

Efecto de la lixiviación de heces sobre los coeficientes de digestibilidad aparente en camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of feces leaching on apparent digestibility coefficients of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

David Alonso Villarreal-Cavazos¹, Lucia Elizabeth Cruz-Suárez¹, Mireya Tapia-Salazar¹, Martha Nieto-López¹, Julián Gamboa-Delgado¹, Andreas Lemme² y Denis Ricque-Marie¹

¹ Programa Maricultura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455. México

² Evonik Degussa GmbH, Rodenbacher Chaussee 4, D_63457 Hanau (Wolfgang). Germany

e-mail: david.villarrealcv@uanl.edu.mx

Recibido: 25 de octubre de 2015.

Aceptado: 9 de julio de 2017.

Villarreal-Cavazos D. A., L. E. Cruz-Suárez, M. Tapia-Salazar, M. Nieto-López, J. Gamboa-Delgado, A. Lemme y D. Ricque-Marie. 2017. Efecto de la lixiviación de heces sobre los coeficientes de digestibilidad aparente en camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). *Hidrobiológica* 27 (3): 353-357.

RESUMEN

Antecedentes. Debido a que no existen estudios sobre el lixiviación de nutrientes de las heces de camarón *Litopenaeus vannamei*, se diseñó el presente estudio. **Objetivos.** Estimar la pérdida de nutrientes de las heces del camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*). **Métodos.** Se utilizaron 15 juveniles de 4.9 ± 1.0 g de peso por cada uno de cuatro acuarios replicados por tratamiento. En un ensayo de alimentación con una dieta de referencia comercial, la cual fue reprocesada para añadir 1% de óxido de cromo como marcador inerte y 1% de alginato de sodio (aglutinante). El tratamiento 1 (T1) consistió en que las heces permanecieron en agua marina durante 3 horas después de su colecta, mientras en el tratamiento 2 (T2), las heces fueron colectadas y congeladas inmediatamente después de su emisión. Además existió alternancia de los tratamientos en las réplicas. **Resultados.** El contenido de materia seca (MS), proteína cruda (PC) y aminoácidos totales en heces fue muy similar para los dos tratamientos. El mismo efecto se presentó para los coeficientes de digestibilidad aparente de MS, PC y aminoácidos. **Conclusiones.** Con base en lo anterior podemos inferir que la lixiviación de nutrientes (MS, PC y AA) de las heces de camarones no se ve afectada por efecto del tiempo de colecta en un lapso igual o menor a 3 horas después de su emisión y por lo tanto, no es necesario ajustar los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca, proteína cruda y aminoácidos.

Palabras clave: Digestibilidad, heces, *Litopenaeus vannamei*, lixiviación.

ABSTRACT

Background. There are no studies on nutrient leaching from feces in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Goals.** Estimate the nutrient loss in feces from the Pacific white shrimp. **Methods.** A bioassay was conducted in order to evaluate the effect of collection time on nutrient loss in feces. Dry matter (DM), crude protein (CP), amino acids (AA), and concentration of chromic oxide (Cr_2O_3) were measured in feces. Fifteen juveniles of Pacific white shrimp having an average weight of 4.9 ± 0.1 g were distributed in 4 replicate aquariums per treatment. Shrimp were fed with a reference diet (commercial diet) that was previously reprocessed to add 1% chromic oxide as an inert marker and 1% sodium alginate (binder). Treatment 1 (T1) consisted of leaving the feces in seawater for 3 hours after collection. In addition, there was alternation between the treatments in the replicates. In the second treatment, feces were immediately collected and frozen after they were emitted (T2). **Results.** The content of DM, CP, and total amino acids in feces for both treatments was similar. The same result was observed for the apparent digestibility coefficients of DM, CP, and total amino acids. **Conclusions.** Based on these results, we can infer that under the conditions of this experiment, nutrient leaching from juvenile *Litopenaeus vannamei* feces is not affected by collection time in a period equal or less than 3 hours after emission and, therefore, there is no effect on the estimation of the apparent digestibility coefficients of DM, CP, and amino acids.

Key words: Digestibility, feces, leaching, *Litopenaeus vannamei*.

INTRODUCCIÓN

El camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Bonne, 1931) es la especie que más se cultiva a nivel mundial, por lo que ha superado a la producción pesquera. La industria del cultivo de camarón busca producir biomasa con máximos rendimientos al costo mínimo; en este aspecto, el uso de alimentos balanceados altamente digestibles puede mejorar la producción de camarón e incrementar las utilidades, además de reducir considerablemente la contaminación ambiental. En este sentido, el precio del alimento es uno de los factores que más repercuten sobre los costos variables de producción en las granjas acuáticas, donde este insumo llega a representar entre 40 y 60% (Reyes, 1998). Por lo tanto, la calidad y el costo del alimento son factores críticos para la rentabilidad de una granja camaronera. La determinación de la digestibilidad aparente de los nutrientes y alimentos en organismos acuáticos puede ser afectada por una estimación errónea de la cantidad de los nutrientes defecados, en particular, cuando estos nutrientes se lixivian durante el tiempo que las heces permanecen en el agua antes de ser recolectadas. Este efecto puede generar una subestimación de la cantidad de nutrientes en las heces y por lo tanto, una sobreestimación del valor de la digestibilidad aparente (Ricque et al., 2006).

Considerando lo anterior, existen muchos estudios sobre la digestibilidad aparente de nutrientes en camarones. En algunos de ellos se considera la lixiviación de nutrientes en los pellets para ajustar los coeficientes de digestibilidad aparente (Ricque et al., 2006; Cruz-Suárez et al., 2009; Nieto-López et al., 2011, Villarreal-Cavazos et al., 2014). Sin embargo, en términos de lixiviación de nutrientes en las heces y con ajustes en los cálculos de digestibilidad aparente, sólo existen dos estudios: Fenucci et al. (1982) realizaron el primero, con camarón azul del Pacífico (*Penaeus stylirostris* Stimpson, 1874); mientras que el segundo lo llevaron a cabo Smith y Tabrett (2004) con camarón tigre negro (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798). En cuanto al camarón blanco del Pacífico, no existe información disponible en este tema, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar dos tiempos de colecta de heces y determinar sus efectos sobre la pérdida de materia seca (PMS), proteína cruda (PPC) y aminoácidos (PAA) de las heces de juveniles de *Litopenaeus vannamei*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de dieta experimental. La dieta de referencia consistió en un alimento balanceado tipo comercial (Tabla 1), formulado y fabricado por la compañía Alimentos Costamar. El alimento fue molido y tamizado a 250 µm, para después ser mezclado con un marcador inerte (1% de óxido de cromo, Impex Continental lote 52-0305) y 1% de aglutinante (alginato de sodio, Aldrich-180947). La dieta se reconstituyó de acuerdo con la metodología descrita por Villarreal-Cavazos et al. (2011). Los ingredientes se incorporaron en una mezcladora KitchenAid durante 10 min, y luego de agregar agua tibia (30%), durante 15 min se procesó la mezcla en un molino de carne (Torrey) con un dado con perforaciones de 1.6 mm de diámetro. El tiempo requerido para el procesado de la dieta fue de 40 min/kg⁻¹, alcanzando temperaturas de 75-80°C. Para secar los extrudidos se utilizó un horno ventilado a 100°C durante 8 min y permanecieron a temperatura ambiente durante una noche para finalmente almacenarlos a 4°C hasta su uso.

Animales y acuarios experimentales. En este estudio se utilizaron 15 juveniles de camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) con una talla promedio de 4.9 ± 1.0 g por cada acuario.

Los organismos provinieron de la compañía mexicana Maricultura del Pacífico (Mazatlán, Sinaloa). Se utilizaron 4 acuarios experimentales de 120 l en un sistema de recirculación de agua marina sintética con capacidad de 9 toneladas métricas. Éste contó con un sistema de recirculación "air lift" (por acuario), un filtro biológico de contacto rotativo, un filtro de carbón activado, filtros de cartucho de 50 micras, un filtro de perlas BBF2 (Aquaculture Systems Technology LLC, New Orleans LA, EUA), un filtro de luz ultravioleta y tres fraccionadores de espuma.

Diseño experimental. La prueba se basó en dos tratamientos representados por diferentes tiempos de permanencia de las heces en agua. Cada tratamiento experimental consistió de cuatro acuarios replicados (réplicas biológicas) distribuidos de la siguiente forma: se destinaron 2 para el tiempo 1 y los dos restantes para el tiempo 2. Al día siguiente los acuarios se alternaron de tratamiento; de tal manera que cada tiempo de colecta obtuvo 4 réplicas biológicas. En cada caso se utilizó un diseño completamente aleatorio y cada análisis químico se realizó por cuadruplicado (réplicas analíticas).

El tratamiento 1 (T1) consistió en realizar tres colectas de heces. La primera iniciaba una hora después de la alimentación, y las dos co-

Tabla 1. Composición proximal y contenidos de aminoácidos (% base seca) de la dieta experimental para camarón blanco del Pacífico.

Composición dieta	DR
Proteína cruda (Nx6.25)	34.8
Lípidos	9.6
Fibra	3.2
Cenizas	11.8
Extracto libre de nitrógeno	40.7
Arginina	2.01
Fenilalanina	1.5
Histidina	0.8
Isoleucina	1.3
Leucina	2.3
Lisina	1.9
Metionina	0.7
Treonina	1.3
Valina	1.6
Suma de AAE	13.4
Ácido Aspártico	2.9
Ácido Glutámico	6.1
Alanina	1.8
Cistina	0.4
Glicina	2.1
Prolina	2.2
Serina	1.4
Suma de AAT	30.4

DR: dieta de referencia; AAE: aminoácidos esenciales; AAT: aminoácidos totales.

lectas adicionales fueron realizadas con un intervalo de una hora entre ellas. La recolección de heces fue por sifoneo a una cubeta de 2 litros. Posteriormente, las heces se trasladaron por gravedad a canastillas de unicel (500 ml) donde fueron seleccionadas (pipetas plásticas de succión de 2 ml). Se eliminaron los restos de alimento, heces amarillas y cafés, colectando únicamente las heces verdes, que permanecían en su canastilla de unicel con un poco de agua marina en refrigeración a 4°C durante 3 horas.

El mismo procedimiento se repitió para la segunda colecta correspondiente a la misma alimentación (se utilizó una canastilla de unicel por cada colecta). Al terminar con la tercera colecta, las heces fueron lavadas (dos veces) con agua destilada para eliminar el exceso de sales, ya que éstas pueden interferir con los análisis posteriores, y finalmente se concentraron en un frasco de plástico con tapa y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

En el tratamiento 2 (T2) la recolección de las heces de la primera ración comenzó 15 minutos después de la primera alimentación y siguió con intervalos de 15 minutos. La segunda ración de heces se recolectaron con el mismo intervalo. La recolección de heces se realizó por succión directa del acuario utilizando una micropipeta de succión. Se seleccionaron sólo las heces de color verde, se lavaron inmediatamente en agua destilada para ser concentradas sin agua en un frasco de plástico con tapa, el cual permaneció en hielo durante las colectas y después fue congelado inmediatamente a una temperatura de -20°C.

La dieta experimental fue ofrecida *ad libitum*. Se inició con el 10% de la biomasa de cada acuario, cantidad que fue dividida en dos raciones por día (50% de la ración diaria cada una); la primera se ofreció a las 9:00 y la segunda a las 13:00 horas. Se realizaron 3 colectas por cada alimentación. La cantidad mínima de heces frescas recolectadas fue de 8 g por replicado y por tratamiento. Las heces recolectadas fueron almacenadas en congelación a -20°C para después ser liofilizadas, molidas y almacenadas en congelación hasta su uso.

Análisis químicos. La composición bromatológica de la dieta experimental y las heces fueron determinadas utilizando los siguientes métodos: determinación de humedad, método 930.15; determinación de proteína cruda, método 990.03; ceniza, método 942.05; fibra, método 962.09B (A.O.A.C. 1997); lípidos, Soxhlet (Tecator. 1983), y el extracto libre de nitrógeno fue calculado por diferencia. La pérdida de nutrientes en agua marina también se estimó acorde a la técnica reportada por Villarreal-Cavazos *et al.* (2014). El contenido de cromo fue determinado mediante el método descrito por Bolin *et al.* (1952), modificado por Cruz-Suárez *et al.* (2009). Las determinaciones de AA se realizaron a través de los procedimientos descritos por Llames y Fontaine (1994) y Fontaine (2003).

Coeficientes de digestibilidad aparente. Los coeficientes de digestibilidad aparente de materia seca, proteína y aminoácidos (CDA) de la dieta fueron calculados usando la ecuación reportada por Villarreal-Cavazos *et al.* (2014).

Análisis estadístico. Los valores se analizaron con una prueba *t* de Student para establecer posibles diferencias entre los tratamientos evaluados, con un nivel de significancia *p* < 0.05. Las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa computacional SAS (2008) versión 9.1.3.

RESULTADOS

La composición química de la dieta experimental se presenta en la tabla 1, donde se observa que el contenido de proteína cruda fue de 34.8%, el de lípidos, 9.6%, el de fibra cruda, 3.2% y el de cenizas, 11.8%; adicionalmente, se muestra el contenido de aminoácidos. Los resultados de proteína cruda en las heces oscilaron entre 28.9 (T1) y 29.0% (T2). Las concentraciones de óxido de cromo promedio fueron de 4.1% (T1) frente a 4.0% (T2). Adicionalmente, se determinó el contenido de aminoácidos de las heces recolectadas en diferentes tiempos, donde se encontró que las concentraciones de aminoácidos entre los tratamientos mostraron diferencias inferiores al 10%, con excepción de arginina, metionina, alanina y ácido glutámico (11%), que fueron más altas para el T1, en general; sólo la prolina registró una menor concentración para el T1 (20%) que el T2. La suma de aminoácidos fue de 16.1% (T1) contra 14.8% (T2) (Tabla 2). Los CDA de materia seca (Tabla 3) fueron estadísticamente iguales, con 75.2% (T1) vs 74.7% (T2) y el mismo resultado se presentó en PC 80.1% (T1) frente a 79.9% (T2), es decir, no se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos para estos parámetros. Los CDA de AA no presentaron diferencias significativas.

Tabla 2. Contenido de Materia seca, proteína cruda Cr₂O₃ y aminoácidos (%base seca) en heces de camarón blanco del Pacífico colectadas después de 3 horas de permanencia en agua (T1) versus colecta inmediata (T2).

Composición dieta	T1	T2	Diferencia (%)
Materia seca	92.2	91.9	0
Proteína cruda	28.9	29.0	0
Cr ₂ O ₃	4.1	4.0	0
Aminoácidos esenciales			
Arginina	1.0	0.9	11
Fenilalanina	0.9	0.8	10
Histidina	0.4	0.3	8
Isoleucina	0.7	0.6	10
Leucina	1.2	1.0	10
Lisina	0.8	0.7	7
Metionina	0.4	0.3	11
Treonina	0.8	0.7	10
Valina	0.9	0.8	9
Suma de AAE	7.0	6.3	10
Ácido Aspártico	1.8	1.6	10
Ácido Glutámico	2.4	2.1	11
Alanina	1.3	1.1	11
Cistina	0.2	0.2	0
Glicina	1.7	1.5	11
Prolina	0.9	1.1	20
Serina	0.9	0.8	9
Suma de AAT	16.1	14.8	8

AAE: aminoácidos esenciales; AAT: aminoácidos totales.

Tabla 3. Coeficientes de digestibilidad aparente de la dieta de camarón blanco del Pacífico calculados a partir de heces colectadas después de 3 horas de permanencia en agua (T1) versus colecta inmediata (T2).

Composición dieta	T1 (%)	T2 (%)	Diferencia (%)
Materia seca	75.2	74.7	0.5
Proteína cruda	80.1	79.9	0.2
Aminoácidos esenciales			
Arginina	87.0	88.1	-1.1
Fenilalanina	84.9	86.1	-1.2
Histidina	87.3	88.1	-0.8
Isoleucina	85.7	86.8	-1.1
Leucina	86.5	87.6	-1.1
Lisina	89.2	89.6	-0.4
Metionina	84.9	86.1	-1.2
Treonina	82.3	83.6	-1.3
Valina	84.2	85.2	-1.0
Suma de AAE	86.0	87.0	-1.0
Ácido Aspártico	83.3	84.5	-1.2
Ácido Glutámico	89.7	90.6	-0.9
Alanina	81.5	83.1	-0.6
Cistina	83.5	83.1	0.4
Glicina	78.0	79.9	-1.9
Prolina	89.0	86.5	2.5
Serina	83.8	85.0	-1.2
Suma de AAT	85.7	86.6	-0.9

AAE = aminoácidos esenciales; AAT = aminoácidos totales

DISCUSIÓN

Los contenidos de proteína cruda y óxido de cromo en heces para ambos tratamientos resultaron estadísticamente iguales. Esta información concuerda con el estudio realizado por Fenucci *et al.* (1982), quienes reportan pérdidas no significativas de proteína cruda (inferiores al 5%) y diferencias en la concentración de Cr_2O_3 (inferiores al 4%). La ausencia de diferencias significativas indica que no hubo una pérdida de nutrientes, ya que el Cr_2O_3 es insoluble e indigestible, lo anterior se observa en heces de juveniles de *Penaeus stylirostris* colectadas después de 15, 120 y 360 minutos de inmersión en agua marina.

Por otro lado, nuestros resultados de lixiviación de materia seca en heces coinciden con los resultados reportados por Smith y Tabrett (2004), quienes observaron que en el camarón tigre negro *Penaeus monodon*, las pérdidas de materia seca fueron del 3% en las heces después de 2, 3 o 6 h, sin ser significativas (pérdidas calculadas como la variación porcentual de la relación $\text{MS}/\text{Cr}_2\text{O}_3$ con respecto a su valor de 1 h). Esto es muy parecido a los hallazgos de este estudio con una variación mínima del 1%. No obstante, los autores reportan pérdidas progresivas de 9, 15 y 31% para proteína cruda en heces, lo que puede

estar asociado con la permeabilidad de la membrana peritrófica entre ambas especies de camarón (*L. vannamei* y *Penaeus monodon*). De acuerdo con Martin *et al.* (2006), la membrana peritrófica es un saco que envuelve las heces, que se encuentra constituido principalmente de quitina y es producido en el intestino medio. En el estudio de Wang *et al.* (2012) se ha documentado, en *L. vannamei*, el contenido de las proteínas de la membrana peritrófica relacionadas con la digestión, sistema inmune, antioxidantes y quitinasa; esta última, asociada con la porosidad o permeabilidad de la membrana peritrófica.

Por otra parte, los CDA de MS y PC no presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos de este experimento. Los CDA de aminoácidos registraron diferencias cercanas al 1% entre los tratamientos, lo que demuestra que los contenidos de proteína cruda, materia seca y aminoácidos en las heces de *Litopenaeus vannamei* no se modifican por el efecto de la lixiviación de nutrientes en las heces en un lapso menor o igual a 3 horas.

De este modo, el uso alterno de los replicados 1 y 2, contra 3 y 4 réplicas para los tratamientos 1 y 2, asegura una adecuada identificación de los animales experimentales y elimina las fuentes de variación de los resultados. Así demostraron Alexandre *et al.* (2014) que la membrana peritrófica sirve de soporte a estas enzimas. Por lo anterior, al impedir el consumo de heces con el tratamiento de colecta inmediata (camarones sometidos al T2), bien podría haberse presentado una disminución en la eficiencia digestiva. Alternar la aplicación del tratamiento de colecta inmediata a los dos grupos replicados, permite repartir de manera equitativa este eventual efecto secundario sobre la eficiencia digestiva, y en última instancia, sobre la concentración de nutrientes en las heces. Los resultados del presente estudio indican que el tiempo de colecta de las heces generadas por el camarón blanco del Pacífico no tiene un efecto sobre la pérdida de nutrientes durante un periodo igual o menos a tres horas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al apoyo brindado por la bióloga Anahí Zavala Hernández y el QBP Julio César Beltrán-Rocha; así como por las compañías mexicanas Alimentos CostaMar, en Hermosillo, Sonora, y Maricultura del Pacífico, en Mazatlán, Sinaloa. La compañía alemana Evonik-Degussa realizó las determinaciones de aminoácidos. Los autores extienden sus más sinceros agradecimientos por sus importantes contribuciones.

REFERENCIAS

- CUNNIFT, P. (Ed). 1997. *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemist, 16th Ed., U.S.A.
- ALEXANDRE, D., R. A. OZORIO, R. B. DERNER, D. M. FRACALOSSI, G. B. OLIVEIRA, R. I. SAMUELS, W. R. TERRA & C. P. SILVA. 2014. Spatial distribution of digestive proteinases in the midgut of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) indicates the existence of endo-ectoperitrophic circulation in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 90-95. DOI:10.1016/j.cbpb.2014.04.010
- BOLIN, D. W., R. P. KINGAND & E. D. KLOSTERMAN. 1952. A simplified method for the determination of chromic oxide Cr2O3 when used as an index substance. *Science* 116: 634-635.

- CRUZ-SUÁREZ, L. E., M. TAPIA-SALAZAR, D. VILLARREAL-CAVAZOS, J. BELTRÁN-ROCHA, M. G. NIETO-LÓPEZ, A. LEMME & D. RICQUE-MARIE. 2009. Apparent dry matter, energy, protein and amino acid digestibility of four soybean ingredients in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 292: 87-94. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.026
- FENUCCI, J. L. 1982. The assimilation of protein and carbohydrate from prepared diets. *Journal of the World Mariculture Society* 13: 134-145.
- FONTAINE, J. 2003. Amino acid analysis of feed. In: D' Mello (Ed.) Amino acids in animal nutrition. Second Edition. CABI publishing. Edinburgh. pp. 22-31.
- LLAMES, C. & J. FONTAINE. 1994. Determination of amino acids in feeds: collaborative study. *Journal of AOAC International* 77: 1362-1402.
- MARTIN, G. G., R. SIMCOX, A. NGUYEN & A. CHILINGARYAN. 2006. Peritrophic Membrane of the Penaeid Shrimp *Sicyoniaingentis*: Structure, Formation, and Permeability. *The Biological Bulletin*. 211: 275-285. DOI:10.2307/4134549
- NIETO-LÓPEZ, M., M. TAPIA-SALAZAR, D. RICQUE-MARIE, D. VILLARREAL-CAVAZOS, A. LEMME & L. E. CRUZ-SUÁREZ. 2011. Digestibility of different wheat products in white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 319:369-376. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.06.046
- REYES-QUINTANA, T. 1998. *Estructura de costos en la camaronicultura y apoyos financieros a través de empresas parafinancieras*. Memorias del II Simposium Internacional de Acuacultura 98. Mazatlán, Sinaloa, México. Documento de Ralston Purina International. pp. 45-64.
- RICQUE-MARIE, D., A. PEÑA-RODRÍGUEZ, M. TAPIA-SALAZAR, M. G. NIETO-LÓPEZ, D. VILLARREAL-CAVAZOS, C. GUAJARDO-BARBOSA, L. E. CRUZ-SUÁREZ & M. L. LOCATELLI. 2006. Effect of pre-prandial nutrient leaching in seawater and different binders on apparent amino acid digestibility coeffi- cients of a practical diet in *Litopenaeus vannamei*. *International Aqua Feed* 9: 32-33
- SAS SYSTEM 9.1.3. 2008. Service pack for Windows. Carry, North Carolina, USA.
- SMITH, D. M. & S. J. TABRETT. 2008. Método usado en el CSIRO para medir la digestibilidad in vivo en camarón. In: Cruz Suarez L., E. H. Villarreal Colmenares, M. Tapia Salazar, M. G. Nieto López, D. A. Villarreal Cavazos & D. Ricque Marie (Eds.). *Manual de Metodologías de Digestibilidad in vivo e in vitro para Ingredientes y Dietas para camarón*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey., N.L., México. pp. 108-121.
- TECATOR. 1997. *Fat Extraction on Feeds with the Soxtec System HT. The Influence of Sample Preparation and Extraction Media*. Application note AN 67/83 (1983.06.13). Soxtec System HT Manual, Tecator. AB Sweden. Höganäs, Sweden, p. 20.
- VILLARREAL-CAVAZOS, D. A. 2011. Determinación de la digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes utilizados en alimentos comerciales para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- VILLARREAL-CAVAZOS, D. A., D. RICQUE-MARIE, A. PEÑA-RODRÍGUEZ, M. NIETO-LÓPEZ, M. TAPIA-SALAZAR, A. LEMME, J. GAMBOA-DELGADO & L. E. CRUZ-SUÁREZ. 2014. Apparent digestibility of dry matter, crude protein, and amino acids of six rendered by-products in juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Ciencias Marinas International Journal of Marine Sciences* 40 (3): 163-172. DOI: 10.7773/cm.v40i3.2427
- WANG, L., F. LI, B. WANG & J. XIANG. 2012. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 33: 1285-1291. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.09.014