCaCO <sub>3</sub>	Titulador	-	Corrección de alcalinidad: Método de Loyless y Malone, (1997).
Evaluación parámetros productivos	Ganancia en Peso	gramos	Balanza digital	-	-
	Tasa de crecimiento específica	(% peso/día)	Balanza digital	-	(Ricker, 1979)
	Porcentaje de sobrevivencia	%	-	-	-
	Factor de Conversión Alimenticia	cm	-	-	(Biscudo <i>et al.</i> , 2010)
	Peso Final	gramos	Balanza digital	Scout	-
Evaluación parámetros metabólicos	Nivel de Glucosa en plasma	mg/dL	Espectrofotómetro 340nm	-	Glucosa oxidasa y peroxidasa. Valtek diagnostics
	Nivel de Cortisol en plasma	ng/mL	Lector Elisa 450 nm	-	Inmunoensayo enzimático. Monobind Inc.
Evaluación parámetros Hematológicos	Conteo Total de eritrocitos	10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup>	Cámara de Neubauer	-	(Oliveira et al., 2008)
	Nivel de Hemoglobina	g/dL	Espectrofotómetro	-	(Collier, 1944)
	Valor de hematocrito (Hto)	%	Microcentrifuga	-	(Goldenfarb <i>et al.</i> , 1971)
	Conteo total de leucocitos y trombocitos	µL <sup>-1</sup>	En una extensión sanguínea en lamina	-	(Tavares-Dias y Moraes, 2006).
	Conteo diferencial de linfocitos	µL <sup>-1</sup>	En una extensión sanguínea en lamina	-	(Tavares-Dias y Moraes, 2003)
	Valores hematimétricos	-	-	-	(Wintrobe, 1934)

Adicionalmente en el SBF se midieron:

*Los sólidos sedimentables (SS)*: Fueron medidos según el protocolo de la APHA (1998) utilizando un cono Imhoff de 1000 mL a las 8 am, con un tiempo de sedimentación entre 15-20 minutos. Cuando los niveles de floc superaban los 50 mL/L, se realizó una remoción de los sólidos de cada unidad experimental en SBF, para garantizar un buen manejo del SBF (Avnimelech, 2009).

*Sólidos suspendidos totales (SST)*: Se evaluaron dos veces a la semana (8 a.m.) según el protocolo de la APHA (1998) para lo cual las partículas del agua fueron separadas por

filtración con papel filtro GF/C (1.2 µm), marca Whatman, posteriormente fueron secados en una estufa, durante una hora a 105 °C. Finalmente, se pesaron en una balanza analítica marca Ohaus con 0.0001 g de aproximación. Por definición los SST, son los materiales retenidos por un filtro estándar de fibra de vidrio y secado a 103 – 105 °C (APHA, 1998). El rango sugerido en el cultivo de biofloc es 0.2-1.0 g/L (Avnimelech, 2009).

Los SST, se determinaron mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SST (mg/L)} = \frac{(P2 - P1) * 1000}{V}$$

Donde:

P1= Peso del filtro preparado (mg/L)

P2= Peso del filtro más el residuo seco a 103-105°C (mg/L)

V= Volumen de la muestra (L)

*La alcalinidad:* expresada en CaCO<sub>3</sub> mg L<sup>-1</sup>, se midió diariamente a las 3p.m. previo filtrado de las muestras, para lo cual se utilizó el método de titulación con ácido sulfúrico a 0,02N e Indicador mixto.

### 3.7.2. Parámetros productivos

Las biometrías para la determinación de las variables de producción, se realizaron sobre toda la población experimental cada 15 días, durante ambas etapas experimentales. La supervivencia en ambos sistemas fue evaluada al final. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

#### 3.7.2.1. Tasa de crecimiento específica (TCE)

$$\text{Tasa de Crecimiento Específica (\%/día)} = 100x \left( \frac{\ln Pf - \ln Pi}{t} \right)$$

(Ricker, 1979)

#### 3.7.2.2. Porcentaje de supervivencia

$$\text{Porcentaje de Supervivencia (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{peces final}}{\text{N}^\circ \text{peces inicio}} \times 100$$

#### 3.7.2.3. Factor de conversión alimenticia (FCA)

$$\text{Factor de Conversión Alimenticia} = \frac{\text{Alimento suministrado}}{\text{Peso Ganado}}$$

(Biscudo *et al.*, 2010)

### 3.7.2.4. Ganancia de Peso (GP)

$$\text{Ganancia de Peso (g)} = (\text{Pf} - \text{Pi})$$

### 3.7.2.5. Densidad de carga (Kg/m<sup>3</sup>)

$$\text{Densidad (Kg/m}^3\text{)} = \left( \frac{\text{suma de pf (g) en el sistema o unidad experimental}}{\text{Volumen de agua en el sistema en L}} \right)$$

Donde:

Pi: Peso inicial de peces (g)

Pf: Peso final de peces (g)

t: Tiempo en días de duración del experimento

### 3.7.3. Indicadores de respuesta fisiológica al estrés

#### *Obtención de muestras de sangre y plasma sanguíneo*

Para la medición de las variables de respuesta fisiológica al estrés en el periodo de 4 días previos al traslado al SBF, se extrajo una muestra de sangre a un pez escogido al azar por cada réplica totalizando tres peces por cada tratamiento. En el periodo de 7 y 14 días después del traslado al SBF, se extrajo una muestra de sangre a dos peces escogidos al azar por cada réplica totalizando seis peces por cada tratamiento.

Previamente a cada toma de muestra de sangre, los paiches fueron anestesiados por hipotermia (10°C) con hielo (Bezerra *et al.*, 2014), con la finalidad de evitar el uso de químicos anestésicos que puedan actuar como un bloqueador anestésico metabólico o de infligir daño en la salud del pez según normas bioéticas (Martinez *et al.*, 2009).

Una vez realizado el anestesiado por hipotermia, se procedió inmediatamente a la colecta de las muestras de sangre de la vena caudal con jeringas hipodérmicas de 1 mL. El volumen de sangre colectada (0.7 mL) se depositó en tubos BD *Microtainer* con EDTA (10%) como anticoagulante para la obtención de sangre desfibrinada para la realización de la determinación de los parámetros hematológicos tales como: conteo de eritrocitos, conteo total y diferencial de leucocitos, conteo de trombocitos, determinación de hemoglobina, hematocrito e índices hematimétricos.

Asimismo, 0.5 mL de la sangre colectada fue centrifugada (2000 x g por 10 min) para la obtención del plasma sanguíneo, el cual fue mantenido a -80 °C para la posterior cuantificación de los parámetros metabólicos de glucosa y cortisol.

Estas colectas de sangre se realizaron el día 54 en SRA (correspondientes al periodo de 4 días previos al traslado al SBF) y en el SBF, a los 7 días después del traslado al SBF y a los 14 días después del traslado al SBF.

### 3.7.3.1. Parámetros hematológicos

Se evaluaron los índices hematológicos a través de un hemograma en muestras de sangre periférica, siendo indicadores sumamente utilizados para evaluar el estado fisiológico de los organismos acuáticos bajo diferentes condiciones de cultivo (tipo de sistema o diferentes dietas) (Tavares-Dias y Moraes, 2004).

Los parámetros hematológicos evaluados fueron:

#### a. Índices hematimétricos

Según Wintrobe (1934):

$$\begin{aligned} \text{Volumen Corpuscular Medio, (VCM)} &= \frac{(\% \text{Ht} \times 10)}{(\text{Número de eritrocitos} \times 10^6 \mu\text{L}^{-1})} \\ &= \text{fL (Fentolitros)} \end{aligned}$$

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media, (CHCM)

$$= \frac{\left( \text{Tasa de Hemoglobina (Hb)} \frac{\text{g}}{\text{dL}} \times 100 \right)}{(\text{Hematocrito})} = \text{g dL}^{-1}$$

Donde:

Ht = Hematocrito, porcentaje del volumen total de sangre correspondiente al volumen de células rojas sanguíneas.

Hb = Hemoglobina

El VCM, determina el volumen de los eritrocitos.

El CHCM, relaciona la concentración del pigmento hemático con los eritrocitos.

Todos los parámetros hematológicos, incluidos los índices hematimétricos anteriormente descritos, fueron determinados según la metodología descrita por Ranzani-Paiva *et al.* (2013).

#### **b. Concentración de hemoglobina**

La determinación de la concentración de la hemoglobina (Hb) se realizó en el laboratorio de bioanálisis de la Facultad de Ciencias, departamento de Química de la UNALM, bajo el método de la cianohemoglobina y sus concentraciones se expresaron en g/dL (Collier, 1944).

#### **c. Hematocrito**

La determinación del hematocrito (Ht) se realizó en el laboratorio de bioanálisis de la Facultad de Ciencias, departamento de Química de la UNALM, bajo el método de microhematocrito (Goldenfarb *et al.*, 1971). Los resultados de Ht, se expresaron en %.

#### **d. Conteo de eritrocitos**

El conteo de eritrocitos se llevó a cabo por el método del hematocitómetro, la sangre se diluye con una solución de formol citrato más azul de toluidina (1:200), el conteo de eritrocitos se realizó en una cámara de Neubauer en 5 campos. Para ello el número obtenido en el conteo de eritrocitos en la cámara de Neubauer se multiplica por  $10^6$  (Oliveira-Júnior *et al.*, 2009). El número total de eritrocitos se expresó en  $10^6\mu\text{L}^{-1}$

#### **e. Conteo total de leucocitos y trombocitos**

Para el conteo de leucocitos y trombocitos fue necesario realizar un procedimiento de coloración, que se describe a continuación, según Tavares-Dias y Moraes (2003):

Primero: se preparan extensiones sanguíneas en una lámina portaobjeto, colocando una gota de sangre en un extremo de la lámina, luego con ayuda de una segunda lámina se procede a extender la gota de sangre. Esperar hasta que la extensión este seca. Segundo: cubrir toda la extensión con el colorante May-Grunwald, Giemsa y Wrigth durante un minuto. Tercero: diluir con una solución tampón pH 7.0 durante 7 minutos. Cuarto: lavar la extensión con agua destilada.

Asimismo para realizar el conteo total de leucocitos y trombocitos, es necesario conocer el número de eritrocitos totales. Luego se procedió a contar los leucocitos o trombocitos en relación a 2000 eritrocitos en la extensión sanguínea, evitando áreas con aglomeración de

células, el número total de leucocitos y trombocitos se expresó en  $\mu\text{L}^{-1}$  (Tavares-Dias y Moraes, 2006).

A continuación se describe la fórmula de conteo de leucocitos y trombocitos:

Leucocitos o trombocitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) =

$$\frac{(\text{Leucocitos o trombocitos en la extensión sanguínea}) * (\text{Número de eritrocitos RBC } (\mu\text{L}^{-1}))}{2.000 \text{ eritrocitos en la extensión}}$$

#### **f. Conteo diferencial de leucocitos**

El conteo diferencial de leucocitos se realizó según Tavares-Dias y Moraes (2003), utilizando una solución colorante May-Grunwald, Giemsa y Wrigth, para la tinción de las células en las extensiones sanguíneas. Fue necesario conocer previamente el número de leucocitos totales y contar nuevamente 100 leucocitos en la extensión, seguidamente se procede a calcular el porcentaje correspondiente para cada tipo de leucocito, basados en el total de leucocitos contados en la extensión (100 leucocitos). Por ejemplo, el contaje de leucocitos totales fue de  $9.500 \mu\text{L}^{-1}$  y el porcentaje de linfocitos fue de 40 (%), entonces:  $9.500 \times 40/100 = \text{Linfocitos} = 3800.0 \mu\text{L}^{-1}$ .

#### **3.7.3.2 Parámetros metabólicos (glucosa y cortisol)**

La glucosa en plasma se determinó usando un kit comercial (Valtek diagnostics, Anexo 10) bajo el método de la glucosa oxidasa y peroxidasa, siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de glucosa se expresó en mg/dL.

El cortisol en plasma se determinó por el método de inmunoensayo enzimático en microplacas de ELISA usando un kit disponible comercialmente (marca Monobind Inc, Anexo 11), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de cortisol en plasma se expresó en ng/L.

#### **3.8. Diseño estadístico**

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar. La normalidad y la homogeneidad de varianzas de los datos fueron verificadas por las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. El análisis estadístico se realizó usando un análisis de varianza (ANVA) de una vía para evaluar los efectos de la concentración de la vitamina C suplementada en la dieta de alevines de *A. gigas*, sobre el crecimiento y la respuesta fisiológica, en SRA y en su adaptación al SBF. Se utilizó un nivel de significancia del 5%,

los resultados fueron representados como el valor de la media  $\pm$  la desviación estándar de la media. Cuando las diferencias en el ANVA fueron significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de comparación múltiple (medias) de Tukey. Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico Minitab 16.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Calidad de Agua

Durante las dos etapas del experimento en sistema de recirculación en acuicultura (SRA) y sistema de biofloc (SBF), no hubo diferencias significativas en los parámetros de calidad de agua entre los tratamientos como temperatura, concentración del oxígeno disuelto, pH, nitrógeno amoniacal total (NAT), nitrógeno en nitritos (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrógeno en nitratos (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). El total de los datos registrados se muestran en el Anexo 12, mientras que los valores promedios para la etapa en SRA y la etapa en SBF se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente.

**Tabla 3: Parámetros de calidad de agua durante la fase experimental en el sistema de recirculación en acuicultura (SRA).**

Temperatura (°C)	Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> )	pH	Alcalinidad (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	SST (mg L <sup>-1</sup> )	NAT (mg L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )
28.8 ± 0.8 (27.5 – 30.9)	6.76 ± 0.21 (6.1 – 7.5)	7.62 ± 0.2 (7.2 – 7.9)	95.4 ± 0.39 (94.8 – 95.7)	26.4 ± 0.2 (26.2 – 26.6)	1.0 ± 0.3 (0.6-1.9)	0.12 ± 0.1 (0.02–0.5)	15.12 ± 4.0 (7.5 - 26.2)

Media ± desviación estándar. SRA, sistema de Recirculación; SBF, sistema de biofloc; SST, sólidos suspendidos totales; NAT, nitrógeno amoniacal total; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrógeno en nitritos; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrógeno en nitratos.

Los parámetros de calidad de agua se encontraron durante todo el experimento dentro de los rangos sugeridos para esta especie (Crescêncio, 2001), a excepción de la concentración de nitritos durante el cultivo en el SBF.

La alcalinidad en el SRA fue estable, pero el SBF perdió su capacidad tampón a una velocidad mayor y por lo tanto fue necesario la adición de bicarbonato de sodio para mantener un nivel de alcalinidad óptimo para que el proceso de inmovilización del nitrógeno por parte de las bacterias heterotróficas no sea alterado (Azim y Little, 2008).

La concentración de sólidos suspendidos totales (SST) en el SBF, muestra un incremento en comparación al SRA, puesto que la presencia de los flóculos microbianos que conforman el



SBF, son necesarios para la inmovilización del nitrógeno por parte de las bacterias heterotróficas. La concentración de sólidos y la turbulencia necesaria para mantener las partículas en suspensión y mantener los niveles aceptables de oxígeno disuelto en el SBF, podrían suponer un factor estresante, en la adaptación de los paiches al SBF. Durante la segunda etapa experimental en el SBF, las concentraciones de nitrógeno amoniacal total (NAT), de nitrógeno en nitritos ( $\text{N-NO}_2^-$ ), fueron más elevados que en la etapa en el SRA.

**Tabla 4: Parámetros de calidad de agua durante la fase experimental en el sistema de biofloc (SBF).**

Parámetros	Tratamientos SBF			
	C 41.3	C 541.0	C 823.0	C 1290.0
Temperatura (°C)	27.5 ± 1.06 (24.5 – 29.3)	28.05 ± 0.54 (27.4 – 29.5)	27.62 ± 0.5 (27.2 – 28.9)	27.8 ± 0.53 (27.03 – 29.2)
Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> )	6.13 ± 0.62 (5.1 – 6.97)	5.88 ± 0.81 (4.42 – 6.83)	5.83 ± 0.88 (4.28 – 6.74)	6.09 ± 0.62 (5.07 – 6.89)
pH	7.73 ± 0.15 (7.40 – 7.96)	7.72 ± 0.16 (7.44 – 7.95)	7.72 ± 0.17 (7.4 – 7.99)	7.68 ± 0.17 (7.36 – 7.98)
Alcalinidad (mgCaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	97.9 ± 14.8 (75.85 – 120)	98.6 ± 15.61 (75.84 – 119.9)	98.3 ± 15.9 (75.8 – 119.8)	97.13 ± 18.6 (70.4 – 118.9)
SS (mL L <sup>-1</sup> )	27.87 ± 12.24 (11 – 47)	29.27 ± 14.91 (10 – 64)	27.8 ± 13.4 (6 – 51)	33.70 ± 12.71 (15 – 55)
SST (mg L <sup>-1</sup> )	333.3 ± 130.9 (216 – 516)	326.0 ± 110.1 (208 – 473)	302.4 ± 99.2 (201 – 437)	324.8 ± 140.9 (208.3 – 523)
NAT (mg L <sup>-1</sup> )	2.59 ± 1.67 (0.82 – 7.68)	2.34 ± 1.70 (0.4 – 6.39)	3.03 ± 2.29 (1.06 – 10.07)	3.15 ± 2.10 (0.86 – 8.13)
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0.85 ± 6.89 (0.07 – 2.33)	0.71 ± 0.59 (0.07 – 2.10)	0.95 ± 0.75 (0.07 – 2.57)	0.85 ± 0.70 (0.07 – 2.48)
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	9.38 ± 1.61 (7.59 – 13.62)	9.65 ± 2.49 (5.89 – 13.73)	9.30 ± 1.79 (6.53 – 12.8)	9.41 ± 2.10 (6.98 – 13.62)

Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar. (Mínimo y Máximo). SRA, sistema de Recirculación; SBF, sistema de biofloc; SS, sólidos sedimentables; SST, sólidos suspendidos totales; NAT, nitrógeno amoniacal total; N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, nitrógeno en nitritos; N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrógeno en nitratos.

En el SBF, los niveles de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ , mostraron una tendencia de incrementar su concentración (Figura 4). Posiblemente, una de las razones del incremento de la concentración de amonio y nitrito en el inicio del cultivo de un SBF, se deba a que durante las primeras semanas del cultivo en SBF, se lleve a cabo la estabilización de las comunidades de bacterias heterotróficas (jerárquicamente predominantes) y quimioautotróficas (bacterias nitrificantes) presentes en el SBF. Luego de la estabilización de las poblaciones bacterianas en el SBF, las concentraciones de amonio y nitrito empiezan a disminuir paulatinamente a niveles adecuados, siendo probable que las bacterias nitrificantes en el SBF, sean las mayores responsables en la disminución de los niveles de nitritos. Según Xu *et al.* (2015), aparte de una comunidad bacteriana predominantemente heterotrófica, es necesario en un sistema de tecnología de biofloc una comunidad bacteriana nitrificante bien establecida para ayudar a que las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$  puedan ser controladas de una manera efectiva. Asimismo, debido a su reproducción más lenta en comparación a las bacterias heterotróficas, las bacterias quimioautotróficas requieren aproximadamente treinta días para establecerse en una unidad de cultivo (Timmons y Ebeling, 2010). Tendencias semejantes en el incremento de amonio y nitrito durante los primeros días del cultivo en sistemas de biofloc, han sido obtenidas por Azim y Little (2008); Luo *et al.* (2014); Long *et al.* (2015).

La acumulación de amonio y nitritos pueden causar problemas de toxicidad en el cultivo, a pesar de que *A. gigas* muestra una tolerancia a las concentraciones elevadas de nitrógeno amoniacal total de  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , correspondiente a  $2.0 \text{ mg L}^{-1}$  de amonio no ionizado (Cavero *et al.*, 2004). Los efectos crónicos por exposición de concentraciones relativamente elevadas de amonio y de nitritos sobre esta especie, podrían causar alteraciones en su crecimiento o en su estado fisiológico. Las concentraciones de nitritos en el SBF suelen ser un problema en la calidad de agua, debido a su aumento durante los primeros 20 días de estabilización del sistema llegando a niveles extremadamente elevados (Luo *et al.*, 2014). En el presente experimento, la concentración promedio más elevada de  $\text{NO}_2^-$ , se presentó el tratamiento C823, siendo de  $0.95 \pm 0.75 \text{ mg/L}$ , con una concentración máxima de  $2.57 \text{ mg/L}$ .

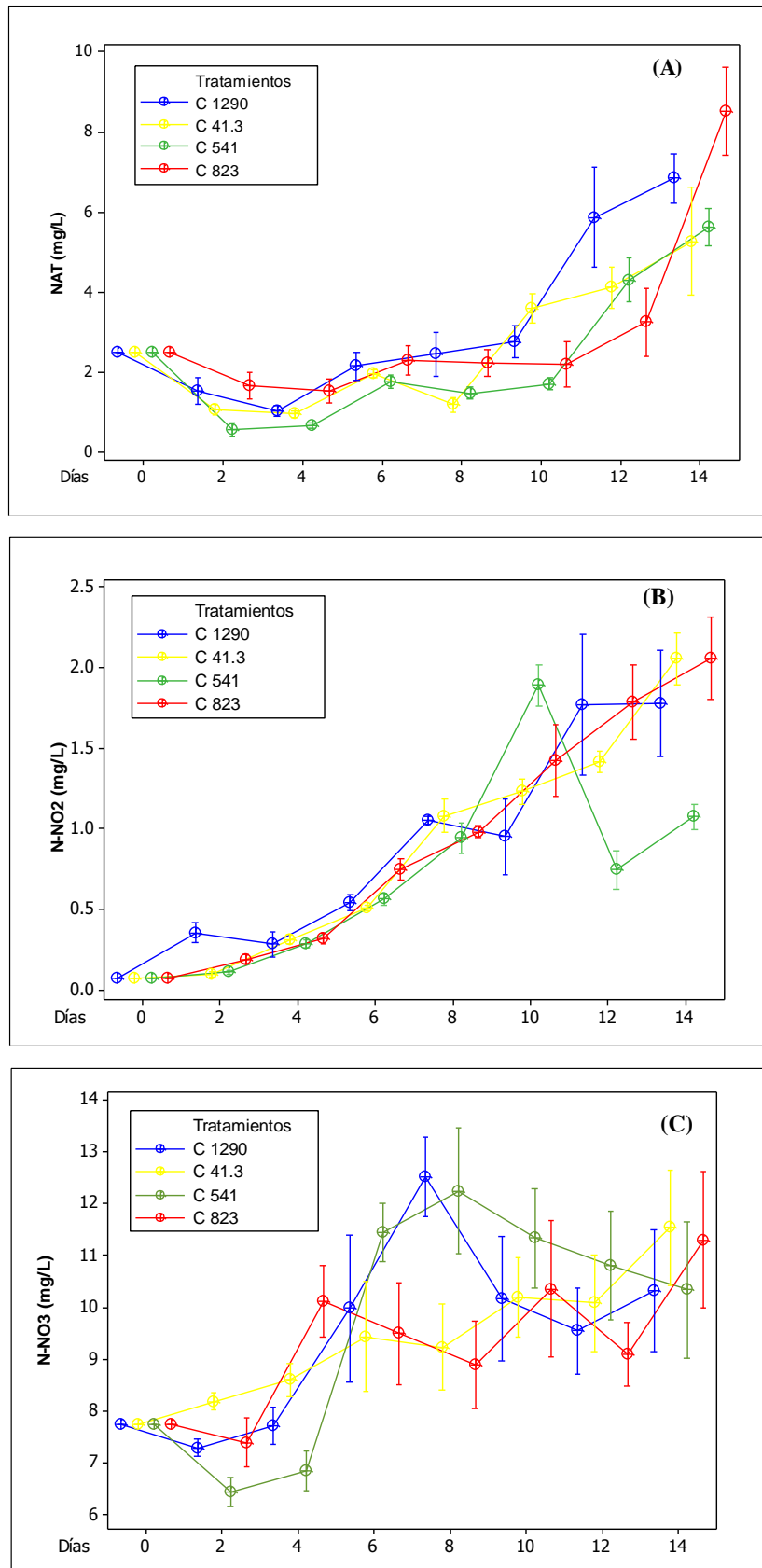
No existe una investigación sobre la tolerancia de *A. gigas* a las concentraciones elevadas de nitritos. Por tal motivo, si se toma como referencia la concentración letal media a 96 horas (96h  $\text{CL}_{50}$ ) de  $8 \text{ mg/L}$   $\text{NO}_2^-$  de un pez tropical como la tilapia, *Oreochromis niloticus*, de peso promedio de  $90.7 \text{ g}$  (Atwood *et al.*, 2001), y haciendo uso del nivel de no efecto (NOEL, por sus siglas en inglés, NO Effect Level), que pretende de que los peces puedan vivir sin ningún efecto adverso a largo plazo, el cual corresponde al 9% de la  $\text{CL}_{50}$  (Ashe *et al.*, 1996),

estimándose el NOEL propuesto en 0.72 mg/L N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, como se observa, la concentración de nitritos promedio y el pico máximo de nitritos en el SBF estuvo por encima del nivel de no efecto propuesto líneas arriba.

La toxicidad de los nitritos, induce una variedad de alteraciones fisiológicas, siendo la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina una de las principales alteraciones fisiológicas en los organismos acuáticos, que produce anoxia en los peces, debido a que la metahemoglobina es incapaz de transportar el oxígeno (Jensen, 2003).

La adición de cloruros, usualmente cloruro de sodio, es utilizado para prevenir la toxicidad del nitrito en el cultivo de peces como el bagre de canal, *Ictalurus punctatus* (Tucker, 1985). Una vez que el cloruro se haya disuelto en el agua, inhibe competitivamente la entrada del nitrito a través de las branquias del pez, haciendo que los niveles tóxicos de nitritos en el cultivo sean más tolerables (Tomasso *et al.*, 1979). Otra forma de disminuir la toxicidad de nitritos es la reportada por Wise *et al.* (1988), donde se obtuvo que concentraciones elevadas de vitamina C en la dieta, pueden reducir la formación de metahemoglobina inducida por nitritos en *Ictalurus punctatus*, basados en el efecto protector de la vitamina C. Sin embargo, la vitamina C no es tan eficaz en la prevención de formación de metahemoglobina inducida por nitritos como la adición de cloruros al agua de cultivo.

Luo *et al.* (2014) investigaron el cultivo de *Oreochromis niloticus* en los sistemas SRA y SBF, donde reportaron picos de nitritos de 119 mg/L en sistema de biofloc. Para contrarrestar la toxicidad del nitrito, recurrieron a la adición de cloruro de sodio (sal) a una concentración del 1% (w/w), para aumentar la tolerancia a concentraciones elevadas de nitritos, siendo esta una alternativa válida para esta especie. No obstante, la adición de sales para la disminución de la toxicidad del nitrito, se ve restringida para especies con poca tolerancia al cambio de salinidad (especies estenohalinas), comprometiendo el crecimiento, debido a un mayor gasto energético en osmorregulación por parte del pez (Zydlewski y Wilkie, 2013), asimismo la salinidad, es un factor importante en la respuesta fisiológica de los peces tropicales en su adaptación a las nuevas condiciones ambientales (Chung, 2001). Por lo tanto, el empleo de ambas estrategias, la de la suplementación de ácido ascórbico (AA) en la dieta y la de la adición de cloruros en el agua de cultivo, podrían utilizarse de manera conjunta para contrarrestar la toxicidad del nitrito y con ello, permitir una estrategia preventiva para las especies poco tolerantes al incremento de salinidad, además al suplementar AA en la dieta, el estado fisiológico y el crecimiento del pez se ven beneficiados (Dabrowski, 2001).



**Figura 4: Cambios de las concentraciones de nitrógeno inorgánico a lo largo del periodo experimental en SBF. (A) nitrógeno amoniacal total (NAT); (B) nitrógeno en nitritos (N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); (C) nitrógeno en nitratos (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Media ± desviación estándar.**

Respecto a la concentración de nitrógeno en nitratos ( $\text{N-NO}_3^-$ ) en la etapa de sistema de biofloc, esta no presentó una fuerte tendencia de incremento en sus concentraciones comparados con las concentraciones de TAN y  $\text{N-NO}_2^-$  en el SBF, como suele suceder en el proceso de nitrificación, llevado a cabo por bacterias autótrofas en un SRA. La falta de una aparente acumulación de  $\text{N-NO}_3^-$ , posiblemente se debió a que el  $\text{N-NO}_3^-$  fue inmovilizado por la acción de las bacterias heterotróficas en el SBF (Luo *et al.*, 2013).

Las concentraciones promedio de oxígeno disuelto en todos los tratamientos en SBF se encontraron alrededor de  $6 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla 4), según Luo *et al.* (2014) concentraciones de oxígeno disuelto mayores a  $6 \text{ mg L}^{-1}$  permiten a las bacterias heterotróficas convertir el amonio en biomasa bacteriana. Por otra parte, en la etapa de SBF el tratamiento C823 muestra la menor concentración promedio de oxígeno disuelto con respecto a los demás tratamientos, lo que posiblemente influyó en las concentraciones de NAT y  $\text{N-NO}_2^-$  en dicho tratamiento (Tabla 4).

Los procesos de inmovilización del nitrógeno, demandan oxígeno, por lo que la concentración del oxígeno disuelto, es un parámetro muy importante en el mantenimiento del SBF, no sólo para cubrir la demanda de oxígeno de los peces, sino también para mantener una población estable de bacterias heterotróficas. No obstante, por tratarse de un pez con respiración aérea obligada, *A. gigas*, no depende completamente del oxígeno disuelto en el agua, lo cual no sólo supone una ventaja para el cultivo en SBF, sino en cualquier sistema de cultivo (Cavero *et al.*, 2003).

#### **4.2. Parámetros de crecimiento**

En la primera etapa experimental de 54 días en SRA, los alevines del tratamiento C823, presentaron un incremento significativo en el peso final (g) en comparación con los del tratamiento control C41.3, mas no con los tratamientos C541 y C1290 (Tabla 5).

Estos resultados corroboran lo descrito por Menezes *et al.* (2006), quienes obtuvieron un incremento significativo en el peso final de juveniles de *A. gigas*, alimentados con  $800 \text{ mg AA Kg}^{-1}$ , en comparación con una dieta control sin suplementación de vitamina C. Sin embargo, Andrade *et al.* (2007), no obtuvieron diferencias significativas entre las dietas con suplemento de vitamina C (dietas con concentración 500, 800 y  $1200 \text{ mg AA Kg}^{-1}$ ) y la dieta control sin suplementación adicional de vitamina C, en *A. gigas*.

**Tabla 5: Parámetros productivos de *Arapaima gigas*, en el sistema de recirculación en acuicultura bajo diferentes niveles de ácido ascórbico, por un período de 54 días.**

Parámetros	Tratamientos			
	C 41.3	C 541	C 823	C 1290
PI (g)	25.79 ± 1.79 <sup>a</sup>	25.95 ± 3.04 <sup>a</sup>	27.267 ± 2.3 <sup>a</sup>	27.542 ± 1.99 <sup>a</sup>
PF (g)	171.6 ± 28.5 <sup>a</sup>	184.8 ± 32.6 <sup>ab</sup>	213.3 ± 15.95 <sup>b</sup>	195.9 ± 32.8 <sup>ab</sup>
GP (g)	145.8 ± 28.13 <sup>a</sup>	158.9 ± 32.9 <sup>ab</sup>	186.1 ± 14.57 <sup>b</sup>	168.4 ± 32.1 <sup>ab</sup>
FCA	0.85 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.14 <sup>a</sup>
TCE (%/día)	3.49 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.62 ± 0.35 <sup>ab</sup>	3.81 ± 0.12 <sup>b</sup>	3.61 ± 0.31 <sup>ab</sup>
Densidad de Carga(Kg/m <sup>3</sup> )	5.10	5.10	5.10	5.10
Superv. (%)	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar; n=20. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). SRA, sistema de Recirculación, PI, peso inicial; PF, peso final; GP, Ganancia de Peso; FCA, Factor de Conversión Alimenticia; TCE, tasa de crecimiento específico; Densidad de Carga final.

En el periodo de cultivo en el SRA, las variables de ganancia de peso (GP g) y tasa de crecimiento específico (TCE % de peso/día) poseen diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento C823. Mientras que, las variables factor de conversión alimenticia (FCA) y supervivencia (%), no presentan diferencias significativas entre todos los tratamientos (Tabla 5).

Los valores obtenidos en el SRA para FCA (0.75), la TCE (3.81%/día) y la supervivencia (100%), son muy buenos en comparación con los valores de paiches de 120 g de peso, cultivados en tanques-red, con un FCA de 2.3, una TCE de 2.4 %/día y una supervivencia de 66.7 % (Ituassú *et al.*, 2005). No obstante, Cavero *et al.* (2003), reportan un valor de FCA de 0.80 para paiches de 107.72 g de peso promedio, criados también bajo un cultivo convencional como son los cultivos tanques-red. Estos resultados favorables, pueden ser explicados por las condiciones óptimas de la primera etapa en SRA, con una densidad de carga final de cultivo de 5.1 Kg m<sup>-3</sup> y buena calidad de agua.

**Tabla 6: Parámetros productivos de *Arapaima gigas*, en el sistema biofloc bajo diferentes niveles de ácido ascórbico, por un período de 14 días.**

Parámetros	C41.3	C541	C823	C1290
PI (g)	171.6 ± 28.54 <sup>a</sup>	184.8 ± 32.63 <sup>ab</sup>	213.3 ± 15.95 <sup>b</sup>	195.9 ± 32.8 <sup>ab</sup>
PF(g)	179.9 ± 39.2 <sup>a</sup>	193.2 ± 24.65 <sup>ab</sup>	243.1 ± 15.85 <sup>c</sup>	215.1 ± 30.12 <sup>bc</sup>
GP(g)	8.38 ± 11.01 <sup>a</sup>	8.36 ± 12.86 <sup>a</sup>	22.24 ± 17.05 <sup>a</sup>	19.15 ± 16.94 <sup>a</sup>
FCA	3.25 ± 2.03 <sup>a</sup>	1.55 ± 1.98 <sup>a</sup>	2.09 ± 1.72 <sup>a</sup>	2.24 ± 5.72 <sup>a</sup>
TCE(%/día)	0.4 ± 0.34 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.55 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.54 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.89 <sup>a</sup>
Densidad de Carga(Kg/m <sup>3</sup> )	12.0 ± 2.96 <sup>a</sup>	12.9 ± 1.64 <sup>a</sup>	16.2 ± 0.49 <sup>a</sup>	14.34 ± 2.19 <sup>a</sup>
Superv. (%)	70 ± 57.7 <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>a</sup>

Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar; n=20. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). SBF, sistema de biofloc, PI, peso inicial; PF, peso final; GP, Ganancia de Peso; FCA, Factor de Conversión Alimenticia; TCE, tasa de crecimiento específico; Densidad de Carga final.

La vitamina C, está directamente involucrada en el metabolismo del colágeno por funcionar como un cofactor de hidrolasas de lisina y prolina, las cuales catalizan la hidroxilación de lisina y prolina en una molécula de pro-colágeno, contribuyendo a la formación ósea y de la piel y por lo tanto al crecimiento (Barnes y Kodicek, 1972; Chaterjee, 1978), lo que quizá pudo permitir que a lo largo de la primera etapa, en SRA, donde no hubo condiciones ambientales hostiles que causen estrés (salvo los de manipuleo), los paiches obtuvieran mejoras en su crecimiento.

En la segunda etapa experimental de 14 días en SBF, los alevines de *A. gigas* del tratamiento C823, muestran un incremento significativo en el peso final (g) en comparación con los paiches del tratamiento control C43.1 y del tratamiento C541. Del mismo modo, los alevines del tratamiento C1290, muestran diferencias significativas sólo con respecto al control C41.3. Mientras que las variables de crecimiento ganancia de peso (g), tasa de crecimiento específico (% de peso/día), factor de conversión alimenticia y supervivencia (%) no presentan diferencias significativas con respecto a ningún tratamiento (Tabla 6), mas si existe una diferencia numérica favorable para los tratamientos con suplemento adicional de vitamina C en la dieta respecto al control.

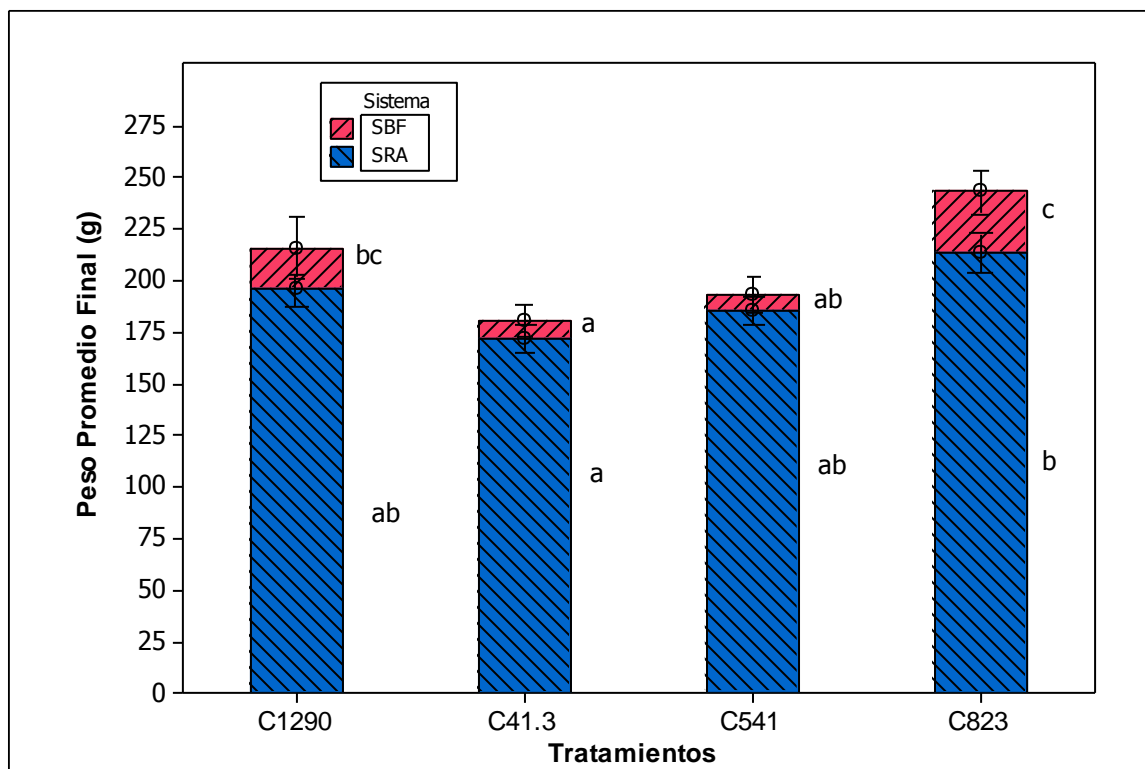
En la Figura 5, se observa que los tratamientos de C823 y C1290, presentaron los mejores pesos finales a lo largo del experimento. El peso final del tratamiento C1290, recién alcanza un incremento significativo con respecto al control, en la segunda etapa en SBF, que podría deberse al efecto de la vitamina C sobre un aumento de la tolerancia al estrés (Liu *et al.*, 2008; Zhou, 2012), y que se evidenció en el periodo de adaptación al SBF que se suponen son condiciones estresantes dadas las características ambientales del sistema. Por otra parte, todos los tratamientos muestran un menor desempeño en los parámetros productivos en comparación con los de la etapa previa en el SRA.

Por otro lado, en la Figura 6 se puede observar que en la etapa experimental en el SBF, se produce una interrupción en el crecimiento en todos los tratamientos. Cabe mencionar que el tratamiento control mostró el menor desempeño a lo largo de todo el periodo experimental, y el mejor fue el del C823, que incrementó su crecimiento favorablemente entre todos los tratamientos durante la segunda etapa experimental.

El factor de conversión alimenticia fue la única variable de crecimiento en ambas etapas en SRA y SBF que no mostró diferencias significativas entre tratamientos, aunque si las hubo numéricamente. Resultados opuestos han sido descritos por Henrique *et al.* (1998) en juveniles de *Sparus aurata*, quienes obtuvieron diferencias significativas en el factor de conversión alimenticia para una dieta de 200 mg AA Kg<sup>-1</sup>, sin embargo, no obtuvieron diferencias significativas en el peso final ni en la tasa de crecimiento específico comparadas con el grupo control.

Faramarzi (2012), obtuvo mejor factor de conversión alimenticia, mejor tasa de crecimiento específico y mejor ganancia en peso en alevines de *Cyprinus carpio*, alimentados con 1200 mg AA Kg<sup>-1</sup>, además, Chien y Hwang (2001), indicaron que niveles entre 80 y 400 mg AA Kg<sup>-1</sup>, favorecen a un mayor crecimiento en peso en juveniles de *Terapon jarbua*, bajo condiciones de estrés por temperatura de 36 °C, comparados con niveles de 0 y 2000 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Dabrowski (2001), menciona que los requerimientos de AA en la dieta son específicos para cada especie y etapa de crecimiento, además sus efectos sobre los parámetros productivos muestran una respuesta variable en relación a las concentraciones de AA en la dieta, que dependerá, también, de las condiciones ambientales.

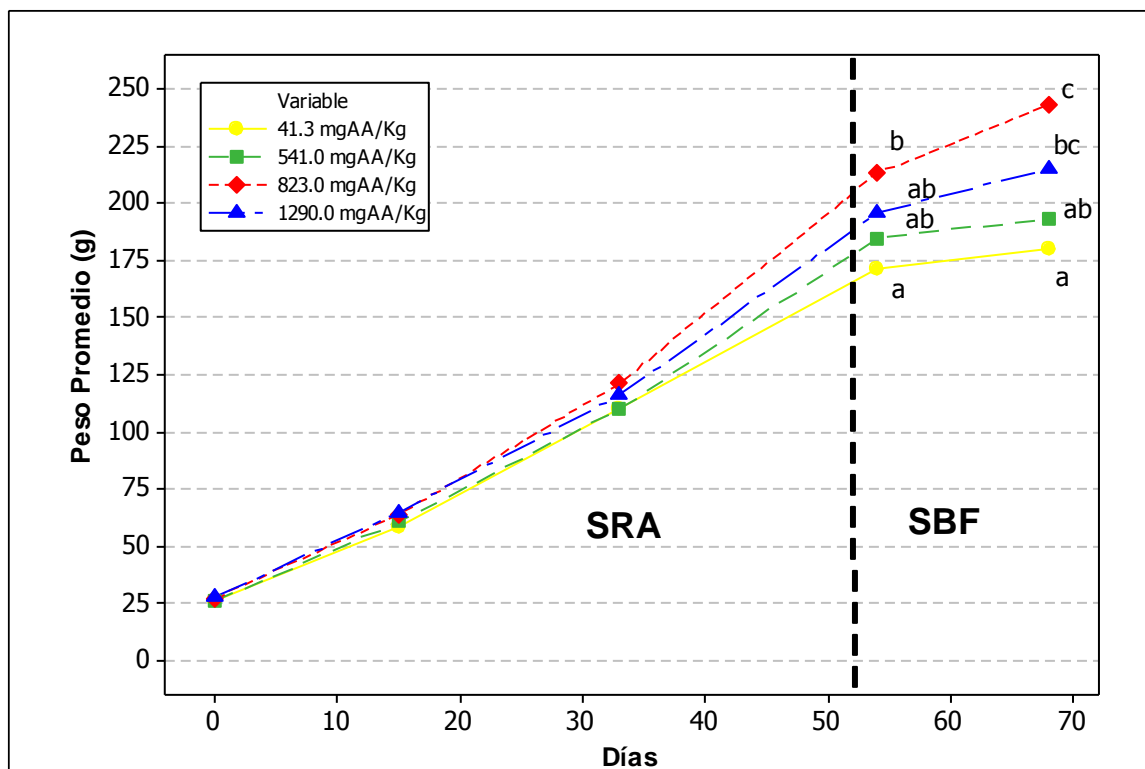




**Figura 5: Peso promedio final (g) de *Arapaima gigas*, después de 54 días en SRA y después de 14 días en SBF.** Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar. SRA, sistema de Recirculación; SBF, sistema de biofloc. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Según Azim y Little (2008) los sistemas biofloc ofrecen un mejor desempeño productivo para juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*), al mostrar mejor peso final, ganancia en peso y factor de conversión alimenticia, comparados con un sistema de recambio de agua, esto atribuido al aporte nutricional del biofloc. Sin embargo, la densidad de cultivo que la tilapia alcanzó al final del experimento fue relativamente baja (4.9Kg m<sup>-3</sup>) para un cultivo superintensivo, como los cultivos en SBF. En comparación con el presente experimento, los alevines de paiches estuvieron bajo densidades de cultivo mucho mayor, entre 12.0 y 16.2 Kg m<sup>-3</sup> para el tratamiento C41.3 y el tratamiento C823, respectivamente.

No obstante, los resultados obtenidos por Luo *et al.* (2014), muestran un mejor desempeño de los parámetros de crecimiento en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*), incluso obtuvieron una densidad muy elevada de 44.95 Kg m<sup>-3</sup> en un sistema biofloc, significativamente superior a la que obtuvieron en un sistema de recirculación de 36.87 Kg m<sup>-3</sup>, la elevada densidad alcanzada en el experimento de Luo *et al.* (2014) significó un gran incremento en las concentraciones de amonio y nitritos en el SBF, durante las primeras semanas de estabilización del sistema. Si bien es posible incrementar la productividad del



**Figura 6: Crecimiento en peso promedio (g) de *Arapaima gigas*, en SRA (sistema de recirculación en acuicultura) y SBF (sistema de biofloc).** Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar. SRA, sistema de Recirculación; SBF, sistema de biofloc. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

cultivo en los sistemas de biofloc, Azim y Little (2008) y Luo *et al.* (2014) reportaron picos en la concentración de amonio y nitritos durante las primeras semanas de cultivo, esto aunado a densidades elevadas que permite albergar el SBF, supone situaciones estresantes, al menos en la etapa de adaptación, (primeras semanas de cultivo en SBF) que coincide con el periodo donde las colonias de bacterias heterotróficas continúan su estabilización, para garantizar la eficiente inmovilización del nitrógeno en el sistema.

Según Wedemeyer (1996) la capacidad adaptativa de los peces a un ambiente como un cultivo intensivo, puede originar una alteración en el crecimiento y en la respuesta al estrés. Por consiguiente, la disrupción en el crecimiento de los paiches del grupo control con respecto a los paiches con suplemento adicional de vitamina C, especialmente comparados con los paiches del tratamiento C823, podría estar relacionada a las condiciones estresantes (alta turbulencia, partículas en suspensión y fluctuaciones de compuestos nitrogenados) durante las primeras semanas de estabilización del SBF. Por lo tanto, el requerimiento de vitamina C en la dieta que garantice o mejore los parámetros productivos en peces, dependen

del tipo de sistema de cultivo, específicamente, de las condiciones ambientales propias del mismo.

### **4.3. Respuestas Fisiológicas**

#### **4.3.1. Parámetros Hematológicos**

En la Tabla 7 se observan los valores de los parámetros hematológicos registrados 4 días antes del traslado al SBF, que corresponden a un escenario donde los peces se encuentran en el SRA y no han sufrido ninguna perturbación o alteración en su ambiente, además durante aproximadamente 8 semanas han recibido diferentes concentraciones de vitamina C. Estos valores, sirvieron de referencia para los dos últimos periodos, de 7 y 14 días después del traslado al SBF, que representan la respuesta a un estrés crónico por el traslado al SBF. El perfil hematológico (índices celulares de eritrocitos, número de leucocitos y número de trombocitos), puede ser un buen indicador del estrés oxidativo, debido a que son células con gran producción de radicales libres, lo cual las hacen más susceptibles al daño oxidativo en sus membranas celulares (Tavares-Dias *et al.*, 2007).

En el primer periodo de 4 días antes del traslado al SBF, los parámetros de células rojas sanguíneas (Tabla 7), pertenecientes a los tratamientos C823 y C1290, son los tratamientos que evidenciaron menor daño oxidativo al poseer mayor concentración de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Ht), diferenciándose del tratamiento control.

Después de los de 7 días del traslado al SBF, los paiches de los tratamientos C823 y C1290, mantuvieron la mayor concentración de Hb y Ht en el periodo, posiblemente debido al aumento de la capacidad antioxidante ofrecida por la vitamina C (Chen *et al.*, 2003). Según Rifkind *et al.* (1993), la producción de radicales libres aumenta causando un daño oxidativo sobre las membranas celulares, debido a que el organismo sufre una regulación en su metabolismo para lograr adaptarse al nuevo escenario. No obstante, a los 14 días después del traslado al SBF, los valores de Hb y Ht, no mostraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos. Las diferencias de hemoglobina y hematocrito entre paiches alimentados con 800 mg vitamina C Kg<sup>-1</sup> y con una dieta control, reportados por Menezes *et al.* (2006), son muy semejantes a las diferencias obtenidas en la presente investigación, entre los tratamientos C823 y C41.3 (control). Del mismo modo, los valores de hemoglobina

**Tabla 7: Valores de células rojas sanguíneas, glucosa y cortisol en *Arapaima gigas*, 4 días previos al SBF, y a los 7 y 14 días en el cultivo.**

Vitamina C (mg Kg <sup>-1</sup> )	Período (días)	Eritr 10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup>	Hb (g/dL)	Ht (%)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Gluc (mg/dL)	Corti (ng/mL)
C 41.3		1.91 ± 0.34 <sup>a</sup>	7.6 ± 0.15 <sup>a</sup>	28.3 ± 1.53 <sup>a</sup>	151.6 ± 25.7 <sup>a</sup>	27.0 ± 1.79 <sup>a</sup>	42.5 ± 19.05 <sup>a</sup>	24.95 ± 7.21 <sup>a</sup>
C 541	4 antes SBF	2.32 ± 0.14 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.69 <sup>ab</sup>	32.7 ± 1.16 <sup>b</sup>	141.2 ± 13.7 <sup>a</sup>	29.1 ± 1.07 <sup>a</sup>	40.3 ± 13.5 <sup>a</sup>	12.93 ± 1.3 <sup>b</sup>
C 823		3.31 ± 0.46 <sup>a</sup>	10.9 ± 0.72 <sup>b</sup>	35.33 ± 1.53 <sup>b</sup>	108.4 ± 17.5 <sup>a</sup>	30.9 ± 1.29 <sup>a</sup>	35.93 ± 17.1 <sup>a</sup>	11.51 ± 0.84 <sup>b</sup>
C 1290		2.96 ± 0.44 <sup>a</sup>	10.5 ± 1.21 <sup>b</sup>	35.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	120.0 ± 18.5 <sup>a</sup>	29.9 ± 3.46 <sup>a</sup>	89.3 ± 15.0 <sup>b</sup>	11.4 ± 0.77 <sup>b</sup>
C 41.3		2.17 ± 0.51 <sup>a</sup>	7.92 ± 0.50 <sup>a</sup>	26.5 ± 2.17 <sup>a</sup>	125.9 ± 30.3 <sup>ab</sup>	29.9 ± 1.74 <sup>a</sup>	34.5 ± 25.6 <sup>a</sup>	13.14 ± 1.67 <sup>a</sup>
C 541	7 en SBF	2.56 ± 0.50 <sup>ab</sup>	8.78 ± 0.77 <sup>ab</sup>	34.20 ± 2.59 <sup>b</sup>	145.5 ± 21.0 <sup>b</sup>	25.9 ± 4.4 <sup>a</sup>	45.0 ± 34.4 <sup>a</sup>	9.89 ± 8.50 <sup>a</sup>
C 823		3.52 ± 0.37 <sup>c</sup>	9.72 ± 0.76 <sup>b</sup>	34.67 ± 2.16 <sup>b</sup>	100.7 ± 9.01 <sup>a</sup>	28.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	35.0 ± 18.96 <sup>a</sup>	8.56 ± 6.76 <sup>a</sup>
C 1290		3.11 ± 0.32 <sup>bc</sup>	9.07 ± 0.75 <sup>b</sup>	33.33 ± 1.21 <sup>b</sup>	108.8 ± 14.0 <sup>ab</sup>	27.3 ± 2.9 <sup>a</sup>	35.2 ± 15.69 <sup>a</sup>	14.08 ± 3.66 <sup>a</sup>
C 41.3		2.02 ± 0.12 <sup>a</sup>	7.43 ± 0.44 <sup>a</sup>	22.0 ± 1.16 <sup>a</sup>	109.2 ± 6.82 <sup>a</sup>	33.7 ± 0.28 <sup>a</sup>	22.9 ± 9.91 <sup>a</sup>	24.50 ± 6.54 <sup>a</sup>
C 541	14 en SBF	2.62 ± 0.72 <sup>ab</sup>	8.33 ± 0.49 <sup>a</sup>	25.17 ± 1.47 <sup>a</sup>	101.1 ± 23.07 <sup>ab</sup>	33.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	44.4 ± 33.2 <sup>a</sup>	14.39 ± 6.93 <sup>a</sup>
C 823		3.29 ± 0.69 <sup>b</sup>	8.33 ± 1.1 <sup>a</sup>	25.17 ± 3.43 <sup>a</sup>	77.78 ± 9.91 <sup>b</sup>	33.1 ± 0.30 <sup>a</sup>	39.95 ± 16.2 <sup>a</sup>	10.26 ± 6.51 <sup>a</sup>
C 1290		2.82 ± 0.55 <sup>ab</sup>	7.33 ± 0.76 <sup>a</sup>	22.33 ± 2.94 <sup>a</sup>	81.51 ± 17.7 <sup>ab</sup>	32.9 ± 1.72 <sup>a</sup>	36.9 ± 15.24 <sup>a</sup>	18.77 ± 10.63 <sup>a</sup>

Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar; n=20. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Eritr, eritrocitos; Hb, hemoglobina; Ht, hematocrito; VCM, volumen corpuscular medio; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; Gluc, glucosa plasmática; Cort, cortisol plasmático.

y hematocrito obtenidos a lo largo de la presente investigación, se encuentran dentro de los valores reportados para *A. gigas* (Tavares-Dias *et al.*, 2007; Drumond *et al.*, 2010; Bezerra *et al.*, 2014).

Durante todo el periodo de adaptación al SBF, los paiches del tratamiento C823, mostraron mayor número de eritrocitos en comparación a los paiches del grupo control. Lim *et al.* (2000), reportaron un incremento significativo en el número de eritrocitos para juveniles de *Ictalurus punctatus*, alimentados con 3000 mg de vitamina C Kg<sup>-1</sup>, asimismo, en juveniles de *Colossoma macropomum*, alimentados con suplemento de 100 mg vitamina C Kg<sup>-1</sup>, mostraron un incremento en el número de eritrocitos (Aride *et al.*, 2010). Esto concuerda con lo reportado por Dinning (1962) y Cox (1968), quienes indican que la vitamina C posee un efecto directo sobre la eritropoyesis. El hecho de que el incremento significativo del número de eritrocitos de los paiches del tratamiento C823 sobre los paiches del tratamiento C41.3 (control), se haya evidenciado durante el periodo de adaptación al SBF, pueda interpretarse como un efecto positivo del AA sobre la adaptación fisiológica al SBF, debido a que el estrés generalmente, incrementa los requerimientos de AA de los peces (Wedemeyer, 1969; Dabrowski, 1992).

En el periodo de 14 días después del traslado al SBF, se puede notar una caída en los niveles de hemoglobina y hematocrito, dicha caída tuvo consecuencias en los valores del volumen corpuscular medio (VCM), y en un aumento de la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) (Tabla 7). La disminución del VCM, quiere decir que el volumen de los eritrocitos ha disminuido, mientras que como medida compensatoria el aumento de la CHCM, indica que la concentración de hemoglobina promedio en los eritrocitos se ha incrementado (Tavares-Dias y Moraes, 2004), lo cual sucede en los paiches del tratamiento C823 durante el periodo de adaptación al SBF. Resultados similares han sido reportados por Andrade *et al.* (2007), en *Arapaima gigas*, los cuales mostraron una disminución significativa del VCM y un ligero aumento de la CHCM en paiches alimentados con 800 mg AA Kg<sup>-1</sup> al ser comparados con paiches del grupo control. La respuesta en las variaciones de los valores de VCM y CHCM, podrían estar influenciadas por la concentración de vitamina C en la dieta, teniendo un efecto positivo en un posible incremento de la capacidad de respuesta hematológica del pez.

En lo referente al número de trombocitos y al conteo total y diferencial de leucocitos (Tabla 8), los paiches del grupo C823 y C1290 en el periodo de 4 días antes del traslado al SBF,

muestran un aumento significativo en el número de trombocitos, leucocitos, linfocitos, neutrófilos y monocitos con respecto al grupo control C41.3. A lo largo de la etapa en SBF, no hubo diferencias significativas en el número de eosinófilos entre los tratamientos (Tabla 8).

Menezes *et al.* (2006) reportaron resultados contrarios en el conteo de linfocitos de juveniles de paiches alimentados con 800 mg de vitamina C Kg<sup>-1</sup>, mostrando una disminución significativa en el número de linfocitos (10568.1 µL) comparados con la dieta control (12968.9 µL). En cuanto a los resultados del número trombocitos y leucocitos totales, sus resultados coinciden con los resultados de la presente investigación, al mostrar incrementos significativos favorables para el tratamiento con suplementación de 800 mg de vitamina C Kg<sup>-1</sup> respecto al grupo control. Finalmente, el número de trombocitos y leucocitos totales de los tratamientos C823 y C1290, son más elevados que los reportados por Menezes *et al.* (2006), no obstante, el número de trombocitos son inferiores en un 50% aproximadamente al número de trombocitos (46097 µL) reportados por Tavares-Dias *et al.* (2007) para juveniles de *A. gigas* de 793.4 g de peso promedio, cabe aclarar que en el estudio realizado por Tavares-Dias *et al.* (2007), el número de trombocitos presentó gran dispersión. Por lo tanto, se puede inferir que el número de trombocitos y leucocitos en *A. gigas*, muestran una elevada variabilidad.

Los leucocitos, poseen la capacidad de almacenar gran cantidad de vitamina C, sugiriendo que la vitamina C, cumple una función de protección en las células de la respuesta inmune contra el daño oxidativo (Verlhac *et al.*, 1998). Las altas concentraciones de AA protegen las funciones de los leucocitos, reduciendo los efectos deletéreos del sistema inmunológico, evidencia de ello son los resultados obtenidos por Ortuño *et al.* (2003), los cuales concluyen que existe una protección de las funciones leucocitarias en *Sparus aurata*, alimentadas con una elevada concentración de vitamina C (3000 mg AA Kg<sup>-1</sup>) cuando fueron expuestos a estresores comunes en la acuicultura, como las altas densidades. Esta protección contra el daño oxidativo, en los leucocitos se asume en los paiches de los grupos C541, C823 y C1290, al presentar mayor número en el conteo total y diferencial de leucocitos en comparación al grupo control C41.3, luego de 7 días después de su traslado al SBF. Posteriormente, a los 14 días después del traslado al SBF, los paiches dejan de mostrar diferencias significativas entre los tratamientos para el conteo total y diferencial de leucocitos, pero sí una diferencia numérica que es más evidente entre los paiches del tratamiento control y los paiches del tratamiento C823.

**Tabla 8: Trombocitos, leucocitos totales y conteo diferencial de leucocitos de *Arapaima gigas*, 4 días previos al SBF, y a los 7 y 14 de cultivo.**

Vitamina C (mg. Kg <sup>-1</sup> )	Período (días)	Trom (μL)	Leuc (μL)	Linf (μL)	Neutr (μL)	Mon (μL)	Eosi (μL)
C 41.3		13698 ± 871 <sup>a</sup>	11466 ± 370 <sup>a</sup>	9217 ± 573 <sup>a</sup>	1525 ± 124.2 <sup>a</sup>	685 ± 187 <sup>a</sup>	39 ± 67.9 <sup>a</sup>
C 541	4 antes SBF	19417 ± 2726 <sup>ab</sup>	15463 ± 402 <sup>b</sup>	11983 ± 524 <sup>ab</sup>	2425 ± 284 <sup>ab</sup>	983 ± 339 <sup>ab</sup>	51 ± 87.7 <sup>a</sup>
C 823		22119 ± 2635 <sup>b</sup>	19210 ± 1654 <sup>c</sup>	14225 ± 1402 <sup>bc</sup>	2942 ± 215 <sup>b</sup>	1780 ± 78.5 <sup>c</sup>	263 ± 138.5 <sup>a</sup>
C 1290		22692 ± 3801 <sup>b</sup>	19583 ± 2098 <sup>c</sup>	14868 ± 1394 <sup>c</sup>	3021 ± 619 <sup>b</sup>	1363 ± 305 <sup>bc</sup>	291 ± 96.8 <sup>a</sup>
C 41.3		12656 ± 2638 <sup>a</sup>	11775 ± 1176 <sup>a</sup>	8786 ± 896 <sup>a</sup>	2338 ± 89.2 <sup>a</sup>	601.8 ± 217.1 <sup>a</sup>	50 ± 111.9 <sup>a</sup>
C 541	7 en SBF	18026 ± 1892 <sup>b</sup>	15392 ± 1055 <sup>b</sup>	11442 ± 841 <sup>b</sup>	2563 ± 276 <sup>ab</sup>	1230 ± 334 <sup>b</sup>	157 ± 137 <sup>a</sup>
C 823		29165 ± 3278 <sup>c</sup>	19246 ± 1474 <sup>c</sup>	13928 ± 972 <sup>c</sup>	3372 ± 763 <sup>bc</sup>	1829 ± 301 <sup>c</sup>	117 ± 107.3 <sup>a</sup>
C 1290		27505 ± 1959 <sup>c</sup>	20143 ± 2053 <sup>c</sup>	14804 ± 1537 <sup>c</sup>	3533 ± 519 <sup>c</sup>	1660 ± 164.9 <sup>bc</sup>	146 ± 184.9 <sup>a</sup>
C 41.3		14401 ± 751 <sup>a</sup>	11541 ± 1262 <sup>a</sup>	8494 ± 762 <sup>a</sup>	2461 ± 386 <sup>a</sup>	523 ± 161.5 <sup>a</sup>	62.7 ± 125.5 <sup>a</sup>
C 541	14 en SBF	19388 ± 4172 <sup>ab</sup>	14188 ± 3479 <sup>a</sup>	10459 ± 2558 <sup>a</sup>	2759 ± 850 <sup>a</sup>	898 ± 381 <sup>a</sup>	72 ± 84.8 <sup>a</sup>
C 823		25690 ± 3296 <sup>c</sup>	16447 ± 2683 <sup>a</sup>	11911 ± 2048 <sup>a</sup>	3113 ± 599 <sup>a</sup>	1268 ± 602 <sup>a</sup>	156 ± 147.9 <sup>a</sup>
C 1290		22167 ± 3402 <sup>bc</sup>	15301 ± 2424 <sup>a</sup>	11113 ± 1930 <sup>a</sup>	2842 ± 509 <sup>a</sup>	1166 ± 299 <sup>a</sup>	180 ± 185.5 <sup>a</sup>

Dieta control, C 41.3= 41.3 mg Ácido Ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup>; C 541= 541 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 823= 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>; C 1290= 1290 mg AA Kg<sup>-1</sup>. Media ± desviación estándar; n=20. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes entre tratamientos ( $p < 0.05$ ). Trom, trombocitos; Leuc, leucocitos; Linf, linfocitos; Neutr, neutrófilo; Mon, monocitos; Eosi, eosinófilos.

Por otro lado, el constante y significativo incremento del número de trombocitos totales, durante todo el experimento, en los tratamientos C823 y C1290 con respecto al tratamiento control C41.3, puede representar una movilización de los trombocitos de sus lugares de reserva para actuar en los mecanismos de defensa (Tavares-Dias y Moraes, 2004).

Durante los 4 días antes y 7 días después del traslado al SBF, los paiches de los tratamientos C823 y C1290, muestran un aumento significativo en el número de neutrófilos y monocitos con respecto a los paiches del tratamiento control, sin embargo a los 14 días después del traslado al SBF, no hubo diferencias significativas en el número de neutrófilos y monocitos.

En esencia, los leucocitos son la primera línea de defensa de la respuesta inmunológica innata en los vertebrados, incluido los peces, resultando muy evidente que las condiciones estresantes causen una alteración en su número (Davis *et al.*, 2008). Los cambios en el perfil de leucocitos son generados por el estrés y pueden estar directamente relacionados con los niveles de hormonas del estrés. El incremento de los niveles de glucocorticoides conduce al aumento del número de neutrófilos (neutrofilia) y a la disminución del número de linfocitos (linfopenia), por lo que se ha considerado que el aumento de la proporción entre los neutrófilos y los linfocitos (N:L), sirve como un indicador de respuesta al estrés (Pulsford *et al.*, 1994; Harris y Bird, 2000; Wojtaszek *et al.*, 2002).

Todos los tratamientos, incluido el control, a los 7 días luego del traslado al SBF muestran neutrofilia ligada a una linfopenia, este aumento de la proporción de N:L indica un tipo de respuesta al estrés, igualmente el aumento en la proporción N:L del tratamiento control C41.3, fue claramente mayor que el aumento en la proporción N:L del tratamiento C823, lo que sugiere que los paiches alimentados con una concentración de 823 mg AA Kg<sup>-1</sup>, no sufrieron mayor alteración por el estrés al cambio de sistema comparados con los paiches del grupo control.

Long *et al.* (2015) reportaron que los parámetros hematológicos como el número de eritrocitos, número de leucocitos, hemoglobina y hematocrito, mostraron una disminución, aunque no significativa en juveniles de tilapia (GIFT) cultivados en sistemas de biofloc en comparación a un sistema con recambio de agua.

Sin embargo, la invariabilidad en los parámetros hematológicos entre los juveniles de tilapia cultivados en un sistema de biofloc y en un sistema con recambio de agua, en el experimento de Long *et al.* (2015), ocurre en un periodo posterior al proceso de adaptación fisiológica, dado que las muestras de sangre fueron colectadas al final del experimento. En base a lo



expuesto, los presentes resultados pretenden mostrar esas posibles variaciones en el perfil hematológico en el proceso de adaptación a sistemas de biofloc en alevines de *A. gigas* alimentados con diferentes concentraciones de vitamina C.

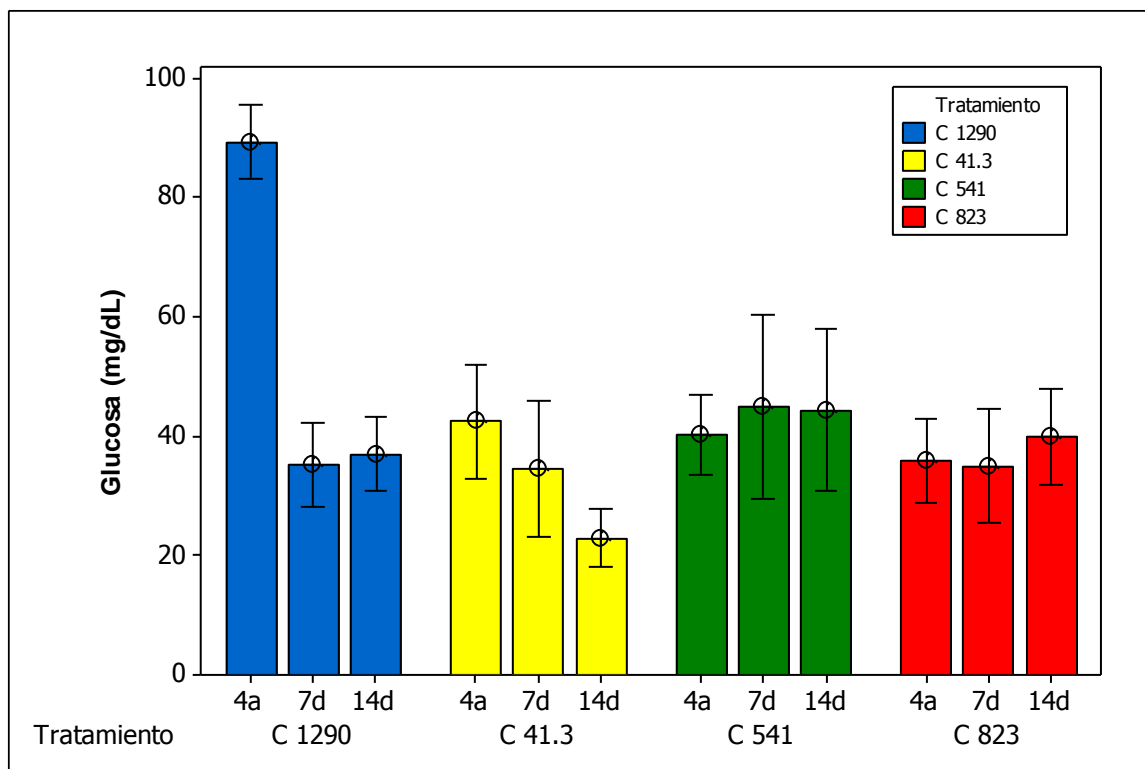
#### **4.3.2 Parámetros metabólicos (glucosa y cortisol)**

Los niveles de cortisol y glucosa en plasma sanguíneo, son utilizados ampliamente como indicadores de respuesta primaria y secundaria al estrés, respectivamente. En la Tabla 7 se observa que solamente en el periodo de 4 días antes del traslado al SBF, los paiches del tratamiento C1290 muestran una mayor concentración ( $p < 0.05$ ) en la concentración glucosa en plasma (mg/dL), en comparación con los demás tratamientos. Asimismo, en el periodo de 4 días antes del traslado al SBF, los paiches de los tratamientos C541, C823 y C1290, muestran una menor concentración ( $p < 0.05$ ) de cortisol en plasma (ng/mL), comparado con los paiches del tratamiento control. Falcon *et al.* (2007), reportaron que concentraciones de 600 y 1200 mg AA Kg<sup>-1</sup> de alimento en alevines de tilapia (*Oreochromis niloticus*), presentan una menor concentración de cortisol en plasma antes y después de un evento estresante (disminución de temperatura), en comparación con tilapias alimentadas con una dieta control. Asimismo, obtuvieron que la suplementación de vitamina C no tuvo un efecto en la concentración de glucosa en plasma.

En general los resultados de los niveles de cortisol en plasma no mostraron un efecto de incremento de la glucosa en plasma, además no se evidenció ningún tipo de relación entre los niveles de cortisol y glucosa en plasma. Resultados similares han sido obtenidos por Brandão *et al.* (2006), quienes tampoco obtuvieron una relación entre los niveles de cortisol y glucosa en juveniles de *A. gigas*, durante el enfrentamiento a estresores agudos de prácticas acuícolas de rutina.

Los cambios en la concentración de glucosa en plasma por la exposición a corticosteroides en peces teleósteos, son variables pudiendo incrementar, disminuir o permanecer constantes y además las mediciones de la concentración de glucosa en plasma, proveen sólo una fotografía estática de la situación metabólica y no se toma en consideración su dinámica en las funciones metabólicas pudiendo enmascarar los efectos del cortisol (Mommsen *et al.*, 1999).

Los paiches del tratamiento C1290, muestran una hiperglicemia en el periodo de 4 días previos del traslado al SBF (Figura 7), reflejada en una mayor concentración de glucosa en plasma en comparación a los demás tratamientos ( $p < 0.05$ ).

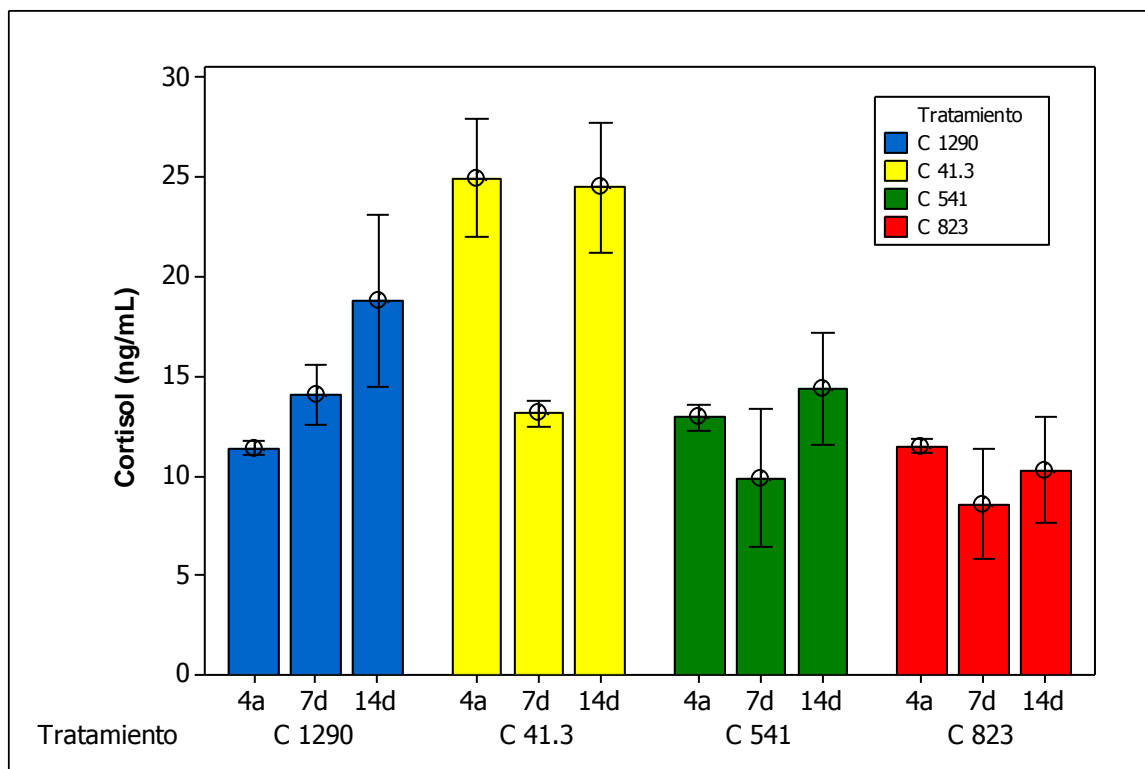


**Figura 7: Concentraciones de glucosa ( $\text{mg dL}^{-1}$ ) en plasma de *Arapaima gigas*, a los 4 días previos, y a los 7 y 14 días del cultivo en biofloc . 4a, cuatro días antes del traslado al SBF; 7d, siete días después del traslado al SBF; 14d, catorce días después del traslado al SBF. Media  $\pm$  desviación estándar.**

Como se mencionó anteriormente, la concentración de glucosa en plasma, puede ser sólo una fotografía de la situación metabólica en ese instante. No obstante, Mommsen *et al.* (1999) sugieren que una elevación de la glucosa en plasma, podría permitir al pez, resistir a una situación de estrés, lo cual es parte del mecanismo de acción de la respuesta al estrés, preparando a los paiches del tratamiento C1290 a una situación hostil.

Las diferentes dietas con suplemento adicional de vitamina C, no mostraron un efecto en la disminución de la concentración de glucosa en plasma de los paiches pertenecientes a todos los tratamientos. Menezes *et al.* (2006) y Andrade *et al.* (2007), no obtuvieron una disminución en la concentración de glucosa en plasma en *A. gigas*, alimentados con concentraciones de 800 y 1200  $\text{mg AA Kg}^{-1}$ , respectivamente.

En el periodo de 4 días antes del traslado al SBF, los paiches de los tratamientos C541, C823 y C1290, mostraron significativamente, menores concentraciones de cortisol en plasma comparados con los paiches del grupo C41.3 (Tabla 7). Las concentraciones del cortisol en plasma reportadas por Gomes (2007) para juveniles de *A. gigas*, son similares a las concentraciones de cortisol obtenidas en la presente investigación.



**Figura 8: Concentraciones de cortisol ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) en plasma de *Arapaima gigas*, a los 4 días previos, y a los 7 y 14 días del cultivo en biofloc.** 4a, cuatro días antes del traslado al SBF; 7d, siete días después del traslado al SBF; 14d, catorce días después del traslado al SBF. Media  $\pm$  desviación estándar.

El periodo de 14 días después del traslado al SBF, coincide en los mayores picos de amonio en el sistema, en dicho periodo, no hubo una respuesta en la concentración de cortisol en plasma correspondiente a los picos de la concentración amonio (Figura 8). Igualmente Brandão *et al.* (2006), reportaron que en juveniles de paiche no hubo una elevación en los niveles del cortisol en plasma, por un estrés agudo causado por una concentración de amonio elevada.

El incremento en niveles de cortisol, empieza a un inicio de una situación de estrés crónico y decaen a valores iniciales en pocos días (Tort *et al.*, 2011), ocasiona una serie de cambios fisiológicos que pretenden adaptar al organismo a las nuevas condiciones en un intento por recuperar la homeostasis en desequilibrio (Mommsen *et al.*, 1999). Los cambios fisiológicos conllevan a un costo metabólico, que puede afectar el crecimiento, lo cual dependerá del grado de severidad del agente estresor (Schreck, 2000).

El aumento de la concentración de cortisol en plasma en *A. gigas*, durante una situación estresante, es alrededor de cuatro veces su valor después de la exposición a un estresor

agudo, dicho incremento es bajo comparado con otras especies de peces (Gomes, 2007), parece ser que la baja liberación de cortisol en *A. gigas* en comparación con otras especies, podría deberse a una mayor tolerancia al estrés.

La alteración de la homeostasis se presenta cuando los peces son expuestos a condiciones de estrés, donde los niveles de cortisol elevados, pueden afectar negativamente los mecanismos de defensa inmunitaria (Barton y Iwana, 1991), en efecto, Belo *et al.* (2012), determinaron que 500 mg AA Kg<sup>-1</sup> mantiene los niveles de cortisol constantes y aumenta la respuesta inmunológica de juveniles de *Piaractus mesopotamicus*, además sus resultados muestran que los niveles elevados de cortisol poseen un efecto inhibitorio sobre el número de macrófagos, y con ello un estado fisiológico menos tolerante a las situaciones de estrés.

En el trabajo realizado por Azim y Little (2008), la liberación del cortisol en juveniles de tilapia (*Oreochromis niloticus*), no varió significativamente entre un sistema de biofloc y un sistema con recambio de agua, sin embargo, luego de un evento estresante, los niveles de cortisol se incrementaron 8 veces en los peces provenientes del sistema de biofloc y el incremento en los peces provenientes del sistema con recambio de agua sólo se incrementó 5 veces, sugiriendo que los peces en sistemas de biofloc, pueden ser más susceptibles a estresarse.

La asimilación de la vitamina C por el pez, durante un periodo prudente, puede beneficiar la respuesta fisiológica frente a condiciones estresantes. En efecto, Barros *et al.* (2014), reportaron que los periodos de administración de AA en la dieta, pueden modificar las concentraciones de cortisol en plasma de tilapia, *Oreochromis niloticus*, luego de un estrés agudo por transporte, donde las tilapias del tratamiento con mayor periodo de alimentación con altas concentraciones de AA en el alimento, liberaron significativamente menos cortisol en plasma, luego de unas horas al evento estresante, asimismo, el tiempo de regulación de los niveles de cortisol en plasma, fue significativamente más rápido en las tilapias de los tratamientos con mayor periodo de alimentación de AA, comparados con los peces de un tratamiento donde fueron alimentados con AA por un periodo más breve. Del mismo modo, la producción de cortisol conduce a una disminución del ácido ascórbico (Wedemeyer, 1969), por lo que esta vitamina podría ser requerida en mayores concentraciones.

Con relación al periodo de 14 días después de su traslado al SBF, todos los paiches, mostraron un ligero incremento de la concentración de cortisol en plasma. No obstante, los paiches del grupo control C41.3, muestran un incremento de la concentración de cortisol en

plasma, mucho más pronunciada y una variación más amplia, comparados con los tratamientos con suplemento adicional de AA en la dieta (Figura 8). Según Henrique *et al.* (1998), juveniles de *Sparus aurata* alimentados con una dieta sin suplemento adicional de vitamina C, mostraron un aumento continuo y variación más amplia en comparación de los peces alimentados con 100 mg AA Kg<sup>-1</sup>, después de un estrés por hipoxia. Sugiriendo que el AA, puede jugar un papel en la liberación de cortisol y con ello influenciar en la capacidad del pez para responder al estrés, implicando un mejor mantenimiento de la homeostasis (Barton, 2002).

Finalmente, los resultados indican que altas concentraciones de AA en la dieta, por un periodo de 8 semanas, mejoran el crecimiento y el estado fisiológico en alevinos de *Arapaima gigas*, en el proceso de adaptación al sistema de biofloc. Siendo la concentración de 823 mg AA Kg<sup>-1</sup> de alimento, la que mostró mejores beneficios en la respuesta al estrés en *A. gigas*.

## V. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos nos llevan a aceptar la hipótesis que menciona que: el suplemento adicional de vitamina C en la dieta mejora la adaptación fisiológica y los parámetros productivos de alevines de paiche, *Arapaima gigas*, cultivados en sistemas de biofloc.
2. Concentraciones de 541, 823 y 1290 mg de ácido ascórbico (AA) Kg<sup>-1</sup> de alimento en un periodo de 8 semanas aproximadamente, mejoraron el crecimiento y el estado fisiológico en alevinos de *Arapaima gigas*, generando significativamente menor liberación y variación de cortisol en plasma, mejora de la tolerancia al estrés oxidativo y una inmunoestimulación, basados en la mejora significativa de los parámetros células rojas sanguíneas (número de Eritrocitos, Hb y Ht,) y en el aumento significativo en el número de células de la defensa orgánica (Leucocitos y Trombocitos), respectivamente.
3. La adaptación fisiológica de alevines de *A. gigas* al sistema de biofloc (SBF), produjo alteraciones en los parámetros hematológicos y cambios en la concentración de cortisol y glucosa en plasma sanguíneo, principalmente relacionadas a la calidad del agua en el SBF durante las primeras semanas de estabilización del sistema.
4. Los paiches alimentados previamente con 823 mg AA Kg<sup>-1</sup> (C823) de alimento como suplemento adicional de vitamina C, mostraron una mejor respuesta al estrés reflejados en los mejores valores de los parámetros hematológicos (Hb, Ht, Eritrocitos, Leucocitos, Trombocitos), menor variación del cortisol en plasma y mayor crecimiento durante su adaptación al SBF en comparación a los paiches que no lo recibieron (C41.3).

## VI. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se hace las siguientes recomendaciones:

1. Adicionar 823 mg AA Kg<sup>-1</sup> en la dieta de alevines de paiche, y alimentarlos previamente durante 8 semanas antes de su puesta en un sistema de biofloc (SBF), con la finalidad de mejorar su tolerancia al estrés e incrementar su rendimiento productivo en el proceso de adaptación al SBF.
2. Prolongar el periodo de evaluación post traslado al SBF a un mes en alevines de *Arapaima gigas*, con el objetivo de verificar el tiempo de resistencia de la vitamina C a través de los parámetros productivos y hematológicos.
3. Determinar las concentraciones de lactato en futuras investigaciones, con el fin de relacionar el destino metabólico de la glucosa en plasma frente a eventos estresantes en alevines de *A. gigas*.
4. Realizar más investigaciones sobre el perfeccionamiento del cultivo de *A. gigas* en sistema de biofloc, como la evaluación de la concentración propicia de sólidos en el SBF, el manejo de densidades de cultivo, son temas de investigación, que aportarían al proceso de producción de esta especie en sistemas de biofloc.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu Bakar, NS; Nasir, NM; Lananan, F; Abdul Hamid, SH; Lam, SS; Jusoh, A. 2015. Optimization of C/N ratios for nutrient removal in aquaculture system culturing African catfish, (*Clarias gariepinus*) utilizing Bioflocs Technology. *International Biodeterioration & Biodegradation* 30: 1-7.
- Adham, KG; Hashem, HO; Abu-Shabana, MB; Kamel, AH. 2000. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Nutrition*. 6: 129–139.
- Affonso, EG; Silva Eda, C; Tavares-Dias, M; de Menezes, GC; de Carvalho, CS; Nunes Eda, S; Ituassú, DR; Roubach, R; Ono, EA; Fim, JD; Marcon, JL. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 147: 383–388.
- Akifumi, E; Silva, E; Campos, J. 2008. Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações energia:proteína em juvenis de pirarucu. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília 43 (2): 249-254.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. *Official and Tentative Methods of the AOAC International*. Maryland.
- APHA (American Public Health Association). 1998. *Standard methods for the examination of the water and wastewater*. Washington, EU. 22 ed.
- Aride, PHR; Ferreira, MS; Duarte, RM; Oliveira, AM. 2010. Ascorbic acid (vitamin C) and iron concentration in tambaqui, *Colossoma macropomum*, iron absorption. *Journal of the World Aquaculture Society* 41 (2): 291-297.
- Ashe, D; Tomasso, JR; Eversole, AG. 1996. Toxicity of ammonia to fingerling white bass: effect of selected environments on uptake dynamics. *The Progressive Fish-Culturist* 58: 277-280.
- Atwood, HL; Fontenot, QC; Tomasso, JR; Isely, JJ. 2001. Toxicity of nitrite to Nile tilapia: effect of fish size and environmental chloride. *North American Journal of Aquaculture* 63: 49–51.



- Avnimelech, Y. 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227-235.
- Avnimelech, Y. 2006. Bio-filters: the need for an new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering* 34:172–178.
- Avnimelech, Y. 2009. *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Azim, ME; Little, DC. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283: 29-35.
- Andrade, JIA; Ono, EA; de Menezes, GC; Brasil, EM; Roubach, R; Urbinati, EC; Affonso, EG. 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology* 146(1):576–580.
- Barnes, MJ; Kodicek, E. 1972. Biological hydroxylations and ascorbic acid with special regard to collagen metabolism. *Vitam. Horm.* 30: 1–43.
- Barros, MM; Falcon, DR; Orsi RO; Pezzato, LE; Fernandes Jr., AC; Guimarães, IG; Fernandes Jr., A; Padovani, CR; Sartori, MMP. 2014. Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed  $\beta$ -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 39: 188-195.
- Barton, BA; Iwama, GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Disease* 1: 3-26.
- Barton, BA; Zitzow, RE. 1995. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *Prog. Fish-Cult.* 57:267–276.
- Barton, BA. 2002. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525.
- Barton, BA; Ribas, L; Acerete, L; Tort, L. 2005. Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research* 36: 172-179.

- Belo, MA; Moraes, JE; Soares, VE; Martins, ML; Brum, CD; Moraes, FR. 2012. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47(5): 1015- 1021.
- Bezerra, RF; Soares, MCF; Santos, AHG; Carvalho EVM; Coelho, LCB. 2014. Seasonality influence on biochemical and hematological indicators of stress and growth of pirarucu (*Arapaima gigas*) an amazonian air-breathing fish. *The Scientific World Journal*.
- Biscudo, AJA; Sado, RY; Cyrino, JEP. 2010. Growth performance and body composition of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) in response to dietary protein and energy levels. *Aquaculture Nutrition* 16: 213-222.
- Brandão, FR; Gomes, LC; Chagas, EC. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica* 36(3): 349-356.
- Cavero, BAS; Pereira-Filho, M; Roubach, R; Ituassu, DR; Gandra, AL; Crescêncio, R 2003. Stocking density effect on alimentary efficiency in juveniles pirarucu (*Arapaima gigas*) in a confined environment. *Acta Amazonica* 33: 631-637.
- Cavero, BAS; Pereira-Filho, M; Bordinhon, AM; Fonseca, FAL; Ituassú, DR; Roubach, R; Ono, EA. 2004. Tolerance of pirarucu juveniles to increasing ammonia concentration in a closed environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39 (5): 513- 516.
- Chagas, EC; Val, AL. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(3): 397-402.
- Chagas, EC; Val, AL. 2006. Ascorbic acid reduces the effects of hipoxia on the Amazon fish tambaqui. *Journal of Fish Biology* 69: 608-612.
- Chatterjee, IB. 1978. Ascorbic acid metabolism. *World Rev. Nutr. Diet* 30: 6.
- Chen, R; Lochmann, R; Goodwin, A; Praveen, K; Dabrowski, K; Lee, KJ. 2003. Alternative complement activity and resistance to heat stress in golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) are increased by dietary vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. *The Journal of Nutrition* 133: 2281-2286.
- Chew, S; Wilson, J; Ip, Y; Randall, D. 2005. Nitrogen excretion and defense against ammonia toxicity. *Fish Physiology. Volume XXI; The Physiology of Tropical Fishes*. Academic Press, New York, USA. 307-379.

- Chung, KS. 2001. Adaptabilidad ecofisiológica de organismos acuáticos tropicales a cambios de salinidad. *Revista Biología Tropical*. 49(1): 9-13.
- Chien, LT; Hwang, DF. 2001. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 91-97.
- Chu-Koo, F; Valdivieso, M; Tello, S; Rebaza, M; Rebaza, C; Deza, S; Alcántara, FB. 2007. Análisis económico de la crianza del paiche o pirarucu (*Arapaima gigas*) en jaulas flotantes en un lago amazónico peruano. *Infopesca Internacional*, 30 (1):28-31.
- Collier, HB. 1944. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal* 50:550-552.
- Cox, VE. 1968. The anemia of scurvy. In: Harris, RS; Wool, IG; Loraine, JA. Eds. , *Vitamins and Hormones* 26 Academic Press, New York, p. 635–651.
- Crab, R; Defoirdt, T; Bossier, P; Verstraete, W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 356- 357: 351-356.
- Crescêncio, R. 2001. Alimentary training of alevins pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), using alimentary attractions. *Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas*. p.35.
- Crescêncio, R; Ituassú, DR; Roubach, R; Pereira Filho, M; Cavero, BAS; Gandra, AL. 2005. Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(12):1217–1222.
- Cuaical, T; Vallejo, E; Franco, H; Sanguino, W. 2013. Efecto de la densidad de siembra y la adición de ácido ascórbico en el cultivo de *Osteoglossum bicirrhosum*. *Rev. MVZ Córdoba* 18(3): 3799-3806.
- Dabrowski, K. 1990. Gulonolactone oxidase is missing in teleost fish. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371:207–214.
- Dabrowski, K. 1992. Ascorbate concentration in fish ontogeny. *J. Fish Biol.* 40: 273–279.
- Dabrowski, K. 2001. *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms - Status and Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, Dabrowski, K. EU. 2ed. p.255-260.

- Davis, KB; Parker, NC. 1990. Physiological stress in striped bass: Effect of acclimation temperature. *Aquaculture* 91:349– 358.
- Davis, LE; Schreck, CB. 1997. The energetic response to handling stress in juvenil coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 126: 248. 258.
- Davis, AK; Maney, DL; Maerz, JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22: 760-772.
- Del Risco, M; Velásquez, J; Sandoval, M; Padilla, P; Moripinedo, L; Chu-Koo, F. 2008. Efecto de tres niveles de proteína dietaria en el crecimiento de juveniles de paiche, *Aparaima gigas* (Shinz, 1822). *Folia Amazónica* 17(1-2): 29-37.
- DengFwu, H; Tse-Kun, L. 2002. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Biochemistry & Molecular Biology* 131:1-7.
- Dinning, JS. 1962. Nutritional requirements for blood cell formation in experimental animals. *Physiol. Rev.* 42: 169–180.
- Drumond, GVF; Caixeiro, APA; Tavares-Dias, M; Marcon, JL; Affonso, EG. 2010. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. *Acta Amazonica* 40(3): 591-595.
- Ebeling, JM; Timmons, MB; Bisogni, JJ. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture.* 256: 346- 358.
- Emerenciano, M; Gaxiola, G; Cuzon, G. 2013. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry, biomass now-cultivation and utilization. In Matovic, M.D. Consultado 2 set. 2014. Disponible en [http://cdn.intechopen.com/pdfs/44409/In%20TechBiofloc\\_technology\\_bft\\_a\\_review\\_for\\_aquaculture\\_application\\_and\\_animal\\_food\\_industr.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/44409/In%20TechBiofloc_technology_bft_a_review_for_aquaculture_application_and_animal_food_industr.pdf)
- Falcon, DR; Barros, MM; Pezzato, LE; Sampaio, FG; Hisano, H. 2007. Physiological Responses of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, Fed Vitamin C- and Lipid-Supplemented Diets and Submitted to Low-Temperature Stress. *Journal of the World aquaculture society* 38 (2): 287-295.

- Fang, M; Shiau, SY. 2005. Dietary -ascorbic acid growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* 244:215-221
- Faramarzi, M. 2012. Effect of dietary vitamin C on growth and feeding parameters, carcass composition and survival rate of common carp (*Cyprinus carpio*). *Global Veterinaria* 8(5): 507-510.
- Flik, G; Klaren, H; Van den Burg, E; Metz, J; Huising M. 2006. CRF and stress in fish. *Endocrinology, General and Comparative* 146: 36-44.
- Fracalossi, DM; Allen, ME; Nichols, DK; Oftedal, OT. 1998. Nutrient requirements and interactions oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *The Journal of Nutrition* 128(1):1745–1751.
- Fracalossi, DM; Allen, ME; Yuyama, LK; Oftedal, OT. 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture* 192(2-4): 321–332.
- Gandra, AL. 2002. Estudo da frequência alimentar do pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829). Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- Goldenfarb, PB; Bowyer, FP; Hall, E; Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American journal of clinical pathology* 56(1):35-39.
- Gomes, LC. 2007. Physiological responses of pirarucu (*Arapaima gigas*) to acute handling stress. *Acta Amazonica* 37(4): 629- 634.
- Hamre, K; Waagbo, R; Berge, R.K; Lie, O. 1997. Vitamin C and E interact in juvenile Atlantic salmon. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 137–149.
- Halver, JE; Smith, RR; Tolbert, BM; Baker, EM. 1975. Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 258: 81–102.
- Halver, JE. 1989. Vitamin-C requirements for fish growth and health in progress in fish nutrition. *Proceedings of Symposium on Fish Nutrition, Keelung, Taiwan, September 6–7*, p. 27–39.

- Hardie, LJ; Fletcher, TC; Seccombes, CJ. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) . Aquaculture 95, 201–214.
- Harris, J; Bird, DJ. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. Veterinary Immunology and Immunopathology 77: 163–176.
- Hemre, GI; Lambertsen, G; Lie, O. 1991. The effect of dietary carbohydrates on the stress response in cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 95: 319 - 328.
- Henrique, MMF; Gomes, EF; Gouillou-Coustans, MF; Oliva-Teles, A; Davies, SJ. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture 161: 415-426.
- Imbiriba, EP. 1994. Reprodução, larva e alevinagem do pirarucú, *Arapaima gigas* (Cuvier). Recomendações básicas Belém-Brasil p. 21.
- Ituassú, DR; Filho, MP; Roubach, R; Crescêncio, R; Cavero, BAS; Gandra, AL. 2005. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu Crude protein levels for juvenile pirarucu. Pesquisa Agropecuária Brasileira 40(3):255–259.
- Jensen FB (2003). Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 135: 9–24.
- Larsson, A; Lehtinen, KJ; Haux, C. 1980. Biochemical and hematological effects of a titanium dioxide industrial effluent on fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 25: 427–435.
- Li, Y; Lovell, RT. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. The Journal of Nutrition 115(1):123–31.
- Li, MH; Robinson, EH. 1999. Dietary ascorbic acid requirement for growth and health in fish. Journal of Applied Aquaculture, Binghamton 9(2):53-79.
- Lin, MF; Shiau, SY. 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 244: 215- 221.
- Lim, C; Klesius, PH; Li, MH; Robinson, EH. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel carfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture 185: 313-327.

- Liu, H; Xie, S; Zhu, X; Lei, W; Han, D; Yang, Y. 2008 Effects of dietary ascorbic acid supplementation on the growth performance, immune and stress response in juvenile *Leiocassis longirostris* Günther exposed to ammonia. *Aquaculture Research* 39 (1): 1-11.
- Long, L; Yang, J; Li, Y; Guan, C; Wu, F. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 448: 135-141.
- Loyless, JC; Malone, RF. 1997. A Sodium Bicarbonate Dosing Methodology for pH Management in Freshwater-Recirculating Aquaculture Systems, *The Progressive Fish-Culturist* 59(3):198-205.
- Luo, GZ; Avnimelech, Y; Pan, YF; Tan, HX. 2013. Inorganic nitrogen dynamics in sequencing batch reactors using bioflocs technology to treat aquaculture sludge. *Aquacult. Eng.* 52: 73–79.
- Luo, GZ; Gao, Q; Wang, C; Liu, W; Sun, D; Li, L; Tan, H. 2014. Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422-423: 1-7.
- Martinez, M; Martinez, L; Rogelio, R. 2009. Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4(2): 158-178.
- Martins, ML. 1995. Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.* (28):563–568.
- McIntosh, D; Samocha TM; Jones ER; Lawrence AL; McKee DA; Horowitz S; Horowitz A. 2000. The effect of a bacterial supplement on the high-density culturing of *Litopenaeus vannamei* with low-protein diet in outdoor tank system and no water exchange. *Aquaculture Engineering* 21:215–227.
- Menezes, GC; Tavares-Dias, M; Ono, EA; de Andrade, JIA; Brasil, EM; Roubach, R; Affonso, EG. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 145(2):274–279.

- Mommsen, TP; Vijaian, MM; Moon, TW. 1999. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268.
- Montero, D; Marrero, M; Izquierdo, MS; Robaina, L; Vergara, JM; Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* 171:269-278.
- Moreau, R; Dabrowski, K. 1998. Fish acquired ascorbic acid synthesis prior to terrestrial vertebrate emergence. *Free Radical Biol. Med.* 25:989–990.
- National-Research-Council, 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington DC.
- Navarre, O; Halver, JE. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture* 79: 207–221.
- Niki, E, 1987. Interaction of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 498: 186–199.
- Oliveira-Júnior, AA; Tavares-Dias, M; Marcon, JL. 2009. Biochemical and hematological reference ranges for Amazon freshwater turtle, *Podocnemis expansa*, (Reptilia: Pelomedusidae), with morphologic assessment of blood cells. *Research in Veterinary Science* 86: 146-151.
- Oliveira, EG; Pinheiro, AB; de Oliveira, VQ; da Silva, ARM; de Moraes, MG; Rocha, ÍR. CB; Costa, FHF. 2012. Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture* 370-371: 96–101.
- Ono, EA; Nunes EDS; Cedano JCC; Filho, MP; Roubach, R. 2008. Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações energia: proteína em juvenis de pirarucu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(2): 249-254.
- Ortuño, J; Esteban, MA; Meseguer, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 14:145–156.
- Pickering, AD. 1981. Introduction: The Concept of Biological Stress. In: *Stress and fish*. Academic Press; 1:1-10.



- Piedrahita, RH. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* 226: 35–44.
- Pitaksong, P; Kupitta, P; Boonanuntanasarn S. 2012. The effects of vitamins C and E on the growth, tissue accumulation and prophylactic response to thermal and acidic stress of hybrid catfish. *Aquaculture Nutrition* 19:148–162.
- Poleo, G; Aranbarrio, JV; Mendoza, L; Romero, O. 2011. Cultivo de cachama blanca en altas densidades y en dos sistemas cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 46 (4):429–437.
- Pulsford, AL; Lemairegony, S; Tomlinson, M; Collingwood, N; Glynn, PJ. 1994. Effects of acute stress on the immune system of the Dab, *Limanda limanda*. *Comparative Biochemistry and Physiology C – Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 109: 129–139.
- Queiroz, HL.2000. Natural history and conservation of pirarucu, *Arapaima gigas*, in Amazonian várzea: Red giants in muddy waters. PhD thesis. Scotland, University of St Andrews.
- Rabello, D; Pereira, M; Roubach, R. 2005. Níveis de proteína bruta para juvenis de pirarucu. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília 40 (3): 255-259.
- Ranzani- Paiva, MJ; Pádua, SB; Tavares-Dias, M; Egami, MI. 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. ed. Alli- Maringá Eduem.p. 35-86.
- Ray, AJ; Lewis, BL; Browdy, CL; Leffler, JW. 2010a. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. *Aquaculture* 299:89-98.
- \_\_\_\_\_; Seaborn G; Leffler, JW; Wilde, SB; Lawson, A; Browdy, CL. 2010b. Characterization of microbial communities in minimal-exchange, intensive aquaculture systems and the effects of suspended solids management. *Aquaculture* 310:130–138.
- Rehulka, J. 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 190: 27-47
- Reid, SD; Perry, SF. 1991. The effects and physiological consequences of raised levels of cortisol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte  $\beta$ -adrenoreceptors. *Journal of Experimental Biology*. 158: 217-240.

- Reid, SG; Bernier, NJ; Perry, SF. 1998. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.* 120C:1–27.
- Ricker, W. 1979. Growth rates and models. *Fish Physiology*. Volume VIII; Bioenergetics and Growth. Academic Press, New York, USA. p.677-743
- Rifkind, JM; Abugo, O; Levy, A; Monticone, R; Heim, J. 1993. Formation of free radicals under hypoxia. In *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, Boca Raton FL. p. 509–525.
- Roubach, R; Miranda, A; Feitosa, N; Campos, E; Val, A. 1998. Aquaculture of tambaqui and its vitamin C requirements. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, (vitamin C): 45–50.
- Schreck, CB. 2000. Accumulation and long term effects of stress in fish. *The biology of animal stress*. CAB International, Wallingford, UK. GP. Moberg and JA. Mench, editors. p. 147–158.
- Scorvo-Filho, JD; Rojas, NET; Silva, CM; Konoike, T. 2004. Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei Osteoglossidae) e estufa e sistema fechado de circulação de água, no estado de São Paulo. *B. Inst. Pesca São Paulo* 30(2): 161- 170.
- Soares, MGM; Menezes, NA; Junk, WJ. 2006. Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia* 568:353-367.
- Soliman, AK; Jauncey, K; Roberts, RJ. 1985. Qualitative and quantitative identification of L-gulonolactone oxidase activity in some teleosts. *Aquacult. Fish. Manage* 1:249–256.
- Soliman, AK; Jauncey, K; Roberts, RJ. 1986. The effect of varying forms of ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 52: 1–10.
- Stevens, ED; Holeyton, GF. 1978. The partitioning of oxygen uptake from air and from water by the large obligate air-breathing teleost pirarucu (*Arapaima gigas*). *Can. J. Zool.* 56:974-976.
- Tavares-Dias, M; Moraes, FR. 2003. Características Hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “Pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Biosci. J.* 19(1): 107- 114.

- Tavares-Dias, M. 2004. Características bioquímicas de *Brycon cephalus* e *Brycon orbignyianus*, teleósteos dulciaquícolas brasileiros de importância econômica. CIVA2004: 282-285.
- Tavares-Dias, M; Mataqueiro, MI. 2004. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. Acta Scientiarum 26:157-162.
- Tavares-Dias, M; Moraes, FR. 2004. Hematología de peixes teleósteos. Eletronica e Arte Final. Ribeirao Preto-SP- p.144.
- Tavares-Dias, M; Moraes, FR. 2006. Hematological parameters for the *Brycon orbignyianus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. Hidrobiológica 16: 271-274.
- Tavares-Dias, M; Barcellos, JFM; Marcon, JL; Menezes, GC; Ono, EA; Affonso, EG. 2007. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. Electronic Journal of Ichthyology 2: 61-68.
- Timmons, MB; Ebeling, JM. 2010. Recirculating Aquaculture. NRAC Publication No. 401. Ithaca, NY, p. 948.
- Tomasso, JR; Simco, BA; Davis, KB. 1979. Chloride inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada 36: 1141-1144.
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. Developmental and Comparative Immunology 35: 1366-1375.
- Tratado de Cooperación Amazónica. 1999. Manual de piscicultura del paiche (*Arapaima gigas* Cuvier). Caracas, Venezuela. p.3-8.
- Tucker, CS. 1985. Channel catfish culture. Elsevier Scientific Publishers, New York.
- Verlhac, V; Obach, A; Gabaudan, J; Schüep, W; Hole, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunol. 8: 409-424.

- Wang, X; Kim, KW; Bai, SC; Huh, MD; Cho, BY. 2003. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture* 215: 203–211.
- Wedemeyer, G. 1969. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 29(2):1247–1251.
- Wedemeyer, GA. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman and Hall, New York, NY.
- Wedemeyer, GA; Barton, BA; McLeay, DJ. 1990. Stress and acclimation. In C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.), *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, p. 451–489.
- Wendelaar- Bonga, SE. 1997. The stress response in fish. *Physiology Rev.* 77(3):591-625.
- Weyts, FAA; Verburg-van Kemenade, BML; Flik, G. 1998. Characterisation of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. *General and Comparative Endocrinology* 111: 1-8.
- Weyts, FAA; Cohen, N; Flik, G; Verburg-van Kemenade, BML. 1999. Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 1-20.
- Wilson, RP; Poe, WE. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *Journal of Nutrition*. 103: 1359-1364.
- Wintrobe, MM. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51:32-49.
- Wise, DJ; Tomasso, JR; Brandt, TM. 1988. Ascorbic acid inhibition of nitrite-induced methemoglobinemia in channel catfish. *The Progressive Fish- Culturist* 50: 77-88.
- Wojtaszek, J; Dziewulska-Szwajkowska, D; Lozinska-Gabska, M; Adamowicz, A; Dzugaj, A. 2002. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *General and Comparative Endocrinology*, 125: 176–183.

- Xie, Z; Niu, C; Zhang, Z; Bao, L. 2006. Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 145(2):152–7.
- Xu, WJ; Pan, LQ; Zhao, DH; Huang, J. 2012. Preliminary investigation into the contribution of biofloc on protein nutrition of *Litopenaeus vannamei* fed with different dietary protein levels in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture* 350–353:147–153.
- Xu, WJ; Morris, TC; Samocha, TM. 2015. Effects of C/N ratio on biofloc development, water quality, and performance of *Litopenaeus vannamei* juveniles in a biofloc-based, high-density, zero- exchange, outdoor tank system. *Aquaculture* 453: 169-175.
- Zhou, Q; Wang, L; Wang, H; Xie, F; Wang, T. 2012. Effect of dietary C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Fish & Shellfish Immunology* 32: 969-975.
- Zydlewski, J; Wilkie, MP. 2013. Growth and osmoregulation. *Fish Physiology. Volume XXXII; Euryhaline Fishes*. Academic Press, Oxford, UK. p. 292-294.

## VIII. ANEXOS

Anexo 1: Unidades experimentales, pertenecientes al sistema de recirculación en acuicultura (SRA)



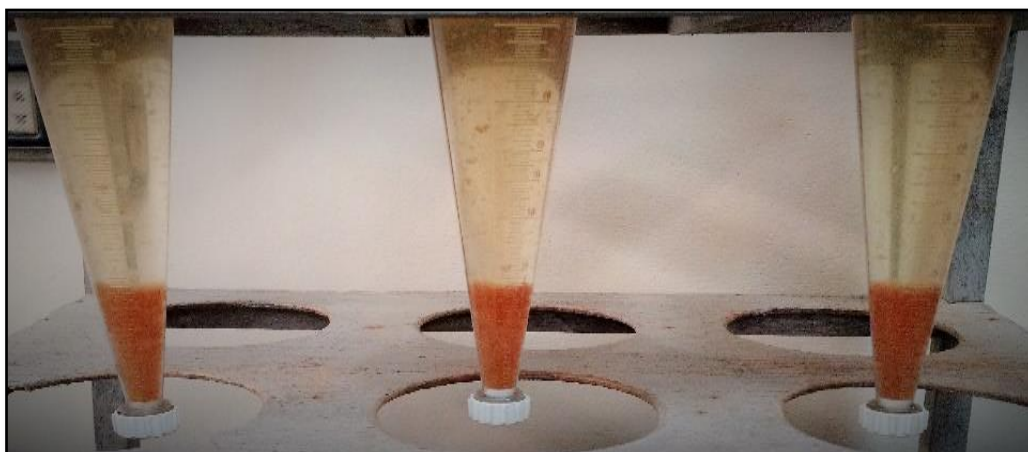
Anexo 2: Alevín de *Arapaima gigas* (paiche), instantes previos a la biometría:



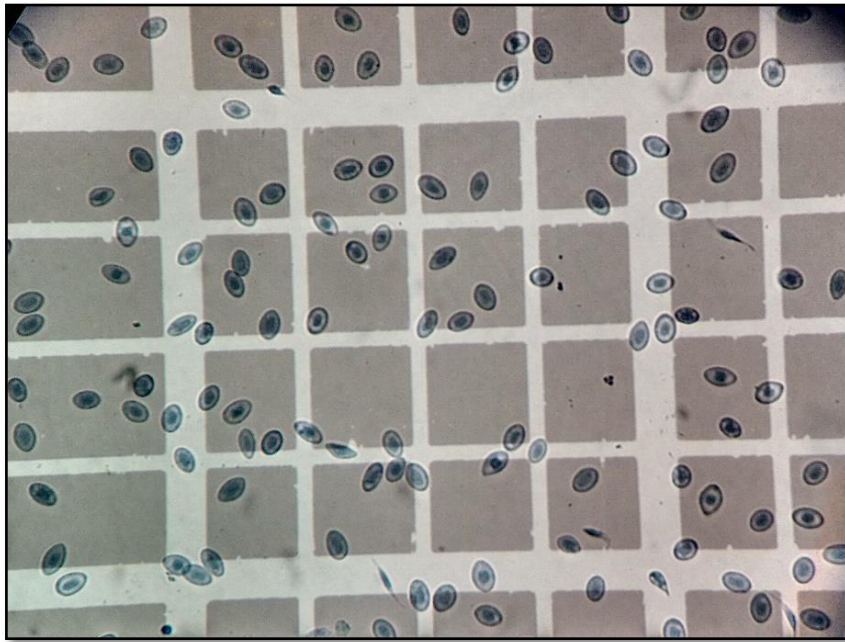
Anexo 3: Cultivo en sistema de tecnología biofloc, que se empleó de inóculo para la etapa experimental en SBF



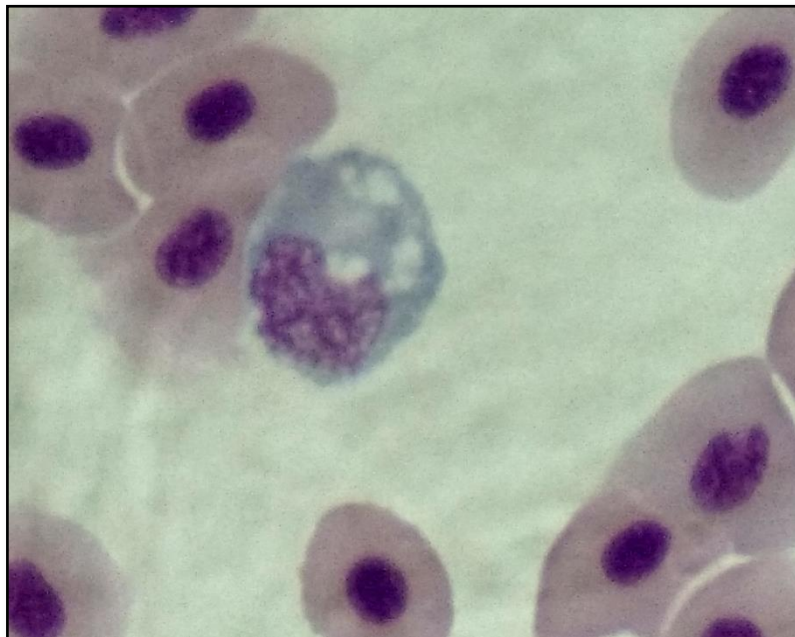
Anexo 4: Medición de los sólidos sedimentables en los conos de sedimentación Imhoff



Anexo 5: Conteo del número de eritrocitos en una cámara de Neubauer, en solución de formol citrato más azul de toluidina (1:200)

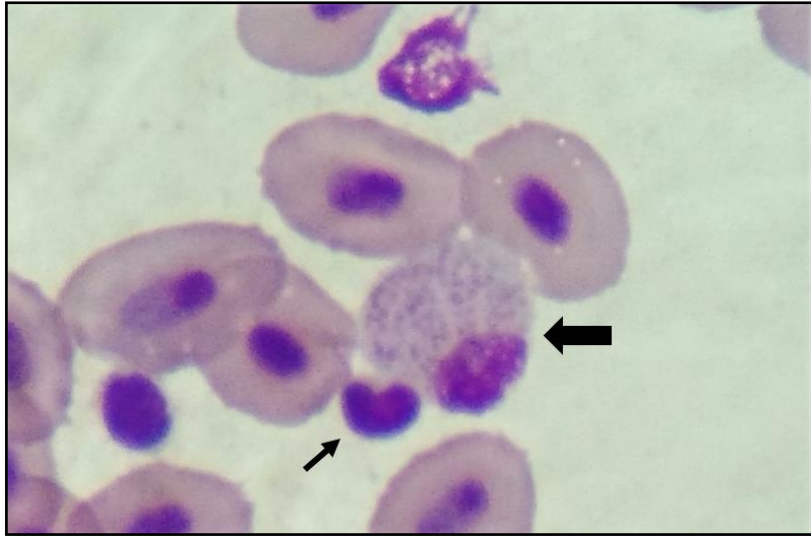


Anexo 6: Monocito de alevín de *Arapaima gigas*, en una extensión sanguínea con tinción May Grunwald- Giemsa- Wright.

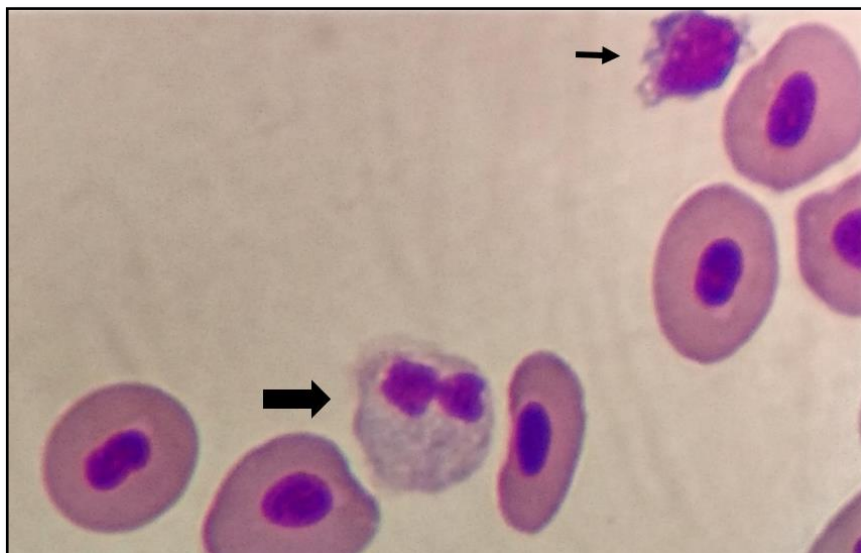




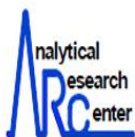

Anexo 7: Eosinófilo (flecha gruesa) y Trombocito (flecha delgada) de alevín de *Arapaima gigas*, en una extensión sanguínea con tinción May-Grunwald -Giemsa – Wright.



Anexo 8: Neutrófilo (flecha gruesa) y Linfocito (flecha delgada) de alevín de *Arapaima gigas*, en una extensión sanguínea con tinción May-Grunwald -Giemsa – Wright.



Anexo 9: Informe de la determinación de las concentración exactas de ácido ascórbico en las dietas experimentales

		<b>DSM Nutritional Products Ltd</b> Research & Development Analytical Research Center (ARC) P.O. Box 2676, CH-4002 Basel			
FINAL		LIMS Result Report		LAB_ORD044129	
LIMS-ID	LAB_ORD044129_0001	Claim	Component	Result	Authorisation Date
Sample Name	C 0	n/a	Ascorbic acid activity from monophosphate ester (Stay-C) m*	41.3 mg/kg	10.Jun.2015
Sample Material	FEED				
LIMS-ID	LAB_ORD044129_0004	Claim	Component	Result	Authorisation Date
Sample Name	C 1600-A	560 mg/kg	Ascorbic acid activity from monophosphate ester (Stay-C) m*	1290 mg/kg	10.Jun.2015
Sample Material	FEED				
LIMS-ID	LAB_ORD044129_0005	Claim	Component	Result	Authorisation Date
Sample Name	C 1200-B	420 mg/kg	Ascorbic acid activity from monophosphate ester (Stay-C) m*	541 mg/kg	10.Jun.2015
Sample Material	FEED				
LIMS-ID	LAB_ORD044129_0006	Claim	Component	Result	Authorisation Date
Sample Name	C 1600-B	560 mg/kg	Ascorbic acid activity from monophosphate ester (Stay-C) m*	823 mg/kg	10.Jun.2015
Sample Material	FEED				

Anexo 10: Manual del kit comercial de la marca Valtek diagnostics para la determinación de glucosa en plasma sanguíneo.

## GLUCOSA – LS (GOD –PAP)

Reactivo líquido para la determinación fotométrica de Glucosa en suero o plasma y otros fluidos biológicos.



---

Para uso en el diagnóstico *in Vitro*. Apto para usar en autoanalizador.

**SIGNIFICANCIA CLINICA**

La medición de la Glucosa sanguínea es importante en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes y otras patologías, tales como hipoglicemia y problemas renales, entre otras.

**FUNDAMENTOS DEL METODO**

La glucosa reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas Glucosa Oxidasa (GOD) y Peroxidasa (POD). En la primera etapa la Glucosa es oxidada a Ac. Glucónico por la acción de la enzima GOD, liberándose como producto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual en una reacción mediada por la enzima POD, reacciona con el Ac. p-Hidroxibenzoico y 4-Aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 505 nm., en cantidad proporcional a la cantidad de Glucosa presente en la muestra.

$$\begin{array}{l}
 \text{D-Glucosa} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Acido D-Glucónico} + \text{H}_2\text{O}_2 \\
 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{p-HBA} + 4\text{-AAP} \xrightarrow{\text{POD}} \text{H}_2\text{O} + \text{Complejo Coloreado}
 \end{array}$$

**REACTIVOS**

Conservados entre 2° y 8°C. y protegidos de la luz, estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Composición del Reactivo Enzimático:

Buffer fosfato pH 7.0	75 mM
Glucosa Oxidasa (Aspergillus Niger)	≥15000 U/l
Peroxidasa	≥ 2000 U/l
4-Aminoantipirina	0.5 mM
Acido p-Hidroxibenzoico	10 mM
Azida sódica	0.1 g/dl
Estabilizantes y preservantes no reactivos	c.s.

Preparación del Reactivo de Trabajo: El reactivo se provee listo para su uso. El reactivo con el tiempo puede tomar un leve color rosado que no afecta los resultados. Descartar el reactivo si su absorbancia contra blanco de agua es superior a 0.4 D.O. a 505 nm.

**MUESTRA**

La muestra a utilizar puede ser tanto suero como plasma, líquido cerebro espinal, orina y otros fluidos biológicos. La muestra debe tomarse con el paciente en ayunas.

**TECNICA**

Llevar el reactivo a la temperatura que se realizará el ensayo. Las pipetas a utilizar deben estar limpias y libres de residuos para no contaminar el reactivo.

	Blanco	Calibrador	Muestra
Muestra (ml)	--	--	0.01
Calibrador (ml)	--	0.01	--
Reactivo (ml)	1.00	1.00	1.00

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o temperatura ambiente (20° a 25°C). Leer las absorbancias ajustando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por a lo menos treinta minutos.

Adaptaciones para la aplicación de este reactivo en autoanalizadores están disponibles a solicitud. Es responsabilidad del laboratorio validar esta aplicación.

**CALIBRACION**


- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTROL-C (código 210-130), proceder de igual forma que con las muestras.
- Se recomienda recalibrar en cualquier momento que se evidencie alguno de estos acontecimientos:
  - El lote de reactivo cambia
  - Se realiza un mantenimiento preventivo del equipo
  - Los valores de control han cambiado o se encuentran fuera de escala.

**CALCULOS**

Factor = $\frac{\text{Concentración Calibrador}}{\text{Abs. Calibrador}}$
Glucosa (mg/dL) = Factor x Abs. Muestra

**CONTROL DE CALIDAD**

Anexo 11: Manual del kit comercial de la marca Monobind Inc. para la determinación de cortisol en plasma sanguíneo.



**Sistema de Prueba Cortisol**  
**Código del Producto 3625-300**

**1.0 INTRODUCCIÓN**

Propósito: Determinar cuantitativamente la concentración Total de Cortisol en suero o plasma humano mediante inmunoanálisis enzimático en microplaca.

**2.0 RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA**

El Cortisol (hidrocortisona, compuesto F) es el glucocorticoide más potente producido por la corteza adrenal humana. Como con otros esteroides adrenales, el cortisol se sintetiza del colesterol, a través de una serie de pasos enzimáticamente mediados por la corteza adrenal (1, 2). El limitante y primer paso en la esteroidogenesis adrenal, conversión de colesterol en pregnenolona, es estimulada por la hormona adrenocorticotropica pituitaria (ACTH) la cual es regulada por el factor de liberación de corticotropina hipotalamica (CRF). Las secreciones de ACTH yCRF son inhibidas por los niveles altos de cortisol. En el plasma, la porción principal de cortisol se une con alta afinidad a la globulina de enlace de corticosteroide. (CBG, transcortina). Siendo el cortisol fisiológicamente efectivo en la actividad anti-inflamatoria y control de presión sanguínea, también

**3.0 PRINCIPIO**

**Análisis secuencial Inmunoenzimométrico (TIPO 7)**  
Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoanálisis incluyen anticuerpo, conjugado enzima - antígeno y antígeno nativo. Después de la mezcla del anticuerpo marcado con biotina, el conjugado enzima - antígeno y un suero que contiene antígeno nativo, una reacción competitiva se presenta entre el antígeno nativo y el conjugado enzima - antígeno por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo. La interacción se ilustra con la siguiente ecuación:

$$\text{Enz Ag} + \text{Ag} + \text{Ab}_{\text{En}} \xrightleftharpoons[k_{-3}]{k_3} \text{AgAb}_{\text{En}} + \text{EnzAgAb}_{\text{En}}$$

$\text{Ab}_{\text{C.W.}}$  = Anticuerpo Monoclonal inmovilizado (Cantidad constante)  
 $\text{Ag}$  = Antígeno nativo (Cantidad variable)  
 $\text{EnzAg}$  = Conjugado de enzima antigena (Cantidad constante)  
 $\text{AgAb}_{\text{En}}$  = Complejo anticuerpo-conjugado  
 $\text{EnzAgAb}_{\text{En}}$  = Complejo de anticuerpo-conjugado de enzima antigena.  
 $k_3$  = Tasa Constante de Asociación  
 $k_{-3}$  = Tasa Constante de Disociación  
 $K = k_3 / k_{-3}$  = Constante de equilibrio


Ocurre una reacción simultánea entre la biotina enlazada al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en la microplaca. Esto logra la separación de la fracción unida al anticuerpo luego de la decantación o aspiración.

La actividad de la enzima en la fracción unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del antígeno nativo. Mediante el uso de diferentes sueros de referencias de concentración conocida, se puede generar una curva dosis respuesta, de la cual se puede deducir la concentración de antígeno de una muestra desconocida.

**4.0 REACTIVOS**

**Materiales Proporcionados:**

A. Calibrador de Cortisol - 1ml/vial – Iconos A-F  
Seis (6) viales de suero referencia Cortisol a niveles de 0(A), 1.0 (B), 4.0(C), 10.0 (D), 20.0 (E) y 50.0 (F) µg/dl. Almacenar a 2-8°C. Un preservante ha sido adicionado.

B. Reactivo de Enzima Cortisol- 1.0 ml/vial – icono   
Un (1) vial que contiene conjugado de Cortisol (Análogo).

Anexo 12: Datos de muestreo para la evaluación de los parámetros de calidad de agua.

**DATOS DE TEMPERATURA EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SRA (°C)**

FECHA	PROMEDIO POR HORA			PROMEDIO POR DÍA
	09:00 a.m.	01:00 p.m.	05:00 p.m.	
23-mar	30.457	31.343	30.767	30.856
24-mar	30.171	30.529	31.333	30.678
25-mar	30.257	30.214	31.057	30.510
26-mar	30.086	30.514	30.575	30.392
27-mar	29.400	30.114	30.914	30.143
28-mar	-	30.160	30.500	30.330
29-mar	29.250	-	29.867	29.558
30-mar	-	-	-	-
31-mar	-	29.400	-	29.400
01-abr	28.800	29.483	-	29.142
02-abr	28.600	28.900	29.600	29.033
03-abr	28.400	28.650	29.367	28.806
04-abr	28.300	28.600	29.400	28.767
05-abr	28.700	29.000	29.600	29.100
06-abr	28.786	29.143	29.714	29.214
07-abr	29.057	29.086	-	29.071
08-abr	-	28.786	29.086	28.936
09-abr	28.200	28.300	28.914	28.471
10-abr	-	-	-	-
11-abr	-	29.000	29.200	29.100
12-abr	28.400	28.700	29.600	28.900
13-abr	28.829	-	-	28.829
14-abr	28.529	-	28.957	28.743
15-abr	28.443	29.214	29.786	29.148
16-abr	28.700	-	29.786	29.243
17-abr	28.340	-	29.000	28.670
18-abr	28.000	28.400	28.600	28.333
19-abr	27.700	28.100	29.000	28.267
20-abr	27.667	28.200	28.600	28.156
21-abr	27.600	28.067	28.700	28.122
22-abr	27.800	-	28.233	28.017
23-abr	27.300	27.767	28.500	27.856
24-abr	27.400	27.700	28.133	27.744
25-abr	27.467	-	-	27.467
26-abr	-	-	-	-
27-abr	26.900	-	28.343	27.621
28-abr	-	28.033	28.100	28.067
29-abr	27.633	28.333	-	27.983
30-abr	28.033	-	-	28.033

Continuación de la Tabla

<b>FECHA</b>	<b>09:00 a.m.</b>	<b>01:00 p.m.</b>	<b>05:00 p.m.</b>	<b>PROMEDIO POR DÍA</b>
01-may	-	29.667	30.133	29.900
02-may	29.200	29.133	29.833	29.389
03-may	28.633	29.000	29.500	29.044
04-may	28.733	28.600	-	28.667
05-may	28.033	29.033	-	28.533
06-may	28.467	-	-	28.467
07-may	28.425	-	-	28.425
08-may	28.125	28.375	-	28.250
09-may	29.029	-	-	29.029
10-may	27.933	28.000	-	27.967
11-may	-	-	28.525	28.525
12-may	-	-	28.100	28.100
13-may	27.650	-	-	27.650
14-may	-	-	-	-
15-may	-	28.025	-	28.025
16-may	27.650	28.075	28.450	28.058
17-may	-	28.425	-	28.425

**DATOS DE TEMPERATURA EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SBF(°C)**

<b>FECHA</b>	<b>PROMEDIO POR TRATAMIENTO</b>			
	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
18-may	29.267	29.500	28.900	29.233
19-may	28.283	28.633	27.900	28.350
20-may	28.283	28.383	27.833	28.217
21-may	28.467	28.233	27.983	28.050
22-may	24.500	28.133	27.483	28.033
23-may	27.400	27.533	27.167	27.733
24-may	27.400	27.367	27.250	27.417
25-may	-	-	-	-
26-may	27.433	27.700	27.700	27.033
27-may	27.567	28.167	27.600	28.100
28-may	27.333	27.833	27.333	27.667
29-may	27.150	27.850	27.233	27.600
30-may	27.367	27.633	27.200	27.433
31-may	27.883	27.717	27.533	27.517

**DATOS DE OXIGENO DISUELTO (mg/L) EN LA ETAPA EXPERIMENTAL SRA**

FECHA	PROMEDIO POR HORA			PROMEDIO POR DÍA
	09:00 a.m.	01:00 p.m.	05:00 p.m.	
23-mar	6.834	6.736	6.702	6.757
24-mar	6.800	6.801	6.633	6.745
25-mar	6.720	6.741	6.693	6.718
26-mar	7.099	6.811	6.960	6.957
27-mar	7.700	7.532	7.344	7.525
28-mar	-	7.108	6.780	6.944
29-mar	6.768	6.300	7.032	6.700
01-abr	-	6.616	6.673	6.644
02-abr	6.859	6.917	6.757	6.844
03-abr	6.894	-	6.737	6.815
04-abr	6.967	7.006	6.816	6.930
05-abr	6.923	6.776	6.634	6.778
06-abr	6.924	6.849	6.600	6.791
07-abr	6.773	6.823	-	6.798
08-abr	-	6.847	6.861	6.854
09-abr	6.919	6.964	-	6.941
11-abr	-	6.797	6.873	6.835
12-abr	7.171	7.021	6.904	7.032
14-abr	7.133	-	6.707	6.920
15-abr	6.941	6.739	6.603	6.761
16-abr	6.943	-	6.607	6.775
17-abr	6.864	6.795	-	6.830
18-abr	7.044	6.776	-	6.910
19-abr	6.850	6.763	6.603	6.739
20-abr	6.853	6.713	6.683	6.750
21-abr	6.847	6.813	6.710	6.790
22-abr	6.680	-	6.687	6.683
23-abr	6.957	6.777	6.687	6.807
24-abr	6.873	6.673	6.683	6.743
25-abr	6.727	-	-	6.727
27-abr	6.667	-	6.480	6.573
28-abr	-	6.677	7.367	7.022
01-may	-	6.680	6.450	6.565
02-may	6.743	-	-	6.743
04-may	6.697	6.550	-	6.623
05-may	6.887	6.597	-	6.742
06-may	6.793	-	-	6.793

Continuación de la Tabla

<b>FECHA</b>	<b>09:00 a.m.</b>	<b>01:00 p.m.</b>	<b>05:00 p.m.</b>	<b>PROMEDIO POR DÍA</b>
07-may	6.710	-	-	6.710
08-may	6.870	5.360	-	6.115
09-may	6.581	-	-	6.581
10-may	6.830	6.763	-	6.797
11-may	-	-	6.735	6.735
12-may	-	-	6.680	6.680
13-may	6.915	-	-	6.915
15-may	-	6.738	-	6.738
16-may	6.140	6.335	6.145	6.207
17-may	-	6.230	-	6.230

**DATOS DE OXIGENO DISUELTO (mg/L) EN LA ETAPA EXPERIMENTAL SBF**

<b>FECHA</b>	<b>PROMEDIO POR TRATAMIENTO</b>			
	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
18-may	6.670	6.520	6.663	6.650
19-may	6.965	6.600	6.718	6.610
20-may	6.792	6.672	6.742	6.720
21-may	6.720	6.832	6.705	6.890
22-may	6.640	6.475	6.397	6.493
23-may	6.493	6.520	6.390	6.443
24-may	6.447	6.345	6.475	6.565
26-may	5.850	5.257	5.400	5.757
27-may	5.667	5.663	5.547	5.993
28-may	5.520	5.533	5.097	5.610
29-may	5.337	4.943	4.523	5.340
30-may	5.097	4.418	4.280	5.068
31-may	5.540	4.635	4.860	5.158



**DATOS DE pH EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SRA**

FECHA	PROMEDIO POR HORA			PROMEDIO POR DÍA
	09:00 a.m.	01:00 p.m.	05:00 p.m.	
23-mar	7.817	7.875	-	7.846
24-mar	-	7.930	-	7.930
25-mar	-	7.924	-	7.924
01-abr	7.888	7.852	-	7.870
02-abr	-	-	7.950	7.950
03-abr	-	7.988	-	7.988
04-abr	7.928	-	-	7.928
05-abr	7.990	-	-	7.990
06-abr	7.834	7.800	7.880	7.838
07-abr	7.765	7.913	-	7.839
08-abr	-	-	7.980	7.980
09-abr	-	7.879	7.767	7.823
11-abr	-	7.784	7.851	7.818
12-abr	7.781	7.703	7.667	7.717
14-abr	7.806	-	7.580	7.693
15-abr	7.664	7.560	7.622	7.615
16-abr	7.550	-	7.580	7.565
17-abr	7.569	-	7.790	7.679
18-abr	7.741	7.744	-	7.743
19-abr	7.684	7.652	7.455	7.597
20-abr	7.629	7.522	-	7.575
21-abr	7.537	7.483	7.310	7.443
22-abr	7.413	-	7.501	7.457
23-abr	7.378	7.344	7.406	7.376
24-abr	7.321	7.187	7.207	7.238
25-abr	7.438	-	-	7.438
27-abr	7.273	-	7.457	7.365
28-abr	-	7.630	7.351	7.491
29-abr	7.495	7.351	-	7.423
30-abr	7.493	-	-	7.493
02-may	-	7.301	7.327	7.314
03-may	7.306	-	-	7.306
04-may	7.377	-	-	7.377
05-may	7.548	7.508	-	7.528
06-may	7.654	-	-	7.654
07-may	7.584	-	-	7.584
08-may	7.639	-	-	7.639

Continuación de la Tabla

<b>FECHA</b>	<b>09:00 a.m.</b>	<b>01:00 p.m.</b>	<b>05:00 p.m.</b>	<b>PROMEDIO POR DÍA</b>
09-may	7.502	-	-	7.502
10-may	7.482	-	-	7.482
11-may	-	-	7.621	7.621
12-may	-	-	7.532	7.532
13-may	7.585	-	-	7.585
15-may	-	7.385	-	7.385
16-may	7.348	7.384	7.484	7.473
17-may	-	7.394	-	7.394

**DATOS DE pH EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SBF**

<b>FECHA</b>	<b>PROMEDIO POR TRATAMIENTO</b>			
	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
18-may	-	-	7.989	-
19-may	7.949	7.947	7.905	7.979
20-may	7.960	7.936	7.978	7.928
21-may	7.808	7.821	7.795	7.726
22-may	7.640	7.720	7.606	7.660
23-may	7.708	7.675	7.688	7.651
24-may	7.399	7.837	7.402	7.362
26-may	7.720	7.435	7.620	7.559
29-may	7.669	7.615	7.566	7.599
30-may	7.723	7.575	7.628	7.618
31-may	7.736	7.628	7.705	7.685

**DATOS PROMEDIO DE NITROGENO INORGANICO EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SRA**

<b>FECHA</b>	<b>NAT (mg/L)</b>		<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/L)</b>		<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L)</b>	
	<b>Salida</b>	<b>Entrada</b>	<b>Salida</b>	<b>Entrada</b>	<b>Salida</b>	<b>Entrada</b>
28-mar	0.79	1.18	0.018	0.016	10.7	9.9
31-mar	0.67	0.88	0.037	0.035	18.2	7.9
10-abr	0.58	0.74	0.09	0.34	18.3	7.5
20-abr	0.86	1.02	0.07	0.503	19.3	9.8
30-abr	1.35	1.91	0.058	0.103	22.5	14.6
05-jun	1.03	1.45	0.022	0.126	26.2	16.5
17-jun	0.85	0.89	-	-	-	-

**DATOS PROMEDIO DE NITROGENO AMONICAL TOTAL (TAN) EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SBF**

<b>DIA</b>	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
0	2.500	2.500	2.500	2.500
2	1.370	0.400	1.200	1.150
2	0.900	0.900	1.500	1.300
2	0.970	0.412	2.320	2.200
4	0.820	0.550	1.060	0.860
4	1.000	0.700	1.476	0.950
4	1.100	0.810	2.100	1.320
6	2.110	2.040	2.040	2.010
6	1.770	1.460	1.850	1.650
6	2.070	1.820	3.030	2.830
8	0.900	1.420	1.850	1.750
8	1.500	1.300	1.960	2.100
8	1.200	1.760	2.910	3.540
10	3.910	1.500	1.080	2.578
10	2.856	1.650	2.590	2.200
10	4.023	2.030	2.910	3.530
12	3.870	4.250	4.410	5.670
12	3.400	3.380	1.580	8.130
12	5.100	5.290	3.790	3.840
14	7.680	5.730	9.110	5.940
14	3.020	4.760	10.070	6.610
14	5.120	6.390	6.400	8.012

**DATOS PROMEDIO DE NITROGENO EN NITRITOS N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (mg/L) EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SBF**

<b>DIA</b>	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
0	0.074	0.074	0.074	0.074
2	0.104	0.089	0.247	0.483
2	0.122	0.119	0.149	0.286
2	0.070	0.128	0.171	0.299
4	0.366	0.283	0.375	0.146
4	0.271	0.250	0.265	0.274
4	0.308	0.335	0.317	0.426
6	0.482	0.621	0.848	0.612
6	0.539	0.503	0.621	0.445
6	0.496	0.564	0.780	0.560
8	1.215	1.011	1.001	1.061
8	0.874	1.066	1.039	1.097
8	1.151	0.758	0.908	1.008
10	1.374	2.100	1.774	0.785
10	1.097	1.651	1.017	1.416
10	1.224	1.919	1.483	0.649
12	1.318	0.549	1.378	0.968
12	1.389	0.970	2.188	2.476
12	1.535	0.716	1.794	1.864
14	2.326	1.026	1.753	1.313
14	2.065	0.967	2.573	2.411
14	1.773	1.228	1.849	1.614

**DATOS PROMEDIO DE NITROGENO EN NITRATOS N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/L) EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SBF**

<b>DIA</b>	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
0	7.745	7.745	7.745	7.745
2	7.903	5.893	7.542	6.977
2	8.219	6.632	6.526	7.339
2	8.445	6.824	8.129	7.564
4	7.993	6.322	10.082	7.000
4	9.077	6.639	11.342	8.016
4	8.738	7.609	8.919	8.151
6	7.790	12.238	11.403	8.468
6	11.425	11.719	8.129	12.794
6	9.100	10.364	8.964	8.671
8	9.890	13.729	7.497	12.871
8	10.229	13.142	8.806	13.616
8	7.587	9.845	10.387	11.042
10	8.716	12.961	12.600	9.258
10	11.297	11.335	10.432	8.693
10	10.545	9.687	8.038	12.532
12	9.145	8.919	7.880	9.055
12	11.945	12.554	9.506	11.177
12	9.145	10.951	9.867	8.400
14	13.616	10.184	12.396	8.897
14	9.822	8.151	12.803	12.645
14	11.177	12.690	8.693	9.438

**DATOS PROMEDIO DE ALCALINIDAD EN LA ETAPA EXPERIMENTAL EN SBF (mgCaCO<sub>3</sub>/L)**

<b>FECHA</b>	<b>PROMEDIO POR TRATAMIENTO</b>			
	<b>C 41.3</b>	<b>C 541</b>	<b>C 823</b>	<b>C 1290</b>
18-may	102.930	102.930	102.930	102.930
20-may	75.850	75.845	75.850	70.430
21-may	102.930	102.930	102.930	102.930
22-may	75.850	75.845	75.850	70.430
24-may	97.521	108.357	108.357	-
26-may	-	86.680	81.265	-
27-may	102.930	102.930	102.930	102.930
28-may	75.850	75.845	75.850	70.430
29-may	75.850	75.845	75.850	70.430
30-may	102.930	102.930	102.930	102.930
31-may	108.350	119.188	119.185	119.185

**DATOS PROMEDIO DE VOLUMEN DEL FLOC EN LA ETAPA  
EXPERIMENTAL EN SBF (mL/L)**

FECHA	PROMEDIO POR TRATAMIENTO			
	C 41.3	C 541	C 823	C 1290
18-may	11.000	10.000	6.000	-
20-may	18.667	20.000	22.000	19.333
21-may	29.667	38.333	41.333	38.333
22-may	22.667	26.667	23.667	28.000
24-may	33.000	28.667	37.000	43.667
26-may	47.333	64.333	51.333	55.667
27-may	44.000	38.000	33.333	39.667
28-may	40.000	34.333	35.000	42.333
30-may	13.667	15.000	12.667	15.000
31-may	18.667	17.333	15.667	21.333

Anexo 13: Datos de muestreo para la evaluación de los parámetros productivos.

**Datos de parámetros productivos en la etapa en SRA**

<b>Tratamientos</b>	<b>Peso Inicial g</b>	<b>Peso final g</b>	<b>GP (g)</b>	<b>FCA</b>	<b>TCE (% peso/día)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
<b>C 823</b>	25.4	192.7	167.3	0.85611775	3.75256556	100
<b>C 823</b>	26.7	227.4	200.7	0.71364474	3.96675373	
<b>C 823</b>	28.5	218.8	190.3	0.75264582	3.77454441	
<b>C 823</b>	31.5	228	196.5	0.72889822	3.66547793	
<b>C 41.3</b>	25.2	160	134.8	0.90319362	3.422833	100
<b>C 41.3</b>	25.5	170.4	144.9	0.8402381	3.51753734	
<b>C 41.3</b>	27.2	174.5	147.3	0.82654786	3.44205142	
<b>C 41.3</b>	30.2	181.4	151.2	0.80522817	3.32011595	
<b>C 823</b>	24.8	217.1	192.3	0.75868045	4.0176193	100
<b>C 823</b>	26.6	229.8	203.2	0.71798351	3.99314472	
<b>C 823</b>	27.1	216.4	189.3	0.77070391	3.84739781	
<b>C 823</b>	30.8	226.4	195.6	0.74588062	3.69405307	
<b>C 41.3</b>	23.6	195.7	172.1	0.77294596	3.91728919	100
<b>C 41.3</b>	24.3	200	175.7	0.75710871	3.90340929	
<b>C 41.3</b>	26.2	206	179.8	0.73984427	3.81873474	
<b>C 41.3</b>	27.0	212.6	185.6	0.71672414	3.8214363	
<b>C 1290</b>	25.4	195.8	170.4	0.85009096	3.78211955	100
<b>C 1290</b>	27.9	205.6	177.7	0.81516882	3.69871453	
<b>C 1290</b>	28.4	219.3	190.9	0.75880304	3.78528057	
<b>C 1290</b>	30.1	238.6	208.5	0.6947506	3.833821	
<b>C 541</b>	21.6	138	116.4	1.03173325	3.43437106	100
<b>C 541</b>	25.0	146	121.0	0.99251033	3.26801999	
<b>C 541</b>	28.5	160.4	131.9	0.9104909	3.19956779	
<b>C 541</b>	29.0	167.6	138.6	0.86647727	3.24867474	
<b>C 823</b>	23.8	182.3	158.5	0.79772713	3.7703113	100
<b>C 823</b>	26.5	192.3	165.8	0.76260404	3.67020726	
<b>C 823</b>	26.6	208.9	182.3	0.69358064	3.8165638	
<b>C 823</b>	28.9	219.7	190.8	0.66268213	3.7563359	
<b>C 41.3</b>	23.7	124.3	100.6	1.09818091	3.06893139	100
<b>C 41.3</b>	25.3	140.7	115.4	0.95733969	3.17745476	
<b>C 41.3</b>	25.6	143	117.4	0.94103066	3.18565237	
<b>C 41.3</b>	25.7	150.2	124.5	0.88736546	3.26940138	
<b>C 1290</b>	26.0	139	113.0	1.12389602	3.10440258	100
<b>C 1290</b>	26.3	146.9	120.6	1.05307007	3.18552434	
<b>C 1290</b>	28.5	160.2	131.7	0.96431473	3.19725731	
<b>C 1290</b>	29.4	177.6	148.2	0.85695175	3.33062807	

**Continuación de la Tabla**

<b>Tratamientos</b>	<b>Peso Inicial g</b>	<b>Peso Final g</b>	<b>GP (g)</b>	<b>FCA</b>	<b>TCE (%peso/día)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
<b>C 541</b>	23.6	174.9	151.3	0.87282221	3.70919939	100
<b>C 541</b>	27.0	179.8	152.8	0.86425393	3.5111264	
<b>C 541</b>	29.2	181.1	151.9	0.86937459	3.37940862	
<b>C 541</b>	29.6	197.4	167.8	0.78699642	3.51381068	
<b>C 541</b>	20.8	186	165.2	0.83026029	4.05702535	100
<b>C 541</b>	23.4	209.6	186.2	0.73662191	4.06012024	
<b>C 541</b>	26.3	224.4	198.1	0.69237254	3.9701134	
<b>C 541</b>	27.4	253	225.6	0.60797429	4.11638236	
<b>C 1290</b>	24.3	205.2	180.9	0.78407131	3.95094215	100
<b>C 1290</b>	26.5	211.4	184.9	0.76710925	3.84556915	
<b>C 1290</b>	26.8	222.7	195.9	0.72403522	3.92115498	
<b>C 1290</b>	30.9	228.7	197.8	0.71708038	3.70676837	

Suma de Pesos finales (biomasa total) en SRA (g)	Volumen en el SRA (m <sup>3</sup> )	Densidad (Kg m <sup>-3</sup> ) SRA
9187.8	1.8	5.104



**Datos de parámetros productivos en la etapa en SBF**

<b>Tratamientos</b>	<b>Peso final</b>	<b>GP (g)</b>	<b>FCA</b>	<b>TCE (% peso/d)</b>	<b>Densidad (Kg m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
<b>C 823</b>	218.7	26.0	1.39317308	0.90404537	15.64	100
<b>C 823</b>	226.8	-0.6				
<b>C 823</b>	234.5	5.7	6.35482456	0.17576663		
<b>C 823</b>	258.1	10.1	3.58638614	0.28513115		
<b>C 41.3</b>	166	6.0	5.24666667	0.26295695	12.00	0
<b>C 41.3</b>	180.35	9.9	3.1638191	0.40536281		
<b>C 41.3</b>	186.25	11.8	2.67914894	0.46546511		
<b>C 41.3</b>	187.2	5.8	5.42758621	0.22480733		
<b>C 823</b>	230.6	3.5		0.10924399	16.49	100
<b>C 823</b>	247.3	17.5	2.083	0.52423435		
<b>C 823</b>	254.1	17.7	2.05946328	0.51573289		
<b>C 823</b>	257.1	20.7	1.76099034	0.59957021		
<b>C 41.3</b>	212.5	16.8	1.84122024	0.58827939	14.96	100
<b>C 41.3</b>	223.6	23.6	1.31069915	0.79672411		
<b>C 41.3</b>	224.4	18.4	1.68111413	0.61110003		
<b>C 41.3</b>	237	24.4	1.26772541	0.77605482		
<b>C 1290</b>	232.3	36.5	1.00890411	1.22097078	16.55	100
<b>C 1290</b>	243.5	37.9	0.97163588	1.20846006		
<b>C 1290</b>	248.2	28.9	1.27422145	0.88424441		
<b>C 1290</b>	268.8	30.2	1.21937086	0.85127928		
<b>C 541</b>	163.1	25.1	1.17380478	1.1936416	11.77	100
<b>C 541</b>	176.5	30.5	0.96598361	1.35510182		
<b>C 541</b>	178.1	17.7	1.66454802	0.74767496		
<b>C 541</b>	188.2	20.6	1.43021845	0.82803599		
<b>C 823</b>	224.4	42.1	0.85380048	1.4841178	16.49	100
<b>C 823</b>	247.4	55.1	0.65235935	1.79964148		
<b>C 823</b>	247.7	28.8	1.24809028	0.88288094		
<b>C 823</b>	270	40.3	0.89193548	1.1546275		
<b>C 41.3</b>	119.5	-4.8	6.67	-0.2812973	9.03	100
<b>C 41.3</b>	135.5	-5.2				
<b>C 41.3</b>	136.3	-6.7				
<b>C 41.3</b>	150.7	0.5		0.02373833		
<b>C 1290</b>	168.2	29.2	1.05719178	1.36199867	12.18	100
<b>C 1290</b>	177.8	30.9	0.99902913	1.36362314		
<b>C 1290</b>	182.6	22.4	1.378125	0.93482095		
<b>C 1290</b>	201.9	24.3	1.27037037	0.91599068		

**Continuación de la Tabla**

<b>Tratamientos</b>	<b>Peso final</b>	<b>GP (g)</b>	<b>FCA</b>	<b>TCE (% peso/d)</b>	<b>Densidad (Kg m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>
<b>C 541</b>	174	-0.9			12.11	100
<b>C 541</b>	175	-4.8				
<b>C 541</b>	181.7	0.6	2.5	0.02362579		
<b>C 541</b>	196	-1.4	2.6	-0.0508391		
<b>C 541</b>	194.4	8.4	3.93363095	0.3155087	14.77	100
<b>C 541</b>	221.5	11.9	2.77668067	0.39444026		
<b>C 541</b>	227.6	3.2		0.10113949		
<b>C 541</b>	242.4	-10.6	-3.1172169	-0.3057159		
<b>C 1290</b>	207.5	2.3	15.1967391	0.0796159	14.29	100
<b>C 1290</b>	214.4	3.0	11.6508333	0.10065254		
<b>C 1290</b>	216.1	-6.6	-5.2958333			
<b>C 1290</b>	219.5	-9.2	-3.7991848			

Anexo 14: Datos de muestreo para la evaluación de los parámetros fisiológicos (metabólicos o bioquímicos y hematológicos).

<b>Periodo (días)</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Eritrocitos (10<sup>6</sup>/μL)</b>	<b>Hemoglobina g/dL</b>	<b>Hematocrito %</b>	<b>VCM (fL)</b>	<b>CHCM (g/dL)</b>	<b>Glucosa mg/dL</b>	<b>Cortisol (ng/mL)</b>
<b>4 antes del SBF</b>	C 823	3.045	11.3	35	114.94	32.29	24	12.5504719
	C 41.3	1.545	7.5	28	181.23	26.79	59	11.0797445
	C 823	3.04	11.4	37	121.71	30.81	58	10.7383354
	C 41.3	2.21	7.6	30	135.75	25.33	26	10.0990025
	C 1290	2.5	9.1	35	140.00	26.00	70	12.0601893
	C 541	2.45	9.1	32	130.61	28.44	52	14.0245114
	C 823	3.84	10.1	34	88.54	29.71	58	11.2326764
	C 41.3	1.96	7.8	27	137.76	28.89	-	34.2644674
	C 1290	3.38	10.9	35	103.55	31.14	98	10.7293378
	C 541	2.17	10.3	34	156.68	30.29	28.6	11.8262108
	C 541	2.35	9.1	32	136.17	28.44	-	-
	C 1290	3.005	11.4	35	116.47	32.57	100	-

Continuación de la Tabla

Periodo (días)	Tratamiento	Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /μL)	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Glucosa mg/dL	Cortisol (ng/mL)
7 en SBF	C 823	3.72	10.8	38	102.15	28.42	18	13.6233106
	C 823	3.88	9.3	34	87.63	27.35	21	10.9254235
	C 41.3	-	7.5	28	-	26.79	22	12.1525379
	C 41.3	2.58	8.7	29	112.40	30.00	12	14.0794017
	C 823	3.485	10.4	35	100.43	29.71	43	12.0063792
	C 823	-	8.9	32	-	27.81	-	0
	C 41.3	2.78	8	27	97.12	29.63	20	10.906947
	C 41.3	1.88	7.3	23	122.34	31.74	18.6	14.0245114
	C 1290	3.21	9.6	32	99.69	30.00	59	10.7248434
	C 1290	2.63	9.6	34	129.28	28.24	24.8	19.6337764
	C 541	1.995	9	34	170.43	26.47	36	10.1194796
	C 541	2.445	8.1	35	143.15	23.14	-	0
	C 823	3.59	9.8	36	100.28	27.22	58	14.7949398
	C 823	2.92	9.1	33	113.01	27.58	-	0
	C 41.3	2.075	7.8	25	120.48	31.20	80	12.2073794
	C 41.3	1.525	8.2	27	177.05	30.37	-	15.4569857
	C 1290	3.3	9.9	33	100.00	30.00	30	12.9209421
	C 1290	-	8.9	32	-	27.81	-	9.81118849
	C 541	2.653	10	30	113.08	33.33	18	17.0210155
	C 541	3.47	-	-	-	-	104	20.4596829
	C 541	2.395	8.6	35	146.14	24.57	42.8	11.7170374
	C 541	2.395	8.2	37	154.49	22.16	24	0
C 1290	3.3	8.2	35	106.06	23.43	20	15.6825929	
C 1290	-	8.2	34	-	24.12	42.4	15.6989049	

Continuación de la Tabla

Periodo (días)	Tratamiento	Eritrocitos (10 <sup>6</sup> /μL)	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	VCM (fL)	CHCM (g/dL)	Glucosa mg/dL	Cortisol (ng/mL)
<b>14 en SBF</b>	C 823	3.78	9.2	28	74.07	32.86	27	8.58803216
	C 823	2.645	8.3	25	94.52	33.20	30	14.3589712
	C 41.3	-	-	-	-	-	-	-
	C 41.3	-	-	-	-	-	-	-
	C 823	2.805	7.4	22	78.43	33.64	40	8.70308427
	C 823	3.025	8.3	25	82.64	33.20	-	19.4383039
	C 41.3	2.015	7.1	21	104.22	33.81	12.4	19.0896156
	C 41.3	2.18	7.8	23	105.50	33.91	25	23.7551825
	C 1290	3.365	7.2	22	65.38	32.73	12	0
	C 1290	2.31	6.8	20	86.58	34.00	57	24.3281578
	C 541	3.925	7.9	24	61.15	32.92	10	26.1109254
	C 541	2.01	7.6	23	114.43	33.04	30.6	18.2543818
	C 823	4.44	9.9	30	67.57	33.00	62.8	10.4822274
	C 823	3.023	6.9	21	69.47	32.86	-	0
	C 41.3	1.945	7	21	107.97	33.33	18.6	21.266807
	C 41.3	1.93	7.8	23	119.17	33.91	35.6	33.8796189
	C 1290	2.34	6.8	20	85.47	34.00	32	25.2119913
	C 1290	3.635	6.8	20	55.02	34.00	34	11.9007888
	C 541	2.32	8.4	25	107.76	33.60	20	8.96968044
	C 541	2.62	8.5	26	99.24	32.69	99.8	14.9297837
	C 541	2.85	8.8	27	94.74	32.59	40	8.4364881
C 541	2.01	8.8	26	129.35	33.85	66	9.61663442	
C 1290	2.645	8.7	26	98.30	33.46	39.6	25.2761304	
C 1290	2.645	7.7	26	98.30	29.62	46.8	25.9074595	

**Datos del perfil hematológico de células blancas y trombocitos, según periodo de muestreo**

<b>Periodo (días)</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Trombocitos (μL)</b>	<b>Leucocitos (μL)</b>	<b>Linfocitos (μL)</b>	<b>Neutrófilos (μL)</b>	<b>Monocitos (μL)</b>	<b>Eosinófilos (μL)</b>
<b>4 antes del SBF</b>	C 823	22838	18270	13520	2741	1827	183
	C 41.3	13133	11588	9270	1506	811	0
	C 823	24320	18240	13315	2918	1824	182
	C 41.3	13260	11050	8619	1658	774	0
	C 1290	20000	18750	14063	2625	1688	332
	C 541	20825	15925	11944	2707	1274	0
	C 823	19200	21120	15840	3168	1690	422
	C 41.3	14700	11760	9761	1411	470	118
	C 1290	27040	21970	16478	3735	1318	360
	C 541	16275	15190	11481	2430	1063	152
	C 541	21150	15275	12526	2139	611	0
	C 1290	21035	18030	14063	2705	1082	180

Continuación de la Tabla

Periodo (días)	Tratamiento	Trombocitos (μL)	Leucocitos (μL)	Linfocitos (μL)	Neutrófilos (μL)	Monocitos (μL)	Eosinófilos (μL)
7 en SBF	C 823	27900	18600	13578	2976	2046	0
	C 823	29100	19400	13968	4074	1358	0
	C 41.3	-	-	-	-	-	-
	C 41.3	15480	12900	9675	2451	774	0
	C 823	24395	19168	14184	2875	1917	192
	C 823	-	-	-	-	-	-
	C 41.3	15290	12510	9257	2252	751	250
	C 41.3	12220	10340	7652	2378	310	0
	C 1290	27285	19260	14060	3082	1733	385
	C 1290	24985	18410	13808	3130	1473	0
	C 541	15960	14963	11372	2693	599	299
	C 541	18338	17115	12836	2910	1198	171
	C 823	32310	21540	15293	4308	1723	215
	C 823	32120	17520	12614	2628	2102	175
	C 41.3	10375	12450	9338	2366	747	0
	C 41.3	9913	10675	8006	2242	427	0
	C 1290	28050	19800	14256	3762	1584	198
	C 1290	-	-	-	-	-	-
	C 541	15918	15918	11779	2547	1433	159
	C 541	20820	15615	11399	2342	1562	312
	C 541	17963	14370	10346	2730	1293	0
C 541	19160	14370	10921	2156	1293	0	
C 1290	29700	23100	17094	4158	1848	0	
C 1290	-	-	-	-	-	-	

Continuación de la Tabla

Periodo (días)	Tratamiento	Trombocitos (µL)	Leucocitos (µL)	Linfocitos (µL)	Neutrófilos (µL)	Monocitos (µL)	Eosinófilos (µL)
14 en SBF	C 823	28350	18900	13608	3024	2079	189
	C 823	22483	13225	9390	2248	1190	397
	C 41.3	-	-	-	-	-	-
	C 41.3	-	-	-	-	-	-
	C 823	23843	14025	10098	3086	842	0
	C 823	24200	15125	11041	3176	756	151
	C 41.3	15113	10075	7758	2015	302	0
	C 41.3	16350	10900	7957	2289	654	0
	C 1290	25238	16825	12282	3029	1346	168
	C 1290	18480	13860	9979	2218	1386	277
	C 541	27475	15700	11461	2826	1413	0
	C 541	17085	9045	6693	1447	814	90
	C 823	31080	17760	12787	3019	1954	0
	C 823	24184	19650	14541	4126	786	196
	C 41.3	13615	12643	9355	2655	632	0
	C 41.3	14475	12545	8907	2885	502	251
	C 1290	17550	11700	8424	2574	702	0
	C 1290	25445	16358	11777	2617	1472	491
	C 541	17400	15080	11159	3016	905	0
	C 541	18340	15720	10846.8	3458	1258	157
	C 541	19950	18525	14079	3705	556	185
C 541	16080	11055	8512.35	2100	442	0	
C 1290	23805	18515	13886.25	3703	926	0	
C 1290	22483	14548	10328.725	2910	1164	145	



Anexo 15: Análisis estadístico de los datos de parámetros productivos en la etapa en SRA.

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tratamientos	fijo	4	C 1290, C 41.3, C 541, C 823

**a) Análisis de varianza para Peso Inicial, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	28.818	28.818	9.606	1.77	0.166
Error	44	238.275	238.275	5.415		
Total	47	267.092				

**b) Análisis de varianza para Peso final (SRA), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	11244.0	11244.0	3748.0	4.67	0.006
Error	44	35311.9	35311.9	802.5		
Total	47	46555.9				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
C 823	12	213.3	A
C 1290	12	195.9	A B
C 541	12	184.8	A B
C 41.3	12	171.6	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**c) Análisis de varianza para Ganancia en Peso (SRA), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	10333.2	10333.2	3444.4	4.49	0.008
Error	44	33780.7	33780.7	767.7		
Total	47	44113.9				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
C 823	12	186.1	A
C 1290	12	168.4	A B
C 541	12	158.9	A B
C 41.3	12	145.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**d) Análisis de varianza para FCA (SRA), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	0.08823	0.08823	0.02941	2.47	0.075
Error	44	0.52475	0.52475	0.01193		
Total	47	0.61298				

**e) Análisis de varianza para SGR (SRA), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	0.63418	0.63418	0.21139	2.59	0.064
Error	44	3.58560	3.58560	0.08149		
Total	47	4.21979				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
C 823	12	3.8	A
C 541	12	3.6	A B
C 1290	12	3.6	A B
C 41.3	12	3.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 16: Análisis estadístico de los datos de parámetros productivos en la etapa en SBF.

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tratamientos	fijo	4	C 1290, C 41.3, C 541, C 823

**a) Análisis de varianza para Peso final (SBF), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	27419.5	27419.5	9139.8	11.08	0.000
Error	44	36303.0	36303.0	825.1		
Total	47	63722.4				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
C 823	12	243.1	A
C 1290	12	215.1	A B
C 541	12	193.2	B C
C 41.3	12	179.9	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**b) Análisis de varianza para Ganancia en Peso (SBF), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	1881.5	1881.5	627.2	2.90	0.05
Error	44	9508.1	9508.1	216.1		
Total	47	11389.5				

**c) Análisis de varianza para FCA (SBF), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	13.75	13.75	4.58	0.37	0.778
Error	36	450.56	450.56	12.52		
Total	39	464.32				

**d) Análisis de varianza para SGR (SBF), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	1.7703	1.7703	0.5901	2.52	0.073
Error	37	8.6556	8.6556	0.2339		
Total	40	10.4259				

**e) Análisis de varianza para Densidad  $\text{kg/m}^3$  (SBF), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	30.466	30.466	10.155	2.46	0.137
Error	8	32.984	32.984	4.123		
Total	11	63.450				

**f) Análisis de varianza para Supervivencia (SBF), utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamientos	3	2500.0	2500.0	833.3	1.00	0.441
Error	8	6666.7	6666.7	833.3		
Total	11	9166.7				

Anexo 17: Análisis estadístico de los datos de parámetros hematológicos y metabólicos (glucosa y cortisol) en el periodo de 4 días antes del traslado al SBF

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tratamientos	fijo	4	C 1290, C 41.3, C 541, C 823

**a) Análisis de varianza para ERITROCITOS ( $10^6/\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	3.5691	3.5691	1.1897	8.81	0.006
Error	8	1.0799	1.0799	0.1350		
Total	11	4.6490				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 823	3	3.3	A
C 1290	3	3.0	A B
C 541	3	2.3	B C
C 41.3	3	1.9	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

**b) Análisis de varianza para HEMOGLOBINA g/dL 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	19.2067	19.2067	6.4022	10.28	0.004
Error	8	4.9800	4.9800	0.6225		
Total	11	24.1867				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 823	3	10.9	A
C 1290	3	10.5	A
C 541	3	9.5	A B
C 41.3	3	7.6	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**c) Análisis de varianza para HEMATOCRITO % 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	93.667		93.667	31.222	20.81	0.000
Error	8	12.000		12.000	1.500		
Total	11	105.667					

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 823	3	35.3	A
C 1290	3	35.0	A
C 541	3	32.7	A
C 41.3	3	28.3	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**d) Análisis de varianza para VCM (fL) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	3468.5		3468.5	1156.2	3.09	0.090
Error	8	2995.4		2995.4	374.4		
Total	11	6463.9					

**e) Análisis de varianza para CHCM (g/dL) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	25.052		25.052	8.351	1.86	0.215
Error	8	35.931		35.931	4.491		
Total	11	60.983					

**f) Análisis de varianza para GLUCOSA mg/dL 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	4433.7	4433.7	1477.9	4.12	0.03
Error	6	2151.6	2151.6	358.6		
Total	9	6585.3				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 1290	3	89.3	B
C 823	3	35.9	A
C 41.3	2	42.5	A
C 541	2	40.3	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**g) Análisis de varianza para CORTISOL (ng/mL) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	362.06	362.06	120.69	5.36	0.039
Error	6	135.14	135.14	22.52		
Total	9	497.20				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 41.3	3	25.0	A
C 541	2	12.9	B
C 823	3	11.5	B
C 1290	2	11.4	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**h) Análisis de varianza para Trombocitos ( $\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	152163944	152163944	50721315	6.86	0.013
Error	8	59152375	59152375	7394047		
Total	11	211316319				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	3	22691.7	A
C 823	3	22119.2	A
C 541	3	19416.7	A B
C 41.3	3	13697.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**i) Análisis de varianza para leucocitos ( $\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	129747914	129747914	43249305	23.26	0.000
Error	8	14873637	14873637	1859205		
Total	11	144621552				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	3	19583.3	A
C 823	3	19210.0	A
C 541	3	15463.3	B
C 41.3	3	11465.8	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



**j) Análisis de varianza para Linfocitos ( $\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	58825191	58825191	19608397	17.38	0.001
Error	8	9024351	9024351	1128044		
Total	11	67849541				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	3	14867.8	A
C 823	3	14225.0	A B
C 541	3	11983.3	B C
C 41.3	3	9216.6	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**k) Análisis de varianza para Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	4265578	4265578	1421859	10.82	0.003
Error	8	1051505	1051505	131438		
Total	11	5317083				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	3	3021.5	A
C 823	3	2942.3	A
C 541	3	2425.4	A B
C 41.3	3	1525.0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**l) Análisis de varianza para Monocitos ( $\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	2026253	2026253	675418	10.85	0.003
Error	8	498003	498003	62250		
Total	11	2524256				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 823	3	1780.2	A
C 1290	3	1362.5	A B
C 541	3	982.8	B C
C 41.3	3	685.0	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**m) Análisis de varianza para Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ ) 4d antes al traslado al SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	162520	162520	54173	5.31	0.026
Error	8	81683	81683	10210		
Total	11	244203				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	3	290.8	A
C 823	3	262.5	A
C 541	3	50.6	A
C 41.3	3	39.2	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 18: Análisis estadístico de los datos de parámetros hematológicos y metabólicos (glucosa y cortisol) en el periodo de 7 días en el SBF.

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tratamientos	fijo	4	C 1290, C 41.3, C 541, C 823

**a) Análisis de varianza para Eritrocitos ( $10^6/\mu\text{L}$ ), 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	5.3127	5.3127	1.7709	9.08	0.001
Error	16	3.1213	3.1213	0.1951		
Total	19	8.4340				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 823	5	3.5	A
C 1290	4	3.1	A B
C 541	6	2.6	B C
C 41.3	5	2.2	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**b) Análisis de varianza para HEMOGLOBINA g/Dl, 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	10.0263	10.0263	3.3421	6.83	0.003
Error	19	9.2980	9.2980	0.4894		
Total	22	19.3243				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 823	6	9.7	A
C 1290	6	9.1	A
C 541	5	8.8	A B
C 41.3	6	7.9	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**c) Análisis de varianza para HEMATOCRITO %, 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	258.859	258.859	86.286	20.25	0.000
Error	19	80.967	80.967	4.261		
Total	22	339.826				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 823	6	34.7	A
C 541	5	34.2	A
C 1290	6	33.3	A
C 41.3	6	26.5	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**d) Análisis de varianza para VCM (fL), 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	5768.8	5768.8	1922.9	4.55	0.019
Error	15	6339.8	6339.8	422.7		
Total	18	12108.6				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 541	5	145.5	A
C 41.3	5	125.9	A B
C 1290	4	108.8	A B
C 823	5	100.7	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**e) Análisis de varianza para CHCM (g/dL), 7 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	47.082	47.082	15.694	2.14	0.128
Error	19	139.149	139.149	7.324		
Total	22	186.231				

**f) Análisis de varianza para GLUCOSA mg/dL, 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	373.1	373.1	124.4	0.20	0.896
Error	15	9427.2	9427.2	628.5		
Total	18	9800.3				

**g) Análisis de varianza para CORTISOL (ng/mL), 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	123.37	123.37	41.12	1.23	0.326
Error	20	670.84	670.84	33.54		
Total	23	794.21				

**h) Análisis de varianza para Trombocitos ( $\mu$ L), 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	901155503	901155503	300385168	47.95	0.000
Error	16	100232506	100232506	6264532		
Total	19	1001388009				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 823	5	29165.0	A
C 1290	4	27505.0	A
C 541	6	18026.3	B
C 41.3	5	12655.5	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**i) Análisis de varianza para Leucocitos ( $\mu\text{L}$ ), 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	209562083	209562083	69854028	34.46	0.000
Error	16	32432452	32432452	2027028		
Total	19	241994535				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	4	20142.5	A
C 823	5	19245.5	A
C 541	6	15391.8	B
C 41.3	5	11775.0	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**j) Análisis de varianza para Linfocitos ( $\mu\text{L}$ ), 7d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	103460855	103460855	34486952	31.32	0.000
Error	16	17618398	17618398	1101150		
Total	19	121079253				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	4	14804.3	A
C 823	5	13927.5	A
C 541	6	11442.3	B
C 41.3	5	8785.5	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**k) Análisis de varianza para Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ) 7d en SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	4979465	4979465	1659822	7.49	0.002
Error	16	3547548	3547548	221722		
Total	19	8527014				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 1290	4	3532.8	A
C 823	5	3372.2	A B
C 541	6	2563.0	B C
C 41.3	5	2337.7	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**l) Análisis de varianza para Monocitos ( $\mu\text{L}$ ) 7d en SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	4383762	4383762	1461254	19.62	0.000
Error	16	1191357	1191357	74460		
Total	19	5575119				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 823 5 1829.3 A

C 1290 4 1659.6 A B

C 541 6 1229.5 B

C 41.3 5 601.8 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**m) Análisis de varianza para Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ ) 7d en SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	35312	35312	11771	0.64	0.598
Error	16	292511	292511	18282		
Total	19	327824				



Anexo 19: Análisis estadístico de los datos de parámetros hematológicos y metabólicos (glucosa y cortisol) en el periodo de 14 días en el SBF

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Tratamientos	fijo	4	C 1290, C 41.3, C 541, C 823

**a) Análisis de varianza para Eritrocitos ( $10^6/\mu\text{L}$ ), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	4.0019	4.0019	1.3340	3.70	0.031
Error	18	6.4976	6.4976	0.3610		
Total	21	10.4995				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 823	6	3.3	A
C 1290	6	2.8	A B
C 541	6	2.6	A B
C 41.3	4	2.0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**b) Análisis de varianza para HEMOGLOBINA g/dL, 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	5.0820	5.0820	1.6940	2.83	0.068
Error	18	10.7675	10.7675	0.5982		
Total	21	15.8495				

**c) Análisis de varianza para HEMATOCRITO %, 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	48.273	48.273	16.091	2.48	0.094
Error	18	117.000	117.000	6.500		
Total	21	165.273				

**d) Análisis de varianza para VCM (fL), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	3528.8	3528.8	1176.3	4.36	0.018
Error	18	4858.2	4858.2	269.9		
Total	21	8387.0				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 41.3	4	109.2	A
C 541	6	101.1	A B
C 1290	6	81.5	A B
C 823	6	77.8	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**e) Análisis de varianza para CHCM (g/dL), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	1.5760	1.5760	0.5253	0.57	0.644
Error	18	16.6644	16.6644	0.9258		
Total	21	18.2404				

**f) Análisis de varianza para GLUCOSA mg/dL, 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	1158.6	1158.6	386.2	0.80	0.514
Error	16	7769.3	7769.3	485.6		
Total	19	8927.9				

**g) Análisis de varianza para CORTISOL (ng/mL), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	546.18	546.18	182.06	2.86	0.066
Error	18	1145.22	1145.22	63.62		
Total	21	1691.39				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento N Media Agrupación

C 41.3	4	24.5	A
C 1290	6	18.8	A
C 541	6	14.4	A
C 823	6	10.3	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**h) Análisis de varianza para Trombocitos (μL), 14d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	284833995	284833995	94944665	8.06	0.001
Error	17	200325682	200325682	11783864		
Total	20	485159677				

Método de Tukey y una confianza de 95.0%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
C 823	6	25689.8	A
C 1290	6	22166.7	A B
C 541	6	19388.3	B C
C 41.3	3	14400.8	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**i) Análisis de varianza para Leucocitos ( $\mu\text{L}$ ) 14 d en SBF, utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	61869600	61869600	20623200	2.84	0.067
Error	18	130658136	130658136	7258785		
Total	21	192527736				

**j) Análisis de varianza para Linfocitos ( $\mu\text{L}$ ), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	29617154	29617154	9872385	2.40	0.102
Error	18	74055495	74055495	4114194		
Total	21	103672649				

**k) Análisis de varianza para Neutrófilos ( $\mu\text{L}$ ), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	1056264	1056264	352088	0.89	0.467
Error	18	7144432	7144432	396913		
Total	21	8200696				

**l) Análisis de varianza para Monocitos ( $\mu\text{L}$ ), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	1569542	1569542	523181	3.08	0.054
Error	18	3062279	3062279	170127		
Total	21	4631821				

**m) Análisis de varianza para Eosinófilos ( $\mu\text{L}$ ), 14 d en SBF utilizando SC ajustada para pruebas**

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Tratamiento	3	56097	56097	18699	0.92	0.450
Error	18	364700	364700	20261		
Total	21	420797				